

**ANÁLISE COMPARATIVA E EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA DOF EM  
*CITRUS SINENSIS* (L.) OSBECK DURANTE O DESENVOLVIMENTO DOS  
FRUTOS**

**LUCIANA MACHADO GUABERTO**

**ANÁLISE COMPARATIVA E EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA DOF EM  
*CITRUS SINENSIS* (L.) OSBECK DURANTE O DESENVOLVIMENTO DOS  
FRUTOS**

**LUCIANA MACHADO GUABERTO**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora. Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador:  
Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

634  
G896a

Guaberto, Luciana Machado

Análise comparativa e expressão dos genes da família *Dof* em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck durante o desenvolvimento dos frutos. / Luciana Machado Guaberto. -- Presidente Prudente, 2016.

74f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) --  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,  
Presidente Prudente, SP, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Luiz Gonzaga Esteves Vieira

1. Desenvolvimento de frutos. 2. Fator de  
transcrição. 3. Regulação da transcrição. I. Título.

**LUCIANA MACHADO GUABERTO**

**ANÁLISE COMPARATIVA E EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA DOF EM  
*CITRUS SINENSIS* (L.) OSBECK DURANTE O DESENVOLVIMENTO DOS  
FRUTOS**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora. Área de concentração: Produção Vegetal.

Presidente Prudente, 19 de Dezembro de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dra. Alessandra Ferreira Ribas  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dra. Inês Cristina Giometti  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Prof. Dra. Sandra Maria Bellodi Cação  
Tropical Melhoramento & Genética - TMG  
Londrina - PR

---

Prof. Dra. Suzana Tiemi Ivamoto  
Instituto agrônômico do Paraná - IAPAR  
Londrina - PR

**Dedico e ofereço  
aos meus filhos amores da minha vida Matheus e Mylena,  
ao meu marido José Antonio meu amor companheiro e amigo.**

**“Se eu não te amasse tanto assim  
Talvez perdesse os sonhos  
Dentro de mim...  
Se eu não te amasse tanto assim  
Talvez não visse flores  
Por onde eu vim...”  
(Hebert Vianna)**

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira pela confiança depositada, pelo conhecimento compartilhado e pelo exemplo de seriedade acadêmica e profissional.

À minha família, a qual amo muito, mesmo não entendendo o grau da situação tamanha ansiedade e responsabilidades dedicaram muito carinho, paciência e incentivo.

À minha amiga de laboratório Andressa por estar do meu lado nos momentos mais críticos onde sempre tinha uma palavra de incentivo, sua participação foi muito especial para a realização deste trabalho.

À minha cunhada e amiga Márcia e as amigas Edna e Fabiana que fizeram parte desses momentos sempre me incentivando.

A todos os colegas dos laboratórios do bloco Q pelo carinho e apoio.

A todos os colegas professores de trabalho pelo incentivo.

A todos os demais professores da pós-graduação em agronomia, expresso minha gratidão por fazerem desta longa empreitada um período de constante aprendizado.

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar”. (Esopo)*

## RESUMO

### **Análise comparativa e expressão dos genes da família Dof em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck durante o desenvolvimento dos frutos**

A família de proteínas Dof (*DNA binding with One Finger*) compreende fatores de transcrição (FT) exclusivos de plantas, caracterizados pela presença do domínio Dof de ligação ao DNA. Estes fatores de transcrição estão envolvidos em diversos processos biológicos em plantas. Embora a análise e caracterização genômica de genes desta família tenha sido realizada em muitas espécies, informações sobre genes *Dof* em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce) e o seu envolvimento no desenvolvimento do fruto é limitado. Para a identificação completa dos genes *CsDof* em *C. sinensis*, incluindo as estruturas dos genes (Exons - Íntrons), localizações cromossômicas e filogenia, três bancos de dados foram analisados. Como resultado desta busca 24 genes desta família de FTs distribuídos em 7 dos 9 cromossomos desta espécie. A análise filogenética e classificação dos fatores de transcrição Dof em *C. sinensis* foi realizada com a inclusão dos seus ortólogos de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.), sendo possível estabelecer quatro grupos principais (A, B, C e D) e 9 subgrupos (A, B1, B2, C1, C2.1, C2.2, C3, D1 e D2) de proteínas Dof. Foram selecionados 12 genes putativamente mais expressos em frutos de acordo com dados públicos de RNA-seq para a análise da expressão gênica por RT-PCR. Estes genes foram diferencialmente expressos durante as fases iniciais do desenvolvimento do fruto, sendo possível estabelecer três grupos: genes com alta expressão (acima de 8 X), expressão intermediária (acima de 3 X) e baixa expressão relativa (abaixo de 3 X) em relação à atividade transcricional em folhas. O gene *CsDof1* se destacou como o gene com a maior expressão, sendo que esta manteve-se elevada em todos os estádios de desenvolvimento do fruto, evidenciando que esta isoforma desempenha um importante papel na regulação do desenvolvimento de frutos de *C. sinensis*. Considerados em conjunto, os nossos resultados fornecem novas informações sobre os genes *CsDof* na complexa rede regulatória envolvida no desenvolvimento dos frutos de laranja doce.

Palavras-chave: Desenvolvimento de frutos; Laranja-doce; Dof; Fator de transcrição.

## ABSTRACT

### **comparative analysis and expression of dof genes in *Citrus sinensis* (L.) osbeck during fruit development**

The DOF family proteins (DNA binding with One Finger) comprises unique plant transcription factors (FTs) characterized by the presence of a DNA binding domain Dof containing a similar structure to the "zinc-finger" domain. These transcription factors are involved in different roles in various biological processes in plants. Although the analysis and genomic characterization of this gene family was performed in many plant species, information on *Dof* genes in sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and their involvement in the development of the fruits is still limited. For the full identification of *CsDof* genes in *C. sinensis*, including the structures of genes, chromosomal locations, introns and phylogeny, the examination of three databases resulted in the identification of 24 genes of this FT family distributed on 7 out of 9 chromosomes of this species. Phylogenetic analysis and classification of Dof transcription factors in *C. sinensis* was compared with their orthologs of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.) and rice (*Oryza sativa* L.), which allowed their classification in four major groups (A, B, C and D) and 9 subgroups (a, B1, B2, C1, C2.1, C2.2, C3, D1, D2) of DOF proteins. For gene expression analysis, the 12 Dof genes with higher abundance of transcripts in fruits based on public RNA-seq data were selected for further analysis by semi-quantitative RT-PCR. This analysis revealed the *CsDof* genes were differentially expressed at different stages of development (up to 90 days after anthesis). It was also possible to establish three groups regarding their transcriptional activity relative to that in leaf tissue: genes with high (up to 8X), intermediate (up to 3X) and low relative expression (below 3 X). The gene *CsDof1* showed higher expression in all of the fruit development stages, indicating that this isoform plays an important role in regulating the development of the fruits of *C. sinensis*. Taken together, our results provide new information about the regulation of *Dof* genes in controlling the formation of fruits of this important fruit species.

Keywords: fruit development; Sweet orange; Dof; transcription factor; transcription regulation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Corte transversal do fruto de laranja-doce.....	18
FIGURA 2 - Domínio Dof.....	24
FIGURA 3 - Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos do domínio de ligação ao DNA dos CsDofs.....	35
FIGURA 4 - Localização cromossômica de 24 genes <i>CsDof</i> em 9 cromossomos de <i>C. sinensis</i> .....	36
FIGURA 5 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento completo de 24 proteínas Csdof.....	38
FIGURA 6 - Estrutura dos introns-exons dos genes <i>CsDof</i> .....	39
FIGURA 7 - Árvore filogenética de genes <i>Dof</i> de <i>C.sinensis</i> , <i>O. sativa</i> , <i>A. thaliana</i> .....	41
FIGURA 8 - Frutos de <i>C. sinensis</i> cv 'Pêra' nos 6 diferentes estádios de desenvolvimento.....	43
FIGURA 9 - Perfil de expressão de 12 genes <i>CsDofs</i> em seis estádios de desenvolvimento do fruto de <i>C. sinensis</i> cv 'Pêra' para o RT-PCR semi-quantitativo.,.....	46

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sequências dos primers específicos para os 12 genes <i>CsDof</i> e do gene normalizador <i>CsEF1-<math>\alpha</math></i> (Fator de alongação 1 alfa) usados para as análises de RT-PCR semi-quantitativo de tecidos de frutos de <i>C. sinensis</i> .....	32
TABELA 2 - Genes <i>CsDof</i> e informações relacionadas de cada gene.....	34
TABELA 3 - Nomeclatura e número de genes <i>CsDofs</i> ( <i>C. sinensis</i> ), <i>OsDofs</i> ( <i>Oryza sativa</i> ) e <i>AtDofs</i> ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) classificados em cada grupo e subgrupo.....	42
TABELA 4 - Medições dos diâmetros e pesos da massa fresca dos frutos de laranja-doce cv. Pera nos seus primeiros 6 estádios de desenvolvimento.....	43

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>OBJETIVO</b> .....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
3.1	Características dos citros.....	16
3.2	Desenvolvimentos do fruto de Citros.....	17
3.3	Genoma de <i>C. sinensis</i> .....	20
3.4	<b>Famílias dos fatores de transcrição Dof em plantas</b> .....	21
3.4.1	Domínio Dof e o seu alvo no DNA.....	22
3.4.2	Estudos funcionais da família de fatores de transcrição Dof.....	24
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1	Identificação dos membros da família Dof em Citrus.....	28
4.2	Análise filogenética.....	28
4.3	Localização cromossômica e estrutura dos genes CsDof.....	29
4.4	Estudo de expressão gênica de CsDof em frutos de laranja-doce.....	29
4.5	Material vegetal.....	29
4.6	Extração de RNA.....	30
4.7	RT-PCR semi-quantitativo.....	30
5	<b>RESULTADOS</b> .....	33
5.1	Identificação de genes CsDof e análise das sequências.....	33
5.2	Localizações cromossômicas e duplicação dos genes CsDof.....	36
5.3	Estrutura e análise filogenética dos genes CsDof.....	38
5.4	Relações evolutivas entre a família de Dof.....	40
5.5	Estudo da expressão gênica de genes CsDof em frutos.....	42
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	54
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
	<b>ANEXOS</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

As frutas cítricas (laranja-doce, tangerina, toranja, limão, lima e híbridos diversos) estão entre as mais cultivadas, e são consideradas importantes culturas do mundo. Consumida como frutas frescas e como suco processado, principalmente o suco de laranja doce, é uma fonte de alimento de alto valor nutricional. Além disso, o suco de frutas cítricas é uma fonte primordial de vitamina C, um importante componente da alimentação humana. A citricultura representa 25% de toda a produção mundial de frutas e o Brasil há décadas ocupa posição de destaque. A citricultura brasileira produz anualmente cerca de 47 milhões de toneladas, destacando-se como o maior produtor de laranja e é responsável por 85% das exportações de suco concentrado congelado e não concentrado dessa fruta no mundo.

O estado de São Paulo é o principal produtor nacional de laranja, possuindo o maior pomar do mundo, com 630.600 mil hectares e cerca de 197,8 milhões de pés. A produção alcançou 393,0 milhões de caixas de 40,8 quilos em 2015/16 julho/junho. Esses dados demonstram que o agronegócio citrícola tem contribuído nos sucessivos superávits comerciais no Brasil, gerando divisas e ao mesmo tempo empregos.

Como em outras espécies vegetais, o desenvolvimento das plantas cítricas envolve uma rede complexa de genes que sofrem alteração na sua expressão durante a indução e diferenciação de tecidos e órgãos e em diferentes fases do desenvolvimento. Basicamente a expressão gênica pode ser descrita como o conjunto de processos que ocorrem para que um organismo, tecido ou célula inicie, aumente, diminua ou cesse a produção de produtos finais de seus genes, proteínas e/ou RNAs. A análise do transcriptoma auxilia a melhor compreensão das respostas das plantas a diferentes tipos de estresses e, através destes estudos, numerosos genes de resposta a estas condições adversas já foram descobertos. A sobreposição de genes induzidos sob várias condições de estresses sugere que existam intersecções entre as vias de sinalização.

No entanto, os mecanismos e estímulos que levam à produção das diferentes proteínas e RNAs, em diferentes células, são tão importantes quanto à própria sequência codificadora. Essas sequências são importantes porque nelas encontramos sinais pelos quais é possível regular a expressão, uma vez que

apresentam sequências específicas para interação de proteínas (por exemplo, fatores de transcrição) que regulam a transcrição do DNA em RNA.

O desenvolvimento de frutos e o amadurecimento são processos biológicos complexos altamente controlados por redes reguladoras e envolve a participação de várias famílias de fatores de transcrição, tais como WRKY, MADS, NAC, MYB, MYC, bHLH, bZIP e HD-ZIP (YE et al., 2010). Dentre as várias famílias de fatores de transcrição (FTs), a família Dof ("DNA binding with One Finger") compreende FTs exclusivos de plantas, sendo caracterizados pela presença de um motivo de ligação ao DNA semelhante a "dedos-de-zinco". As proteínas Dof exercem efeitos ativadores ou repressores da transcrição, atuando sobre promotores de genes associados aos mais diferentes mecanismos metabólicos nos vegetais, regulando a resposta a estresses, hormônios, luz, sinalização do fitocromo, germinação de sementes, entre outras.

Apesar de seleção genética intensiva para melhores frutos em laranja-doce (*C. sinensis* L. Osbeck), informações a respeito de como esses frutos se desenvolvem e quais genes controlam este processo ainda são incipientes. Enquanto que redes regulatórias envolvidas no crescimento inicial de estruturas frutíferas foram amplamente estudadas em *Arabidopsis*, os estudos genéticos em laranja-doce têm focado principalmente na elucidação da base molecular da maturação dos frutos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar e analisar as sequências dos genes da família *Dof* em *C. sinensis* e caracterizar o perfil de expressão de alguns desses genes nos estádios iniciais de desenvolvimento dos frutos.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho foi identificar, caracterizar e analisar as sequências correspondentes aos genes da família *Dof* em *C. sinensis* (L.) Osbeck.

### **2.2 Objetivos específicos**

Analisar as sequências codificadoras dos fatores de transcrição *Dof* de *C. sinensis*.

Localizar a posição dos genes *Dof* nos cromossomos de *C. sinensis*.

Avaliar os perfis de expressão de genes *Dof* de *C. sinensis* em estádios iniciais de desenvolvimento dos frutos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Características dos citros

##### Importância econômica da citricultura

Os citros pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae e tribo Citreae, sendo esta composta por três subtribos. A subtribo Citrinae apresenta 13 gêneros e 65 espécies, contendo as principais espécies de interesse comercial, como as do gênero *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus* (SWINGLE; REECE, 1967; DAVIES; ALBRIGO, 1994). São espécies nativas do sudeste da Ásia, mais especificamente das regiões da Índia e do sul da China, regiões com clima tropical e subtropical característico do sul e sudeste Asiático (MOORE, 2001; NICOLSI, 2007).

Estudos genéticos apontam apenas três espécies como a base de origem de todas as outras exploradas apesar de existirem atualmente muitas espécies e variedades, comerciais: *C. medica* o grupo das cidras; *C. grandis*, o grupo das toranjas; e *Citrus reticulata* Blanco, o grupo das tangerinas (ARAÚJO; ROQUE, 2005; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Pio et al. (2005) agrupa as frutas cítricas de uso comercial em laranjeiras doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerineiras (*Citrus reticulata* Blanco), limoeiros (*Citrus limon* (L.) Buen. F.), limeiras ácidas (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) e *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka), pomeleiros (*Citrus paradisi* Macf.), entre outras.

As frutas cítricas também têm algumas características botânicas únicas, tais como embrião nucelar. Conseqüentemente, os embriões somáticos crescem muito mais vigorosamente do que os embriões zigóticos em sementes de mudas de tal forma que são essencialmente clones da planta mãe. Tais características têm dificultado o estudo da genética e o melhoramento genético dos citros (ROOSE; CLOSE, 2008; GMITTER et al., 2012). Assim, as principais variedades de citros cultivados no mundo foram originadas por mutações espontâneas ou por seleção de plantas individuais (SCHWARZ, 2006). Entretanto, existe uma grande diversidade de citros cultivados ou mantidos em bancos de germoplasma, mas poucas variedades são conhecidas (MACHADO et al., 2005), as quais podem também ser usadas em programas de melhoramento genético (KOEHLER-SANTOS; DORNELLES; FREITAS, 2003; RADMANN; OLIVEIRA,

2003). Resende (2012) apresentaram um levantamento de aproximadamente 1.700 diferentes acessos de citros, sendo 650 representados por variedades de laranjas doces, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG-Citros) do Instituto Agronômico (IAC).

As laranjas doces, *C. sinensis*, também são nativas do sudeste da Ásia, sendo árvores de porte médio, com 5 a 10 m de altura e copa de formato esférico. Suas folhas, brevipetioladas, medem de 7 a 15 cm de comprimento, e são aromáticas. As flores nascem isoladamente ou em inflorescências e são formadas por cinco pétalas (LORENZI et al., 2006) que possuem glândulas de óleo na sua superfície abaxial (QUEIROZ-VOLTAN; BLUMER, 2005). Seus frutos têm formato esférico ou oval e com superfície lisa, coloração laranja-clara quando maduros e pesam 190 g em média. A variedade Pêra é a mais conhecida e cultivada no Brasil dentre as laranjas doces (SAUNT, 1990).

A enxertia é a forma mais utilizada para o cultivo de laranja doce. O limoeiro “Cravo” (*Citrus limonia* L. Osbeck), por exemplo, é a espécie mais utilizada como porta-enxerto devido a diversos atributos, como facilidade de obtenção de sementes, compatibilidade adequada com a maioria das variedades copas, tolerância à seca e à tristeza dos citros e produção precoce (POMPEU JUNIOR, 2005).

Os estresses bióticos podem ser considerados os fatores mais limitantes ao aumento e manutenção da produtividade de citros do mundo. Os principais fatores bióticos limitantes aos citros compreendem a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, a leprose, a tristeza, a pinta preta, a morte súbita, diversas pragas, e mais recentemente o Huanglongbing (HLB). Ainda, fatores abióticos, principalmente as condições nutricionais e de estresse, estão relacionados com características do fruto (cor, composição e valor nutricional), sendo que estes fatores necessitam mais estudos para apoiar futuros trabalhos de melhoramento da qualidade (GCONCI, 2009).

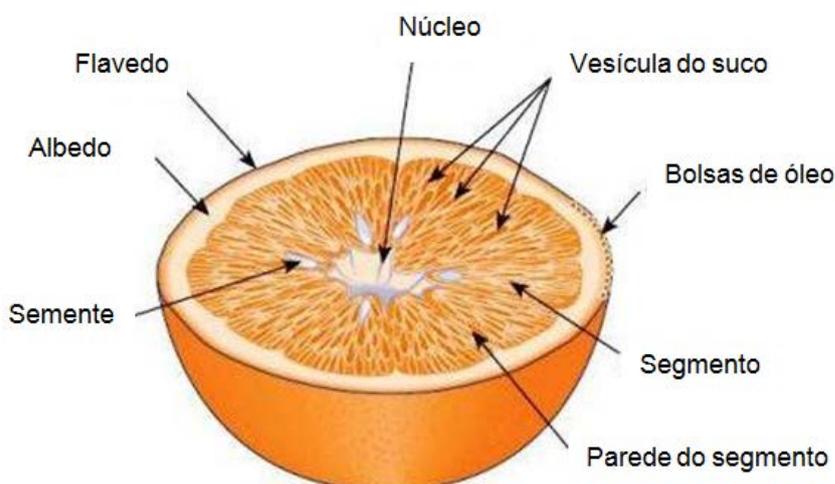
### **3.2 Desenvolvimentos do fruto de Citros**

A origem dos frutos é resultado de uma longa evolução vascular das plantas. No início as sementes eram nuas, formadas sobre folhas modificadas (megasporofilos), expostas diretamente a natureza como, por exemplo, o pinhão-do-

paraná (*Araucaria angustifolia*). Os frutos carnudos e suculentos só surgiram no final do Cretáceo ou início do período Terciário, tendo a função inicial de proteção e mais tarde agregando a função de dispersão das sementes (IGLESIAS et al., 2007).

Agustí et al. (1995) descrevem os frutos de citros como do tipo hesperídio composto por mesocarpo septado e endocarpo com “pêlos glandulares” ocupado por suco. O pericarpo é subdividido em epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O flavedo, formado pelo epicarpo mais parte do mesocarpo, é a região mais externa do pericarpo formando a “casca”. É a região pigmentada do pericarpo, contém numerosas glândulas de óleo revestidas por várias camadas de células epiteliais especializadas. O albedo é composto pelo mesocarpo, que forma um tecido branco e esponjoso situado logo abaixo do flavedo. O endocarpo delimita a região dos lóculos com as vesículas repletas de suco e radialmente por algumas membranas delgadas denominadas septos.

**FIGURA 1** – Corte transversal do fruto laranja-doce.



Fonte: The Orange Book, Tetra Pak 2004, p.7. Figura adaptada.

A frutificação não envolve apenas o fruto, mas também a semente. Pode-se dividir a formação dos frutos de citros em 3 fases: Fase I - momento da polinização, fertilização. É o início do desenvolvimento do fruto com divisão celular, fase de expansão envolvendo alargamento celular e acúmulo de água que ocorre no

mesocarpo (BAIN, 1958); Fase II: retomada das divisões celulares, tanto no ovário quanto na semente; Fase III: fase de crescimento linear e período de expansão das células e a maturação do embrião. Os carotenoides e outros sólidos solúveis são acumulados, a clorofila é perdida, a parede celular é extensivamente modificada, o conteúdo em ácidos orgânicos é reduzido, e a concentração de um número de compostos voláteis aumenta (KERBAUY, 2008).

O desenvolvimento do fruto em citros segue a tradicional curva sigmoide, desde a polinização da flor, até a maturação, caracterizada por período de crescimento exponencial, iniciado na antese (BAIN, 1958). O crescimento linear se estende por vários meses, até o início de sua mudança de cor e o período de maturação, no qual a taxa de crescimento reduz e o fruto sofre conversão de cloroplastos em cromoplastos (HUFF, 1984; IGLESIAS et al., 2007). Além da produção normal de frutos, existe uma pequena produção extemporânea, que chega a 5% do volume total produzido em um determinado ano, o que faz com que existam frutos durante os 12 meses do ano (POZZAN; TRIBONI, 2005; QUEIROZ-VOLTAN; BLUMER, 2005).

Os estudos de genes expressos em frutos não climatérios, como é o caso de citros, são importantes para compreender a regulação do desenvolvimento e amadurecimento destes frutos. O amadurecimento dos frutos é altamente coordenado geneticamente e envolve uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e organolépticas permitindo o desenvolvimento de uma fruta madura comestível (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). Por exemplo, as mudanças observadas no perfil de expressão de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos (CERCÓS et al., 2006) possibilitaram identificar proteínas reguladoras de expressão gênica que foram super expressas ao longo do desenvolvimento do fruto.

Através das técnicas de microarranjos foram identificadas redes de regulação gênica únicas durante o desenvolvimento dos frutos de citros (SHIMADA et al., 2005). Ainda, Liu et al. (2009) usando as técnicas de SSH (técnica de hibridação por supressão subtrativa) e microarranjos na variedade de laranja doce 'Hong Anliu' determinou um conjunto de genes candidatos ligados a um fenótipo mutante que causa acumulação de licopeno, baixo conteúdo de ácido cítrico e alta sacarose em frutos.

Yu et al. (2012) mostraram que o transcriptoma muda ao longo do curso do desenvolvimento dos frutos e maturação de *C. sinensis*, sendo que mais de 89% dos genes apresentaram expressão diferencial durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto. Como a maturação dos citros é acompanhada pela síntese de um grande número de proteínas e a transcrição de muitos genes, naturalmente vários fatores de regulação estão envolvidos neste processo. Análises do transcriptoma e do proteoma são métodos extremamente eficazes para a identificação de genes de expressão diferencial em todo o genoma. Wu et al. (2014 b) estudando sobre as diferenças na transcrição e na expressão de proteínas envolvidas no amadurecimento da polpa de um mutante de laranja doce de maturação tardia e seu tipo selvagem encontrou 130 proteínas diferencialmente expressas que corresponderam a 54 sequências de genes identificadas por RNA-seq.

As análises dos conjuntos de dados dos ESTs obtidos das variedades de polpa vermelha “Mutant ‘Cara Cara” e laranja “Washington Navel” foram utilizadas para a identificação de genes durante a maturação de laranja-doce (YE et al., 2010). De um total de 1348 sequências, selecionou-se 964 sequências únicas, com 489 ESTs agrupados em 148 contigs. Um total de 10 genes se destacaram com alta expressão nas bibliotecas das duas variedades dentre eles “chloroplast small heat shock protein” classe I, aldeído desidrogenase, metalotioneína, Cu/Zn superóxido dismutase e “Late embryogenesis abundant protein” (Lea5). Além disso, 25 fatores de transcrição foram identificados nas bibliotecas, sendo que 15 destes genes foram diferencialmente expressos entre 'Cara Cara' e 'Washington Navel', incluindo genes das famílias WRKY, MADS, NAC, MYB, MYC, bHLH, bZIP e HD-ZIP.

### **3.3 Genoma de *C. sinensis***

A origem genética da laranja-doce não é clara, embora existam algumas especulações de que a laranja doce pode ser derivadas da hibridação interespecífica de algumas espécies de citros primitivo. Entretanto, a disponibilidade de genomas nucleares (XU et al., 2013; WU et al., 2014a) e plastidiais (BAUSHER et al., 2006) de referência de outras espécies de citros possibilitaram conclusões mais precisas sobre a origem, a domesticação e as relações filogenéticas dentro deste grupo de plantas. Análises comparativas de genomas de plantas cítricas sugerem

que a laranja doce é originada de um híbrido entre *C. maxima* (pomelo) e *C. reticulata* (tangerina) (LI et al., 2010; XU et al., 2013).

Com a finalização do sequenciamento do genoma de *C. sinensis*, os dados foram disponibilizados à comunidade científica mundial no banco de dados Citrus Sinensis [2016]. Este trabalho de sequenciamento do genoma de *C. sinensis* apresentou uma cobertura de 87,3%, representando 367 Mb distribuídos em 4.811 "scaffolds". No total, foram identificados 29.445 loci codificadores de proteínas com 44.387 transcritos únicos, e 23.421 modelos de genes foram alocados nos nove pseudocromossomos. Os transcritos têm um comprimento médio de 1.817 bp, um tamanho médio da sequência codificante de 1.255 pb e uma média de 5,8 exons por gene. Além disso, identificaram um total de 181 RNAs ribossomais, 451 RNAs de transferência e 104 RNAs nucleares pequenos. Dos 29.445 genes codificadores de proteínas, 23.804 foram agrupados em 14.348 famílias de genes, sendo 1.691 destes genes específicos para citros. A maior parte (96%) desses genes citros-específicos são "hipotéticos" e têm função desconhecida. Dos genes anotados, os domínios de proteína mais representados foram o de fatores de transcrição do tipo dedo-de-zinco e o domínio rico em repetições de leucina (NBS-LRR) que estão presentes em genes que atuam na resposta da planta ao ataque de patógenos e são conhecidas por aumentarem a resistência da planta a esse estresse (XU et al., 2013).

### **3.4 Famílias dos fatores de transcrição Dof em plantas**

Os genes de fatores de transcrição (FT) estão envolvidos em muitos processos fundamentais em plantas superiores, incluindo respostas à luz, produção de fito-hormônio, influenciam a maturação e a germinação de sementes (YANAGISAWA, 2004). Os genes *Dof* são importantes moduladores da resposta das plantas a estresses abióticos e bióticos. Neste contexto, muitos são induzidos por diferentes fitohormônios e/ou por patógenos, e participam da regulação de fitoalexinas (SKIRYCZ et al., 2008; NAKANO et al., 2006).

A família Dof ("DNA binding with One Finger") compreende fatores de transcrição exclusivos de plantas, caracterizados pela presença de um motivo conservado de ligação ao DNA tipo dedo-de-zinco. O primeiro gene contendo um domínio Dof foi isolado em milho, por rastreamento de uma biblioteca de cDNA de folhas

(YANAGISAWA; SHEEN, 1998). A sequência necessária para a localização nuclear foi identificada e um sinal de localização nuclear que se sobrepõe em parte com o domínio conservado Dof foi mapeado (KREBS; MUELLER-ROEBER; RUZICIC, 2010). Além disso, os domínios das proteínas Dof, incluindo o domínio Dof em si, também estão envolvidos em interações físicas entre os próprios Dofs e uma série de outros fatores de transcrição (YANAGISAWA, 2000).

Dados recentes de sequenciamento proporcionaram uma compreensão mais abrangente sobre a distribuição das classes de Dof entre as espécies de plantas, dentro de diferentes tipos de tecidos e sobre a evolução das funções assumidas por esta família de fatores de transcrição.

### **3.4.1 Domínio Dof e o seu alvo no DNA**

O domínio de ligação em DNA dos fatores de transcrição Dof geralmente está localizado perto da região N-terminal da proteína. Esse domínio é uma região de 52 aminoácidos que contém na sua cadeia a sequência  $CX_2CX_{21}CX_2C$ , a qual se liga com zinco ( $Zn^{2+}$ ) caracterizando uma configuração dedo-de-zinco (YANAGISAWA, 2001) (Figura 2). Tanto o comprimento da estrutura em forma de laço e a presença do íon  $Zn^{2+}$  afeta diretamente a estrutura final da proteína e determina a natureza da ligação com o DNA. O triptofano na extremidade C-terminal do dedo-de-zinco também é importante para a ligação ao motivo AAAG ou à sequência complementar CTTT (SHIMOFURUTANI et al., 1998). A interação específica de proteínas de domínio Dof com o motivo AAAG foi também verificada em batata transgênica portadora de uma fusão entre o promotor KST1 (canal de fluxo de  $K^+$  de células guarda) quando se observou que mutações nos motivos AAAG reduziram drasticamente a atividade do promotor (PLESCH; EHRHARDT; MUELLER-ROEBER, 2001). O motivo AAAG é o mais frequente e repetido (YANAGISAWA, 2000), mas nem todas as sequências AAAG são sítios de ligação Dof (YANAGISAWA; SCHMIDT, 1999), sendo que em abóbora, por exemplo, foi encontrado um sítio de ligação AAGT (KISU, 1998).

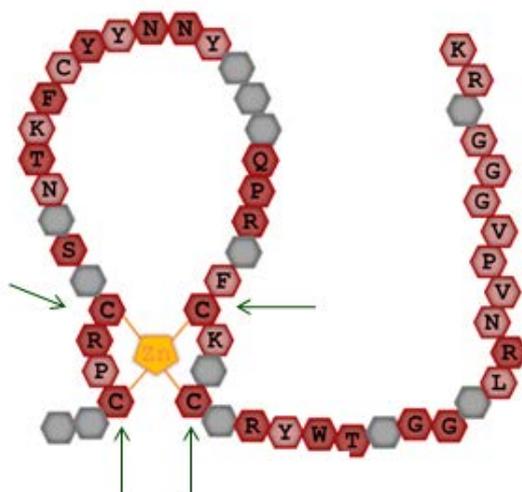
A região do domínio Dof na região N-terminal é altamente conservada, ao contrário do domínio na região C-terminal que apresenta-se altamente variável entre as diferentes proteínas Dofs. Estas podem interagir com diferentes proteínas reguladoras ou sinais de interceptação mediante a ativação ou repressão da

expressão gênica (YANAGISAWA, 2001). Os fatores de transcrição Dof funcionam em associação com outros fatores de transcrição e com proteínas chaperonas que auxiliam o Dof na sua ligação com o DNA e na sua especificidade. Em *A. thaliana*, a proteína Dof denominada OBP1, embora não se ligue de forma estável por si só, facilita a ligação do fator de transcrição bZIP com o DNA alvo (ZHANG et al., 1995). De acordo com Krohn, Yanagisawa e Grasser (2002), as proteínas denominadas HMG (*High Mobility Group*) podem estar agindo como acompanhantes que auxiliam na ligação do fator Dof ao DNA. Estas interações proteína-proteína requerem a presença do domínio Dof, mas não requerem que ocorra a ligação com o DNA, pois uma mutação em um dos resíduos de cisteína necessários para a formação de dedo-de-zinco não elimina as interações Dof1-Dof2 ou Dof1-HMG.

A especificidade de ligação ao DNA é compreendida pela região alfa-helicoidal na extremidade C-terminal do domínio Dof, mas o laço é necessário para manter uma configuração capaz de ligação de DNA (SHIMOFURUTANI et al., 1998). Um quinto resíduo de cisteína dentro do laço de ligação ao DNA do domínio Dof distingue os Dofs da família GATA de fatores de transcrição de hormônios esteroides.

Embora não haja informação estrutural, as sequências do domínio dedo-de-zinco C2C2 nos fatores de transcrição Dof tem algumas semelhanças com outras famílias, tais como a WRKY, R2R3-MYB, bZIP, MADS, GATA (EULGEM et al., 2000; MARTIN; PAZ-ARES, 1997; JAKOBY, 2002; PARENICOVA et al., 2003; REYES; MURO-PASTOR; FLORENSCIO, 2004; UMEMURA et al., 2004).

**Figura 2 - Domínio Dof.**



Nota: Resíduos de aminoácidos são apresentados com seu código IUPAC de uma letra.. Setas indicam os resíduos de cisteína conservados (CX<sub>2</sub>CX<sub>21</sub>CX<sub>2</sub>C).

Fonte: Figura adaptada de Noguero et al. (2013).

### 3.4.2 Estudos funcionais da família de fatores de transcrição Dof

Proteínas Dofs estão presentes em todas as plantas, e representam uma classe única de fatores de transcrição por possuírem atividades de ligação bifuncionais, tanto com o DNA quanto com proteínas, para regular a transcrição em células vegetais (GUPTA et al., 2015). Os fatores de transcrição Dof estão envolvidos no controle de diferentes genes em plantas, sendo que os produtos desses genes podem ter inúmeras funções, tais como a maturação das sementes e germinação, fitohormônios e regulação e respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos.

Nos últimos anos, genes codificadores de fatores de transcrição Dof foram identificados em diversas espécies incluindo arroz (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA., 2003), álamo (YANG; TUSKAN; CHENG, 2006), algas verdes (MORENO-RISUENO et al., 2007), trigo (SHAW et al., 2009) sorgo (KUSHWAHA et al., 2011), braquipódio (HERNANDO-AMADO et al., 2012), soja (GUO; QIU, 2013), tomate (CAI et al., 2013), cana-de-açúcar (GUPTA et al., 2015) e repolho chinês (MA et al., 2015). Visto que genes ortólogos normalmente apresentam funções semelhantes (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-

CARBAJOSA, 2003), estudos filogenéticos têm auxiliado na inferência da função de possíveis sequências codificadoras de proteínas Dof recém-descobertas ao serem comparadas com outras proteínas Dof já identificadas e devidamente caracterizadas funcionalmente.

Por exemplo, o desenvolvimento vascular em *A. thaliana* é regulado por dois genes *Dof*, *AtDof2.4* e *AtDOF5.8*, que são diferencialmente expressos (KONISHI; YANAGISAWA, 2007). Também em *A. thaliana*, genes envolvidos na produção de lignina no sistema vascular possuem sítio de ligação Dof nos seus promotores (ROGERS et al., 2005). Ainda nesma mesma espécie, sítios de ligação dos fatores de transcrição Dof e HD-ZIP (“homeo-domain-leucine-zipper”) parecem importantes para a expressão específica de dois genes para transporte de sacarose (Sucrose Transporters) (SCHNEIDERREIT; IMLAU; SAUER, 2008). Wei et al. (2010) identificaram o gene *AtDOF4.7* como expresso em zonas de abscisão de órgãos florais, reprimindo a expressão de um gene da poligalacturonase, importante para abscisão de órgãos florais. Curiosamente, *AtDOF4.7* interage com um segundo fator de transcrição dedo-de-zinco, *AtZFP2*, também implicado na repressão da abscisão de órgãos florais, sugerindo cooperação entre os dois fatores de transcrição. Engel et al. (2005) estudando promotores específicos de gametas masculinos (pGEX e pGEX2) em *A. thaliana*, mostraram que estas sequências contem sítios de ligação Dof. Ainda em *A. thaliana*, o gene *AtDof4.1* atua como um repressor para regular o tamanho de órgãos (AHMAD et al., 2013).

O gene *DAG1* (*AtDof21*) de *A. thaliana* está envolvido na expressão no tecido maternal de sementes, sendo que mutantes desse gene têm a dormência reduzida (PAPI et al., 2000). Um segundo gene *Dof*, *DAG2* (*AtDof14*), apesar de estar relacionado intimamente com o seu parálogo, mostrou o efeito oposto, isto é, um aumento da dormência em resposta ao ácido giberélico quando mutado (GUALBERTI et al., 2002). Ainda em *A. thaliana*, o “Cycling DOF Fator 1” (*CDF1-AtDof33*) reprime transcrição do gene *constans* (*CO*) e, portanto, reprime a floração (SONG et al., 2012). Um ortólogo de *AtDof1*, foi encontrado em *Solanum tuberosum*, onde controla a formação de tubérculos reprimindo os genes *Constans* (*CO1* e *2*) numa reação de cascata que induz o desenvolvimento de tubérculos (KLOOSTERMAN et al., 2013).

Fatores de transcrição Dof também podem interferir ou influenciar a na produção de metabólitos pelas plantas em resposta a mudanças do ambiente. Os

membros da família de proteínas Dofs estão envolvidos na regulação dos genes envolvidos na fotossíntese e conseqüentemente no metabolismo de carboidratos em milho (YANAGISAWA; SHEEN, 1998). Nesta mesma espécie, a redução dos níveis de transcritos do gene *ZmDof1* não afetou a expressão de genes específicos do sistema fotossintético C4 em milho, sugerindo a possibilidade de redundância na sua ação sobre estes promotores (CAVALAR et al., 2007).

O *Dof1* parece ser um regulador-chave da expressão de genes envolvidos na ativação da via dos ácidos orgânicos para a produção de esqueletos de carbono, os quais mantêm uma estreita associação com o metabolismo de nitrogênio. O efeito positivo do *Dof1* sobre a produção de esqueletos de carbono tem sido explorado para a engenharia metabólica em *A. thaliana*. Em plantas transgênicas super-expressando este gene, o teor de nitrogênio aumentou 30%, indicando a promoção de assimilação líquida de nitrogênio (YANAGISAWA, 2004). A super-expressão de *OsDof25* alterou o metabolismo do carbono e nitrogênio em *A. thaliana*, resultando em aumento das concentrações de aminoácidos (SANTOS, SOUZA; FERNANDES, 2012). Plantas transgênicas com este gene tiveram os níveis de expressão de transportadores de amônia de baixa afinidade (*AtAMT1.1* e *AtAMT2.1*) aumentados e o transportador de nitrato de alta afinidade (*AtNRT2.1*) reprimido. O aumento na expressão simultânea de AMTs e enzimas do metabolismo do carbono pode explicar os elevados níveis de aminoácidos encontrados nas plantas transgênicas.

O gene *PpDof5*, em pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), está implicado na regulação de dois genes da glutamina sintase, *GS1a* e *GS1b* (RUEDA-LOPEZ et al., 2008). O *PpDof5* contribui para a ativação do promotor de *GS1b* e a repressão do *GS1a* em ensaios com o gene repórter *uidA* (beta-glucuronidase) em protoplastos de pinheiro, sendo que esse gene desempenha um papel em reassimilação de nitrogênio durante lignificação.

Os genes *Dofs* têm um papel central no controle da germinação e no desenvolvimento de sementes. Estes fatores de transcrição estão implicados na regulação da síntese de proteínas de reserva e outras proteínas expressas durante a fase de enchimento de grãos e do desenvolvimento do endosperma em cereais. Por exemplo, promotores de genes expressos durante o desenvolvimento do endosperma em cereais tem um motivo conservado TGTAAG presente no “prolamin-box” (Pbox) o qual é suficiente para conferir expressão específica em

endosperma em um promotor mínimo (ZHANG et al., 1995; MARZABAL et al., 2008). Esse motivo é dividido em duas partes sendo que uma reconhece o fator bZIP e a outra contem o elemento AAAG, que é o sítio de ligação Dof (VICENTE-CARBAJOSA et al., 1997; DIAZ et al., 2002). Usando outras estratégias, Wang et al. (2007) selecionaram *GmDof4* e *GmDof1* a partir de um conjunto de genes *Dofs* de soja expressos durante o desenvolvimento da semente. A super-expressão destes genes em plantas de *A. thaliana* causou um aumento no teor de lípidos em sementes.

Outro tipo de *Dof*, o gene *SRF1* isolado de batata-doce, foi preferencialmente expresso em raízes e com atuação na modulação do metabolismo de carboidratos nestes órgãos através de regulação negativa de um gene da invertase vacuolar (TANAKA et al., 2009).

Os genes *Dof* também são importantes moduladores das respostas aos estresses bióticos e abióticos em plantas, sendo que muitos são induzidos por diferentes fitormônios e/ou por patógenos, e participam na regulação da produção de fitoalexinas (NAKANO et al., 2006; SKIRYCZ et al., 2007). O papel dos *Dofs* na tolerância ao estresse biótico foi investigado em sementes de cevada com base na sua interação com o gene da cistatina (MARTINEZ et al., 2005), sendo que duas proteínas *Dofs* interagem especificamente *in vitro* com oligonucleotídeos contendo sítios de ligação *Dof* derivados do promotor do gene da cistatina.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Identificação dos membros da família Dof em Citrus

As sequências correspondentes aos 24 genes *Dof* de *C. sinensis* foram selecionadas e recolhidas em três bancos de dados. Primeiramente, foram realizadas buscas a partir da opção “palavra chave” no banco de dados “*Citrus sinensis* – Annotation Project” (CITRUS SINENSIS, [2016]). Em seguida, essas sequências foram individualmente confrontadas com as sequências depositadas nos bancos de dados “Citrus Genome Database” (CITRUS GENOME DATABASE, [2016]) e “Phytozome 11” (GOODSTEIN et al., 2012). As sequências foram utilizadas como sondas eletrônicas (*queries*) contra sequências depositadas no banco de dados do GenBank, utilizando os programas BlastP e BlastX (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, [2016]), para confirmar a similaridade das mesmas com genes *Dof* de outras espécies (ALTSCHUL et al., 1990).

As sequências de nucleotídeos de domínio Dof nos genes encontrados no genoma de *C. sinensis* foram submetidas à análise funcional *in silico* utilizando a versão PFAM 24.0 (FINN et al., 2006) e PROSITE 20.58 (CASTRO, 2006) usando os parâmetros “default”.

### 4.2 Análise filogenética

As sequências de aminoácidos de CsDof foram alinhadas usando ClustalX 2.0.10 (THOMPSON et al., 1997) com BLOSUM30 (BLOCKS of Amino Acid Substitution Matrix) como matriz de substituição. Para o alinhamento foram usados 36 proteínas completas Dof de *A. thaliana*, de acordo com a classificação e nomenclatura de Kushwaha et al. (2011), e 30 de *Oryza sativa* (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA, 2003), selecionadas nos bancos de dados The Arabidopsis Information Resource (TAIR, [2016]) e Phytozome 11 (GOODSTEIN et al., 2012), respectivamente.

Uma árvore filogenética foi gerada usando o método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) com o auxílio do programa MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis v. 6 (TAMURA et al., 2013). Para testar a confiabilidade da análise foram utilizadas 1.000 réplicas de *bootstrap*.

### 4.3 Localização cromossômica e estrutura dos genes *CsDof*

A localização dos genes nos cromossomos e a informação sobre a estrutura de íntrons/éxons foi posicionada manualmente para cada um dos genes *CsDof* nos cromossomos de acordo com as informações obtidas no banco de dados “*Citrus sinensis* – Annotation Project” (CITRUS SINENSIS, [2016]).

### 4.4 Estudo de expressão gênica de *CsDof* em frutos de laranja-doce

Dos 24 genes *Dof* encontrados no genoma de *C. sinensis* foram escolhidos 12 genes para a análise da expressão gênica em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto. Esta escolha foi baseada de acordo com resultados de expressão gênica gerados por RNA-seq e disponíveis na plataforma pública “*Citrus sinensis* – Annotation Project” (JIAO et al., 2013; CITRUS SINENSIS, [2016]), os quais indicaram os genes altamente expressos em frutos em relação aos demais tecidos usados na construção de bibliotecas de cDNA (Anexo 3).

### 4.5 Material vegetal

Frutos de laranja-doce da variedade Pêra enxertada em Limão cravo foram coletados de plantas cultivadas em Argissolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 2006) no campo experimental localizado no Campus II da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) em Presidente Prudente. A área experimental está localizada a 430 m de altitude, nas coordenadas geográficas 22° 07' S e longitude 51° 27' W.

Para a coleta de frutos, foram selecionadas nove plantas distribuídas em diferentes posições no campo experimental. Os frutos foram coletados, individualmente, em diferentes estádios de desenvolvimento, considerando a data do florescimento (23/08/2013). A primeira coleta foi realizada no dia 02/09/2013, sendo que a partir desta data, foram efetuadas mais cinco coletas em intervalos de 15 dias, resultando em um período de 90 dias de desenvolvimento dos frutos a partir da antese. Em cada amostragem, coletou-se três frutos aleatoriamente em diferentes posições de cada uma das plantas, resultando num total de 27 frutos por data de coleta. Os frutos foram mergulhados imediatamente em nitrogênio líquido e

transportados para o laboratório e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração do RNA total. Antes da extração do RNA, os frutos foram pesados e avaliados quanto ao seu diâmetro médio na parte central com um auxílio de uma balança digital e um paquímetro, respectivamente.

#### **4.6 Extração de RNA**

Para extração do RNA, 300 mg do flavedo e albedo foram utilizados em todos os estádios de coletas dos frutos. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e colocadas em microtubo estéril tipo Eppendorf® de 1,5 mL, sendo então adicionado 1 mL de Trizol® Reagent (Invitrogen®). Após incubação por 5 min no gelo, as amostras foram centrifugadas (9000 rpm) em centrífuga refrigerada por 15 min. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. A amostra foi agitada por 15 s em vortex, deixada em repouso por 3 min em temperatura ambiente, sendo novamente centrifugada a 9000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Após breve agitação por 30 s, as amostras foram deixadas por 10 min em temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas a 9000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 min, o sobrenadante descartado e o “pellet” seco em temperatura ambiente por 10 min. O “pellet” foi ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de água milli-Q tratada com DEPC (dietil pirocarbonato). A pureza e a quantidade do RNA isolado foram estimadas através de espectrometria baseada na relação A260/A280. Para avaliar a qualidade e a integridade do RNA realizou-se uma eletroforese (150V/120mA por 1 hora) em gel de agarose 1% com tampão TBE 0,5X, contendo brometo de etídio (0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os resultados foram visualizados com iluminação ultravioleta em fotodocumentador (Quantum ST4, Vilber Lourmat).

#### **4.7 RT-PCR semi-quantitativo**

Todas as amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNase I – Amplification Grade® (Invitrogen) antes de serem submetidas ao RT-PCR, conforme as instruções do fabricante. As amostras foram homogeneizadas e

mantidas por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, 1 µl de 25 mM EDTA (etilenodiamotetracetato) foi adicionado e as amostras mantidas por 10 min a 65°C.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript III® (Invitrogen). A transcrição reversa foi a partir de 1-µg do RNA total, utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A (Oligo dT). O protocolo consistiu em usar 1 µl de dNTPs e 1 µl de Oligo dTs por amostra e incubação por 5 min a 65°C. Após, foram adicionados 5 ul de Tampão 5X (kit SuperScript III), 1 ul de DTT (ditiotreitól), 1 ul de RNase out, 1 ul de água e 1 ul da enzima Superscript III em um volume final de 20 µl. Posteriormente, as amostras foram levadas a um termociclador (Multigene Labnet) e incubadas a 37°C por 50 min e a 70°C por 15 min. Os cDNAs foram armazenados a - 20°C até a sua utilização nos experimentos de RT-PCR.

“Primers” gene-específicos (Tabela 1) foram desenhados no programa Primer3 (PRIMER3, [2016]), seguindo as orientações de Rozen e Skaletky (2000). Os “primers” foram analisados no programa Primer-Blast (PRIMER-BLAST, [2016]) para verificar a especificidade para as sequências-alvo.

Para otimização e definição dos melhores parâmetros para as reações de RT-PCR para cada um dos “primers”, testou-se os números de ciclos (15, 20, 25, 30, 35 e 40 ciclos) e as temperaturas de anelamento (56, 57 e 58°C). Para os 12 pares de “primers” dos genes *CsDof* utilizou-se 35 ciclos de amplificação e 20 ciclos para o normalizador Fator de alongação 1 alfa (*EF1-α*). Assim, a reação da RT-PCR consistiu 10% de tampão (20 mM Tris-HCL, pH 8.4, 50 mM de KCL), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada dNTP, 0,8 µM de “primer”, 1 U de Taq DNA polimerase e 1 µl de cDNA em um volume final de 25 µl. Os parâmetros utilizados consistiram em desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 20 ou 35 ciclos a 94° C durante 1 min, 58°C durante 1,0 min e 72°C durante 2 min, após o ciclo utilizou-se uma extensão final de 72°C durante 10 min. Os produtos da RT-PCR foram migrados através de eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE 1X por 1 hora a 80V e as imagens dos géis foram observadas em luz ultravioleta e documentadas em foto documentador (Quantum ST4, Vilber Lourmat). Foram feitas três replicatas biológicas de cada amostra de frutos coletados nos diferentes estádios de desenvolvimento.

**TABELA 1** - Sequências dos “primers” específicos para os 12 genes *CsDof* e para o gene normalizador *EF1- $\alpha$*  usados para as análises de RT-PCR semi-quantitativo de tecidos de frutos de *C. sinensis*.

Gene	“Primer” Senso	“Primer” Anti-senso	Tamanho do fragmento em pb
<i>CsDof1</i>	5'AGGCTTCCCTATGCCATTCT3'	5'GCTCCTGTCCCTCAGAGTTG3'	191
<i>CsDof2</i>	5'GACTACTCGTATTCCGGGACG3'	5'CTGTTGCAACGTGGACATGG3'	252
<i>CsDof3</i>	5'CTGAATCGCCGGAGGCTAAT3'	5'CATGCTATTGCAACGAGGGC3'	176
<i>CsDof4</i>	5'GAAGCAGCGGCTCATCAAAG3'	5'AGTCCCGATGGGGAAGAAGA3'	379
<i>CsDof7</i>	5'AGCCATTGAAGTGTCCGAGG3'	5'AGCCATTGAAGTGTCCGAGG3'	587
<i>CsDof9</i>	5'GGTACTGGACTGAAGGTGGC3'	5'GGTACTGGACTGAAGGTGGC3'	312
<i>CsDof10</i>	5'AGGTATTGGACCAAAGCGG3'	5'TCGTCAAACCCTAGTTGCC3'	230
<i>CsDof12</i>	5'TCACTGGCCACAGGGAATTG3'	5'TTCTCAGAGACCCACCTGCT3'	221
<i>CsDof14</i>	5'ACTACAGCTTGTCTCAGCCG3'	5'TTCGGTGTGGAGACAGCATC3'	208
<i>CsDof16</i>	5'GGAGGCCTGTTGTGATCGAA3'	5'TTTTTGCAGAAATGCCGGGG3'	396
<i>CsDof20</i>	5'TCCGTCGATGGGGTCTTACT3'	5'ATGGAGGAGGGCCATAACCT3'	554
<i>CsDof23</i>	5'CGGTGGTGGTACCCGTAAAA3'	5'TCCTGATCCAATGGCAACCC3'	240
<i>EF1-<math>\alpha</math></i> (normalizador)	5'AAGGCTGAGCGTGAACGTGG3'	5'ACGGCAATGTGGGAGGTGTG3'	850

Fonte: Elaborado pelo autor.

A expressão relativa dos *CsDofs* nos diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos foram calculadas mediante a comparação entre as intensidades das bandas obtidas nos géis. Dados de densitometria para as intensidades de bandas subtraídas do “background” local foram gerados com o programa ImagenJ® (RASBAND, 2014).

Para calcular a expressão relativa dos *CsDofs* nos diferentes estágios de desenvolvimento dos frutos aqui analisados, a intensidade total de pixels de cada banda foi primeiramente normalizada com a expressão do gene *CsDof* na folha (controle) e, posteriormente, o sinal de cada banda foi normalizado com a expressão do gene *CsEF1- $\alpha$*  (Endo et al., 2006) no fruto e na folha. A expressão relativa do gene alvo foi calculada: ER = expressão do *CsDof* no fruto/expressão do *CsDof* na folha dividido pela expressão do gene normalizador *CsEF1- $\alpha$*  no fruto/*CsEF1- $\alpha$*  na folha.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação de genes *CsDof* e análise das sequências

Vinte quatro sequências não-redundantes com o domínio DOF conservado CX2CX21CX2C foram selecionadas no banco de dados “*Citrus sinensis* – Annotation Project” (CITRUS SINENSIS, [2016]) (Tabela 2). As sequências destes genes Dofs putativos foram então submetidas a outros dois bancos de dados, Citrus Genome Database [2016] e Phytozome (GOODSTEIN et al., 2012) para confirmação. O número de genes *Dof* identificados em *C. sinensis* é menor do que em outras espécies de plantas utilizadas comumente como modelo em estudos de análises comparativas de genomas. Por exemplo, em estudos semelhantes a este, foram encontrados 36 genes *Dof* em *Arabidopsis*, 30 em arroz *Dof* (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA, 2003), 34 em tomate (CAI et al., 2013) e 46 em cenoura (HUANG et al., 2016). Uma vez que não há nenhuma anotação padrão atribuída aos genes *Dof* em *C. sinensis*, estes foram nomeados de *CsDof1* a 24 (Tabela 2).

Os 24 genes *CsDof*, o locus identificado de acordo com a nomenclatura do Citrus Sinensis [2016], a localização nos cromossomos, o ponto isoelétrico (pI), o peso molecular (PM), o órgão com maior expressão de acordo com RNAseq (JIAO et al., 2013), a presença de splicing alternativo, o tamanho da “Open Reading Frame” (ORF) e o número de íntrons podem ser observados na Tabela 2. O tamanho deduzido da sequência de aminoácidos dos genes variou de 172 a 495 aa, com um tamanho médio 320 aa. O ponto isoelétrico (pI) teórico variou de 4,66 a 9,52 e o peso molecular (PM) da proteína variou de 26,71 kD a 54,82 kD. As sequências completas de aminoácidos dos genes *Dof* identificados podem ser visualizadas no Anexo 1.

**TABELA 2 - Genes *CsDof* e informações relacionadas de cada gene**

Nome do Gene	Locus (Phytosome)	†Chr	pl	PM kDa	Exp.	S/A	aa	Int
<i>CsDof1</i>	orange1.1g011016m	6	7,24	54,82	Fruto	0	495	1
<i>CsDof2</i>	orange1.1g011169m	5	6,26	53,23	Fruto	1	492	1
<i>CsDof3</i>	orange1.1g011752m	5	6,83	52,17	Fruto	0	478	1
<i>CsDof4</i>	orange1.1g017919m	6	9,06	38,36	Fruto	0	364	1
<i>CsDof5</i>	orange1.1g019668m	7	9,25	36,62	Folha	0	337	2
<i>CsDof6</i>	orange1.1g020288m	8	8,87	36,62	Calo	0	328	1
<i>CsDof7</i>	orange1.1g021502m	2	9,38	33,99	Fruto	0	311	1
<i>CsDof8</i>	orange1.1g021633m	5	7,06	34,87	Flor	0	310	1
<i>CsDof9</i>	orange1.1g021641m	Un*	8,78	33,75	Fruto	1	309	1
<i>CsDof10</i>	orange1.1g021974m	8	7,61	34,52	Fruto	0	304	1
<i>CsDof11</i>	orange1.1g023047m	5	8,37	31,79	Folha	2	288	2,1,2
<i>CsDof12</i>	orange1.1g024229m	Un	8,81	30,15	Fruto	0	270	2
<i>CsDof13</i>	orange1.1g024786m	1	8,49	27,23	Flor	0	262	0
<i>CsDof14</i>	orange1.1g025998m	3	4,66	27,54	Fruto	0	245	1
<i>CsDof15</i>	orange1.1g036178m	7	6,83	36,09	Flor	0	330	0
<i>CsDof16</i>	orange1.1g038013m	7	7,96	54,79	Fruto	0	494	1
<i>CsDof17</i>	orange1.1g040161m	1	9,15	39,17	Folha	0	366	0
<i>CsDof18</i>	orange1.1g041099m	1	8,15	39,57	Folha	0	361	1
<i>CsDof19</i>	orange1.1g041420m	1	9,38	33,49	Folha	0	309	1
<i>CsDof20</i>	orange1.1g042156m	2	9,52	37,02	Fruto	0	336	0
<i>CsDof21</i>	orange1.1g043493m	3	7,64	26,71	Calo	0	254	0
<i>CsDof22</i>	orange1.1g043617m	6	5,58	32,59	Flor	0	291	0
<i>CsDof23</i>	orange1.1g046549m	1	8,59	27,11	Fruto	0	250	0
<i>CsDof24</i>	orange1.1g047290m	2	8,88	20,08	Calo	0	172	0

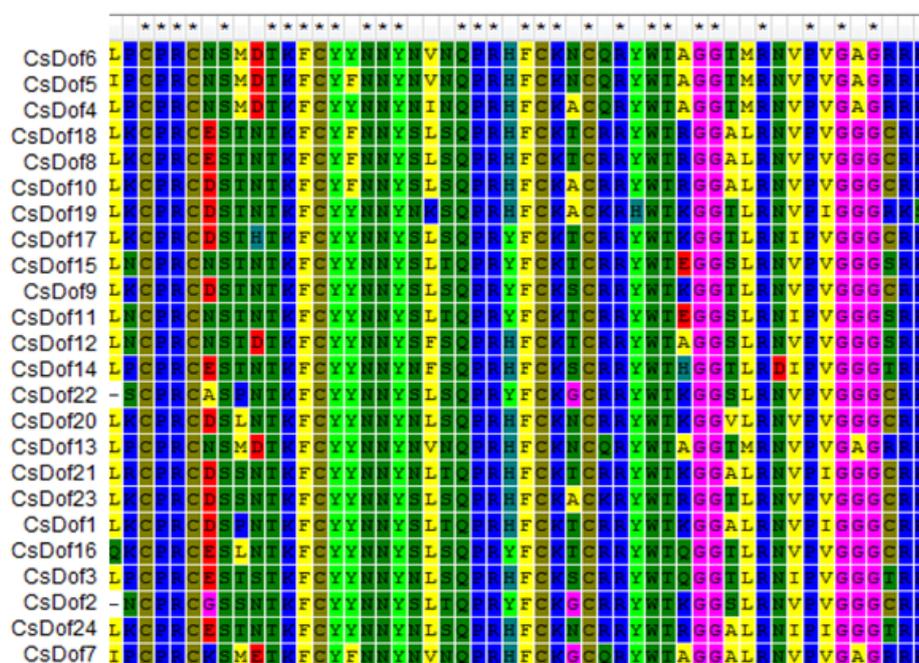
†Chr: localização cromossomal; (pl) ponto isoelétrico do peptídeo deduzido; PM, peso molecular; Órgão com mais alta expressão de acordo com “Citrus sinensis – Anotation Project”; (S/A) presença de “splicing alternativo”; (Int) número de íntrons; (aa) aminoácidos; (Exp.) órgão com maior transcrição estimada com dados de RNA-seq (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange>).

Un\* (“unassembled scaffold”; scaffold não-montado).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença do domínio conservado Dof nas proteínas é uma característica essencial para estas serem consideradas como membros da família deste fator de transcrição. O domínio Dof das proteínas CsDof, baseado no banco de dados de domínios conservados do National Center for Biotechnology Information (“Conserved Domain Database - CDD”), é constituído por aproximadamente 52 resíduos (Figura 3) e localiza-se na região N-terminal (Anexo 02), sendo que as distribuições de aminoácidos conservados entre os homo-domínios são bastante semelhantes entre todas as proteínas CsDofs, sendo que 29 dos 52 aminoácidos são conservados em todas as 24 proteínas CsDofs identificadas (Figura 3). A análise deste domínio nas proteínas identificadas nos três bancos de dados analisados mostrou que o motivo CX2CX21CX2C está presente em todas as 24 proteínas CsDofs putativas.

**FIGURA 3** - Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos do domínio de ligação ao DNA dos fatores de transcrição CsDofs, contendo quatro resíduos de cisteína associadas com a estrutura de dedo de zinco.



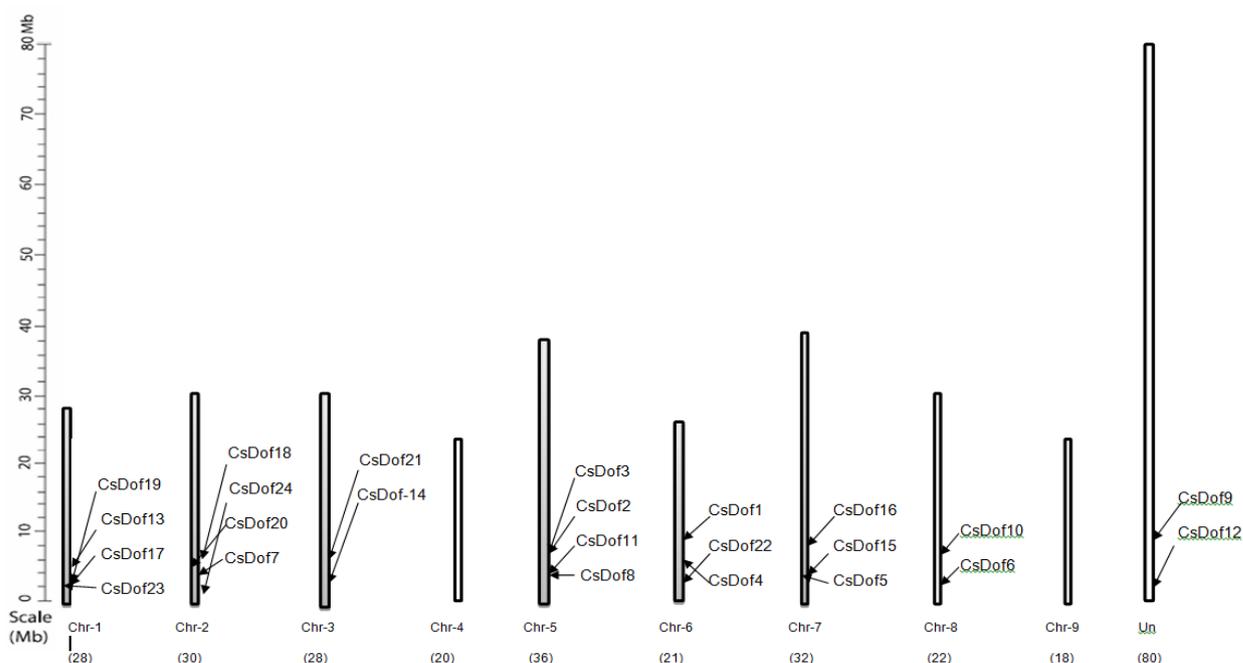
Nota: Os resíduos fortemente conservados podem ser observados no alinhamento acima, sendo que os asteriscos indicam um resíduo perfeitamente conservado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.2 Localizações cromossômicas e duplicação dos genes *CsDof*

Os 24 genes *CsDof* identificados estão distribuídos na maioria dos nove cromossomos de acordo com o banco de dados CITRUS Sinensis [2016] – Annotation Project, exceto nos cromossomos 4 e 9. Os cromossomos 1, 2 e 5 apresentaram o maior número de *CsDofs* (4 genes em cada), enquanto que 3 genes *CsDof* foram mapeados nos cromossomos 6 e 7 e dois nos cromossomos 3, 8 e no “scaffold” não-montado (Un) (Figura 4).

**FIGURA 4** - Localização cromossômica de 24 genes *CsDof* nos 9 cromossomos de *C. sinensis*.



Os números de cromossomos e seu tamanho em megabases (Mb) são indicados na parte inferior do eixo X. Tamanho do cromossomo é representado usando a escala no eixo Y.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

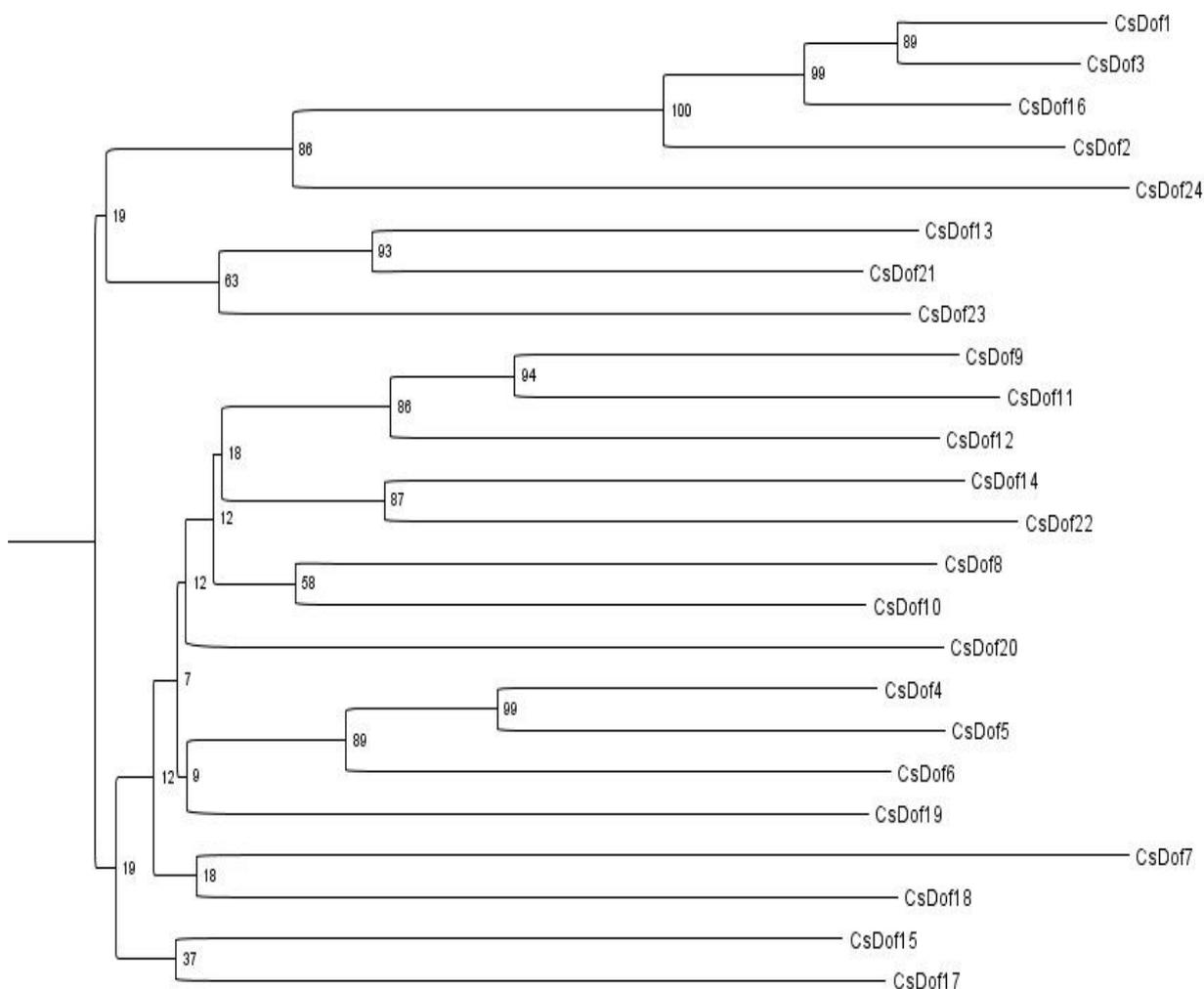
De acordo com os dados de expressão baseados em RNA-seq (CITRUS SINENSIS, [2016]), os 24 genes *CsDof* são expressos em diferentes partes da planta, tais como frutos, folhas, flores e calos (Tabela 2). O fruto foi a estrutura da planta onde o maior número de genes *CsDof* foram expressos, com um total de 12 genes (*CsDofs*1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 20 e 23), os quais apresentam-se

dispersos nos 9 cromossomos de *C. sinensis* e no “scaffold” não montado. A maior expressão do restante dos *CsDofs* foi detectada em folhas (*CsDofs5*, 11, 17, 18 e 19 - mapeados nos cromossomos 1, 2, 4 e 7), em calos (*CsDofs6*, 21 e 24, localizados nos cromossomos 2, 3 e 8) e em flores (*CsDofs8*, 13, 15 e 22, mapeados nos cromossomos 1, 5, 6 e 7) (Tabela 2).

Uma árvore filogenética foi construída baseada nas sequências de proteínas completas empregando-se o método de agrupamento de vizinhos (“Neighbor-Joining” – NJ). Além disso, o método de Máxima Parcimônia (MP) foi também utilizado, mas os dois algoritmos mostraram-se quase idênticos (dados não mostrados). Portanto, somente a árvore obtida com o NJ foi utilizada para as análises neste estudo. A análise da topologia da árvore das proteínas Dof de *C. sinensis* mostrou pares de genes com diferentes graus de homologia (Figura 5), o que pode indicar a presença de parálogos. Vários pares de genes *CsDof* distantemente relacionados estão localizados adjacientemente no genoma de *C. sinensis* (Figura 4). Entretanto, somente 2 pares foram agrupados, isto é, separados por menos de 200 kb (dados não mostrados). Os genes *CsDof13* e *CsDof19* foram mapeados a 136 kb de distância entre eles no cromossomo 1, enquanto que *CsDof5* e *CsDof15* estão localizados a 158 kb um do outro no cromossomo 7.

Agrupamento de genes geralmente representam parálogos, mas nem sempre isto é o caso. Para a identificação de possíveis parálogos foram utilizados os seguintes critérios: (a) o comprimento da sequência alinhada de aminoácidos abrange >80% do maior gene; (b) a similaridade das regiões alinhadas é >70% (YANG et al., 2008). Somente um par de parálogos putativos (*CsDof1* e *CsDof3*, mapeados nos cromossomos 6 e 5, respectivamente) que atendem esses critérios foram identificados. Portanto, o agrupamento dos genes *CsDofs* parece ser resultado de duplicações segmentais oriundas de fusões e translocações cromossomais derivadas da origem híbrida de *C. sinensis* proveniente do cruzamento entre *C. grandis* e *C. reticulata* (XU et al., 2013), do que de duplicações em tandem, seguidas pela retenção dos parálogos resultantes.

**FIGURA 5** - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento completo de 24 proteínas CsDof pelo método de agrupamento de vizinhos (“Neighbor-Joining” – NJ).

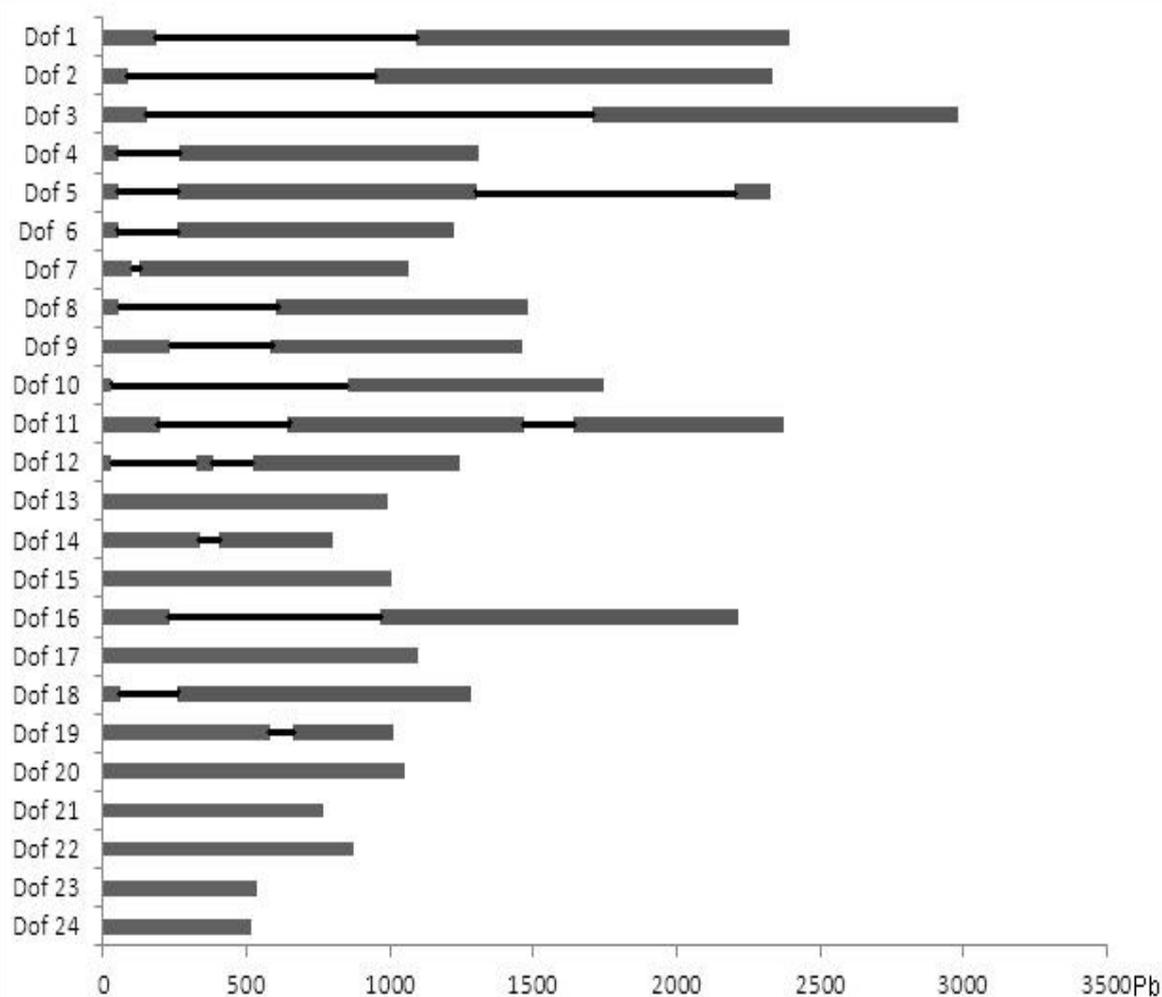


Nota: O alinhamento múltiplo foi realizado com o programa MUSCLE e a árvore filogenética construída com o programa MEGA v. 6, com 1000 replicações de bootstrap.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3 Estrutura e análise filogenética dos genes *CsDof*

As estruturas dos genes da família de genes *Dof* de *C. sinensis* em termos de padrão de distribuição de íntrons/ exons são mostradas na Figura 6. Não foram encontrados íntrons em 35% dos genes *Dofs* (*CsDofs13, 15, 17, 20, 21, 22, 23* e *24*). Dos restantes, treze contém somente um íntron (*CsDofs1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 16, 18* e *19*) e dois apresentam dois íntrons (*CsDofs5* e *12*). Já o *CsDof11* apresenta um ou dois íntrons devido a ocorrência de “splicing” alternativo.

**FIGURA 6** - Estrutura dos introns-exons dos genes *CsDof*. Exons são representados por barras mais grossas e íntrons por barras finas.



Nota: O tamanho dos exons e íntrons em pares de bases pode ser estimado usando a escala horizontal.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Kushwaha et al. (2011) destaca que existe uma grande similaridade entre os genes Dof de arroz, *Arabidopsis* e sorgo em termos de estrutura dos genes desta família. Dos 28 genes *SbDof* de sorgo, 21 apresentaram íntrons, sendo que o *SbDof15* mostrou a presença de dois íntrons, enquanto que em arroz foram encontrados 17 genes *OsDof* com íntrons em um total de 30 genes (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA, 2003).

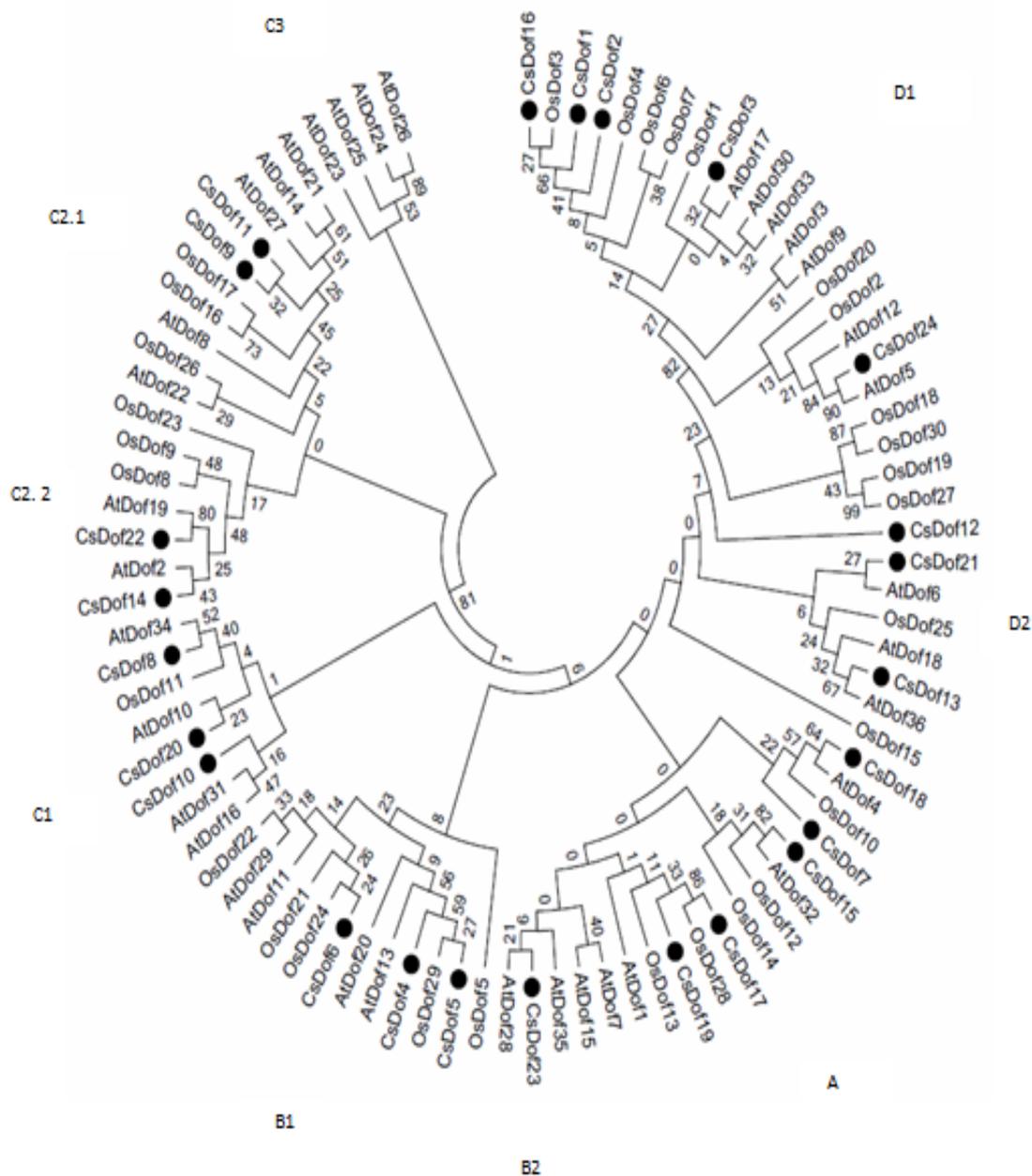
#### 5.4 Relações evolutivas entre a família de Dof

Para determinar as relações dos genes *Dof* com os de outras espécies, foi construída uma árvore filogenética não enraizada pelo método de agrupamento de vizinhos (“Neighbor-Joining” – NJ) com análise de *bootstrap* (1000 replicações) usando sequências completas de proteínas de 24 genes *CsDofs* de *C. sinensis*, 36 de *AtDofs* de *A. thaliana* e 30 de *OsDofs* de *O. sativa* (Figura 7).

Nossos dados mostraram que os membros da família *CsDofs* podem ser divididos em quatro grupos principais (A, B, C e D) e em 9 subfamílias (A, B1, B2, C1, C2.1, C2.2, C3, D1 e D2) de proteínas. Portanto, os genes *Dof* de *C. sinensis* apresentam uma classificação semelhante com os de *Arabidopsis* e arroz, mesmo sendo espécies de famílias diferentes como Rutaceae, Brassicaceae e Poacea, respectivamente. Para os 24 membros da família *Dof* de *C. sinensis*, os grupos C e D foram os que apresentaram o maior número de genes (sete e oito, respectivamente), semelhantemente ao encontrado em *Arabidopsis* e arroz, espécies nas quais estes grupos também apresentaram o maior número de genes (Figura 7 e Tabela 3). Em relação a esses dois grupos, é importante mencionar que a subfamília D1 está entre os que apresentam maior número de genes, tanto em *C. sinensis* como nas outras duas espécies usadas na construção da árvore filogenética. Por outro lado, nenhum dos 24 membros da família *CsDof* pôde ser classificado como C3.

Os grupos A e B apresentaram um número similar de genes (cinco e quatro genes, respectivamente), sendo que o grupo B pode ser dividido em duas subfamílias, B1, com 3 membros, e B2, com somente um membro (Figura 7 e Tabela 3). Comparativamente aos dois grupos anteriormente descritos, a distribuição e o número relativo de genes no grupo A e nas subfamílias do grupo B também seguiram padrão similar aos observados em *Arabidopsis* e arroz (Tabela 3).

**FIGURA 7** - Árvore filogenética dos genes *Dof* Os *CsDofs* (*C. sinensis*) foram alinhados com os membros da família *OsDof* (*O. sativa*) e *AtDof* (*A. thaliana*).



Nota: O alinhamento múltiplo foi feito usando o algoritmo MUSCLE e a árvore filogenética construída com o método Neighbor-Joining usando o programa MEGA 6.0. Os números indicam os valores de "bootstrap" para 1000 réplicas e os grupos e subgrupos resultantes estão indicados como A – D e B1, B2, C1, C2.1, C2.2, C3, D1 e D2, respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

**TABELA 3** - Nomeclatura e número de genes *CsDofs* (*C. sinensis*), *OsDofs* (*O. sativa*) e *AtDofs* (*A. thaliana*) classificados em cada grupo e subgrupo, de acordo com a árvore filogenética.

Grupo Subgrupo	<i>C. sinensis</i> CsDofs	# de genes	Ortólogos de <i>A.</i> <i>thaliana</i> AtDofs	# de genes	Ortólogos de <i>O.</i> <i>sativa</i> OsDofs	# de genes	Total # genes por subgrupo
A	18, 7, 15, 17, 19	6	4, 32, 1, 7, 15	5	10, 12, 14, 28, 13	5	16
B1	5, 4, 6	3	13, 20, 11, 29	4	5, 29, 24, 21, 22	5	12
B2	23	1	35, 28	2	0	0	3
C1	10, 20, 8	4	16, 31, 10, 34	6	11	1	16
C2.1	9, 11	2	22, 8, 27, 14, 21	5	26, 16, 17	3	10
C2.2	14, 22	2	2, 19	2	8, 9, 23	3	5
C3	0	0	26, 24, 25, 23	4	0	0	4
D1	16, 1, 2, 3, 24	5	17, 30, 33, 3, 12, 5, 9	6	3, 4, 6, 7, 1, 20, 2	7	18
D2	12, 21, 13	3	6, 18, 36	3	18, 30, 19, 27, 25, 15	6	12

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.5 Estudo da expressão gênica de genes *CsDof* em frutos

Os frutos foram coletados em 6 diferentes estádios de desenvolvimento de acordo com o período de tempo decorrido após a antese (Tabela 4 e Figura 8). Os primeiros frutos que foram coletados em diferentes regiões da copa de várias árvores de laranja-doce cv. 'Pera' mostravam-se em estágio inicial de desenvolvimento e rodeados pelas sépalas em formato de coroa. A partir desta fase, os frutos foram colhidos a cada 15 dias até atingirem o diâmetro médio de 4,3 cm (medido no sentido equatorial, na região de maior diâmetro) e 36,5 g de massa fresca na última coleta, aos 90 dias após a antese. Os dados de diâmetro e massa fresca dos frutos observados neste trabalho são semelhantes aos obtidos por Araujo (2010) em estudo sobre o desenvolvimento de frutos na cultivar Valência.

**TABELA 4** – Diâmetro e massa fresca dos frutos de laranja-doce cv. Pera nos seus primeiros 6 estádios de desenvolvimento.

Estádio de desenvolvimento do fruto	Dias após a antese	Diâmetro do fruto (cm) $\pm$ desvio padrão	Massa fresca (g) $\pm$ desvio padrão
1	15	0,57 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,03
2	30	0,9 $\pm$ 0,05	2,1 $\pm$ 0,05
3	45	1,7 $\pm$ 0,05	6,0 $\pm$ 0,10
4	60	2,9 $\pm$ 0,11	13,0 $\pm$ 0,11
5	75	3,1 $\pm$ 0,5	18,2 $\pm$ 0,05
6	90	4,3 $\pm$ 0,11	36,5 $\pm$ 0,05

N= 5 frutos

Fonte: Elaborado pelo autor.

**FIGURA 8** - Frutos de laranja-doce cv. 'Pera' representativos dos coletados em 6 diferentes estádios de desenvolvimento coletados para as análises de expressão dos genes *CsDof*.



Nota: Da esquerda para direita, frutos com 15, 30, 45, 60, 75, 90 dias após o florescimento.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em tomate, a expressão de genes *Dof* foi estudada e diversos genes foram considerados órgãos-específicos (CAI et al., 2013). Os frutos de *C. sinensis* não apresentam as mesmas estruturas dos frutos de tomate, decidiu-se caracterizar genes da família *Dof* no desenvolvimento dos frutos em *C. sinensis*, uma vez que nesta espécie são relatados poucos estudos de fatores de transcrição envolvidos com o desenvolvimento de frutos. Baseado nos dados de RNA-seq (CITRUS SINENSIS, [2016]), de um total de 24 genes foram selecionados os 12 genes *CsDof*

com maior expressão transcricional em frutos para a análise destes em diferentes estádios de desenvolvimento de frutos na cultivar Pera (Anexo 3).

Foram realizadas reações de RT-PCR preliminares para assegurar que a inexistência de ampliações de fragmentos inespecíficos e contaminação. Todas as amostras analisadas apresentaram somente a produção de *amplicons* de tamanho esperado nas reações de saturação (dados não apresentados).

De acordo com os perfis de expressão de *CsDof* em frutos, os genes foram divididos em três grupos quando comparados à expressão da amostra controle (folhas). No grupo 1 foram classificados com maior expressão relativa (*CsDof1*, *CsDof4*, *CsDof10*, *CsDof16*, *CsDof23*, 8 vezes acima da expressão detectada em folhas). O grupo 2 foi composto de genes com expressão relativa intermediária (*CsDof2*, *CsDof3* e *CsDof9*, acima de 3 vezes do nível de mRNA detectado nas folhas). O restante dos *CsDofs* apresentaram baixo nível ou redução da expressão nos frutos (*CsDof7*, *CsDof12*, *CsDof14* e *CsDof20*, abaixo de 3 vezes) em comparação com o controle (Figura 9).

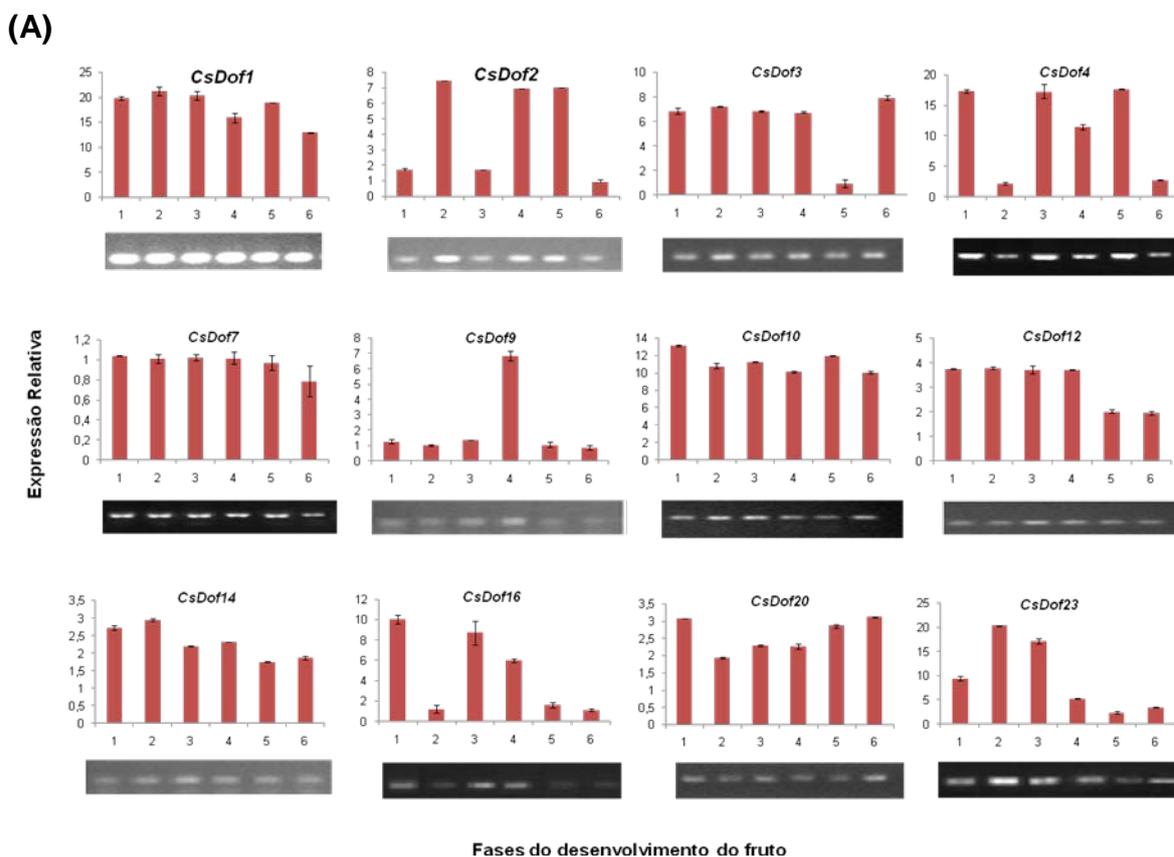
O gene *CsDof1* apresentou maior expressão e manteve uma atividade transcricional elevada em todos os estádios de desenvolvimento do fruto analisados neste trabalho. Diferentemente, o *CsDof23* mostrou um nível de expressão crescente nos primeiros estádios de desenvolvimento seguida de uma grande diminuição conforme a progressão do desenvolvimento do fruto (Figura 9). Outro gene com alta expressão relativa, o *CsDof4*, apresentou uma flutuação acentuada no número de transcritos, com uma grande diminuição nos estádios 2 e 6. Comportamento similar foi observado para o gene *CsDof16* que mostrou um declínio transcricional acentuado nas últimas fases de desenvolvimento do fruto aqui analisadas. Por outro lado, apesar de mostrar menor transcrição que o *CsDof1*, o gene *CsDof10* apresentou expressão relativa moderada e uniforme nos frutos do início ao fim do período de coleta (Figura 9).

Entre os genes com níveis de expressão transcricional intermediária, o gene *CsDof9* apresentou um pico de expressão na fase 4 (frutos com 60 dias após a antese), sendo que nas demais fases sua expressão se manteve estavelmente baixa. Por outro lado, o nível de transcritos do *CsDof3* teve um declínio acentuado na fase 5 (cerca de 7 vezes), sendo que nos demais estádios de desenvolvimento este gene manteve um nível de expressão moderada e estável de cerca de 6 a 7 vezes acima do controle. Já a abundância de transcritos do gene *CsDof2* oscilou

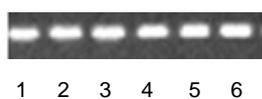
durante os diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos, tendo a sua expressão mais aumentada nos estádios 2, 4 e 5 e reduzida nos estádios 1, 3 e 6 até cerca de 4 vezes em comparação ao apresentado nas folhas.

Entre os genes com baixa expressão relativa, os resultados de RT-PCR semi-quantitativo mostraram que os menores níveis transcricionais foram apresentados pelo gene *CsDof7*. Estes baixos níveis de expressão foram detectados em todas as fases de desenvolvimento do fruto mantiveram um grau similar ao controle (folhas) até 75 dias após a antese, após o que a expressão foi ainda mais reduzida. O *CsDof12* também pertencente ao grupo com baixo nível de expressão, sendo mais expresso no início do desenvolvimento do fruto (até os 60 dias após a antese) e apresentado uma diminuição na abundância de transcritos de cerca de 50% nas fases 5 e 6. Os genes *CsDof14* e *CsDof20* mostraram comportamento similar com o decorrer do processo de maturação dos frutos, mostrando apenas pequenas flutuações dos níveis de expressão, os quais variaram cerca de 2 vezes acima daquela detectada no tecido foliar (controle).

**FIGURA 9** - Perfil de expressão relativa de 12 genes *CsDof* em seis estádios de desenvolvimento do fruto de *C. sinensis* cv. 'Pêra' (A).



(B)



Nota: Os valores são médias de 3 replicatas biológicas independentes. Barras de erro indicam o desvio padrão. (B) Gel do RT-PCR semi-quantitativo do gene normalizador *CsEF1- $\alpha$* .

## 6 DISCUSSÃO

A regulação da transcrição é um dos mecanismos mais importantes da expressão gênica. O número, a posição e a interação entre diferentes elementos de transcrição/regulatórios de um promotor de um dado gene determina o seu padrão de expressão. A ativação da transcrição em taxas mais altas requer a ligação de proteínas, chamadas de fatores de transcrição, aos elementos regulatórios no DNA ao redor do gene. Famílias de genes de fatores de transcrição são classificadas de acordo com a presença de domínios de ligação ao DNA específicos.

Em *C. sinensis*, até o presente momento, somente algumas famílias de fatores de transcrição, tais como NAC (OLIVEIRA et al., 2011), MADS-BOX (HOU et al., 2014), CCH-dedo de zinco (LIU et al., 2014) e ARFs (LI et al., 2015) foram devidamente caracterizadas. O sequenciamento do genoma desta espécie (XU et al., 2013) forneceu uma oportunidade de utilizar ferramentas de bioinformática para analisar em detalhe o conjunto completo de genes desta espécie e caracterizar as várias famílias de fatores de transcrição conhecidas.

Entre os diferentes fatores de transcrição, os genes *Dof* representam uma família envolvida em múltiplas funções exclusivamente em plantas e apresentam o motivo dedo-de-zinco (*zinc-finger*). Os fatores de transcrição *Dof* foram associados com a regulação de processos vitais em plantas, tais como a assimilação fotossintética de carbono, acúmulo e armazenamento de proteínas em sementes, germinação, dormência, resposta a fitormônios, tempo de floração e expressão de genes específicos das células-guarda (YANAGISAWA et al., 2004; NOGUEIRO et al., 2013). Por estarem envolvidos em importantes processos biológicos em plantas, as funções e a evolução dos genes *Dofs* foram estudadas em várias espécies, tais como *Arabidopsis* e arroz (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA, 2003), milho (JIANG et al., 2010), álamo (YANG; TUSKAN; CHENG, 2006), cevada (SHIGYO et al., 2007), *Chlamydomonas reinhardtii* (MORENO-RISUENO et al., 2007), trigo (SHAW et al., 2009), sorgo (KUSHWAHA et al., 2011), tomate (CAI et al., 2013), couve-chinesa (MA et al., 2015), banana (FENG et al., 2016) e cenoura (HUANG et al., 2016).

Existe uma grande diversidade em termos de número de genes que codificam os fatores de transcrição *Dof* em plantas. Vários trabalhos descreveram

diversos genes *Dof* em arroz (30), arábida (36), sorgo (28), *Brachypodium distachyon* (27), banana (74), tomate (34) e couve-chinesa (76), respectivamente (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA, 2003; KUSHWAHA et al., 2011; HERNANDO-AMADO et al., 2012; D'HONT et al., 2012; CAI et al., 2013; MA et al., 2015). No entanto, há poucos estudos sobre estes fatores de transcrição em árvores frutíferas (WU; FU; YI, 2016) e pouca informação sobre a sua expressão durante o desenvolvimento de frutos de interesse econômico. Assim, neste trabalho, foi realizado um estudo para identificar os genes da família *Dof* em bancos de dados genômicos para apresentar uma análise completa desta família de genes em *C. sinensis*, incluindo as estruturas íntron-éxon, localização nos cromossomos, comparação filogenética com outras espécies e expressão transcricional de alguns dos genes *Dof* em diferentes estádios iniciais do desenvolvimento do fruto.

Através deste estudo foi possível identificar 24 genes *CsDof* nas sequências disponíveis em banco de dados de *C. sinensis* (CITURS SINENSIS, [2016]; CITRUS GENOME DATA BASE, [2016]; JGI, [2016]), os quais foram classificados pela presença de um domínio de *Dof* altamente conservado. Comparativamente a outras espécies, onde o número de membros da família *Dof* variam de 30 a 90 genes (MA et al., 2015). *C. sinensis* possui um número pequeno de genes (24) desta família. Apesar dos genomas apresentarem diferentes tamanhos, *C. sinensis* com 367 Mbp enquanto que o do sorgo com 750 Mbp (PATERSON et al., 2009) e de *B. distachyon* de 272 Mb (VOGEL et al., 2010), o número de genes *Dof* encontrados em *C. sinensis* é semelhante ao encontrado em sorgo (KUSHWAHA et al., 2011) e *B. distachyon* (HERNANDO-AMADO et al., 2012). É importante ressaltar que, até a presente data, o genoma de *C. sinensis* foi montado com 320,5 Mbp, o que representa cerca de 87% do genoma (XU et al., 2013), desta forma é possível que mais genes *CsDof* possam ainda ser identificados.

Do total de 24 *CsDofs*, 16 deles apresentaram íntrons (Figura 6 e Tabela 7). Semelhantemente a outros genes *Dof* em arroz e arábida (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA, 2003), sorgo (KUSHWAHA et al., 2011) e tomate (CAI et al., 2013), os genes *CsDof* também apresentaram de um a dois íntrons em cada gene. Isto é distinto do encontrado em *B. distachyon*, onde a maioria dos genes *Dof* não possui íntrons, sendo que somente 11 deles apresentaram de um a dois íntrons (HERNANDO-AMADO, 2012).

Os *CsDofs* estão distribuídos em todos os cromossomos, exceto nos cromossomos 4 e 9. As mais altas densidades de distribuição dos *CsDof* foram encontradas nos cromossomos 1, 2 e 5, os quais apresentaram 4 genes por cromossomo. Em menor número, foram assinalados 2 genes *CsDofs* em cada um dos cromossomos 3, 8 e no “scaffold” não montado (Un). Os demais genes *CsDof* localizam-se aleatoriamente por todo o genoma. Comparativamente, em arroz, os 30 genes *Dof* foram organizados em 11 dos 12 cromossomos, com número máximo de 6 genes *Dof* distribuídos nos cromossomos 1 e 3, enquanto que os 36 genes *Dof* de *Arabidopsis* estão distribuídos entre todos os cinco cromossomos com um máximo de 9 genes no cromossomo 1 (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA, 2003; KUSHWAHA et al., 2011). Em tomate 34 genes *Dofs* foram distribuídos em 12 cromossomos, exceto nos cromossomos 7 e 12 que não apresentaram nenhum *Dof* (CAI et al., 2013).

Genes homólogos são designados ortólogos e parálogos. Ortólogos quando estes foram separados por um evento de especiação onde cada cópia do gene divergiu para duas espécies distintas com a mesma função. Parálogos são genes originados por um evento de duplicação dentro do genoma da mesma espécie, ocupando diferentes posições com funções distintas (GRIFFITHS, 2009). Duplicações segmentares, duplicações em tandem e eventos de transposição são as principais causas para expansão de famílias de genes. Dois ou mais genes, sendo localizados no mesmo cromossomo podem ser originários de um evento de duplicação em tandem, enquanto que a duplicação de genes entre diferentes cromossomos é designada como um evento de duplicação segmentar (LIU et al., 2011). Cai et al. (2013), em tomate, detectou 11 pares de genes parálogos, 8 oriundos de eventos de duplicação segmentar aleatoriamente espalhados por todo o genoma, enquanto que 3 situados num mesmo cromossomo foram indicados como eventos de duplicação em tandem. Neste trabalho, somente um par de parálogos putativos foi identificado (*CsDof1* e *CsDof3*, mapeados nos cromossomos 5 e 6). Portanto, o agrupamento dos genes *CsDofs* parece ser resultado de duplicações segmentais oriundas de fusões e translocações cromossomais derivadas da origem híbrida de *C. sinensis* proveniente do cruzamento entre *C. grandis* e *C. reticulata* (XU et al., 2013), e não de duplicações em tandem, seguidas pela retenção dos parálogos resultantes. Liu et al. (2014), em uma análise da família dos fatores de transcrição dedo-de-zinco CCCH em laranja clementina (*Citrus x clementina*),

também observou a presença de poucos parálogos em citros, sugerindo que a ocorrência de duplicações em plantas cítricas é muito menos prevalente quando comparados com *Arabidopsis* e arroz.

A análise comparativa dos genes da família *Dof* de laranja-doce com os de arroz e *Arabidopsis* pode auxiliar a estabelecer as relações filogenéticas entre os genes *CsDof* e inferir a história evolutiva desta família de genes. Para tanto, uma árvore filogenética, com base no alinhamento de sequências das proteínas *Dof* (Figura 7) foi construída. Esta análise indicou a existência de 4 grupos (A, B, C e D) e 9 subgrupos (A, B1, B2, C1, C2.1, C2.2, C3, D1, D2) de genes *CsDof* (Figura7). O grupo D1 apresentou o maior número de genes (18 membros) enquanto que o menor grupo foi o B2 com 3 membros. Esses resultados foram semelhantes aos foram obtidos em tomate (CAI et al., 2013), couve-chinesa (MA et al., 2015) e banana (FENG et al., 2016), espécie esta onde o grupo D1 se destacou por ser o grupo com mais membros (23, 21, 25).

O agrupamento e a classificação dos genes *CsDof* mostram uma grande similaridade com a encontrada por Lijavetzky, Carbonero e Vicente-Carvajosa (2003) em *Arabidopsis* e arroz. Como esperado pelo tempo de divergência evolutiva de monocotiledônias e dicotiledônias (WOLFE et al., 1989), os genes *CsDof* foram agrupados mais próximos aos seus ortólogos de *Arabidopsis* (Figura 7). Kushwaha et al. (2011) encontrou grande similaridade entre *AtDof17*, *AtDof30* e *AtDof33* em *arabidopsis*, que são as proteínas também denominadas CDF (Cycling Dof Factor) e estão associadas à regulação do fotoperíodo e controle da floração (IMAIZUMI et al., 2005; FORNARA et al., 2009). Neste trabalho, esses três *Dofs* de *arabidopsis* foram agrupados no grupo D1 juntamente com os *CsDof* 1, 2, 3 e 16 os quais são mais expressos em frutos de acordo com os dados RNAseq (CITRUS SINENSIS, [2016]). Já o gene que codifica para o *AtDof18* (OBP1), que segundo Skirycz et al. (2008) está envolvido na regulação do ciclo celular, está classificado no grupo D2, próximo do *CsDof13*.

Em *Arabidopsis*, os genes *AtDof 23, 24, 25 e 26*, pertencentes ao clado C3 formam um grupo separado dos demais *Dofs*, semelhante ao o que foi relatado anteriormente por diversos autores (LIJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA, 2003; CAI et al., 2013; HUANG et al., 2016, MA et al., 2015). Estes genes *AtDofs* estão presentes em poucas espécies, principalmente em crucíferas, sendo que nenhum homólogo aparente foi observado em arroz, tomate, cenoura,

repolho chinês, banana (FENG et al., 2016) e, também, neste trabalho com *C. sinensis*.

Os genes *Dofs* pertencentes aos mesmos grupos e subgrupos não apresentam estrutura e arquitetura de domínios similares, o que sugere que estes genes podem ter diferentes funções moleculares e biológicas. Uma vez que os padrões de expressão dos genes podem fornecer informações importantes para a função dos mesmos, neste estudo analisamos o perfil transcricional de 12 de genes *CsDof* em diferentes estádios de desenvolvimento de frutos. A escolha desses genes foi baseada nos dados de expressão de RNA-seq (CITRUS SINENSIS, [2016]), que mostraram que o fruto foi a estrutura da planta onde o maior número de genes *CsDof* foram expressos.

O amadurecimento do fruto é um processo altamente complexo que envolve mudanças importantes na cor, sabor, aroma, textura e conteúdo nutricional da polpa, sendo controlado por redes de regulação transcricional que envolvem vários fatores de transcrição (GIOVANNONI, 2004; KLEE; GIOVANNONI, 2011; MARTEL et al., 2011; GAPPER; MCQUINN; GIOVANNONI, 2013; SEYMOUR et al., 2013a, b; CHERIAN; FIGUEROA; NAIR, 2014). Ao longo dos últimos anos, mais e mais fatores de transcrição relacionados com o amadurecimento de frutos, como as famílias MADS-box / NAC / NOR, CNR, ERF e Dof têm sido relatados (ELITZUR et al., 2010; YIN et al., 2010; KLEE; GIOVANNONI, 2011; SEYMOUR et al., 2011; CAI et al., 2013; KARLOVA et al., 2014).

Segundo Araújo et al. (2010) o desenvolvimento dos frutos de *C. sinensis* pode ser dividido em 3 fases, sendo a primeira relativa aos cerca de 21 dias iniciais de desenvolvimento, a segunda fase de 120 dias de crescimento acelerado e uma terceira fase caracterizada pela desaceleração do desenvolvimento iniciada aproximadamente 160 dias após a antese. Nesse trabalho os frutos foram coletados de 15 até 90 dias de desenvolvimento do fruto (Figura 9), com o intuito de analisar a expressão dos genes *Dofs* somente nas fases iniciais e de rápido crescimento dos frutos.

Conforme esperado, os genes *CsDof* analisados mostraram diferente níveis de expressão no decorrer dos diferentes estádios de desenvolvimento do fruto. A expressão de transcritos do gene *CsDof1* foi a mais alta em todos os estádios analisados, indicando que este gene provavelmente possui um papel importante no desenvolvimento dos frutos de laranja-doce. Ao contrário, o *CsDof7* foi

o menos expresso nos 6 estádios amostrados. Especificamente no início do desenvolvimento dos frutos (estádio 1 até os 15 dias após a antese), os genes mais expressos foram os *CsDof1*, *4*, *10*, *16* e *23*, os quais apresentaram uma posterior diferenciação no nível de transcritos entre eles nos demais estádios, como podemos observar notadamente com o *CsDof23*. Cai et al. (2013) trabalhando com genes da família *Dof* em tomate, destacou que os genes *SIDof3*, *SIDof22* e *SIDof32* tiveram uma expressão mais alta em frutos indicando que eles poderiam desempenhar um papel chave no desenvolvimento deste órgão. Feng et al. (2016), estudando 25 genes *Dof* em banana observaram diferentes padrões de expressão de *MaDofs* durante o amadurecimento do fruto, sendo que os genes *MaDof2*, *3*, *10*, *20*, *23*, *24* e *25* foram induzidos com a aplicação de etileno e atingiram o seu nível máximo após 3 a 5 dias de armazenamento. Na árvore filogenética podemos observar que *CsDof1* e *16*, com alta expressão em fruto, foram agrupados no subgrupo D1, da mesma forma que outros trabalhos os genes *SIDofs3* e *SIDof22* de tomate (CAI et al., 2013) e os genes *MaDof2*, *3*, *10* e *20* de banana (FENG et al., 2016) também foram classificados no grupo D1 sendo também os mais expressos. Este subgrupo D1 apresenta o maior número de membros nas espécies mencionadas acima, como também em *C. sinensis*.

Comparando com os dados do RNA-seq (JIAO et al., 2013; CITRUS SINENSIS, [2016]) (Anexo 3) com os obtidos por RT-PCR semi-quantitativo obtidos neste trabalho, foi possível verificar que os genes (*CsDof1*, *2*, *7*, *10*, *12*, *14* e *16*) apresentaram uma expressão relativa similar entre os dois métodos, com uma abundância de transcritos bem maior nos frutos do que nas folhas. Destes, destacam-se os genes *CsDof1* e *CsDof10*, que apresentaram alto nível de expressão transcricional em todos os estádios de desenvolvimento dos frutos. Entretanto, alguns genes não mostraram níveis similares de expressão nos frutos em relação aos observados nas folhas quando comparados com os perfis de expressão obtidos por RNA-seq. Por exemplo, enquanto os genes *CsDof3* e *CsDof23* mostraram respostas transcricionais semelhantes entre frutos e folhas pelos dados de RNA-seq, aqui os resultados obtidos com RT-PCR semi-quantitativo mostraram que isto só ocorreu no estágio 5 (75 dias após a antese) e após o estágio 4 (60 a 90 dias após a antese) para os genes *CsDof3* e *CsDof23*, respectivamente. Convém ressaltar que diferentemente dos dados de RNA-seq obtidos por de Jiao et al. (2013) e apresentados no banco de dados “*Citrus sinensis* – Annotation Project”,

neste trabalho as amostragens foram realizadas em diferentes estádios de desenvolvimento do fruto, desta maneira podem particularizar níveis de expressão, ao contrário dos dados de RNA-seq que se referem ou a uma amostragem de frutos em um único estágio ou a um pool de estádios de desenvolvimento. Adicionalmente, salienta-se que estas poucas divergências podem ser devidas às diferentes capacidades de detecção da quantidade de transcritos entre os dois métodos de análise, à utilização de diferentes genótipos e/ou à complexidade biológica resultante dos efeitos ambientais nos locais de cultivo das plantas utilizadas para a coleta dos frutos.

## 7 CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta uma completa identificação e análise dos genes da família de fatores de transcrição *Dof* em *C. sinensis*. Um total de 24 genes *Dof* completos foram identificados no genoma de *C. sinensis*. De acordo com a estrutura, as características das proteínas, a análise filogenética, e a comparação com homólogos de arroz e arábido, os genes *Dof* foram agrupados em quatro grupos (A, B, e C) e 9 subgrupos (A, B1, B2, C1, C2.1, C2.2, C3, D1, D2). Somente um evento de duplicação foi identificado nos cromossomos de *C. sinensis*. Os dados de expressão diferencial de transcritos de 12 genes *Dofs* em diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos evidenciaram que eles desempenham um importante papel na regulação do desenvolvimento de frutos. Consideradas em conjunto, estas informações podem trazer novos recursos para futuras análises funcionais da família de genes *Dof* em *Citrus* e em outras espécies frutíferas.

## REFERÊNCIAS

- AGUSTÍ, M. et al. **Desarrollo y tamaño final del fruto em los agrios**. 32 ed. Valência: Generalitat Valenciana, 1995. 80p.
- AHMAD, M. et al. Functional characterization of Arabidopsis Dof transcription factor AtDof4.1. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.60, p.116–123, jan. 2013.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3 p.403–410, out. 1990.
- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (eds) **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. v.1, p.125-145.
- ARAÚJO, P. **Análise do padrão de expressão dos genes da família Mads-Box durante o desenvolvimento do fruto de *Citrus sinensis***. 2010. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2010.
- BAIN, J.M. Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange. (*Citrus sinensis* (L) Osbeck). **Australian Journal of Botany**, v.6, n.1, p.1-23, 1958.
- BAUSHER, M.G. et al. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var “Ridge Pineapple”: organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. **BMC Plant Biology**, v6, n.21, p.1-11, set. 2006.
- CAI, X. et al. Genome-wide analysis of plant-specific dof transcription factor family in tomato. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.55, n.6, p.552-566, jun. 2013.
- CASTRO, E. Scan Prosite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Research**, v.34 p.W362–W365, jul. 2006.
- CAVALAR, M. et al. A drastic reduction in DOF1 transcript levels does not affect C-4-specific gene expression in maize. **Journal of Plant Physiology**, v.164, n.12, p.1665–1674, dez. 2007.
- CERCÓS, M. et al. Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. **Plant Molecular Biology**, v.62, n.4, p.513-527, nov. 2006.
- CHERIAN, S.; FIGUEROA, C.R.; NAIR, H. ‘Movers and shakers’ in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus nonclimacteric fruit. **Journal of Experimental Botany**, v.65, n.17, p.4705–4722, jul. 2014.
- CITRUS GENOME DATABASE. [2016]. Disponível em: <<https://www.citrusgenomedb.org/>>. Acesso em: 01 fev 2015.

CITRUS SINENSIS. [2016]. Disponível em: <<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>>. Acesso em: 01 fev 2015.

D'HONT, A. et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, v.488, p.213–217, jul. 2012.

DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. **Crop production science in horticulture 2: citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254p.

DIAZ, I. et al. The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. **The Plant Journal**, v.29, n.4, p.453–464, fev. 2002.

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: Mattos Júnior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Júnior, J. (eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, 2005. p.1-18.

ELITZUR, T. et al. The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.5, p.1523–1535, mar. 2010.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 2006.

ENDO, T. et al. Cloning and characterization of 5 MADS-box cDNAs isolated from citrus fruit tissue. **Scientia Horticulturae**, v.109, n.4, p.315–321, ago. 2006.

ENGEL, M.L et al. Green Sperm. Identification of male gamete promoters in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.138, p.2124–2133, ago. 2005.

EULGEM, T. et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends Plant Science**, v.5, n.5, p.199–206, mai. 2000.

FENG, B.H. et al. The banana fruit Dof transcription factor MaDof23 acts as a repressor and interacts with MaERF9 in regulating ripening-related genes. **Journal of Experimental Botany**, v.67, n.8, p. 2263-2275. fev. 2016.

FINN, R.D., et al. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.D247–D251, jan. 2006.

FORNARA, F. et al. Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce constans expression and are essential for a photoperiodic flowering response. **Developmental Cell**, v.17, n.1, p.75–86, 2009.

GAPPER, N.E.; MCQUINN, R.P.; GIOVANNONI, J.J. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. **Plant Molecular Biology**, v.82, n.6, p.575–591, ago. 2013.

GCONCI. **Grupo de Consultores em Citros**. 2009. Disponível em: <<http://www.gconci.com.br/>>. Acesso em: 17 mar. 2013.

GIOVANNONI, J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell**, v.16, n.supl., p.S170–S180, mar. 2004.

GMITTER, F.G. et al. Citrus genomics. **Tree Genetics & Genomes**, v.8, p.611–626, abr. 2012.

GOODSTEIN, D.M. et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v.40, p.1178–1186, jan. 2012.

GRIFFITHS, A.J.F. **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 712p.

GUALBERTI, G. et al., Mutations in the Dof zinc finger genes DAG2 and DAG1 influence with opposite effects the germination of Arabidopsis seeds. **The Plant Cell**, v.14, n.6, p.1253–1263, jun. 2002.

GUO, Y.; QIU, L.J. 7-Genome-wide analysis of the dof transcription factor gene family reveals soy bean-specific duplicable and functional characteristics. **PLoS One**, v.8, n.9, p.e76809, set. 2013.

GUPTA, S. et al. Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor. **Planta**, v.241, p.549-562, mar. 2015.

HERNANDO-AMADO, S. et al. The family of DOF transcription factors in *Brachypodium distachyon*: phylogenetic comparison with rice and barley DOFs and expression profiling. **BMC Plant Biology**, v.12, n.202, p.1-12, nov. 2012.

HOU, X. et al. Genome-wide identification, classification, expression profiling, and SSR marker development of the MADS-Box gene family in citrus. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.32, p.28–41, fev. 2014.

HUANG, W. et al. Dof transcription factors in carrot: genome-wide analysis and their response to abiotic stress. **Biotechnology Letters**, v.38, n.1, p.145–155, jan. 2016.

HUANG, et al. Dof transcription factors in carrot: genome-wide analysis and their response to abiotic stress. **Biotechnol Lett**, v.38 p.145–155, 2016.

HUFF, A. Sugar regulation of plastid interconversions in epicarp of citrus fruit. **Plant Physiology**, v.76, n.2, p.307-312, out. 1984.

IGLESIAS D.J. et al. Physiology of citrus fruiting. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.4, p.333-362, out/dez. 2007.

IMAIZUMI, T. et al. FKF1 F-BOX protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. **Science**, v.309, n.5732, p.293–297, 2005.

JAKOBY, M. bZIP transcription factors in Arabidopsis. **Trends Plant Science**, v.7, n.3, p.106–111, mar. 2002.

JGI. **Phytozome 11**. [2016]. Disponível em:  
<<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>>. Acesso em: 01 fev 2015.

- JIANG, H.Y. et al. Genome-wide analysis of Dof transcription factor family genes in maize. **China Journal Bioinformatics**, v.8, p.198–201, 2010.
- JIAO, W.B. et al. Genome-wide characterization and expression analysis of genetic variants in sweet Orange. **The Plant Journal** v.75,p 954–964, 2013.
- KARLOVA, R. et al. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. **Journal of Experimental Botany**, v.65, n.16, p.4527–4541, 2014.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**, 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 452p.
- KISU, Y. et al. Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. **Plant Cell Physiology**, v.39, n.10, p.1054–1064, 1998.
- KLEE, .HJ.; GIOVANNONI, J.J. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. **Annual Review of Genetics**, v.45, p.41–59, dez. 2011.
- KLOOSTERMAN, B. et al. Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. **Nature**, v.495, p.246–250, mar. 2005.
- KOEHLER-SANTOS, P.; DORNELLES, A.L.C.; FREITAS, L.B. Characterization of mandarin citrus germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.7, p.797-806, jul. 2003.
- KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. Sequential activation of two Dof transcription factor gene promoters during vascular development in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology Biochemistry**, v.45, n.8, p.623-629, 2007.
- KREBS, J.; MUELLER-ROEBER, B.; RUZICIC, S. A novel bipartite nuclear localization signal with an atypically long linker in DOF transcription factors. **Journal of Plant Physiology**, v.167, n.7, p.583–586, mai. 2010.
- KROHN, N.M.; YANAGISAWA, S.; GRASSER, K.D. Specificity of the stimulatory interaction between chromosomal HMGB proteins and the transcription factor Dof2 and its negative regulation by protein kinase CK2-mediated phosphorylation. **The Journal Biological Chemistry**, v.277, p.32438-32444, 2002.
- KUSHWAHA, H. et al. Genome wide identification of Dof transcription factor gene family in sorghum and its comparative phylogenetic analysis with rice and Arabidopsis. **Molecular Biology Reports**, v.38, n.8, p.5037-5053, nov. 2011.
- LI, S.B. et al. Genome-wide identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). **Frontiers Plant Science**, v.6, p. 119, mar. 2015.
- LI, X. et al. The origin of cultivated citrus as inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequence and amplified fragment length polymorphism fingerprints. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.135, n.4, p.341–50, jul. 2010.

LIJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; VICENTE-CARBAJOSA, J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. **BMC Evolutionary Biology**, v.23, n.3, p.1-11, jul. 2003.

LIU, Q. et al. Transcriptome analysis of a spontaneous mutant in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] during fruit development. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.3, p. 801-813, mar. 2009.

LIU, S. et al. Comprehensive analysis of CCCH-type zinc finger gene family in citrus (Clementine mandarin) by genome-wide characterization. **Molecular Genetics and Genomics**, v.289, n.5, p.855-872, out. 2014.

LIU, Y. et al. Genome-wide analysis of the auxin response factor (ARF) gene family in maize (*Zea mays*). **Plant Growth Regulation**, v.63, n.3., p.225–234, abr. 2011.

LORENZI, H. et al. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672p.

MA, J. et al. Genome-wide analysis of Dof family transcription factors and their responses to abiotic stresses in Chinese cabbage. **BMC Genomics**, v.16, n.33, 2015.

MACHADO, M.A. et al. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JÚNIOR, D. et al. (eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.221- 277.

MARTEL, C. et al. The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. **Plant Physiology**, v.157, n.3, p.1568–1579, 2011.

MARTIN, C.; PAZ-ARES, J. MYB transcription factors in plants. **Trends in Genetics**, v.13, p.67–73, fev. 1997.

MARTINEZ, M. et al. The barley cystatin gene (*lcy*) is regulated by DOF transcription factors in aleurone cells upon germination. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.547–556, fev. 2005.

MARZABAL, P. et al. The maize Dof protein PBF activates transcription of gamma-zein during maize seed development. **Plant Molecular Biology**, v.67, n.5, p.441–454, jul. 2008.

MOORE, G.A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. **Trends in Genetics**, v.17, p.536–540, set. 2001.

MORENO-RISUENO, M.A. et al. The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. **Molecular Genetics and Genomics**, v.277, n.4, p.379–390, abr. 2007.

NAKANO, T. et al., Identification of genes of the plant-specific transcription-factor families cooperatively regulated by ethylene and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*, **Journal of Plant Research**, v.119, n.4, p.407–413, jul. 2006.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. [2016]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 02 fev 2015.

NICOLOSI, E. Origin and Taxonomy. In: KHAN, I. A. Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. **CAB International**, 2007.

NOGUERO, M. et al. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. **Plant Science**, v.209, p.32–45, ago. 2013.

OLIVEIRA, T.M. et al. Analysis of the NAC transcription factor gene family in citrus reveals a novel member involved in multiple abiotic stress responses. **Tree Genetics & Genomes**, v.7, n.6, p.1123-1134, jun. 2011.

PAPI, M. et al., Identification and disruption of an Arabidopsis zinc finger gene controlling seed germination. **Genes & Development**, 14, n.1, p.28–33, jan. 2000.

PARENICOVA, L. et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. **The Plant Cell**, v.15, n.7. p.1538–1551, jul. 2003.

PATERSON, A.H. et al. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. **Nature**, v.457, n.7229, p.551–556, jan. 2009.

PIO, R. M. et al. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D. et al. (ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. cap.3, p.39-60.

PLESCH, G.; EHRHARDT, T.; MUELLER-ROEBER, B. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. **The Plant Journal**, v.28, n.4, p.455-464, nov. 2001.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-Enxertos. In: MATTOS JÚNIOR, D. et al. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p. 61-104.

POZZAN, M.; TRIBONI, H.R. Colheita e qualidade do fruto. In: MATTOS JÚNIOR, D. et al. (ed). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.799-822.

PRASANNA, V.; PRABHA, T.N.; THARANATHAN, R.N. Fruit ripening phenomena- An overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47, n.1 p.1-19, jan. 2007.

PRIMER3. [2016]. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>> . Acesso em: 15 Jan 2015.

PRIMER-BLAST. [2016]. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>. Acesso em: 15 Jan 2015.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; BLUMER, S. Morfologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D. et al. (ed). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.106-122.

RADMANN, E.B.; OLIVEIRA, R.P. Caracterização de cultivares apirênicas de citros de mesa por meio de descritores morfológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p.1123-1129, 2003.

RASBAND, W.S. **ImageJ**. Bethesda, Maryland: U. S. National Institutes of Health, 1997-2014.

RESENDE, P.A. **Estudos morfofisiológicos e genéticos da característica folha enrolada em genótipos de laranja doce**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas – SP, 2012.

REYES, J.C.; MURO-PASTOR, M.I.; FLORENCIO, F.J. The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, v.134, n.4, p.1718–1732, abr. 2004.

ROGERS, L.A. et al. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. **New Phytologist**, v.168, p.123–140, 2005.

ROOSE, M.L.; CLOSE, T.J. Genomics of citrus, a major fruit crop of tropical and subtropical regions. In: MOORE, P.H.; MING, R. (ed.). **Genomics of Tropical Crop Plants**. New York: Springer, 2008. cap.8, p.187–201.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the World Wide Web for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (ed.). **Bioinformatics Methods and Protocols: methods in molecular biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p.365–386.

RUEDA-LOPEZ, M. et al. Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. **The Plant Journal**, v.56, n.1, p.73–85, out. 2008.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n.4 p.406–425. Jul. 1987.

SANTOS, L.A.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. OsDof25 expression alters carbon and nitrogen metabolism in Arabidopsis under high N-supply. **Plant Biotechnology Reports**, v.6 p.327–337, out. 2012.

SAUNT, J. **Citrus varieties of the world: an illustrated guide**. Norwich: Sinclair International Limited, 1990. 128p.

SCHNEIDERREIT, A.; IMLAU, A.; SAUER, N. Conserved cis-regulatory elements for DNA-binding-with-one-finger and homeo-domain-leucine-zipper transcription factors regulate companion cell-specific expression of the Arabidopsis thaliana SUCROSE TRANSPORTER 2 gene. **Planta**, Heidelberg, v.228, n.4, p.651–662, jun. 2008.

SEYMOUR, G.B. et al. A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.3, p.1179–1188, jan. 2011.

SEYMOUR, G.B., et al. Fruit development and ripening. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p.219–241, 2013a.

SEYMOUR, G.B. et al. Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. **Plant Biotechnology Journal**, v.11, n.3, p.269–278, abr. 2013b.

SCHWARZ, S. F. Melhoria genética e variedades. In: KOLLER, O. C. (Org.). **Citricultura: 1. Laranja: Tecnologia de produção, pós-colheita, industrialização e comercialização**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006. p. 41-54.

SHAW, L.M. et al. Members of the Dof transcription factor family in *Triticum aestivum* are associated with light-mediated gene regulation. **Functional Integrative Genomics**, v.9, n.4, p.485–498, nov. 2009.

SHIGYO, M, et al. Evolutionary processes during the formation of the plant-specific Dof transcription factor family. **Plant Cell Physiology**, v.48, n.1, p.179–185, jan. 2007.

SHIMADA, T. et al. Toward comprehensive expression profiling by microarray analysis in citrus: monitoring the expression profiles of 2213 genes during fruit development. **Plant Science**, v.168, n.5, p.1383-1385, mai. 2005.

SHIMOFURUTANI, N. et al. Functional analyses of the Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain, in a pumpkin DNA-binding protein AOBP. **FEBS Letters**, v.430, p.251–256, jul. 1998.

SKIRYCYZ, A. et al. The DOF transcription factor OBP1 is involved in cell cycle regulation in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.56, p.779–792, dez. 2008.

SKIRYCYZ, A. et al. Transcription factor AtDOF4;2 affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v.175, n.3, p.425–438, ago. 2007.

SONG, Y.H. et al. FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. **Science**, v.336, n.6084, p.1045–1049, mai. 2012.

SWINGLE, W.T.; REECE, R.C. The botany of Citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELLOR, L.D.; WEBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967, p.190-430.

TAIR. [2016]. Disponível em: <<https://www.arabidopsis.org/>>. Acesso em 15 fev. 2015.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.12, p.2725–2729, out. 2013.

TANAKA, M. et al. Altered carbohydrate metabolism in the storage roots of sweet potato plants overexpressing the *SRF1* gene, which encodes a Dof zinc finger transcription factor. **Planta**, 230, n.4, p.737–746, set. 2009.

THOMPSON, J.D. et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.24, p.4876–4882, mar. 1997.

UMEMURA, Y. et al. The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys<sup>2</sup>/Cys<sup>2</sup> Zn finger domain. **The Plant Journal**, v.37, n.5, p.741–749, mar. 2004.

VICENTE-CARBAJOSA, J. et al. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, n.14, p.7685–7690, jul. 1997.

VOGEL, J.P. et al. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Nature**, v.463, n.11, p.763-768, fev. 2010.

WANG, H.W. et al. The soybean Dof-type transcription factor genes, GmDof4 and GmDof11, enhance lipid content in the seeds of transgenic Arabidopsis plants, **The Plant Journal**, v.52, n.4, p.716–729, set. 2007.

WEI, P.C. et al. Over expression of AtDOF4.7, an Arabidopsis DOF family transcription factor, induces floral organ abscission deficiency in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.153, n.3, p.1031–1045, 2010.

WOLFE, K.H. Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 16, p. 6201–6205, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2762323> Acesso em 24 fev 2015.

WU, G.A. et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nature Biotechnology**, v.32, n.7, p.656–662, 2014a.

WU, J. et al. An integrative analysis of the transcriptome and proteome of the pulp of a spontaneous late-ripening sweet orange mutant and its wild type improves our understanding of fruit ripening in citrus. **Journal of Experimental Botany**, v.65, n.6, p.1651-1671, abr. 2014b.

WU, J.; FU, L.; YI, H. Genome-wide identification of the transcription factors involved in citrus fruit ripening from the transcriptomes of a late ripening sweet orange mutant and its wild type. **Plos One**, v.11, n.4, e0154330, 2016.

XU, Q. et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature Genetics**, v.45, n.1, p.59-66, jan. 2013.

YANAGISAWA, S. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. **Plant Cell Physiology**, v.45, n.4, p.386–391, abr. 2004.

YANAGISAWA, S. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. **The Plant Journal**, v.21, n.3, p.281–288, 2000.

YANAGISAWA, S. The transcriptional activation domain of the plant-specific Dof1 factor functions in plant, animal, and yeast cells. **Plant Cell Physiology**, v.42, n.8, p.813–822, ago. 2001.

YANAGISAWA, S.; SCHMIDT, R.J. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. **The Plant Journal**, v.17, n.2, p.209–214, jan. 1999.

YANAGISAWA, S.; SHEEN, J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. **The Plant Cell**, v.10, n.1, p.75–89, jan. 1998.

YANG, S. et al. Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species. **Molecular Genetics and Genomics**, v.280, n.3, p.187–198, set. 2008.

YANG, X.; TUSKAN, G.A.; CHENG, M.Z. Divergence of the Dof gene families in poplar, *Arabidopsis*, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication. **Plant Physiology**, v.142, p.820–830, nov. 2006.

YE, J.L. et al. Comprehensive analysis of expressed sequence Tags from the Pulp of the Red Mutant 'Cara Cara' Navel Orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Journal of Integrative Plant Biology**, v.52, n.10, p.856-867, mai. 2010.

YIN, X.R. et al. Kiwifruit *EIL* and *ERF* genes involved in regulating fruit ripening. **Plant Physiology**, v.153, n.3, p.1280–1292, jul. 2010.

YU, K. et al. Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). **BMC Genomics**, v.13, n.10, p.1-13, jan. 2012.

ZHANG, B. et al. Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. **The Plant Cell**, v.7, n.12, p.2241–2252, dez. 1995.

## ANEXOS

### Anexo 01. Sequências completas de aminoácidos das proteínas CsDof.

#### CsDof1

MAEPKDQGIKLFGRITIPLEVTSPVGAAPSVDIDQDPTCSTNSSRESKSRDGEERDS  
 EKEMSVDKPVETKQDEAPPENSEESTNPGSTSGISENPKASPVEKECTTVKTSKTEEEQ  
 SEPSTSQEKTLLKPKDKILPCPRCNSMDTKFCYNNYNVNQPRHFCKNCQRYWTAGGTMRN  
 VPGAGRRKNKNSASHYRHITVSEALQNVRTDVPNGVHHPALKTNGTVLTFGSDAPLCS  
 MASVPLNIADKTMRNCTRNGFHKPEELRIRLTYRGGENDNYAHGSPVTVSNKDEAGKTT  
 SQEAVVQNCQGFPPHVACFPGAPWPYPWNSAQWSPVTPPAILPPGFPMFYPPAAYWGC  
 TVPGAWNIPWIPQPTSPKTPSSAPNSPTLGKHSREESLVKASNSEGQEQHKENNAERCLW  
 VPKTLRIDDPGDAAKSSIWTTLGIKNDKADSI GRGGLFKAFQQKNDGRGHIAGTSPVLQA  
 NPAALSRLNLFQESS

#### CsDof2

MNGGDMSAPIKDPAIKLFGAKIPVPDTRIPDVCKQITKEEAEDNHEYNSEEPDKSSSLNN  
 VKEGARNFVQANGIQANAKTKADQSESNTDQEKAFKRPDKIIPCPRCNSMDTKFCYFNNY  
 NVNQPFRHFCKNCQRYWTAGGTMRNVVPGAGRRKNKHFASQYRQILVSSDGVPTGLETPN  
 SANQQLMLCGDSATTFRSTGNGTVLKFGEPTPLCESMENVLNLRDQKRSVEICTVTVCVE  
 NKEEPSSSGSPVTASSIRGNELPE SVMQKEQVMMTGSCNELNMQQSMHCYPVSPWGVWN  
 PNNVASMEAAQNPSDRVCVPNGSNP GPVQWCPTTVLAVPGFCAPNIPLQFVPASYWGMGV  
 WAAGAGNIPLTGSNGCLSPSSSTSNNSCCSGNGSPTLGKHSRDPNLTDEGQSEKCVLVPK  
 TLRIDDPDEASRSPIWATLGFKPDQKDLKSGGAI FKFDFETKKGKADVLDGAEIILESNA  
 ALSRSHTFQEST

#### CsDof3

MRQESKDPAIRLFGKKIAFPSPDGEVPIVIFSEELPSPAAKEECSIEAEKAEEDSSAVKA  
 AETTQDDTTPPNIDESKIPESPEANVNPKTPSIDDETAKSAAKSEKSQNDASNSNSQ  
 KTLKPKDKILPCPRCNSMDTKFCYNNYNINQPRHFCKACQRYWTAGGTMRNVVPGAGRR  
 KNKNCASQYRHITISEALQAARIDAPNGISHPSVKSNRVLVSLFGLDAPICDSMASVLNLA  
 EKKVLNTRNGFHGFQEQEIPVPCRGGENGDDCSSGSSITVSNPMEEVGRNGMQEPLMRS  
 INGFPSPIPCLPGVPWPYPWNASVPPPAFCPSGFPMSFYPAAFWNCGIPSTWNMPWISPO  
 SSPNQKSPSSGPNSTLGKHSRDADMIKSENMDKEELSKEKNRCVLPKTLRIDDPNEAA  
 KSSIWATLGIKNESLAGGRLFKGLQSKSDEKSHMAETSPVLRANPAALSRLNLFHES

#### CsDof4

MVFSSIPAYLDPANWQQQPNPQTGASTGVSTQFVQPQAPPPPPQPHGSGGGGAGSIRPG  
 SMADRARMANVPMPEAALKCPRCESTNTKFCYFNNSLSQPRHFCKTCRRYWTRGGALRN  
 VVGGGCRNRKRSKGGSSGSKSPVNSTDRQTASGNNSTSTMSCNNSGGASDILGLGPQI  
 PQLRFMTPNLHHFTSEFFSGDIGLNYGSLTAPPVANELNFGGSLLSLSGLDQWRLQQQA  
 HHHQQFPFLGGLDSSSSSSPSGLYPFEGGVEASGYVGGGSAQIRPKISSTGIVSOLAAAA  
 APVKMEESSHHHHQQQQEINLSRQFLGMQNEHQYWSSTTAAGAAAAGWTDLSSFSST  
 SNPL

#### CsDof5

MVFSSVPVYLDPPNWQQQPPTHHPQGGGGIDGSQPLPLPMLPMGSGGGSTGAIRPNSM  
 TERARMAMPQPEATALKCPRCCESTNTKFCYFNNSLSQPRHFCKTCRRYWTRGGALRNVP  
 VGGGCRNRKRSKGRNRSKSPAVTEGQATAGTSSSSALSSRNII GRMQNPQQQIPMLPNL  
 HHLNDYNSSDIGLNFGGIQIPSQGVACNGNDIGFQVANGTSNSGSLSSGLVEQWKLQQF  
 PFLSNGLEQVTGLYPFDTEIMEFPQSYTIGQLRSKSAALDSEATQFANVKMEDNTQSLNLS  
 RNFLGINSANDHQYWGTTNNNAWSDLSGFTSSSTSHLL

#### CsDof6

MVFSSVPVYLDPPNWHHQPNHQGAGSENPQLPPIP SAPHHVGVGGAPGGAGSIRPG  
 SMADRARLAKIPHTEVPLKPCRCSTNTKFCYFNNSLSQPRHFCKACRRYWTRGGALRN  
 VVGGGCRNRKRSKSSSSSSKSPANNTKELQQMGNSTSSSLPPEIIGHLQQQCNTPHQI  
 PLMPSLHNLQYNNMGSIGLNFGGIGASSGVGSSHSTDHVGFQIGSNSSMSSSAILSAGGG  
 VQQFTFFPEPNTGLYSFQAEGIEAPSSLVVANSNPRVSEQAPAKMEDHHQELNLSRPFQI  
 SENNQYWSGNWTDLSALNNSTSTNHLL

#### CsDof7

MGLSSKQVSSDGQGSQSLQAQTLELKPASVKRPLQQQSSLNQQQAEPLKCPRCST  
 NTKFCYNNYNKSPRHFCKACKRHWTKGGTLRNVP IGGGRKSKRLKTSDNAATSTATAT  
 ASRVSTHVAVQSQQQRQILPFPPLGDDQKNLSDVPLYQPLIHPPSNLLESKGMGTNNINVG  
 NPFISSSLGIPQIQIQYQSLTLPNHASASSFNPTPSTISNSFQRSASVINYAGEITMED

PTNVINTTSTTATSMPITIASSSAVTQPWQQVASTSSGTNNMTTTSYWNWDDIDTFVSTDL  
NIPWDDSDIKP

CsDof8

MMGLTSLQVCMDDSSDWLQGSIHESGLDSSSPSGDMLTCSRPLMERRLRPPHDQALKCPR  
CDSTHTKFCYNNYSLSQPRYFCKTCRRYWTGGTLRNIPVGGGCRKNKKVSSKKSNDQS  
MNQNPSSSSHNPTDLQLSFPQMQLSHLGNILGAHGTLANNNHFMNDNKYSAMLENPRPIDF  
MENKLEAIVGSSRYDFMGNNGDMGMVGGGLGNLSHHHQEGLTPNVHNLCSPPFGMSLDGTG  
GTFIDGCQRIMLPYDANEVQNAIDVKPNAKLLSLDWQDQSCSDVGYLGNLSSWSGMMNG  
YGSSTTNSLV

CsDof9

MDAAKWPQNFPFVGGVKAMEEVSNTCNSSSSSRPPMLERKARPQEQLNCPRCNSTNTKFC  
CYNNYSLSLQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRKNKRSSSSAAAASSSSNNNNNN  
NNNYNKLIIIPDLNPPSLSHFSSHENPKILKGGQDLNLGFQVMHNNANDMSQYADHPAVAS  
KAETNTTSDNINNNMSPVSALDLLRTGIASRAGLDHFIPTPMPDSNTLFSGGFPLQDIK  
PAATLSFSIDQANRFGIQDNIGNGSRLLFFPFGEKQLSSASTTEVDHHSNKGTSTSTGYW  
NGMFGGGSW

CsDof10

MDASSGQHQMATHSLESMLVCSKAQQERKPRPQPEQALKCPRCDSTNTKFCYNNYSLS  
QPRYFCKSCRRYWTGGTLRNVPVGGGCRKNKRSSSSSSKRSQDQPLMSSNTSPLTNFPP  
LSYDNDLSLAFARLQKQNGQLGFDDQHDFSIILGNPVSSHCDILGNPSSSSTATTTP  
AFLDALRSGLDTHNNFNQNYLYYGFGNANSMGEVDHHHHHHLNHNHDHGASAEMLMPFGDH  
QMSATNATTTAVTVTMTKQELCNSRESENSKVLWGFQWQLNADASMNNELNSTWHGLLN  
SPLM

CsDof11

MDTAQWPQEIIVVKPIEEIVTNTCPKPASAAALERKARPQKEQALNCPRCNSTNTKFCYNN  
NYSLSLQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNIPVGGGSRKNKRSSSSSSKLPDPATPPSHHPQN  
PKIHDHGEDLNLSFPAATTOGYRSFSELVQLPNIDNKSQIPISSSTTTTTTTTTSSQQLSA  
LELLTGISRRGLNSFMPMPVDPNAIYAPGFPMQDFKPTLNFSLDGLGSGYGLHHQSVQ  
ENNGRLLFPFEDLQVSSSTDHMEQNRHEGDSGYWTGMLGGGSWWGA

CsDof12

MDTAYHWPQKSQKSYNNLLYCFNPSPICKGIGFVTPMEAGSNPTLERRPKPQRERVLNC  
PRCNSTDTKFCYNNYSFSQPRHFCKTCRRYWTAGGSLRNVPVGGGSRKNKRSSSSSGLS  
MNLTDLNTPCFPDQSAVSSDHNPNSTIHHEYHRDLKLAYPPNYTESKISSSSSASSSEFN  
SFMGMPAAASNSANATCQSGNILLQEPKKTLDFFSSSDGFENNGARLWFPLQDIKPEISN  
TTTTDRFELNRGQAQAEESTGYWTRLLGGGSW

CsDof13

MPTDSNENNNNNNNSSSSSSNKRVTAKNPAAEQEQLPCPRCESTNTKFCYNNYNSQP  
RHFCKSCRRYWTHGGTLRDIIPVGGGTRKNKRRTIPSSSTCAATNTMSITPGVAVGSAHQ  
DYPLHATPVLVFPQGSAPLKAANMNGGYVCGNGTGAGGFASLLSPQGPFLALGGFGL  
GLGSGFVGDVGLAGLGRGAWLAGVSDAGAAAANGGGGGSSGIGNTWQFESGEATTTSG  
FGTADCFSWPDLAISTPGNGLK

CsDof14

MEKKWKPDVETAPSCPRCASPNTKFCYNNYSLSQPRYFCKGCRRYWTGGSLRNVPVGG  
GCRKNGRAKSSRRKSPFNDRPKASCSSDHTDDAVSTPNGGSDIDLAVVFANSSTPDNVV  
QNDDFNVHVMGNGDLNILGEFPQVFGQLQEEEDRRVQDFLEDDMVNAHGLQALLGDEIV  
DHQVALWSDQAETETLPNFTWQRAMFQLQDFDSFPADDQLKASANLISDNWTSFDLPGFE  
LYSRP

CsDof15

MQDIHSIGGGRLFGGGGGDRRLRPHPHQNHQALKCPRCDLSLNTKFCYNNYNSLQPRHFC  
KNCRRYWTGGVLRNVPVGGGCRKTKRSSKPKPNSESSAQTTQTQTEAPAAGERDRKAN  
SHSSSESSSTLTVTNNNNNNNTSVETVSVHSSSSVSNVLSAMNNNNNNNNNDPGFETAP  
TTALLDQASSDCGIFSEIGSFTSLITSSNEALPFGFSNLLNNAQQNLEHVQNEQQWQQEQ  
QKLASASSMGHHELKHEMASGLLDQTVHDELSALQDRSGNTGGFGSLDWHGSADHQLG  
FDLPNAVHDHASYWSQSTQWTDQDHPSLYLP

CsDof16

MSEVKDSAIFKLGQMIPLSLLKFKQQQQGPETLANDHSASDDHHEACCDRNPETALREE  
SSNKQQQQQQQQQRDDKEHSGQIIEDEHEDVTSKQKDPITSSGNSDNPKTSLVDRETR  
SLKSSKNGEQSETSNSQEKTLKPKDKILPCPRCNSMDTKFCYNNYNNVQPRHFCKNCQR  
YWTAGGTMRNVVPGAGRRKNKSSSASNYRQIMISEALRTFQANASGGVYKPYSGNNGTIL  
TFGSDSPLHESVASVPNLSDKSNCLRNNGFHRSEQKILVSGTDNGSSITASSSLEKGGNC  
TSQDIRTKNYRGSVPVQVPYFPGPPWPHHWNTMPMPGGFYPSGFPVSFYPETTYWGCAVP

YCNMPCVPPNASLQSQFVPKTLSTPTLGKHSRDGDIITPASTEKEEPSTGSRNSERCVLV  
PKTLRIDDPSEAAKSSIWATLGIKNEKTTSSAGECLFKGFQSKSDHRNYIAETSEVLQANP  
AALSRLNLFHERHN

CsDof17

MIQELLGAAGFISGDRKISITGSIFEGTTSPLPPCTTTTTATVTTTTATAAPPPPPPLP  
TTTTSNNTDSNIGNNTNNTSSNSGNNQNLRCPRCDSSTKFCYNNYNTLQPRHFCKTCRR  
YWTGGALRNVPIGGGCRKNKSSSTVTAASFGKSSSSSSAANKMKTVAYEIGRGGFVHHP  
HEYYSSTPIMWNNSPHNSQLLALLRSTQNPNINPTGPSTSTSSVRVKEEQGVIGTHHVIK  
GEPVGDAAVLNSGTMVFNPLSQQLQVPSQLGLWKNQHQIQAPQQNGFLVGHEVQNSGV  
QELYQRFKSSSTNNYADHLASPVVLSNAASSTTTILE SAPVAGGELGYWNPVFSWSDLST  
TNGSYP

CsDof18

MLSNCEKMVVISSTTNEWPNHQIDEKNLMASGRVMDKAGQEPPQQQQQPPLKPCRCD  
SNTKFCYNNYSLSQPRHFCKACKRYWTRGGTLRNVPVGGGCRKNKRVPASANNIDG  
SNPSAAANPNPHSQRQIDISSSTSNHINPLFFGLSTNPSDMNLPFSTFNRSRVSSLDTIS  
GYDLQPQLNALGLGFSSGLIMSNTDVGDCNYRNGFNPNKQIQEVVTSSNSLLSSYPTFGS  
SSSSPTIASLLASSLHQPKFMNGVVKSSSTEAPNHFNNNLASFEDLQMTANNNNNNGEAAR  
TGMMKEVKAEEGQRRMDWNVEQCQNQMEQIGLADPSLYWNSTSSVGAWHDP SNIGSSVTS  
L

CsDof19

MSENILTTQAVMTKEENQNPAGNRKTASTRPQEALKPCRCDSPNTKFCYNNYSLTQP  
RHFCKTCRRYWTGGALRNVPIGGGCRKNKIKSSSRLSVDSKDSASSEIGGFKFFHGL  
SPAMDFQLGGLSFPRLNPSAGICSQFSSFGDATSPSYFGLDPSASSANHPLTGFNYPLS  
SIVANTFVEQFKKQQRLAMLFGGENQKETT VASAQLETQTQKQPILFQNL EISSKPEA  
PAVGNRKEGASGESTATEWFFGNSYAPVTAGTPTTTSSGGNGGNDNTINWNNGAQGWS  
DLHRYSGLP

CsDof20

MQQQERGGSSSEERKQDDRRLKTMQGGTENQQQQEQPQPQKPCRCESLNTKFCYNNYSL  
QPRYFCKTCRRYWTQGGTLRNVPVGGGCRKGRKTKTSSVSGEASRASQPPQPPSPHPNL  
TTTTQQNILSSSNPVIITGPPVLRKLEPAAASPMSGYSYPSGGFLSSLAAIQSQSFNPQP  
LHQAFNVGGADHHHNIIGSSNLDLLQGFSTVPSFGSSHTQHQQIQQSKIYHHQMGNIDKS  
ANPMHMMYHTIPSDQENLTIQSRRPGSSTSHHQHHDWHQQGSFINNSNNPNVPHDTSLW  
SISTASANSNNTNTASVSGSLNPNQWRDLPGYGPPP

CsDof21

MPSESTDRKLARAHNP ISTYPPPKVTESELPCPRCESTSTKFCYNNYNSLQPRHFCKSCR  
RYWTQGGTLRNIPVGGGTRKNKRTRISSSSSGAVVATANSSSCSSAVTHDRVAEPANP  
VSVLPCGNPEMLITMTDVNLNDSVGVPGSGSYTMLNMQIQGQNFGLGGFHNHGYGIG  
SGLEELGFGTARSWDIPGTGYACTGGGSGAATSGCNTWQMMNGDDQGGNDVGEDCFGW  
SGLAISTPAGKDLK

CsDof22

MERVVNHKPNVEISPNCPRCGSSNTKFCYNNYSLTQPRYFCKGCRRYWTGGSLRNVPV  
GGGCRKNRRGKSVRLSTDGVSSKALSYMGEINKVNGFLESTSTSSLMQQQDGGSHIDIALV  
FANFLNQPPPEEKPAGSFELPEFPDIDPSMEFNSCMVSTNLESRVQLPEENVNGLVRSLS  
FSDLSSAETQTHFRDNDQSYYSMFDSVQKHGHHVQDGIQSNQVLPPLPSEEILWLSQMM  
MNQSLQAAAAAATHEPMLGPADDHQAQDPNNLLFGNWSPPDFSSDDTFSKT

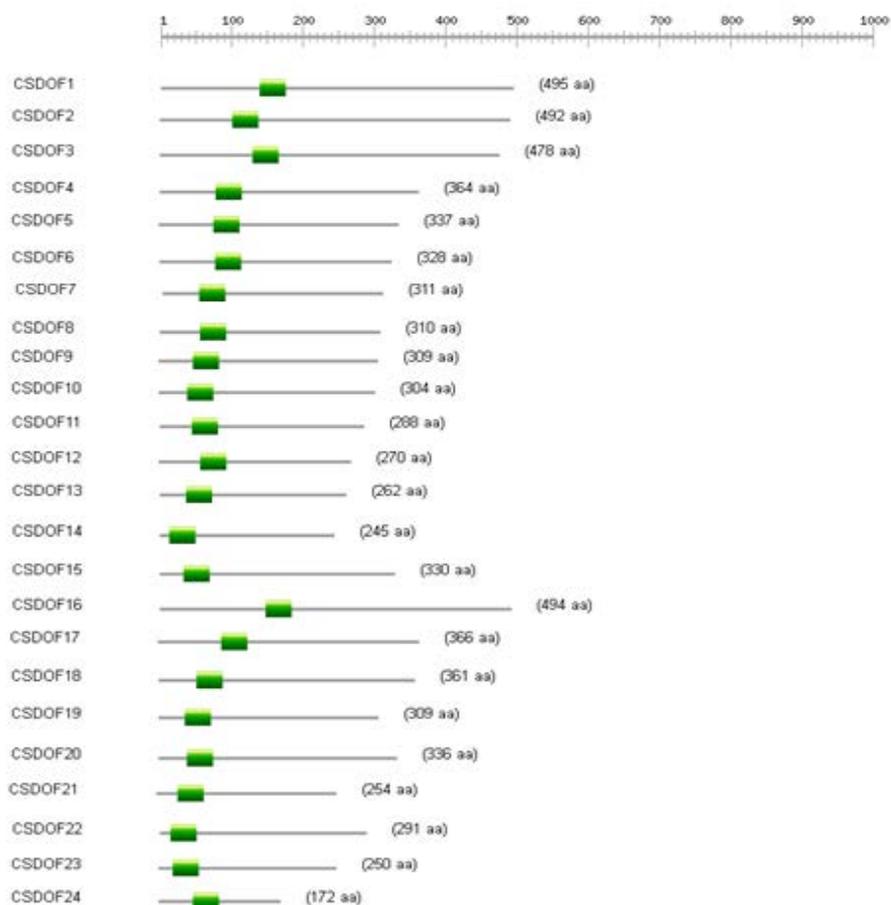
CsDof23

MQDPATFNPMPKPHFPESEQLKPCRCESTNTKFCYNNYNSLQPRHFCKNCRRYWTRGGAL  
RNIPIGGGTRKSNTKKRQKPDPPSRSNPTRKSQETANTQSMQAAAATTSTSSQEPAVTL  
PGAVARESGTEHDPRLYGLPLDQDHKMLDITGSFSSLLASNGGLGSVLDGITPNGSGFK  
MVQMGFGGENFGSDQSLDLISVRGSGSQNQGNNGGESFMQSGNNDSSCWSSGGSNGWPD  
LAIYTPSSNFQ

CsDof24

MGNDEEEQGIKLFGKTITLHGRQVKEEQNQQRGSDQPQAVVDKRPDKIIPCPRCKSMETKF  
CYFNMYNVNQPRHFCKGCQRYWTAGGALRNVPVAGARRKTKPPGRGLPDGCLYDVASGDH  
HHQLLHHQLDQFDLEGVFVEDWHPAAAAHGYGGFQNAFPVKRRRSNSGGQLC

**Anexo 2.** Posição do domínio Dof nas sequências de aminoácidos dos 24 genes de *C. sinensis*. O comprimento das proteínas CsDof pode ser estimado utilizando a escala acima da figura. O número entre parênteses ao lado de cada gene indica o número de aminoácidos em cada proteína. Posição do domínio Dof em cada gene é marcada com caixa verde.



**Anexo 3.** Dados de RNAseq dos 12 genes *CsDof* escolhidos para avaliar a expressão por RT-PCR semi quantitativo durante as fases iniciais do desenvolvimento do fruto.

