

## ÍNDICE DE PALESTRAS

### **VIII Curso sobre tecnologia de produção de sementes de hortaliças Brasília, 25 a 27 de agosto de 2008**

#### **Estabelecimento de uma Plataforma Bioquímica e Molecular para Seleção de Hortaliças com Maiores Teores e Variada Composição de Elementos Funcionais.**

**Leonardo S. Boiteux**

boiteux@cnph.embrapa.br

**Elaine Dias da Silva**

elaine@cnph.embrapa.br

**Maria Esther de Noronha Fonseca**

mesther@cnph.embrapa.br

Embrapa Hortaliças

Caixa Postal 218, Brasília, DF - CEP 70359-970,

#### **Índice**

[Introdução](#)

[Metodologias para análise de carotenóides em tecidos vegetais](#)

[Estratégias para o estudo da Biologia e genética molecular](#)

[Síntese de bibliotecas subtrativas](#)

[Desenho de marcadores moleculares](#)

[Avaliação dos marcadores obtidos](#)

[Análise genômica de elementos funcionais em cenoura](#)

[Exemplos práticos de Marcadores moleculares em cenoura](#)

[Estratégias genômicas aplicadas ao melhoramento genético do tomateiro](#)

[Análise genômica visando o enriquecimento nutracêutico de cucurbitáceas](#)

[Genética molecular dos carotenóides em cucurbitáceas](#)

[Análise genômica de carotenóides em cucurbitáceas](#)

[Objetivos da análise genômica de carotenóides em cucurbitáceas](#)

[Resultados obtidos com cucurbitáceas](#)

[Considerações finais](#)

[literatura citada](#)

#### **Resumo**

As avaliações mais precisas de carotenóides, flavonóides, vitaminas e outros grupos de compostos nutracêuticos presentes em tecidos vegetais envolvem a extração, caracterização, quantificação e análise espectrofotométrica ou via “High Performance Liquid Chromatography” – HPLC. Para a avaliação de vitamina C tem sido empregado o método titulométrico (Método de Tillmans modificado) que se baseia na redução de 2,6-diclorofenolindofenol-sódio (DCFI) pelo ácido ascórbico e também HPLC. Estas metodologias têm sido utilizadas para avaliar acessos das coleções de germoplasma e linhagens dos programas de melhoramento genético. Com o objetivo de estabelecer uma plataforma de seleção assistida, esforços têm sido conduzidos visando o isolamento de alelos dos genes estruturais da via metabólica dos carotenóides por meio de PCR heterólogo e RT-PCR. Em tomate e cenoura, seqüências gênicas correspondendo aos genes codificando as enzimas fitoeno sintase, fitoeno desaturase, IPP sintase, GGPP sintase, zeta-ciclase e beta-ciclase já foram caracterizadas, e “primers” foram sintetizados para utilização em análises via PCR. Alelos distintos estão sendo investigados em linhagens e/ou híbridos com teores e tipos contrastantes de carotenóides. A co-segregação de genes candidatos identificados com

algumas características fenotípicas relacionadas com o acúmulo de vitamina C, precursores de vitamina A e licopeno tem sido conduzida com linhagens de tomateiro com teores contrastantes. As estratégias empregadas (em associação com o mapeamento genético) para identificar genes candidatos envolvem uma combinação das técnicas de bibliotecas subtrativas usando materiais genéticos (linhagens/acessos) contrastantes, PCR-heterólogo e sequenciamento. O uso de plantas contrastes para elementos funcionais tem como objetivo de enriquecer as bibliotecas com genes relacionados aos fatores estudados (“relacionados” significando, neste contexto, genes que apresentam aumento ou diminuição de seu respectivo mRNA).

## **Introdução**

O desenvolvimento de cultivares mais ricas em elementos funcionais (isto é, compostos associados à prevenção de doenças humanas) tem se consolidado como um dos principais focos dos modernos programas de melhoramento genético de hortaliças. As principais classes de compostos funcionais em plantas incluem ácido fenólico, bioflavonóides, genistelina, glutathione, indóis, isotiocianatos, monoterpenos, o elemento Selênio, sulforafane, sulfetos alílicos, carotenóides (alfa-caroteno, beta-caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina) e vitamina C. Os ganhos genéticos obtidos por estes programas têm sido sustentados pela aplicação de estratégias de avaliação mais precisas destes compostos nutracêuticos nos tecidos vegetais. Estas metodologias envolvem a extração, caracterização, quantificação e análise espectrofotométrica ou via “High Performance Liquid Chromatography” – HPLC. Estas técnicas têm sido empregadas com sucesso para avaliar coleções de germoplasma e/ou linhagens dos programas de melhoramento genético. Além disso, trabalhos estão sendo conduzidos no Brasil e no mundo visando estabelecer uma plataforma de seleção assistida também para compostos funcionais. Esforços têm sido conduzidos visando o isolamento de alelos dos genes estruturais da via metabólica dos carotenóides por meio de PCR heterólogo e RT-PCR. Neste trabalho são detalhadas ferramentas de análise para identificar e selecionar genótipos superiores para teores e tipos de carotenóides. Ênfase especial será dada aos exemplos obtidos no melhoramento genético para maiores teores de compostos carotenóides em cenoura, tomate e cucurbitáceas.

## **Metodologias para análise de carotenóides em tecidos vegetais**

A disponibilidade de métodos simples, práticos e de baixo custo é essencial para otimizar o processo de identificação e seleção de linhagens com maiores teores de licopeno. A metodologia padrão empregada na determinação dos teores de licopeno em tomate tem sido a mesma utilizada em outras espécies de hortaliças e frutas onde a concentração de carotenóides estimada via análise espectrofotométrica ou HPLC (Moretti *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2000; Rodriguez-Amaya, 2001). Devido à conveniência e maior facilidade no uso de medidas de cor, vários estudos têm investigado a intensidade da correlação entre valores de cromaticidade e o teor de pigmentos carotenóides. Em tomate, uma boa correlação tem sido observada entre cor de fruto e teor de licopeno (D'Souza *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 2000). Trabalhos recentes foram conduzidos pela Embrapa Hortaliças tendo como objetivo investigar a intensidade de correlação entre a concentração de licopeno em frutos do tomateiro com a medida de sua cromaticidade (Carvalho *et al.*, 2005). Os valores mais expressivos de  $R^2$  (entre 0,86 e 0,91) foram obtidos quando a

concentração de licopeno foi correlacionada com os resultados das relações  $a^*/b^*$  e  $(a^*/b^*)^2$ , sendo que os valores de cromaticidade da polpa homogeneizada apresentaram novamente as mais elevadas correlações. Estes resultados confirmam que é possível estimar indiretamente e com relativa precisão, o teor de licopeno em frutos do tomateiro a partir de valores de cromaticidade. Esta metodologia pode ser empregada para seleção de genótipos com maiores teores de licopeno, de maneira mais simplificada, evitando o dispêndio e os problemas de descarte dos solventes orgânicos utilizados nos métodos espectrofotométricos (Carvalho *et al.*, 2005).

## **Estratégias para o estudo da Biologia e genética molecular da acumulação de carotenóides em tecidos vegetais**

O teor e tipo de carotenóides representam características especialmente favoráveis para a prospecção de novos genes devido ao vasto conhecimento da via biosintética destes compostos em plantas (Cunnigham & Gantt, 1998). Vários estudos têm tentado correlacionar a expressão ou a segregação de alelos polimórficos dos genes estruturais desta via com teores e tipos de carotenóides em diversas plantas. A análise dos genes da via biosintética de carotenóides indica uma elevada conservação em seqüência, o que tem permitido o isolamento destes genes via PCR heterólogo utilizando “primers” que anelam em regiões conservadas (Thorup *et al.*, 2000). Esta conservação de seqüência tem também permitido o isolamento de genes análogos em livrarias genômicas e de cDNA (Fonseca, 2000; Just *et al.*, 2007). No entanto, estas estratégias de isolamento gênico ainda não têm sido amplamente adotadas mesmo em algumas hortaliças de importância nutricional e econômica.

### **Síntese de bibliotecas subtrativas**

Uma das técnicas empregadas para a seleção de genes relacionados ao acúmulo de carotenóides é a síntese de bibliotecas subtrativas de cDNA. Genes “relacionados” significam, neste contexto, genes que apresentam aumento ou diminuição de seu respectivo mRNA em tecidos ricos em carotenóides quando comparados com tecidos com menor acúmulo de carotenóides. Bibliotecas subtrativas foram sintetizadas para cenoura, tomate e abóbora “Brasileirinha”.

### **Desenho de marcadores moleculares**

Os genes candidatos obtidos via biblioteca subtrativa ou amplificados diretamente utilizando-se PCR com “primers” para genes da via de carotenóides são genes que tenham sua expressão diferencial entre clones com diferentes tipos/teor de carotenóides ou que possuam polimorfismos. Genes candidatos são convertidos em marcadores moleculares através da busca de alelos polimórficos dos mesmos em parentais contrastantes para os fenótipos estudados. Variantes de seqüência nos genes de carotenóides em acessos de tomate são resultado tanto com mutações em uma base (“single nucleotide polymorphisms” – SNPs) ou pequenas inserções e deleções (InDels) (Araújo *et al.*, 2007). InDels são detectados pela amplificação de uma pequena parte do genes contendo a inserção ou deleção. Caso as diferenças sejam muito pequenas pode

ser utilizado gel de poliacrilamida. SNPs são convertidos em marcadores do tipo “Cleaved Amplified Polymorphic Markers” (CAPS; Konieczny & Ausubel, 1993) ou “derived CAPS” (dCAPS; Michaels & Amasino, 1998). Alternativamente os SNPs podem ser explorados como marcadores através do uso de PCR alelo específico utilizando-se “primers” desenhados para que a região 3'corresponda ao SNP (Drenkard *et al.*, 2000).

### **Avaliação dos marcadores obtidos**

Após a conversão, os marcadores são avaliados em populações segregantes para demonstrar a correlação/ligação com teor e/ou tipo de carotenóides. A Técnica de “Northern blot” vem também sendo utilizada para a confirmação de que os mRNAs dos genes candidatos são mais (ou menos) abundantes em materiais biológicos contrastantes teores e tipos de carotenóides. O mapeamento de marcadores que diferem em uma única base (SNPs) tem sido progressivamente empregado (Sherry *et al.*, 2001), o que aumenta ainda mais as chances de sucesso da busca por polimorfismos em qualquer material genético de interesse.

### **Análise genômica de elementos funcionais em cenoura**

O melhoramento para a quantidade e tipo de carotenóides em raízes acumuladoras é uma área pouco explorada e a cooperação entre melhoramento clássico e molecular pode se mostrar bastante produtiva. A via biosintética dos carotenóides é uma das vias bioquímicas mais bem caracterizadas em plantas, com vários genes já clonados e sequenciados (Cunningham & Gantt, 1998), inclusive em cenoura (Fonseca, 2000; Just *et al.*, 2007). No entanto, com algumas exceções (Thorup *et al.*, 2000), o conhecimento destes genes ainda não tem sido amplamente utilizado para o melhoramento para conteúdo de carotenóides em culturas de importância econômica ou para o estudo da regulação desta importante via biosintética em plantas. Os impactos técnico-científicos destes estudos residem no fato de que estudos de genômica funcional (variabilidade alélica e expressão gênica) poderão ajudar os programas de melhoramento genético a desenvolver estratégias mais efetivas para modificar ou aumentar o conteúdo de carotenóides em raízes e, teoricamente, também em outros órgãos acumuladores.

### **Exemplos práticos de Marcadores moleculares ligados a genes controlando teores de elementos funcionais em cenoura**

Genes para acumulação de pigmentos amarelos e vermelhos foram estudados por Buishand & Gabelman (1979). Sete genes foram descritos controlando os caracteres de coloração laranja, branca, amarela e vermelha. Mais recentemente, os genes  $Y$  e  $Y_2$  foram mapeados e um marcador do tipo SCAR foi desenvolvido para  $Y_2$  (Bradeen & Simon, 1998). Vinte QTL associados com a acumulação de diferentes pigmentos carotenóides foram localizados no mapa genético de cenoura (Santos & Simon, 2002). Diversos genes da via biosintética dos carotenóides foram isolados e poderão servir, em um futuro próximo, como genes candidatos em seleção assistida por marcadores (Fonseca, 2000; Just *et al.*, 2007).

## **Estratégias genômicas aplicadas ao melhoramento genético do tomateiro para maiores teores de elementos funcionais**

O tomateiro tem sido considerado, no ponto de vista do melhoramento genético, como uma planta modelo apresentando diversos mutantes tanto para teor quanto para tipo de carotenóides (Giordano *et al.*, 2003). Alguns destes acessos carregando mutações de interesse têm sido identificados em germoplasma de espécies cultivadas e selvagens. A maioria dos genes da via de carotenóides já está isolada em *Solanum* (secção *Lycopersicon*) (Carvalho *et al.*, 2004). Além disso, “primers” para seqüências gênicas correspondendo aos genes codificando as enzimas fitoeno sintase, fitoeno desaturase, IPP sintase, GGPP sintase, zeta-ciclase e beta-ciclase já estão disponíveis (Carvalho *et al.*, 2004). Na Embrapa Hortaliças, a diversidade alélica para genes da via biosintética dos carotenóides está sendo investigada em linhagens e/ou híbridos com teores e tipos contrastantes de carotenóides. Marcadores moleculares estão sendo gerados através de uma combinação das técnicas de bibliotecas subtrativas com materiais genéticos (linhagens e/ou acessos) contrastantes, PCR-heterólogo e sequenciamento. A co-segregação dos segmentos genômicos carregando estes genes candidatos com algumas características fenotípicas de acumulação de precursores de vitamina A (especialmente beta-caroteno) e licopeno estão em andamento para dois mutantes de coloração do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças. Marcadores do tipo QTL ligados à acumulação de licopeno foram recentemente localizados no mapa genético de tomate (Liu *et al.*, 2003) e podem ser empregados em sistemas de seleção assistida.

### **Análise genômica visando o enriquecimento nutracêutico de cucurbitáceas**

Um dos objetivos do melhoramento genético de cucurbitáceas é o estabelecimento de uma plataforma tecnológica que auxilie a identificação de acessos/genótipos mais ricos em termos nutricionais e nutracêuticos (maiores teores e tipos mais variados de carotenóides com ação de pró-vitamina A e antioxidantes). Para tal, as ferramentas que têm sido utilizadas incluem: (1) estabelecimento de um catálogo de acessos da coleção de germoplasma caracterizados via HPLC para tipos e teores de carotenóides; (2) desenvolvimento de populações segregantes para estudos genéticos e mapeamento molecular e (3) o isolamento de genes estruturais da via metabólica dos carotenóides e de fatores de transcrição em acessos com fenótipos contrastantes (coloração, teor e tipo de carotenóides) dentro de acessos de melão, melancia, abóboras e morangas.

### **Genética molecular dos carotenóides em cucurbitáceas**

Em melancia já existem marcadores ligados à cor de fruto (Hashizume *et al.*, 2003) e já foram isolados alelos do gene licopeno beta-ciclase que foram convertidos para marcadores moleculares capazes de distinguir cor de polpa canário e vermelha (Bang *et al.*, 2007). Em melão, existem mapas moleculares ultra-saturados (Monforte *et al.*, 2004) e projetos genoma em andamento (Yariv *et al.*, 2002; Puigdomènech *et al.*, 2007), gerando um grande número de “expressed sequence tags” (ESTs) que podem eventualmente representar alelos da via dos carotenóides. Até o presente momento, apenas o gene da “fitoeno sintase” foi isolado em melão (Karvouni *et al.*, 1995). Não existem relatos de isolamento de outros genes estruturais da via biosintética em melão e também não existem associações entre estes genes e macromutações

controlando coloração ou tipo e teor de carotenóides em frutos. Para *C. maxima* e *C. moschata* esta informação não está disponível.

## **Análise genômica de carotenóides em cucurbitáceas**

Como verificado, nestas cucurbitáceas, mesmo nas de maior valor econômico, existem poucos estudos sobre características nutricionais e nutraceuticas. Neste contexto, foram conduzidas ações de pesquisa com o objetivo de preencher algumas destas importantes lacunas. Um dos principais objetivos tem sido o estabelecimento de uma plataforma tecnológica que auxilie no desenvolvimento de variedades de abóboras, morangas, melancias e melões mais ricas em termos nutricionais e nutraceuticos. Este projeto visa isolar e mapear alguns dos genes estruturais da via metabólica dos carotenóides e estudar os padrões de expressão destes genes em acessos que apresentam distintos teores e/ou balanço de carotenóides com ação antioxidante e de pró-vitamina A. Genes da via metabólica de carotenóides foram isolados através de PCR heterólogo diretamente de bibliotecas de cDNA ou através de RT-PCR (Fonseca, 2000). Existe a possibilidade de isolamento de genes regulatórios através da mesma estratégia ou de seleção de genes em bibliotecas subtrativas entre acessos e/ou tecidos contrastantes. O mapeamento e validação destes “genes candidatos” têm sido feito via estudos de cosegregação com uma coleção de macromutações qualitativas e com segmentos genômicos associados com a variabilidade quantitativa (QTLs). A análise de padrões de expressão visa identificar genes que possam estar associados com diferenças qualitativas e quantitativas controladas por genes/alelos cujos reduzidos níveis de polimorfismo impedem o seu mapeamento. Tais estudos podem permitir também a identificação de possíveis passos da via metabólica onde genes reguladores possam estar atuando. Este conjunto de “genes candidatos” e QTLs podem funcionar como marcadores moleculares aumentando a eficiência de programas de melhoramento clássico e podem também ser mobilizados via transgenia para diferentes cultivares elite e/ou distintas espécies vegetais.

## **Objetivos da análise genômica de carotenóides em cucurbitáceas**

- (1) Caracterizar acessos de abóboras, morangas, melancia e de melão que apresentam coloração contrastante para conteúdo e tipo de carotenóides via HPLC e gerar um banco com estes caracteres. Os acessos de cucurbitáceas têm sido avaliados para composição de pigmentos carotenóides através da extração com acetona e éter de petróleo e HPLC em coluna C18 e utilizando-se uma mistura de acetonitrila:metanol:acetato de etila como fase móvel (Rodriguez-Amaya, 2001);
- (2) Desenvolver populações segregantes para o mapeamento de regiões genômicas associadas ao tipo e teor de carotenóides. As populações segregantes em estudo visam gerar mapas locais densos em regiões genômicas contendo o gene *W* (licopeno) em melancia e o gene *gf+* controlando beta-caroteno em melão e gene *B<sup>mos</sup>* controlando elevados carotenóides totais e frutos bicolors em *C. moschata*;
- (3) Síntese de bibliotecas subtrativas de cDNA enriquecidas para seqüências relacionadas à acumulação diferencial de diferentes tipos de carotenóides;
- (4) Sequenciamento dos cDNAs obtidos de bibliotecas subtrativas e construção de um banco de dados destas seqüências;

- (5) Isolamento completo ou parcial de alelos dos genes estruturais da via dos carotenóides. O isolamento tem sido feito via PCR heterólogo usando “primers” universais derivados da informação disponível para cada gene estrutural da via de carotenóides reportados em espécies vegetais (Fonseca, 2000);
- (6) Identificação de polimorfismos em alelos dos genes isolados em um conjunto de linhagens/cultivares apresentando distintos níveis de acumulação de pigmentos com ação antioxidante e de pró-vitamina A;
- (7) Emprego dos genes clonados em sistemas de “fingerprinting” e/ou para seleção-assistida em programas de melhoramento públicos e privados.
- (8) Estes genes podem também ser potencialmente mobilizados via transgenia.

## **Resultados obtidos com cucurbitáceas**

Um exemplo ilustrativo da caracterização via HPLC foi o da cultivar de *C. moschata* ‘Brasileirinha’ (de frutos bicolors) cuja recente liberação veio acompanhada de informações sobre composição dos carotenóides dos frutos em diferentes estádios de maturação (Boiteux *et al.*, 2007). Frutos imaturos apresentam em torno de 14 µg/g e frutos maduros 243 µg/g de carotenóides totais. No fruto verde verificou-se que 50% dos carotenóides correspondem ao beta-caroteno e 40% à luteína, um pigmento com conhecida ação nutracêutica, estando envolvido na prevenção de problemas cardiovasculares, catarata e degeneração macular (Smidt & Burke, 2004). Em frutos maduros, o pigmento beta-caroteno corresponde a 66%, alfa-caroteno 33% e luteína apenas 1%. A proporção diferenciada de carotenóides de acordo com o estágio de maturação dos frutos é uma característica interessante, permitindo diversificar os teores de vitaminas e antioxidantes utilizando uma mesma cultivar. Análises similares estão sendo conduzidas para acessos de melancia, melão e *C. maxima*. Na análise genômica já foram isolados (via PCR) e caracterizados (via sequenciamento) segmentos análogos aos genes fitoeno sintase, GGPP sintase, IPP isomerase, fitoeno desaturase, licopeno beta-ciclase e licopeno epsilon-ciclase em melão, melancia e *C. moschata*. O isolamento destes genes tem sido conduzido via PCR heterólogo usando “primers” universais derivados da seqüência de genes estruturais da via biosintética de carotenóides. A análise da diversidade de seqüência de acessos fenotipicamente contrastantes permitiu a descoberta de variabilidade estrutural destes genes, incluindo “single nucleotide polymorphisms” (SNPs). Estes marcadores estão sendo posicionados em mapas genéticos locais visando identificar segmentos genômicos importantes no controle de mutações em coloração e pela modulação de teores e tipos contrastantes de carotenóides nos frutos destas cucurbitáceas.

## **Considerações finais**

No longo prazo, espera-se que a adoção e consumo das hortaliças melhoradas para carotenóides com qualidades funcionais tenham um impacto positivo em termos de saúde da população consumidora ajudando a sanar eventuais carências nutricionais de alguns destes compostos. Do ponto de vista econômico, espera-se que estes produtos diferenciados possam agregar valor e gerar mais renda em diversos segmentos da cadeia do agronegócio de hortaliças do Brasil.

## literatura citada

- ARAUJO, A.H.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. 2007. Nucleotide diversity of a major carotenoid biosynthetic pathway gene in wild and cultivated *Solanum* (Section *Lycopersicon*) species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.19, no.3, p.233-237.
- ARIAS, R.; LEE, T.C.; LOGENDRA L; JANES, H. 2000. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L\*, a\*, b\* color readings of a hidroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.1697-1702.
- ARIMA HK; RODRIGUEZ-AMAYA DB. 1990. Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and pumpkin from Northeastern Brazil. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v.40, p.284-292.
- BANG H; KIM S.; LESKOVAR D; KING S. 2007. Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene b-cyclase (LCYB) gene. *Molecular Breeding*, v. 20, p. 63-72.
- BOITEUX L.S.; NASCIMENTO W.M.; FONSECA M.E.N.; LANA M.M.; REIS A.; MENDONÇA J.L.; LOPES J.F.; REIFSCHNEIDER F.J.B. 2007. 'Brasileirinha': cultivar de abóbora (*Cucurbita moschata*) de frutos bicolors com valor ornamental e aptidão para consumo verde. *Horticultura Brasileira*, v.25, p.103-106.
- BRADEEN, J.M.; SIMON, P.W. 1998. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y<sub>2</sub> locus to a simple, codominant PCR-based marker form, *Theoretical and Applied Genetics*, v.97, p. 960-967.
- BUIHAND, J.D.; GABELMAN, W.H. 1979. Investigations of color and carotenoid content in phloem and xylem of carrot roots (*Daucus carota* L.). *Euphytica*, v.28, p.611-632.
- CARVALHO, W.; ARAÚJO, A.H.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S.; SALES, M.P.; FONSECA, M.E.N. 2004. Use of genes of the carotenoid biochemical pathway to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*. In: Proceedings of the XXXIII Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Congress, Caxambu, Minas Gerais, Brazil.
- CARVALHO, W.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, H.R.; BOITEUX, L.S.; GIORDANO, L.B. 2005. Estimativa indireta de teores de licopeno em frutos via análise colorimétrica e aplicação no melhoramento genético do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, v.23, n.3, p.819-825.
- CLAYBERG CD. 1992. Interaction and linkage tests of flesh color genes in *Cucumis melo* L. *Report of Cucurbit Genetics Cooperative*, v.15, p.53.
- CRAMER, D.W.; KUPER, H.; HARLOW, B.L.; TITUS-ERNSTOFF, L. 2001. Carotenoids, antioxidants and ovarian cancer risk in pre- and postmenopausal women. *International Journal of Cancer*, v.94, n.1, p.128-134.
- CUNNINGHAM, F.X.; GANTT, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.49, p.557-583.
- FONSECA, M.E.N. 2000. Cloning and expression of carrot (*Daucus carota* L.) cDNAs coding for enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway in roots accumulating different types and amounts of carotenoids. Ph.D. Dissertation. University of Wisconsin-Madison, Madison-WI, EUA.



- GIORDANO, L.B.; ARAGÃO, F.A.S.; BOITEUX, L.S. 2003. Melhoramento Genético do Tomateiro. *Informe Agropecuário*, v.24, n.219, p.43-57.
- HASHIZUME T. et al. 2003. Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon using RAPD, RFLP and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v.106, p.779-785.
- HENDERSON, W.R.; SCOTT, G.H.; WEHNER, T.C. 1998. Interaction of flesh color genes in watermelon. *Journal of Heredity*, v.89, p.50-53.
- JUST, B.J.; SANTOS, C.A.F.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; OLOIZIA, B.B.; SIMON, P.W. 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, v.114, p.693-704.
- KARVOUNI Z. et al. 1995. Isolation and characterization of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Molecular Biology*, v.27, p.1153-1162.
- LAFERRIERE, L.; GABELMAN, W.H. 1968. Inheritance of color, total carotenoids, alpha-carotene, and beta-carotene in carrots, *Daucus carota* L. *Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences*, v.93, p.408-418.
- LESTER, G.E.; EISCHEN, F. 1996. Beta-carotene content of postharvest orange-fleshed muskmelon fruit. *Plant Foods and Human Nutrition*, v.49, p.191-197.
- LEWINSOHN, E. et al. 2005. Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 3142-3148.
- LIU, Y.S.; GUR, A.; RONEN, G.; CAUSSE, M.; DAMIDAUX, R.; BURET, M.; HIRSCHBERG, J.; ZAMIR, D. 2003. There is more to tomato fruit color than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnology Journal*, v.1, p.195-207.
- MOLLDREM, K.L.; JIALIANG LI; SIMON P.W.; TANUMIHARDJO, S.A. 2004. Lutein and  $\alpha$ -carotene from lutein-containing yellow carrots are bioavailable in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.80, p.131-136.
- MONFORTE, A.J. et al. 2004. Identification of quantitative trait loci involved in fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.) *Theoretical and Applied Genetics*, v.108, p.750-758.
- MORETTI, C.L.; SARGENT, S.A.; HUBER, D.J.; CALBO, A.G.; PUSCHMANN, R. 1998. Chemical composition and physical properties of pericarp, locule, and placental tissues of tomatoes with internal bruising. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.123, n.4, p.656-660.
- NGUYEN, M.L.; SCHWARTZ, S.J. 1999. Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technology*, v.53, n.2, p.38-45.
- OLSON, J.A. 1999. Carotenoids. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. & ROSS, A.C. (eds). *Modern Nutrition in Health and Disease*, 9th edition. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. p. 525-541.
- PARIS, H.S. 1994. Genetic analysis and breeding of pumpkins and squashes for high carotene content. In: *Vegetables and Vegetable Products*. Springer-Verlag, Berlin. p. 93-115.
- PUIGDOMÈNECH, P. et al. 2007. The Spanish melon genomics initiative. *Acta Horticulturae*, v.731, p. 47-54.
- RAO, A.V. 2002. Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Experimental Biology and Medicine*, v. 227, p. 908-913.

- RAO, A.V.; AGAWAL, S. 2000. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*, v.19, n.5, p.563-569.
- RAO, A.V.; WASEEM, Z.; AGAWAL, S. 1998. Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Research International*, v.31, n.10, p.737-741.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. 2001. A Guide to Carotenoids Analysis in Food. Washington: International Life Sciences Institute Press, 64p.
- RUBATZKY, V.E.; QUIROS, C.F.; SIMON, P.W. 1999. Carrots and Related Vegetable *Umbelliferae*. Crop Production Science in Horticulture Volume 10. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, United Kingdom, 294pp.
- SANTOS, C.A.F.; SIMON, P.W. 2002. QTL analyses reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenes and lycopene in carrot roots. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 268, p. 122-129.
- SHIFRISS, O. 1996. The *B* genes and their phenotypic expression in *Cucurbita*: An overview. *Report of Cucurbit Genetics Cooperative*, v.19, p.73-77.
- SIMON, P.W. 1992. Genetic Improvement of Vegetable Carotene Content. In: *Biotechnology and Nutrition: Proc. Third Int. Symp.* BILLS, D.D.; KUNG, S.-D. (eds.), Butterworth-Heinemann, London. pp 291-300.
- SIMON, P.W. 1996. Inheritance and expression of purple and yellow storage root color in carrot. *Journal of Heredity*, v.87, p.63-66.
- SIMON, P.W.; WOLFF, X.Y.; PETERSON, C.E.; KAMMERLOHR, D.S.; RUBATZKY, V.E.; STRANDBERG, J.O.; BASSET, M.J.; WHITE, J.M. 1989. High carotene mass carrot population. *HortScience*, v.24, p.174.
- SIMON, P.W.; WOLFF, X.Y. 1987. Carotenes in typical and dark orange carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 35, p. 1017-1022.
- SIMON, P.W.; WOLFF, X.Y.; PETERSON C.E. 1985. Selection of high carotene content in carrots. *HortScience*, v.20, p.586.
- SMIDT, C.R.; BURKE, D.S. 2004. Nutritional significance and measurement of carotenoids. *Current Topics in Nutraceutical Research*, v.2, n.2, p. 79-91.
- SURLES, R.L.; NING WENG; SIMON, P.W.; TANUMIHARDJO, S.A. 2004. Carotenoid profiles and consumer sensory evaluation of specialty carrots (*Daucus carota* L.) of various colors. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.52, p. 3417-3421.
- THORUP, T.A.; TANYOLAC, B.; LIVINGSTONE, K.D.; POPOVSKI, S.; PARAN, I.; JAHN, M. 2000. Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the *Solanaceae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 97, p.11192-11197.
- UMIEL, N.; GABELMAN, W.H. 1971. Inheritance of root colour and carotene synthesis in carrot, *Daucus carota* L. orange vs. red. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 97, n.4, p. 453-460.
- VIEIRA, J.V.; DELLA VECCHIA, P.T.; IKUTA, H. 1983. Cenoura 'Brasilia'. *Horticultura Brasileira*, v.1, p. 42.
- VIEIRA J.V., SILVA J.B.C., CHARCHAR J.M., RESENDE F.V., FONSECA M.E.N., CARVALHO A.M.; MACHADO C.M.M. 2005. Esplanada: cultivar de cenoura de verão para fins de processamento. *Horticultura Brasileira*, v.23, p. 851-852.
- WATANABE, K. 1987. Carotenoid pigments in red, orange and yellow-fleshed fruits of watermelon. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, v.56, p.45-50.

- WHITAKER, T.W.; ROBINSON, R.W. 1986. Cucurbit Breeding. In: *Breeding Vegetable Crops*. Bassett, M.J. (ed.) AVI Publishing Co, Westport, Connecticut.
- YARIV, Y. et al. 2002. The isolation and characterization of fruit ripening-related genes in melon (*Cucumis melo*) – a genomic approach. In: *Cucurbitaceae 2002* (D.N. Maynard, ed.), p. 421-426. A.S.H.S. Press, Alexandria, VA.
- ZHIHUA, M. 1995. Heredity of main economic characteristics of the *Cucumis melo*. *Acta Horticulturae*, v.402, p.66-71.

[TOPO](#)