

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***“COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO NÉCTAR
DE LARANJEIRA CONVENCIONAL E
TRANSGÊNICA”***

VALENTIM SALA JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira

Co-Orientador: Prof^a. Dra. Regina Ap. Correia Gonçalves

Maringá 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***“COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO NÉCTAR
DE LARANJEIRA CONVENCIONAL E
TRANSGÊNICA.”***

VALENTIM SALA JUNIOR

Dissertação apresentada para
obtenção do título de mestre em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual de Maringá
Área de concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos Biologicamente
ativos

Maringá 2007

"Nunca desista e acima de tudo lembre-se,
desistir é um hábito difícil de largar".

J. K.

Agradecimentos

A Deus, pela coragem determinação e dignidade em perseguir meus objetivos e pela disposição para sempre seguir em frente;

A minha noiva Thais, por sempre ser muito especial na minha vida desde o dia que a conheci e pela nova fase em nossa vida que iniciamos agora;

A meus pais pelo incentivo em todos os momentos e pelo exemplo de vida;

Ao professor Dr. Arildo José Braz de Oliveira pela oportunidade e orientação que culminaram na realização deste trabalho;

Aos professores Dra. Regina Ap. Correia Gonçalves e Dr. José Eduardo Gonçalves pela co-orientação e ajuda durante o mestrado;

A técnicos Lucílio, Bete e D. Nina pelos bons momentos no laboratório de Química Farmacêutica;

As alunas de Iniciação Científica Francielli Bulla e Valeria Celloto pela ajuda nas análises químicas;

As secretárias Helena e Sônia pelo companheirismo durante o mestrado e durante a graduação;

Ao Departamento de Farmácia e Farmacologia e seus professores que participaram da realização deste mestrado;

Ao IAPAR que gentilmente forneceu material de pesquisa pela realização deste trabalho e ao Pesquisador Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira pela ajuda;

E a todos não citados aqui, mas que participaram da realização deste trabalho.

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 01: Frutos de laranjeira contaminados com cancro cítrico.....	12
Figura 02: Lesões em planta contaminada com cancro cítrico.....	12
Figura 03: Áreas que sofreram prejuízos com a disseminação do cancro cítrico.....	13
Figura 04 Transferência de material genético através do patógeno vegetal <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
Figura 05: Gene da sarcotoxina inserido na sequência de peptídeos usado na transformação.....	15
Figura 06: Extração do néctar floral de laranjeira transgênica no IAPAR.....	19
Figura 07: Filtração e separação de amostras.....	19
Figura 08: Amostras etiquetadas e congeladas para transporte.....	20
Figura 09 Comparação entre as concentrações de triglicérides no néctar de laranjeira convencional e transgênica.....	31
Figura 10: Comparação entre as concentrações dos compostos fenólicos no néctar de laranjeira convencional e transgênica.....	33
Figura 11: Comparação entre as concentrações de xantinas totais (cafeína) no néctar de laranjeira convencional e transgênica.....	34

Figura 12: Concentração dos metabólitos primários em laranjeira convencional (LC) e transgênica (LT).....	37
Figura 13: Concentração dos metabólitos secundários em laranjeira convencional (LC) e transgênica (LT).....	38
Tabela 01: Material botânico transgênico cedido pelo IAPAR.....	17
Tabela 02: Quantidade de açúcar total no néctar de laranjeira.....	27
Tabela 03: Açúcares majoritários presentes no néctar floral de laranjeira.....	28
Tabela 04: Metabólitos primários em néctar de laranjeira convencional (LC) e transgênica (LT).....	37
Tabela 05: Metabólitos secundários em néctar de laranjeira convencional (LC) e transgênica (LT).....	38

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com 355 milhões de caixas produzidas em 2000/ 01, o que corresponde a cerca de 30% da produção mundial. Porém, a citricultura nacional apresenta vários problemas fitossanitários, entre os quais se destaca o cancro cítrico por sua virulência. A obtenção de plantas transgênicas de laranja doce de cultivares plantados no Brasil com o gene da sarcotoxina é uma estratégia muito promissora para aumentar a tolerância à bactéria do cancro cítrico. Os objetivos deste projeto foram: (a) determinar a composição química do néctar de flores da laranjeira convencional e transgênica; (b) otimizar métodos analíticos aplicados a determinação de componentes químicos de néctar floral. Os métodos de análise foram convertidos com sucesso para microescala, gerando economia de tempo e do consumo de reagentes. As amostras analisadas demonstraram poucas mudanças no perfil químico do néctar, principalmente nos compostos secundários, porém não demonstrando alterações significativas nos compostos primários do néctar produzido pelas plantas geneticamente modificadas.

Palavras chave: Laranjeira, laranjeira transgênica, polinização, composição química do néctar, *Citrus sinensis*.

1. INTRODUÇÃO	10
Importância do néctar	10
Cultivo da laranja variedade <i>Citrus sinensis</i>	11
2. OBJETIVOS	16
3. METODOLOGIA	17
3.1. Área de estudo	17
3.2. Material botânico	17
3.3. Extração do néctar	18
3.3. Análise química do néctar	20
3.3.1. Carboidratos	20
3.3.1.1. Açúcares totais	20
3.3.1.2. Glicose	21
3.3.1.3. Sacarose	21
3.3.1.4. Frutose	21
3.3.2. Aminoácidos	21
3.3.3. Proteínas	22
3.3.4. Triglicérides	22
3.3.5. Ácido ascórbico – Vitamina C	22
3.3.6. Compostos fenólicos	23
3.3.7. Alcalóides (Cafeína)	23
3.3.8. Fitoesteróides (Colesterol)	23
3.4. Análise estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Coleta	26
4.2. Análise química do néctar	26
4.2.1. Carboidratos	26

4.2.2. Aminoácidos	29
4.2.3. Proteínas	30
4.2.4. Esteróides	31
4.2.5. Ácido ascórbico – Vitamina C	32
4.2.6. Compostos fenólicos e alcalóides de bases purínicas (cafeína)	33
5. CONCLUSÃO	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

Importância do néctar

O néctar na mitologia greco-romana era considerado como a bebida dos deuses. Atualmente a secreção de néctar é o objeto de pesquisas, pois o mesmo é de importância vital para um grande número de sistemas reprodutivos de plantas com flores. O néctar é a principal recompensa para muitos polinizadores. É produzido a partir da seiva do floema por secreção ativa que resulta em mudanças na composição do fluido original. O néctar é fundamentalmente uma solução de açúcar cujos constituintes principais são a sacarose, a frutose e a glicose em proporções variadas (BAKER & BAKER, 1975). Outros açúcares são encontrados em alguns néctares, como a maltose e melesitose e alguns outros que ocorrem em quantidades muito pequenas ou raras.

Muitas outras substâncias ocorrem no néctar, mais na maioria das vezes somente em quantidades muito pequenas. Os componentes de uma solução de néctar dão um sabor e odor específico que podem ser importantes na atração de grupos específicos de insetos. A presença ou ausência de componentes diferentes de açúcares é também responsável pelas diferenças que os seres humanos notam no sabor e cor do mel derivado de diferentes espécies de plantas. Apesar da visão comum que o néctar constitui-se somente de água e açúcar, uma variedade de outros compostos químicos tem sido reportados em néctares de diversas plantas com flores como, por exemplo: aminoácidos, proteínas, lipídeos, antioxidantes (incluindo ácido ascórbico), alcalóides, glicosídeos, dextrinas e substâncias inorgânicas (BAKER & BAKER, 1978).

A partir destes trabalhos (BAKER & BAKER, 1978) foi possível classificar os constituintes químicos do néctar em 5 grupos de substâncias que estão particularmente envolvidos de maneiras diferentes no processo de co-evolução das plantas e animais antofílicos. Assim, (a) aminoácidos são os constituintes que aparentemente tem menor influência nutricional; (b) as proteínas parecem ter uma importância nutricional similar ou podem estar presente como enzimas; (c) os lipídeos podem ser uma fonte de energia (como os açúcares) ou podem estar envolvidos no crescimento corpóreo; (d) o ácido ascórbico ou vitamina C pode ter uma função nutricional ou simplesmente atuar como antioxidante no néctar; e (e) os alcalóides que teriam um efeito tóxico sobre visitantes e, portanto uma

função protetora contra animais que retiram o néctar das flores e que não são polinizadores eficientes.

Por causa de sua principal função, a recompensa para os polinizadores, é provável que o mesmo seja objeto de pressões de seleção por parte dos polinizadores (BAKER & BAKER, 1990). As características do néctar tendem a ser similares para plantas polinizadas pela mesma taxa de animais, resultando nas diferenças entre néctares de plantas altamente relacionadas mas visitadas por diferentes polinizadores.

Os principais aspectos abordados nas pesquisas envolvendo néctar são, (a) investigar o significado das relações individuais entre flores e polinizadores, especialmente em relação as quantidades das substâncias que os visitantes ingerem e suas necessidades ou sensibilidade a estas substâncias. A outra abordagem refere-se ao papel desta relação no contexto de seu ecossistema apropriado.

Cultivo da laranja variedade *Citrus sinensis*

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com 355 milhões de caixas produzidas em 2000/ 01, o que corresponde a cerca de 30% da produção mundial. Além disso, o país é responsável por, aproximadamente, metade da produção mundial de suco concentrado (61° Brix), um dos principais produtos agrícolas exportados pelo Brasil. O volume de recursos movimentados pelo agronegócio citrícola supera R\$ 5 bilhões por ano, gerando cerca de 400 mil empregos diretos, somente no estado de São Paulo, o maior produtor do Brasil (BESPALHOK-FILHO et al., 2001).

A citricultura nacional apresenta vários problemas fitossanitários, entre os quais se destacam a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), a pinta preta (doença fúngica provocada por *Guignardia citricarpa*), a clorose variegada dos citros (CVC, causada pela bactéria *Xyllela fastidiosa*) e cancro cítrico (causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri) (BESPALHOK-FILHO et al., 2001).

O cancro cítrico tem provocado grandes prejuízos tanto no Brasil como em outros países produtores de citros. Essa doença afeta toda a parte aérea da planta, causando lesões em frutos, folhas e ramos (Figura 01). Os frutos ficam depreciados e caem precocemente, reduzindo a produção

da planta. As portas de entrada para a bactéria do cancro são ferimentos em folhas causados pelo vento ou pelo ataque da larva minadora dos citros (BESPALHOK-FILHO et al., 2001).



Figura 01: Frutos de laranjeira contaminados com cancro cítrico (Fonte: http://www.anl.gov/Media_Center/Image_Library/lifesciences.html)



Figura 02: Lesões em planta contaminada com cancro cítrico (Fonte: http://www.anl.gov/Media_Center/Image_Library/lifesciences.html)

O controle do cancro cítrico tem sido realizado através de medidas para prevenir a introdução da bactéria e da erradicação das plantas contaminadas. Para isso, são realizadas por agências fiscalizadoras, inspeções periódicas em pomares comerciais e domésticos. As plantas cítricas contaminadas, bem como as não contaminadas, num raio de 50 metros, são cortadas e incineradas (BESPALHOK-FILHO et al., 2001).



Figura 03: Áreas que sofreram prejuízos com a disseminação do cancro cítrico. (Fonte: http://www.anl.gov/Media_Center/Image_Library/lifesciences.html)

Somente no ano de 1999 foram gastos cerca de R\$ 33 milhões na erradicação de pomares infectados nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Entretanto, a presença e o progresso epidêmico do cancro cítrico em diversas regiões produtoras de citros ao redor do mundo, e a sua recente introdução e reintrodução em vários países têm levantado dúvidas quanto à eficiência da adoção exclusiva de medidas para impedir a sua introdução em novas áreas e para a erradicação completa da doença em regiões onde ela foi introduzida (LEITE, 1990).

O desenvolvimento de variedades cítricas agronomicamente aceitáveis com adequado nível de resistência é ainda a forma mais econômica e eficiente de controlar o cancro cítrico. Entretanto, o melhoramento de citros é um processo longo, principalmente pelos aspectos botânicos desse gênero. Grande parte das espécies apresenta poliembrionia e longo período juvenil, o que dificulta a seleção de genótipos por hibridação. A obtenção de uma nova variedade é um processo que leva em média 30 anos.

Os principais avanços têm sido obtidos pela seleção de mutações naturais. Frente a esses problemas, a transformação genética da laranjeira mostra-se como uma estratégia de melhoramento muito promissora, podendo ser utilizada para a introdução de novas características em variedades

elite, reduzindo o tempo necessário para o lançamento de novos cultivares (BESPALHOK-FILHO et al., 2001).

Vários métodos disponíveis existem no momento para inserir o DNA recombinante no gene, como a biobalística que usa microprojéteis de metal recobertos com DNA; vetores de plasmídeos “desarmados” (Figura 05) do patógeno vegetal *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 04); ou a absorção direta do DNA por parte dos protoplastos das células das plantas (PAARLBERG, 2003).

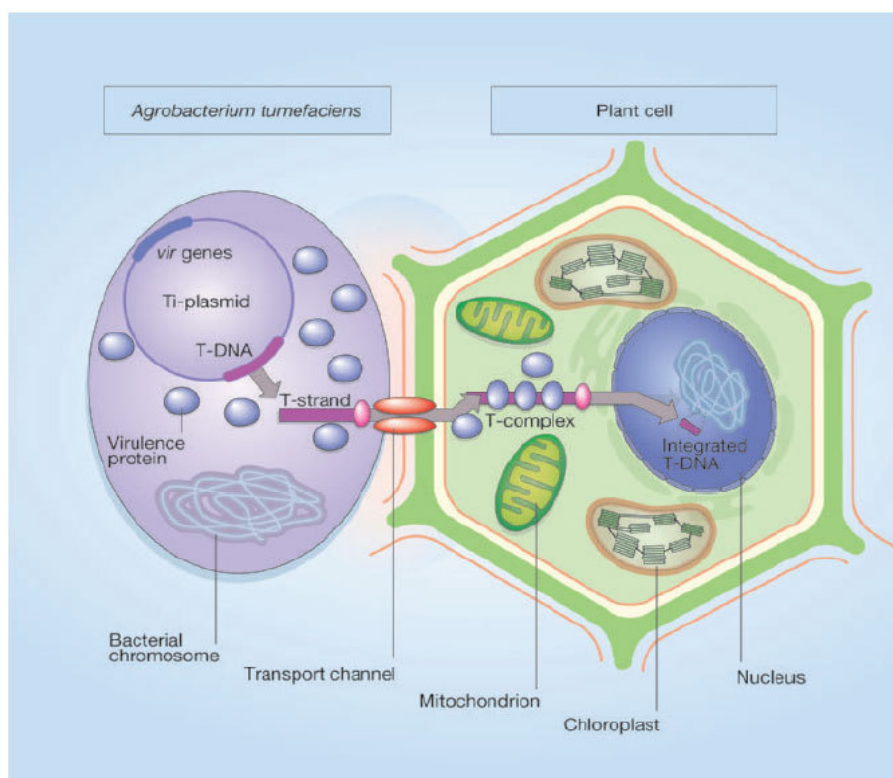


Figura 04: Transferência de material genético através do patógeno vegetal *Agrobacterium tumefaciens*. (Fonte: http://www.anl.gov/Media_Center/Image_Library/lifesciences.html)

Dessa maneira foram realizados trabalhos de transformação de plantas de laranja com o gene da sarcotoxina no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná). Os resultados da inoculação das plantas transgênicas com a bactéria do cancro cítrico mostraram que as plantas apresentando maiores quantidades de sarcotoxina foram mais resistentes a essa doença (BESPALHOK-FILHO et al., 2001).

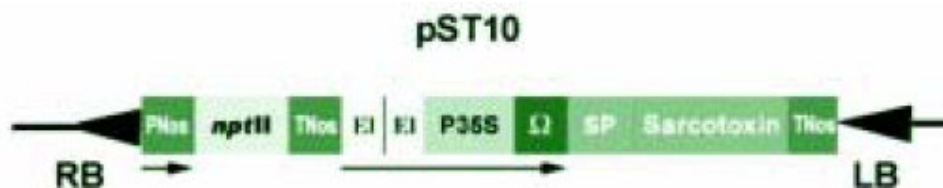


Figura 05. Gene da sarcotoxina inserido na sequência de peptídeos usado na transformação (BESPALHOK-FILHO et al., 2001).

Apesar do sucesso na obtenção de laranjeiras transgênicas e no controle do cancro cítrico, foram necessários estudos para se conhecer o efeito da introdução do gene da sarcotoxina nas plantas, na segurança alimentar e o seu impacto no ambiente, antes que essa tecnologia possa ser utilizada de maneira mais ampla (MITSUHARA et al., 2001; BESPALHOK-FILHO et al., 2001).

Muito se tem discutido atualmente sobre os benefícios e desvantagens dos alimentos geneticamente modificados (GM). Os defensores desses alimentos asseguram que os plantios GM são benéficos para o ambiente e que os alimentos deles provenientes são seguros e não oferecem riscos para a saúde. Os céticos retrucam que as lavouras GM causam riscos para o ambiente e para a saúde (BROWN, 2002).

O vento e os insetos podem carregar pólen de plantações GM para plantas silvestres da mesma família e fertilizá-las. Nesse caso as plantas híbridas se tornarão super ervas daninhas, extremamente resistentes a qualquer tipo de erradicação. Segundo Brown (2002) em muitos casos já se sabe que a transferência irá ocorrer. A questão agora é determinar as conseqüências.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste estudo são:

- Avaliar a composição química do néctar floral de laranjeira transgênica e convencional,
- Otimizar métodos analíticos aplicados a determinação de componentes químicos de néctar floral.

O estudo da composição química do néctar produzido pelas flores das espécies transgênicas e a comparação destas com as das plantas não transgênicas permitirá obter conclusões sobre o impacto ambiental causado por estas espécies geneticamente modificadas, uma vez que qualquer modificação significativa na composição química do néctar irá alterar o delicado equilíbrio nas interações plantas-polinizadores.

3. METODOLOGIA

3.1. Área de estudo

As flores das laranjeiras transgênica e convencional, variedade Pêra, foram cultivadas em casa de vegetação na Estação do Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR em Londrina, onde existe a variedade de laranja transgênica instalada de acordo com as normas de segurança exigidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

3.2. Material botânico

As flores das laranjeiras transgênicas foram coletadas pelos técnicos do Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR e estocadas em freezer a -80°C. O material cedido recebeu identificação segundo o evento realizado e foi processado nas instalações do laboratório do IAPAR. A tabela 01 apresenta os dados coletados para a laranja transgênica e para a laranja convencional.

Tabela 01: Material botânico transgênico cedido pelo Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR

Amostras	Período de coleta	Data da coleta
LT1	Manhã	Agosto /2004
LT2	Manhã	-----
LT3	Manhã	Setembro /2004
LT4	Tarde	Julho /2004
LT5	Tarde	-----
LC1	Tarde	16 /Julho /2004
LC2	Tarde	20 /Julho /2004
LC3	Tarde	23 /Julho /2004
LC4	Tarde	26 /Julho /2004
LC5	Manhã	30 /Julho /2004
LC6	Manhã	02 /Agosto /2004
LC7	Tarde	06 /Agosto /2004
LC8	Manhã	12 /Agosto /2004

3.3. Extração do néctar

As flores coletadas foram congeladas em freezer, na temperatura de -80°C, para preservar os constituintes do néctar. A extração do néctar floral da laranjeira transgênica foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR (CQB junto a CTNBio 0059/98). Cinco amostras de plantas do mesmo indivíduo foram coletadas (cinco flores por planta), e após a coleta foram levadas ao laboratório e imersas em 25 mL de água destilada submetidas à extração em um frasco apropriado e mantidas em agitação por 30 minutos (Figura 06). Os extratos aquosos foram filtrados (Figura 07), aliquotados em frascos de 5 mL e congelados (Figura 08).



Figura 06: Extração do néctar floral de laranjeira transgênica no IAPAR



Figura 07: Filtração e separação de amostras



Figura 08: Amostras etiquetadas e congeladas para transporte

Os extratos de néctar foram submetidos a uma série de ensaios qualitativos e quantitativos, procurando evidenciar a presença de carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipídeos, vitamina C, alcalóides e compostos fenólicos (BAKER & BAKER, 1975).

3.3. Análise química do néctar

3.3.1. Carboidratos

3.3.1.1. Açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados por espectrofotometria pelo método da antrona modificado. Este método consiste na preparação de uma solução padrão de sacarose. Esta solução foi preparada diluindo 500 mg de sacarose em 200mL de água deionizada (2.500 $\mu\text{g/mL}$). A partir desta solução foram preparados padrões com concentrações variando de 10-100 $\mu\text{g/mL}$. A seguir, a 100 μL das soluções padrões e das amostras foi adicionado 0,3 mL do reagente de antrona e mantido em banho-maria à 40° C por 15 min. Para a realização das leituras utilizamos um espectrofotômetro

Varian Cary Modelo 1E UV-VIS em um comprimento de onda de 620 nanômetros (DREYWOOD, 1946).

3.3.1.2. Glicose

Para a determinação da quantidade de glicose do néctar utilizou-se o Kit para doseamento enzimático de glicose Bio Diagnóstica - Laborclin.

3.3.1.3. Sacarose

Em 100 µL de amostra de néctar de laranjeira convencional e transgênica foram adicionados 0,1 mL de solução aquosa de KOH 30% e a mistura mantida a 100°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e a seguir adicionou-se 0,3 mL do reativo de antrona e mantidas em banho-maria à 40°C por 15 min. As leituras das amostras foram obtidas no comprimento de onda (λ) de 620 nanômetros (KEARNS & INOWYE, 1993).

3.3.1.4. Frutose

A partir dos valores calculados da quantidade de sacarose, glicose e carboidratos totais (CT) obtêm-se a quantidade de frutose através da seguinte fórmula:

$$AT = [SAC + GLI] - FRU$$

AT= açúcares totais

GLI= glicose

SAC= sacarose

FRU= frutose

Os valores são expressos em µg/lor (KEARNS & INOWYE, 1993).

3.3.2. Aminoácidos

Os aminoácidos foram, quando presentes, quantificados por um método colorimétrico empregando o reagente de ninidrina. Este método consiste na preparação de uma solução padrão de L-Histidina 1 mg/mL. A partir desta solução foram preparados padrões com concentrações variando de 20-140 µg/mL. A seguir, a 1 mL das soluções padrões e das amostras foi adicionado 2 mL do

reagente de ninidrina e mantido em banho-maria fervente por 15 min. A cada amostra foram adicionados 6 mL de solução etanólica (50%, v/v) e as leituras foram obtidas em um espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 570 nanômetros (BAKER & BAKER, 1975; ROSEN, 1957).

3.3.3. Proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo micro-método de Bradford. Este método consiste na preparação de uma solução padrão de Albumina 0,25 mg/mL. A partir desta solução foram preparados padrões com concentrações variando de 1,0-10 μ g/mL. A seguir à 1 mL das soluções padrões e das amostras foi adicionado 200 μ L do reagente Coomassie blue e as leituras foram obtidas em um espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 595 nanômetros (BRADFORD, 1976).

3.3.4. Triglicérides

Os Triglicérides foram quantificados por espectrofotometria, empregando um Kit enzimático para análise de triglicérides Gold-Análise Triglicérides-PP por metodologia enzimática colorimétrica.

A partir desta solução padrão de triglicérides (equivalente a 200 mg/dL de trioleína) foram preparados padrões com concentrações variando de 10,0-100 μ g/mL. A seguir, a 100 μ L das soluções padrões e das amostras foi adicionado 900 μ L do reagente de cor e mantido a 37°C em banho-maria por 15 minutos e as leituras foram obtidas em um espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 500 nanômetros.

3.3.5. Ácido ascórbico – Vitamina C

A concentração de vitamina C foi determinada empregando-se a espectrofotometria baseada em uma reação colorimétrica com o cloridrato de fenil-hidrazina. A partir desta solução padrão de ácido ascórbico (1 mg/mL) foram preparados padrões com concentrações variando de 10,0-100 μ g/mL. A seguir, a 100 μ L das soluções padrões e das amostras foi adicionado 1 mL de uma solução recém preparada de cloridrato de fenilhidrazina 1% (m/v) e mantida a 50°C em banho-maria por 1 hora e as leituras foram obtidas em um espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 395 nanômetros (LABIB et al., 1974).

3.3.6. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram quantificados por um método colorimétrico adaptado empregando o reagente Azul da Prússia. Este método consiste na preparação de uma solução padrão de ácido tânico e 100 µl desta adicionado de 1 mL de ferrocianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) e 1 mL de cloreto férrico ($FeCl_3$ em 0,1 M de HCL). Misturar bem e aguardar 15 min para que a reação ocorra e forma a cor azulada esperada. Adicionar então 3 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4), agitar bem e ler no espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 700 nanômetros. O ácido fosfórico tem como função estabilizar a cor azulada (GRAHAM, 1992).

3.3.7. Alcalóides (Cafeína)

Para os alcalóides de bases purínicas totais (usando um padrão de cafeína) empregou-se 5 mL da amostra que depois foi alcalinizada com NaOH 0,1 N. Extraíu-se com diclorometano (2,5 mL) duas vezes e deixar em agitação magnética por 5 minutos. Separou-se a fase aquosa do diclorometano, e filtrou sobre sulfato de sódio anidro. Os extratos foram evaporados em banho maria a 50°C e re-suspensos em 2 mL de ácido clorídrico 0,1N. Após, realizou-se a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 273 nanômetros, utilizando cubeta de quartzo (NATHANSON, 1984).

3.3.8. Fitoesteróides (Colesterol)

Os fitoesteróides (usando como padrão o colesterol) foram determinados por um método enzimático empregando o Kit Enzimático Gold-Análise para análise de colesterol. A partir desta solução padrão de colesterol 200 mg/dL foram preparados padrões com concentrações variando de 10,0-100 µg/mL. A seguir, a 100 µL das soluções padrões e das amostras foram adicionados 900 µL do reagente de cor e mantido a 37°C em banho-maria por 15 minutos e as leituras foram obtidas em um espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 500 nanômetros.

3.4. Análise estatística

Se um experimento é repetido ou uma medida é mensurada várias vezes, e se os erros são puramente aleatórios, então os resultados tendem a se agrupar simetricamente em torno de um valor médio. Quanto mais vezes o experimento é repetido, mais os resultados se aproximam de uma curva idealmente suave, chamada distribuição gaussiana. (HARRIS, 2005).

Os resultados podem ser expressos estatisticamente por 2 parâmetros: a média é a soma dos valores medidos divididos pelo número de medidas e o desvio-padrão que determina como os dados estão agrupados em torno da média (HARRIS, 2005).

O teste de Student (teste t) é usado para comparar um grupo de medidas com outro, a fim de decidir se eles são ou não diferentes. Os estatísticos dizem que se testa a hipótese nula, a qual estabelece que os valores médios de dois conjuntos de medidas são iguais. Devido a erros aleatórios, inevitáveis, não se espera que os valores médios sejam exatamente iguais, mesmo sendo as mesmas as grandezas físicas que estão sendo medidas. A estatística permite obter a probabilidade de que a diferença observada em duas médias seja devido a erros de medida puramente aleatórios. Normalmente, a hipótese nula é rejeitada se existe uma chance menor do que 5% de que a diferença observada surja devido a um erro aleatório. Com este critério, existe uma chance de 95% de que a conclusão esteja correta, ou seja, a cada 20 tentativas em que se conclui que as duas medias não são diferentes erra-se somente uma vez (HARRIS, 2005).

Nas análises realizadas as populações obtidas por amostragem apresentavam 5 e 8 indivíduos. Para testar populações com números de indivíduos diferentes deve-se avaliar primeiramente os desvios padrões para avaliar sua significância. Um teste através do qual podemos saber se dois desvios-padrão são “significativamente diferentes entre si” é o teste F, em que:

F = razão entre o maior e o menor desvio=padrão, ou seja:

$$F = s^2_{\text{maior}} / s^2_{\text{menor}}$$

O desvio-padrão maior é sempre o do numerador, de modo que $F \geq 1$. Se o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ então a diferença é significativa.

$F_c > F_t$ (95%) Os desvios-padrões diferem significativamente.	F_c	$F_c < F_t$ (95%) Os desvios-padrões não diferem significativamente.
--	-------	--

a) Se os desvios-padrões não diferem significativamente um do outro, $F_c < F_t$ (95%), aplica-se o teste t empregando a equação (a):

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{\text{agrupado}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

onde

$$s_{\text{agrupado}} = \sqrt{\frac{\sum_{\text{grupo 1}} (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_{\text{grupo 2}} (x_j - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} =$$

$$= \sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

b) Se os desvios padrões diferem significativamente um do outro, $F_c > F_t$ (95%), aplica-se o teste t empregando a equação (b):

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}}$$

$$\text{Graus de liberdade} = \left\{ \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{\left(\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1 + 1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2 + 1} \right)} \right\} - 2$$

As médias foram comparadas usando o software Microcal Origin 6.0, usando o teste t. O F teórico é tabelado para um nível de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Coleta

A floração na casa de vegetação teve que ser induzida por “stress hídrico” levando a problemas como variabilidade no período de floração e coleta. As flores coletadas pelos funcionários do Instituto Agronômico do Paraná foram armazenadas a baixa temperatura, o que impede a determinação de volume. Desse modo não foi possível determinar o volume médio de néctar das flores da laranjeira convencional e transgênica coletadas no Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR

As flores das plantas foram coletadas no período de Agosto a Setembro de 2004, no período da manhã ou da tarde, pois no caso de laranjeiras segundo Malerbo-Souza et al., (2003) o período da coleta não leva a variações significativas nas concentrações dos componentes majoritários do néctar floral.

4.2. Análise química do néctar

Para realizar as análises necessárias no néctar de laranjeira os métodos clássicos de análises foram otimizados. O primeiro passo foi à conversão para microescala, ou seja, trabalhar com microlitros (μL) no lugar de mililitros (mL). Desse modo foi otimizado o tempo de preparo das amostras e o consumo de reagentes diminuiu. Os kits enzimáticos foram recalibrados para operar em faixas menores de detecção, pois a quantidade de analito a ser analisado era menor. Sendo assim o primeiro objetivo do trabalho foi alcançado com a otimização dos métodos de análise.

4.2.1. Carboidratos

A quantidade total de carboidratos está associado a concentração de açúcares (sacarose/glicose/frutose). Foram calculadas as concentrações dos açúcares totais através de técnica espectrofotométrica. Os resultados são apresentados na tabela 02.

Tabela 02: Quantidade de açúcar total no néctar de laranjeira

Laranjeira	Açúcar Total µg/flor
LC (8 amostras)	1792,71 ± 711,75a
LT (5 amostras)	2483,15 ± 974,98a

Em que: médias com letras minúsculas diferentes diferem significativamente pelo Teste t ($P \leq 0,05$).

Para os açúcares totais o F_{calc} foi 1,88. Na situação $F_{calc} < F_{tab}$, foi usado o teste t empregando a equação b. De acordo com o teste os resultados do teste t, com intervalo de confiança de 95%, as concentrações de açúcares totais não apresentaram diferenças significativas nos valores observados (Tabela 02).

Como não houve diferenças significativas nas concentrações dos açúcares totais, o próximo passo foi determinar se ocorriam variações nas concentrações dos açúcares majoritários no néctar, segundo a literatura são: glicose, frutose e sacarose (BAKER & BAKER, 1990).

Através da análise espectrofotométrica foi possível determinar a quantidade isolada de sacarose e por meio de um kit de doseamento enzimático de glicose foi possível medir a concentração de glicose. A quantidade de frutose foi determinada partindo dos valores encontrados para glicose, sacarose e açúcar total, como descrito na parte experimental.

O néctar analisado apresentou a concentração sacarose de $239,30 \pm 107,35$ e $338,10 \pm 158,70$ µg /flor para a laranjeira convencional e transgênica respectivamente. Para a glicose foram encontradas $174,38 \pm 46,71$ e $208,22 \pm 66,57$ µg /flor para a laranjeira convencional e transgênica respectivamente. Para o cálculo da frutose usou-se a fórmula detalhada na parte teórica. Os valores calculados foram $1379,03 \pm 631,88$ e $1936,82 \pm 1017,83$ µg /flor para laranjeira convencional e transgênica. Na tabela 03 encontra-se a relação entre os componentes majoritários do açúcar em porcentagem e a relação entre sacarose e hexose (S/H) das amostras analisadas.

Tabela 03: Açúcares majoritários presentes no néctar floral de laranjeira

Laranja	n	Sacarose %	Glicose %	Frutose %	S/H
Convencional	8	13a	10b	77c	0,1540d
Transgênica	5	14a	7b	79c	0,1576d

Médias na mesma coluna seguidas de letras minúsculas diferentes diferem significativamente pelo Teste t ($P \leq 0,05$).

S/H = razão sacarose/hexose (GLI + FRU)

Através da aplicação dos testes F e t foi determinado que não existem diferenças significativas entre os valores encontrados para os açúcares majoritários do néctar.

Em trabalhos anteriores com espécies de *Passiflora* (VARASSIN et al., 2001), observou-se que flores em que o néctar apresenta alta concentração de frutose são polinizadas por abelhas *Apis mellifera*, beija-flores e mariposas. A relação S/H, Tabela 03, representa um dado importante para determinar a característica do polinizador. Razões sacarose/hexose > 1 denotam plantas sacarose-dominante, enquanto plantas com a razão sacarose/hexose $< 0,5$ são ricos em hexose. Em relação a composição de açúcares no néctar de laranjeira convencional e transgênica as mesmas apresentam um néctar hexose dominante, uma composição química preferida por abelhas de língua curta característica de *Apis mellifera* (BAKER & BAKER, 1990).

No caso das laranjeiras analisadas, apesar de serem na natureza polinizadas principalmente por abelhas *Apis mellifera*, a relação S/H ficou menor do que o esperado. Esse fato pode ser atribuído ao fato das plantas crescerem dentro da casa de vegetação e não se correlacionar com polinizador. Acredita-se que o polinizador exerça algum tipo de estímulo nas flores para a produção de néctar (MALERBO-SOUZA et al., 2003). A qualidade e a quantidade de néctar produzido é um atrativo para as abelhas *Apis mellifera*.

4.2.2. Aminoácidos

Os aminoácidos foram quantificados por um método colorimétrico empregando o reagente de ninidrina e o valor médio de aminoácido determinado para o néctar de flores das laranjeiras foi de $2.356,08 \pm 1.025,23$ μg de aminoácido/flor para a laranjeira convencional e de $3.605,43 \pm 904,61$ μg de aminoácido/flor para a transgênica.

Os resultados obtidos foram submetidos aos testes F e t demonstraram que os valores são significativamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostram um aumento significativo na quantidade de aminoácidos presente no néctar das flores de laranjeira transgênica comparado ao da convencional. Este aumento pode ser atribuído a modificação genética, que introduziu um gene responsável pela produção da sarcotoxina, um peptídeo antimicrobiano que possui 39 aminoácidos e pertence ao grupo das cecropinas (VIEIRA et al., 2001), que uma vez sendo expresso na planta e sendo carregado para o néctar pode contribuir para o aumento das concentrações de aminoácidos no néctar de laranjeira transgênica.

4.2.3. Proteínas

As proteínas foram quantificadas por um método colorimétrico empregando o reagente Comassie blue (BRADFORD, 1976) e o valor médio de proteínas determinado para o néctar de flores das laranjeiras foi de $64,87 \pm 35,07$ µg/flor para a laranjeira convencional e de $63,14 \pm 52,93$ µg/flor para a transgênica.

Os resultados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico e revelam que os valores não são significativamente diferentes entre si para um intervalo de confiança de 95%.

4.2.4. Esteróides

Os triglicérides foram analisados para o néctar das flores das laranjeiras convencional e transgênica e o valor médio foi de $1.186,57 \pm 300,12 \mu\text{g} / \text{flor}$ para o néctar da laranjeira convencional e de $250,03 \pm 178,12 \mu\text{g} / \text{flor}$ para a transgênica, Figura 09. Os resultados obtidos demonstraram que os valores são significativamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%.

Para a análise dos esteróides totais (colesterol) foram observados os valores reduzidos em algumas amostras, $58,90 \pm 31,45 \mu\text{g}/\text{flor}$ para a laranjeira convencional e $88,13 \pm 61,24 \mu\text{g}/\text{flor}$ para laranja transgênica. Esse fato vem corroborar com os resultados já descritos na literatura (VARASSIN et al., 2001), pois as flores de laranjeira não são polinizadas por pássaros e mamíferos. Os resultados obtidos demonstraram que os valores não são significativamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%.

Os triglicérides, junto com o colesterol constituem uma importante forma de captação energética para polinizadores vertebrados. Plantas podem ser polinizadas por morcegos e pássaros que encontram nestes compostos uma fonte de energia mais interessante do que os açúcares.

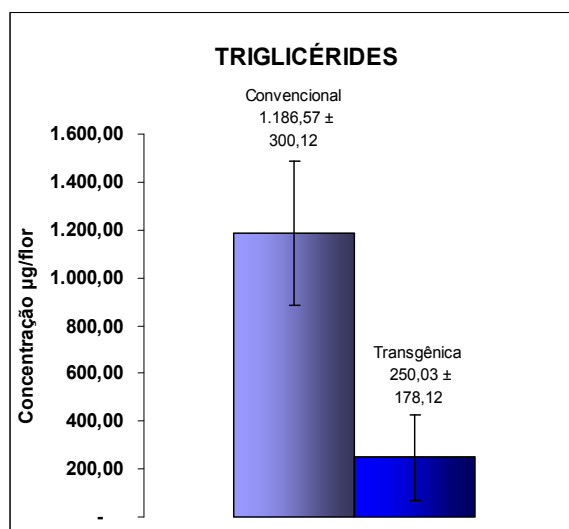


Figura 09. Comparação entre as concentrações de triglicérides no néctar de laranjeira convencional e transgênica.

4.2.5. Ácido ascórbico – Vitamina C

O ácido ascórbico analisado para o néctar das flores das laranjeiras convencional e transgênica e o valor médio foi de $7.155,53 \pm 2.240,88$ µg/flor para o néctar da laranjeira convencional e de $8.882,20 \pm 4.622,38$ µg/flor para a transgênica. O tratamento estatístico revelou não haver diferença significativa entre as concentrações.

O ácido ascórbico presente no néctar não tem importância nutricional para os polinizadores. Ele atua como antioxidante do néctar, preservando os compostos de reações de decomposição.

4.2.6. Compostos fenólicos e alcalóides de bases purínicas (cafeína)

Os compostos fenólicos foram analisados e apresentaram as médias de $0,991 \pm 0,007$ $\mu\text{g}/\text{flor}$ para as amostras da laranja transgênica e $0,975 \pm 0,014$ $\mu\text{g}/\text{flor}$ para a laranja convencional, Figura 10. Esses resultados apresentaram, no intervalo de confiança de 95%, diferenças significantes nos valores observados.

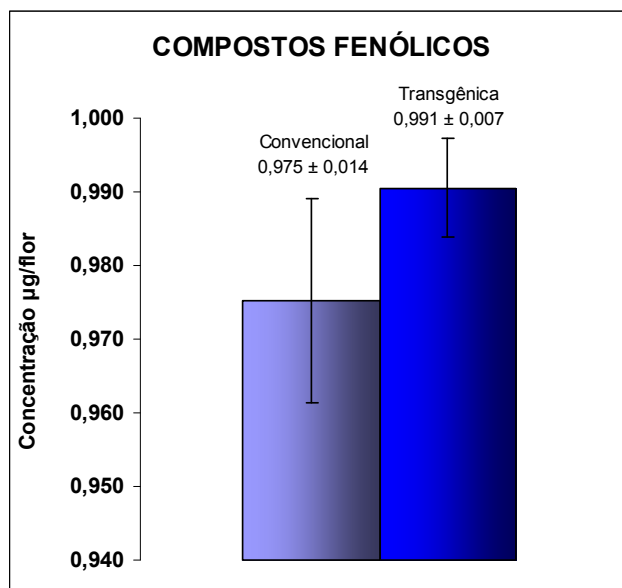


Figura 10. Comparação entre as concentrações dos compostos fenólicos no néctar de laranja convencional e transgênica.

Os alcalóides de bases purínicas (cafeína), que pertencem ao grupo das xantinas, foram analisados por espectrofotometria e foram obtidos os valores de $333,76 \pm 118,38$ e $173,61 \pm 71,93$ $\mu\text{g}/\text{flor}$ para a laranja transgênica e convencional, respectivamente (Figura 11). Esses resultados apresentaram diferenças significativas nos valores observados, no intervalo de confiança de 95%.

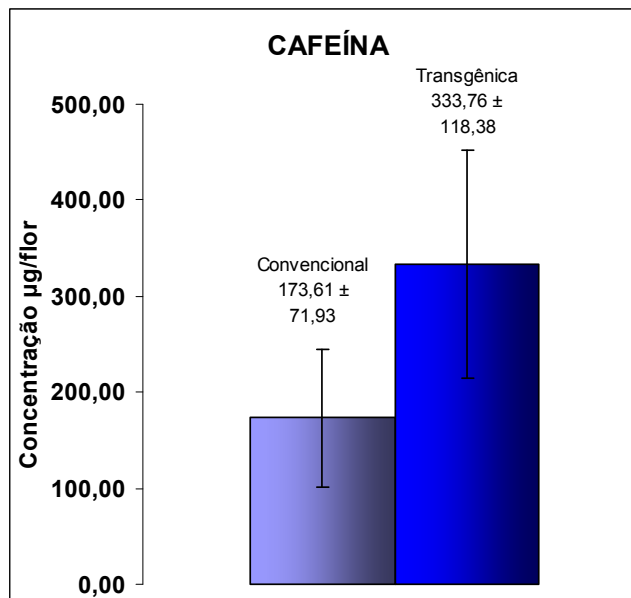


Figura 11. Comparação entre as concentrações de xantinas (cafeína) no néctar de laranja convencional e transgênica.

BAKER & BAKER (1975) foram os primeiros a especular sobre as funções das “substâncias desfavoráveis no néctar floral”. Eles propuseram que as abelhas eram mais resistentes aos alcalóides do que as Lepidópteras e essas substâncias encorajavam a polinização por abelhas mais especializadas do que lepidópteros que eram polinizadores inconstantes. Assim o néctar tóxico pode ser benéfico por afastar visitantes que entregam uma menor quantidade de pólen. Este conceito foi amplamente desenvolvido por Rhoades e Bergdahl (1981), que sugeriram que o néctar tóxico é análogo a outras estruturas florais que requerem especialização dos polinizadores. Como corolas fechadas ou lugares inacessíveis do néctar podem deter e/ou encorajar polinizadores específicos, o néctar tóxico pode ser um mecanismo para aumentar a fidelidade do polinizador. Esta hipótese reconhece que os polinizadores especializados são mais efetivos do que os genéricos, e que estes são menos susceptíveis ao néctar tóxico do que os não-específicos (ADLER, 2001).

Como uma fonte rica dos açúcares e dos nutrientes, o néctar pode ser suscetível à degradação por micróbios. Hagler e Buchmann (1993) sugerem que os fenólicos no néctar podem ser antimicrobianos. Muitas plantas, embora a maioria não, contêm compostos fenólicos em seu néctar (BAKER, 1978; GUERRANT & FIEDLER, 1981). Em um exame da composição do néctar através de uma escala geográfica larga, a porcentagem das espécies das plantas com os constituintes fenólicos

no néctar diminuiu com latitude crescente (BAKER, 1978); isto era também verdadeiro para os alcalóides, que têm efeitos antimicrobianos (VERPOORTE & SCHRIPSEMA, 1994). Mesmo se a diversidade ou a virulência microbiana diminuem com latitude crescente, uma correlação entre a latitude e a toxicidade do néctar não é evidência suficiente para demonstrar que o néctar tóxico é benéfico devido às propriedades antimicrobianas. Atualmente, os dados publicados para avaliar esta hipótese não parecem estar disponíveis (ADLER, 2001).

A hipótese antimicrobiana não relaciona o néctar tóxico diretamente aos visitantes florais específicos, e merece a atenção particular porque fornece uma explanação mais geral e conseqüentemente mais plausível para a evolução inicial do néctar tóxico. Se um novo composto é sintetizado pela planta e se encontra no néctar é improvável para o mesmo ser específico em deter visitantes florais prejudiciais, tais como "ladrões" do néctar ou polinizadores não-específicos, sem que também afete polinizadores especializados. A possibilidade mais plausível atualmente é que os polinizadores se especializam eventualmente no néctar tóxico e não o néctar tóxico serve como agente seletor dos polinizadores. As propriedades antimicrobianas forneceriam um benefício imediato para compostos secundários no néctar que poderia compensar custos potenciais se o néctar tóxico detiver os polinizadores legítimos (ADLER, 2001).

Altas concentrações de metabólitos secundários foram detectadas em microsporos de flores polinizadas pelo vento (MEURER et al., 1988) e insetos (DETZEL & WINK, 1993). Neste último caso a intoxicação dos polinizadores foi aumentada. Detzel e Wink (1993) testaram um grande número de aleloquímicos em alimentos fornecidos para abelhas melíferas. Estes estudos demonstraram que a cafeína atua como um dissuasivo e sua toxicidade foi comparativamente baixa em condições as quais as abelhas não tinham outra opção de alimentação (DL_{50} 10,2%). Em estudos realizados anteriormente com abelhas melíferas (ISHAY & PANIRY, 1979), foi permitido que elas pudessem escolher livremente entre uma solução de açúcar ou uma solução de açúcar com a cafeína, as abelhas preferiram a solução de açúcar. A concentração de cafeína (ca. 250 μ M) era similar as faixas de concentração determinadas no néctar de *Citrus* por Kretschmar e Baumann (1999). A solução que continha cafeína foi facilmente aceita quando era a única opção de alimentação. Após cinco dias, estimulou em 300-500% a oviposição pela rainha (jovem), e aumentou as atividades das abelhas fora da colméia, e aumentou a defesa das abelhas contra a invasão da colméia por vespas. Ao contrário

das abelhas, as vespas que foram alimentadas com cafeína interromperam a coleta de néctar no campo e não conseguiram retirar as larvas mortas (envenenadas pela cafeína) da colméia.

A cafeína e substâncias correlatas são conhecidas não somente por exercerem uma atividade inseticida, mas também por potencializarem sinergeticamente os efeitos dos pesticidas (NATHANSON, 1984). Por outro lado, parece que o efeito tóxico da cafeína sobre as larvas de abelhas melíferas é relativamente baixo.

Yue, Childers e Fouly (1994) relataram que o pólen de *Citrus* foi tóxico para um pequeno ácaro predador o *Euseius mesembrinus*, o qual é um coletor de pólen facultativo amplamente distribuído em plantações de *Citrus*. Se a toxicidade é devido a presença de alcalóides purínicos, pode-se sugerir que os ácaros, em contraste com as abelhas melíferas, são muito suscetíveis aos alcalóides purínicos, uma situação que poderia ser uma vantagem no controle químico do ácaro ectoparasita *Varroa destructor* associado as abelhas melíferas. KRETSCHMAR & BAUMANN, 1999).

As diferenças apresentadas nas concentrações destes metabólitos secundários podem ser importantes para a relação planta-polinizador e estas variações podem ser decisivas no processo de introdução de cultivares transgênicas, pois as mesmas podem ser ainda mais seletivas que as variedades convencionais podendo perturbar este delicado equilíbrio.

A presença da sarcotoxina no néctar também pode influenciar a constituição da microflora do néctar. As abelhas necessitam de certas bactérias presentes no néctar para realizar a digestão do néctar ingerido, pois não possuem enzimas apropriadas para esta função. Este importante equilíbrio também deve ser avaliado, visto que a abelha por si própria não digere o néctar e necessita desta microflora. Uma vez que as bactérias presentes no néctar possam ser afetadas, o néctar perde seu valor para a abelha, que pode preferir outras espécies de plantas reduzindo a polinização e conseqüentemente o rendimento econômico da cultura de *citrus*. Estes parâmetros devem ser avaliados para a introdução da laranjeira transgência nos cultivos de *citrus*, o que demanda futuros estudos e discussões sobre a microflora do néctar da laranjeira geneticamente modificada.

Tabela 4. Metabólitos primários em néctar de laranjeira convencional (LC) e transgênica (LT) em $\mu\text{g}/\text{flor}$.

	Açúcares	Proteínas	AA ($\mu\text{g}/\text{flor}$)	TG	Vit. C
LC	$1792,71 \pm 711,75a$	$64,87 \pm 35,07b$	$3605,43 \pm 904,61c$	$1186,57 \pm 300,12d$	$7155,53 \pm 2240,88e$
LT	$2483,15 \pm 974,98a$	$63,14 \pm 52,93b$	$2356,08 \pm 1025,23c$	$250,03 \pm 178,12d$	$8882,20 \pm 4622,38e$

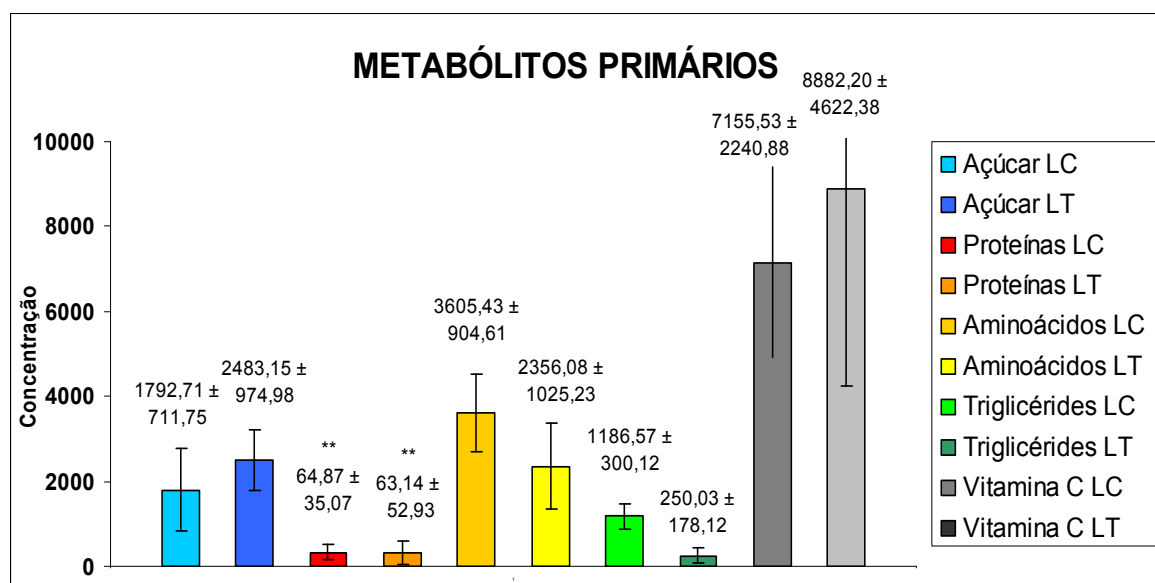


Figura 12 Concentração dos metabólitos primários em laranjeira convencional (LC) e transgênica (LT)

** Valores redimensionados no gráfico devido ao baixo resultado da análise.

Tabela 5. Metabólitos secundários em néctar de laranjeira convencional (LC) e transgênica (LT) em $\mu\text{g}/\text{flor}$.

	Xantinas (Cafeína)	Compostos Fenólicos ($\mu\text{g}/\text{flor}$)	Esteróides
LC	173,61 $\pm$ 71,93	0,975 $\pm$ 0,014	1186,57 $\pm$ 300,12
LT	333,76 $\pm$ 118,36	0,991 $\pm$ 0,007	250,03 $\pm$ 178,12

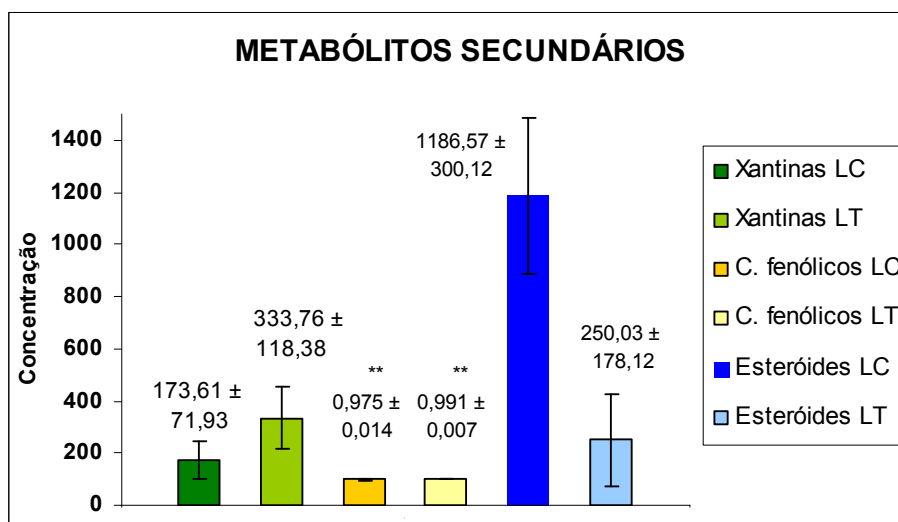


Figura 13. Concentração dos metabólitos secundários em laranjeira convencional (LC) e transgênica (LT) ** Valores redimensionados no gráfico devido ao baixo resultado da análise.

5. CONCLUSÃO

Os métodos analíticos utilizados para a determinação da constituição química do néctar foram otimizados usando a diluição em microescala. Deste modo as técnicas se tornaram mais eficientes pelo aumento da praticidade do método e economia dos reagentes, sem perder a precisão das mesmas.

Os resultados obtidos nas análises demonstraram que houve poucas alterações significativas no perfil dos metabólitos primários (açúcares, proteínas e vitamina C) do néctar da laranjeira transgênica em relação ao da laranjeira convencional, com exceção a concentração dos aminoácidos, que pode ser explicada pela inserção do gene que expressa a produção da sarcotoxina e dos triglicérides. As principais mudanças observadas ocorreram nos metabólitos secundários presentes no néctar floral, principalmente, os alcalóides do grupo das purinas (xantinas) e dos compostos fenólicos. Os metabólitos secundários, apesar de aparecerem em quantidades reduzidas podem influenciar tanto na polinização quanto na composição do mel.

Deste modo, conclui-se que a modificação genética gerou uma planta viável sem alterações expressivas no perfil químico do néctar da laranjeira. A próxima avaliação a ser realizada é a introdução do polinizador no estudo, para testar se este é afetado de modo significativo pela presença da sarcotoxina ou pela mudança de algum parâmetro químico do néctar. A microflora do néctar, responsável em algumas espécies de abelhas como a *Apis mellifera* pela digestão do néctar, também deve ser estudada, pois a sarcotoxina sintetizada pela planta é um antibacteriano que pode ser nocivo para a microflora do néctar, podendo favorecer a proliferação de certas bactérias e inibir o crescimento de outras sensíveis a este.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, L. S. The ecological significance of toxic nectar. - **Oikos** v.91, p: 409–420, 2001

BAKER, H.G.; BAKER, I., Studies of nectar-constitution and pollinator plant coevolution. *In*: **Coevolution of Animals and plants**, p.100-140; 1975

BAKER HG, BAKER I. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. **Israel Journal of Botany** v.39: 157-166, 1990

BAKER, H. G. Chemical aspects of the pollination biology of woody plants in the tropics. – In: **Tropical trees as living systems**, p. 57–82, 1978

BESPALHOK-FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E., Laranja Transgênica: Transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.23, p.62 - 66, 2001

BRADFORD, M. M., Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.241-250, 1976

BROWN, K., Transgênicos seguros ou não? Scientific American Brasil, <http://www2.uol.com.br/sciam/reportagem/report10.html>

DETZEL, A.; WINK, M. Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. **Chemoecology**, v. 4, p. 8-18, 1993

DREYWOOD, R., **Industrial Engering Chemical Analytical**, v. 18, p. 499, 1946

GUERRANT, E. O., JR., FIEDLER, P. L. Flower defenses against nectar-pilferage by ants. – **Biotropica** 13 (Suppl): 25–33, 1981

GRAHAM, HORACE D., Stabilization of the prussiam blue color in the determination of poliphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n 40 p. 801-805, 1992

HARRIS, D. C., **Análise Química Quantitativa**. 6^a.ed, 2005

HAGLER, J. R. AND BUCHMANN, S. L. Honey bee (Hymenoptera: *Apidae*) foraging responses to phenolic-rich nectars. – **J. Kansas Entomol. Soc.** 66: 223–230, 1993

ISHAY, J. S.; PANIRY, V. A. Effects of caffeine and various xanthines on hornets and bees. **Psychopharmacology**, v. 65, p. 299-309, 1979

KEARNS, C.A.; INOWYE, D.W., Techniques for pollination biologists. **University Press of Colorado**. p. 583, 1993

KRETSCHMAR J.A.;BAUMANN T.W. Caffeine in *Citrus* flowers **Phytochemistry**, v. 52, p. 19-23, 1999

LABIB, S. R.; WAHBA, N.; YASSA, A. D., A simplified colorimetric method for the determination of ascorbic acid in pure solutions and in pharmaceutical preparations. **Analyst**, v.99, p.397-402, 1974

LEITE, R.P. Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná. Circular No 61, **Fundação Instituto Agrônômico do Paraná**, p. 51, 1990

MALERBO-SOUZA; D. T. NOGUEIRA-COUTO,;R. H. COUTO, L. A. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio) **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v.40 p.237-242, 2003

MEURER, B.; WRAY, V.; WIERMANN, R.; STRACK, D. Phenylpropanoid patterns in fagales pollen and their phylogenetic relevance. **Phytochemistry**, v. 27, p. 839-843, 1988

MITSUHARA, I.; NAKAJIMA, Y.; NATORI, S.; MITSUOKA, T.; OHASHI, Y., *In vitro* growth inhibition of human intestinal bacterial by sarcotoxin IA, an insect bactericidal peptide. **Biotechnol Lett**, v.23, p. 569-573. 2001

NATHANSON, J. A. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. **Science**, v. 226, p. 184-187, 1984

PAARLBERG, R.L. The Politics of Precaution: Genetically Modified Crops in Developing Countries, **The Johns Hopkins University Press**, p. 1-2. 2003

RHOADES, D. F. AND BERGDAHL, J. C.. Adaptive significance of toxic nectar. – **Am. Nat.** 117: 798–803, 1981

ROSEN, H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.67, p. 10-15, 1957

VARASSIN, I.G.; TRIGO, J.R.; SAZIMA, M.; The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (*Passifloraceae*) in south-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. V 136; 139-152, 2001

VERPOORTE, R. AND SCHRIJPEMA, J. Isolation, identification, and structure elucidation of alkaloids: a general review. - In: Linskens, H. F. and Jackson, J. F. (eds), **Modern methods of plant analysis**. v. 15, p. 1–24, 1994.

VIEIRA et al., Laranja transgênica, **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n 23, novembro/dezembro, 2001.

Floral nectar chemical composition of conventional and transgenic sweet orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, expressing an antibacterial peptide

Valentim Sala Junior^a, Valéria Rodrigues Celloto^a, Luiz Gonzaga Esteves Vieira^c, José Eduardo Gonçalves^b, Regina Aparecida Correia Gonçalves^a,
Arido José Braz de Oliveira^{a,*}

^aLaboratório de Química Farmacêutica e Síntese, Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil, Avenida Colombo, 5790, CEP: 87020-900; ajboliveira@uem.br, racgoncalves@uem.br

^bCentro Universitário de Maringá - CESUMAR, Av. Guerdner 1619, 8705-390, Maringá-PR, Brasil; jegoncal@cesumar.br

^cLaboratório de Biotecnologia Vegetal; Instituto Agrônomo do Paraná; lvieira@iapar.br; C. P. 481; CEP: 86001-970

Abstract

Floral nectar chemical composition of conventional and transgenic sweet orange trees expressing the antibacterial peptide sarcotoxin IA (Stx IA), which has been shown to efficiently inhibit *in vitro* growth of the bacteria responsible for citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), is reported. The nectar contents of primary metabolites: sugars, amino acids, proteins, triacylglycerides and of the secondary metabolites: total purine alkaloids, phenolics compounds and phytosteroids were determined by spectrophotometric analysis. The results showed small variations in the nectar primary and secondary metabolites composition. The biochemical and biological significance of the variations in the nectar contents of the primary and secondary metabolites and the possible effects of these variations in the key citrus pollinators are discussed.

Keywords: *Citrus sinensis*, nectar chemical analysis, transgenic plants, sarcotoxin IA

1. Introduction

Brazil is the largest citrus producer in the world and also the major leading producer and exporter of frozen concentrated orange juice. Nevertheless, the Brazilian citrus industry has showed many sanitary problems such as the bacteria diseases citrus variegated chlorosis (*Xylella fastidiosa*) and citrus canker (caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri) (Bespalhok-Filho et al., 2001a)

The citrus canker has caused high economical losses in Brazil and other citrus producing countries (Bespalhok-Filho et al., 2001a). Although different levels of field resistance among citrus species, hybrids and cultivars to citrus canker have been reported (Leite, 1990), the resistance in commercial cultivars is not adequate to control the disease. Besides the lack of natural source of resistance, citrus breeding is limited by several factors related to its reproductive biology (Mendes et al., 2002).

Different technologies, including molecular methods and cell/tissue culture, have offered alternatives for citrus genetic improvement and some of these barriers can be overcome. The development and optimization of efficient protocols for obtaining transgenic plants can offer great advantages to citrus breeding programs, allowing the introduction of important traits to elite cultivars (Vardi et al., 1990; Kaneyoshi et al., 1994; Peña et al., 1995).

Using this approach, Bespalhok et al. (2001b) introduced a gene encoding sarcotoxin IA in sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cv. Pera, that showed to be highly efficient for *in vitro* growth inhibition of the bacteria responsible for citric canker, *Xanthomonas axonopodis* pv. citri at low concentration (Ohshima et al., 1999). Sarcotoxins are cecropin-like antibacterial peptides isolated from larvae of the common flesh fly, *Sarcophaga peregrina*. They belong to a type of antibacterial peptide in which two amphiphilic α -helices interact with bacterial cell membrane, causing loss of membrane electrochemical potential

(Nakajima et al., 1987). The transgenic events with high sarcotoxin IA expression were reported to be more resistant to citrus canker under greenhouse conditions (Bespalhok et al., 2001b).

Many plants need animal pollinators to obtain efficient seeds sets. Dicotyledonous plants often attract these pollinators offerings floral nectar that is secreted into the floral tube at the base of ovary. Nectar is considered the most important floral rewards by flower to animal visitors (Simpson and Neff, 1983). Nectar is an aqueous combination of a significant number of substances such sugars, amino acids, proteins, lipids, phenols, alkaloids and antioxidants (Baker and Baker, 1983; Carter et al., 1999; Kretshmar and Baumann, 1999).

All these substances often impart particular function, taste and odour that may be essential for maintaining certain pollinator groups (Sowthwick, 1990). In many cases it has been interpreted as the pollinator determine nectar components (Galleto and Bernadello, 2004). Also, the nectar is not sterile. Insects or avian pollinators certainly transfer microorganisms from flower to flower and, for this reason, a chemical variation in the nectar composition could alter the microflora present in the nectar.

Considering that insertion of a transgene will vary among plants derived from separate transformation events, possible pleiotropic effects may interfere unpredictably with a biochemical pathway in the plant to create phenotypic changes. Consequently, variations in nectar chemical composition caused by the insertion of a transgene through genetic manipulation could alter the interactions flower-pollinators in crop plants. Potentially, novel proteins occurring in nectar from a genetically modified plant may affect pollinators behaviour, development or survival, or it may have no effect.

Results so far suggest that transgenic plant impacts on pollinators will depend on a case-by-case analysis of the gene concerned and its expression in the parts of the plant

ingested by insects (Malone and Pham-Delègue, 2001). Considering this aspect, the study of the nectar chemical composition is important to access environmental impacts of transgenic plants. In this work, we analyze the main nectar constituents of conventional and Stx IA transgenic sweet orange trees growing in greenhouse conditions without the influence of pollinators. The results were discussed in the chemical and ecological context.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Non-transgenic (9 plants) and transgenic sweet orange trees originated from five different transformation events with high sarcotoxin IA expression (5 plants from each event) were grown in a greenhouse at Agronomic Institute of Paraná State (IAPAR), in Londrina, Paraná State, Brazil, in the absence of pollinators that were controlled by weekly insecticide applications.

The plasmid pST10 (Okamoto et al., 1998) was utilized for transformation. This plasmid contains the sarcotoxin IA coding region fused to the signal peptide from *Nicotiana tabacum* PR1a gene under a constitutive high expression promoter consisting of the CaMV 35S promoter, 2 repeats of the 5' enhancer sequence of CaMV 35S promoter and the Ω 5'-untranslated sequence from the tobacco mosaic virus (TMV). The plasmid also contains the selectable marker gene *nptII* under the control of the NOS promoter. The transgenic plants containing the gene for sarcotoxin IA were obtained by transformation with *Agrobacterium tumefaciens* (Bespalhok et al., 2001b).

2.2. Nectar extraction

Due to irregular blooming of the citrus plants grown in greenhouse conditions, the flowers were collected in different ages of development. Fresh entire flowers (n=25) from

each event (5 transformation events) were randomly collected during morning and afternoon period, pooled and extract with distilled water (30 ml) at room temperature for 30 min by magnetic stirring. After that the solution was filtrated in filter paper into a 50 ml volumetric flask and the volume was adjusted to 50 ml with distilled water.

The nectar solutions were aliquoted (5 ml) in 10 ml amber flask and maintained in freezer at -20°C needed for assaying. These solutions were used in all chemical analysis.

2.3. Data processing

The data were statistically analyzed using a complete randomized experimental design, with four replicates. After variance analysis and F test, means were compared using Tukey's test using Microcal Origin 6.0 software (Microcal Software Inc.). Differences at level of 5% were considered significant.

2.4. Chemical analysis

All the analysis of the nectar constituents was determined using a Varian Cary Spectrophotometer (Model 1E UV-VIS). The total sugar (TS) content was determined by colorimetric analysis using the anthrone method (Passos, 1996). The individual concentrations of the main sugars in the nectar (glucose, fructose and sucrose) were determined through colorimetric analysis. Glucose (G) concentration was determined by colorimetric-enzymatic method using a commercial kit (Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, Brazil), sucrose (S) by anthrone method after monosaccharides removal by treatment with hot 30% aqueous KOH and fructose (F) by subtraction from the total sugars, glucose and sucrose values ($[F] = [TS] - [G] - [S]$).

The total amino acids content per flower was determined using a modified ninhydrin reagent method (Hungria et al., 1994) and the total protein analysis was performed by the Bradford assay (Bradford, 1976).

Triacylglycerides and total phytosteroids were assayed by colorimetric-enzymatic analysis (Varassin et al., 2001) using available commercial kits for triacylglycerides and total cholesterol measurement in blood serum (Gold-Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, Brazil).

Total phenolics were determined by colorimetric analysis using the Prussian blue method (Graham, 1992).

To determine total purine alkaloids (TPAs) per flower, the nectar solution was alkalized to pH 9.0 with NaOH 0.1M, and extracted three times with the same volume of CH₂Cl₂. The extract was subsequently evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in 1.0 mL of HCl 0.1M for spectrophotometric analysis or resuspended in 1.0 mL of CH₂Cl₂ to be used for thin layer chromatography (TLC) analysis. TPAs in CH₂Cl₂ extracts were identified by TLC in silica gel G60 aluminium plates, using CHCl₃:Methanol (90:10, v/v) as eluent. Dragendorff spray was used as the detecting reagent, using the caffeine as standard (retention factor of caffeine 0.5 %, w/v = 0.6). As the TLC analyses showed that caffeine is the purine alkaloid (PA) present at the highest concentration in all samples analyzed, TPAs concentration was assayed by spectrophotometry using UV measurement at 273 nm and caffeine as standard (Moffat, 1986).

3. Results and Discussion

Concentration of primary metabolites (sugars, amino acids, proteins and triacylglycerides) and of secondary metabolites (total purine alkaloids, total phytosteroids and phenolics) in the nectar of conventional and transgenic sweet orange trees is represented in Figure 1 and 2, respectively.

The mean concentrations of total sugars per flower for conventional and transgenic sweet orange were not different (Figure 1A), showing that the insertion of the transgene by genetic transformation did not caused any change in this main component of the nectar. In order to verify whether the proportion of different sugars could differ between conventional and genetically modified plants, the relative proportions (%) of the sugars more frequently found in the nectar, glucose, fructose and sucrose, were determined and the sugar ratio (SR) calculated. The results showed no significant differences among the contents of these sugars in the nectar of conventional when compared with the transgenic orange trees ($P \leq 0.05$) (Table 1).

Most nectars are also free of protein, being composed principally of sugars and sometimes free amino acids (Baker and Baker, 1977). There are exceptions to this however. Tobacco plants have been found to secrete a limited array of proteins to a concentration of about 0.024% protein of total nectar (Carter et al., 1999). In our study, the analysis of proteins and amino acids contents per flower in the nectar of conventional and transgenic plants showed that proteins concentrations do not differ significantly but the amino acids concentration present differences (Figure 1). Initially, it would be expected an increment in protein concentration caused by the constitutive production of sarcotoxin IA (Okada and Natori, 1985). However, due to the fact that the small proteins and peptides are easily degraded by plant proteases (Mitsuhashi et al., 2000), probably the sarcotoxin IA, an antimicrobial peptide with 39 amino acids, was breakdown in the intercellular fluids as the nectar.

Therefore, the increase of amino acids content in the floral nectar of the sweet orange transgenic trees in relation to the nectar present in flowers of conventional trees can be attributed to the genetic transformation approach used to obtain the plants expressing the Stx IA gene, as the 35S CaMV promoter induces the plant to express the sarcotoxin IA gene

constitutively. The sarcotoxin IA once produced in nectaries of transgenic plant can be transported to the nectar, where it can be easily degraded by proteases contributing to increased amino acids content in the floral nectar of the transgenic sweet orange trees.

The other primary metabolites present in the nectar of conventional and transgenic orange trees did not present a significant variation in their concentration (Figure 1) with exception of triacylglycerides, where the concentration in the conventional was higher than in transgenic floral nectar. A possible explanation for reduction of the triacylglycerides content in transgenic nectar is the capacity of sarcotoxin IA to bind lipids forming stable complexes (Okemoto et al., 2002), which in turn may interfere with the enzymatic assay sensitivity for triacylglycerides detection. This is an important factor if sweet orange trees would have to rely on vertebrates as pollinator agents (Malerbo-Souza et al., 2003).

The contents of the secondary metabolites (TPA = caffeine and phenolics compounds) showed an increase in the nectar of transgenic sweet orange trees in relation to the conventional plants (Figure 2). Caffeine was estimated by TLC analysis as the main purine alkaloid (PA) present in the floral nectar of conventional and transgenic orange trees. This result is consistent with data obtained by Kretschmar and Baumann (1999) that showed that caffeine is the major purine alkaloid in the nectar of different *Citrus* species.

An explanation for the increment of caffeine in the nectar of transgenic orange trees may be attributed to elevation of amino acids concentration. In contrast to the situation with many other alkaloids, the main carbon skeleton of purine alkaloids such as caffeine does not originate directly from an amino acid (Weilacher et al. 1996). Only the core of the molecule is made from glycine, while the other C atoms are provided from the tetrahydrofolic acid (THF) pool, active formate or formaldehyde, and one of them even from HCO_3 . The methyl groups are derived, as in all other alkaloids, from S-adenosylmethionine (SAM). Interestingly, the primary source of glycine as well as of all C_1 compounds mentioned is serine (Weilacher et

al., 1996). Therefore a direct and indirect correlation of purine biosynthesis with amino acids metabolism can be expected, because yet with different metabolic distances of the individual precursors from this origin. Caffeine is produced from a purine, nevertheless purines are derivated from amino acids as L-glycine, L-aspartic acid and L-glutamine, this amino acids pools may be originated by sarcotoxin degradation (Okada and Natori, 1985) and may to contribute to the increase of caffeine biosynthesis in transgenic orange tree, since them caffeine synthases are active in the nectarines of transgenic sweet orange tree.

Secondary metabolites (SM) are not uncommon in floral nectar, and depending of the specific compound, SMs have been found in 9–55% of surveyed species (Baker and Baker, 1975; Baker, 1977, 1978). Moderate, but still noticeable purine alkaloids concentrations were found in the nectar of *Citrus* (Kretschmar and Baumann, 1999). Detzel and Wink (Detzel and Wink, 1993) tested a great number of such allelochemicals on the feeding behavior of honeybees. Caffeine was found to act as a deterrent and its toxicity was comparatively low under no-choice conditions (LD50 at 0.2%).

Caffeine and related substances are known not only to exert insecticidal activity but also to synergize the effects of pesticides (Nathanson, 1984). On the one hand it seems that the toxicity of caffeine in the honey-bee larvae, but the knowledge about effects of caffeine-rich nectar citrus on honey-bees is relatively small (Kretschmar and Baumann, 1999). Therefore an increase in caffeine concentration in transgenic sweet orange nectar may become deterrent or even toxic to floral visitors (Adler, 2000). Caffeine and related substances in nectar may mediate plant–pollinator interactions affecting the fitness of both plants and pollinators (Baker, 1977).

As a rich source of sugars and nutrients, nectar could be susceptible to degradation by microbes. Hagler and Buchmann (1993) suggest that phenolics in nectar could be antimicrobial. Many plants, although not the majority, contain phenolics in their nectar (Baker

1978, Guerrant and Fiedler 1981). The variations in concentrations of phenolics compounds were very small (Figure 2), but statistically significant. This could be indicative of an alteration induced by genetic transformation with the antibacterial peptide sarcotoxin IA through the modification of the nectar microflora. Therefore further studies are necessary to verify the influence of phenolics contents on the microflora of transgenic sweet orange floral nectar.

In summary, the main floral nectar components of the conventional and transgenic sweet orange trees were analyzed to study possible quantitative and qualitative modifications. The results showed that there are small variations, but significant, in the primary and secondary metabolites contents. These data suggest that the introduction of the gene responsible for the production of the antibacterial peptide sarcotoxin IA could modify the amino acids, triacylglycerides and purine alkaloids content present in the sweet orange nectar. Such nectar this composition alteration can affect floral visitors, such as nectar robbers, generalist pollinators and specialized pollinators. Further investigations will be required to enlarge our understanding of multispecies interactions, as plant-pollinator, plant-herbivore and plant-microorganisms and to evaluate the impact of gene insertions on the nectar composition of genetically modified plants.

Acknowledgments

The authors are grateful to F. Araucária, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

Adler, L.S., 2000. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91, 409-420.

- Baker, H.G., Baker, I., 1975. Studies of nectar-constitution and pollinator–plant coevolution, In: Gilbert, L.E., Raven, P.H. (Eds.), *Coevolution of Animals and Plants*, University of Texas Press, Austin, Texas, pp. 100-140.
- Baker, H.G., 1977. Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie* 8, 349-356.
- Baker H.G., Baker I., 1977. Intraspecific constancy of floral nectar amino acid complements. *Botanical Gazette* 138, 183-191.
- Baker, H.G., 1978. Chemical aspects of the pollination biology of woody plants in the tropics, In: Tomlinson, P.B., Zimmerman, M. H. (Eds.), *Tropical trees as living systems*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 57–82.
- Baker, H.G., Baker I., 1983. A brief historical review of the chemistry of floral nectar, In: Bentley, B., Elias, T. (Eds.), *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, pp. 126-152.
- Bespalhok-Filho, J.C., Kobayashi, A.K., Pereira, L.F.P., Hissano, Z., Vieira, L.G.E., 2001a. *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. *Crop Breed Applied Biotechnology* 1, 27-34.
- Bespalhok-Filho, J.C., Kobayashi, A.K., Pereira, L.F.P., Vieira, L.G.E., 2001b. Laranja Transgênica: Transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 23, 62-66.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 241-250.
- Carter, C., Graham, R.A., Thornburg, R.W., 1999. Nectarin I is a novel, soluble germin-like protein expressed in the nectar of *Nicotiana* sp. *Plant Mol. Biol.* 41, 207–216.
- Detzel, A., Wink, M., 1993. Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. *Chemoecology* 4, 8-18.

- Galetto, L., Bernardello, G., 2004. Floral Nectaries, Nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany* 94, 269-280.
- Graham, H.D., 1992. Stabilization of the prussiam blue color in the determination of polyphenols. *J. Agr. Food Chem.* 40, 801-805.
- Guerrant, E.O., Jr. Fiedler, P.L., 1981. Flower defenses against nectar-pilferage by ants. *Biotropica* 13 (Suppl), 25-33.
- Hagler, J.R., Buchmann, S.L., 1993. Honey bee (Hymenoptera: Apidae) foraging responses to phenolic-rich nectars. *J. Kansas Entomol. Soc.* 66, 223-230.
- Hungria, M., 1994. Metabolismo do carbono e nitrogênio nos Nódulos, In: Hungria, M.; Araujo, Ricardo S. (Eds.), *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. EMBRAPA/SPI, Brasília, Brasil, pp. 249-283
- Nathanson, J.A., 1984. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides, *Science* 226, 184-187.
- Kaneyoshi, J., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Shigemoto, N., Doi, Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Plant Cell Rep.* 13, 541-545.
- Kretschmar, J.A., Baumann T.W., 1999. Caffeine in *Citrus* flowers. *Phytochemistry* 52, 19-23.
- Leite, R.P., 1990. Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná. Circular N°61, Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina, Pr, 51p.
- Malerbo-Souza, D.T., Nogueira-Couto, R.H., Couto, L. A. 2003. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 40, 237-242.

- Malone, L. A., Pham-Delègue, M.H., 2001. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus sp.*). *Apidologie* 32, 1–18.
- Mendes, B.M.J.M., Boscariol, R.L., Mourão Filho, F.A.A., Almeida, W.A.B. 2002. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of ‘Hamlin’ sweet orange. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 37, 955-961.
- Mitsuhara, I., Matsufuru, H., Ohshima, M., Kaku, H., Nakajima, Y., Murai, N., Natori, S., Ohashi, Y., 2000. Induced Expression of Sarcotoxin IA Enhanced Host Resistance Against Both Bacterial and Fungal Pathogens in Transgenic Tobacco. *Mol. Plant Microbe In.* 13, 860-868.
- Moffat, A.C., 1986. Clarke’s Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Press, London.
- Nakajima, Y., Qu, X. M., Natori, S. 1987. Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Bio. Chem.* 262, 1665-1669.
- Okada, M. and Natori, S., 1985. Primary Structure of Sarcotoxin I, an Antibacterial Protein Induced in the Hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (Flesh Fly) Larvae. *J. Biol. Chem.* 260, 7174-7177.
- Okamoto, M., Mitsuhara, I., Ohshima, M., Natori, S., Ohashi, Y. 1998. Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiology* 39, 57-63.
- Okamoto, K., Nakajima, Y., Fujioka, T., Natori, S., 2002. Participation of two N-Terminal residues in LPS-Neutralizing activity of sarcotoxin IA. *J. Biochem.* 131, 277-281.
- Ohshima, M., Mitsuhara, I., Okamoto, M., Sawano, S., Nishiyama, K., Kaku, H., Natori, S., Ohashi, Y. 1999. Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. *J. Biochem.* 125, 431-435.

- Passos, L.P. 1996. Carbohidratos: análise quantitativa In: Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal, EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil. pp. 53-65.
- Peña, L., Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Durán-Vila, N., 1995. Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep. 14, 616-619.
- Simpson, B.B., Neff, J.L., 1983. Evolution and diversity of floral rewards. In: Jones, C.E., Little, R.J. (Eds.), Handbook of experimental pollination biology. Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York., pp. 142-159.
- Southwick, EE. 1990. Floral nectar. Am. Bee J. 130, 517-519.
- Varassin, I.G., Trigo, J.R., Sazima, M., 2001. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (*Passifloraceae*) in south-eastern Brazil. Bot. J. Linn. Soc. 136, 139-152.
- Vardi, A., Bleichman, S., Aviv, D. 1990. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. Plant Science 69, 199-206.
- Weilacher, T., Gleixner, G., Schmidt, H. L. 1996. Carbon isotope pattern in purine alkaloids a key to isotope discriminations C1 compounds. Phytochemistry 41, 1073-1077.

Table 1. Sugar content (%) in conventional (COT) and transgenic (TOT) sweet orange floral nectar.

	Sucrose (%)	Fructose (%)	Glucose (%)	Sugar Ratio ²
COT¹	13 ^a	10 ^a	77 ^a	0.1540 ^a
TOT¹	14 ^a	7 ^a	79 ^a	0.1576 ^a

¹Means followed by same letter on each row were not significant according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

² Sugar Ratio = $\frac{[\text{Sucrose}]}{[\text{Fructose}] + [\text{Glucose}]}$

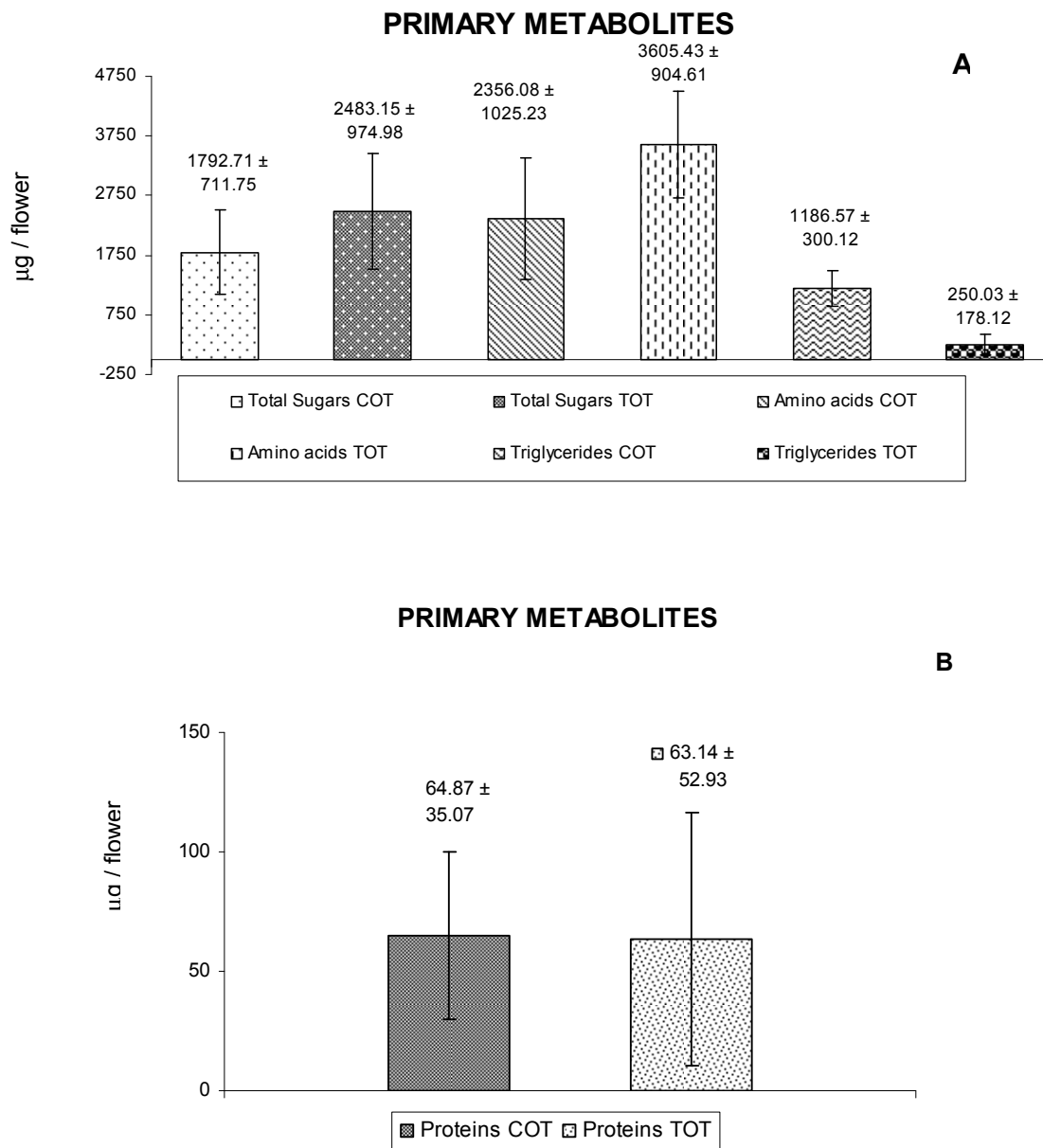


Fig. 1. Primary metabolites contents in microgram per flower ($\mu\text{g}/\text{flower}$) from nectar of conventional (COT) and transgenic (TOT) sweet orange plants. A- Total sugars, amino acids and triacylglycerides; B- Proteins.

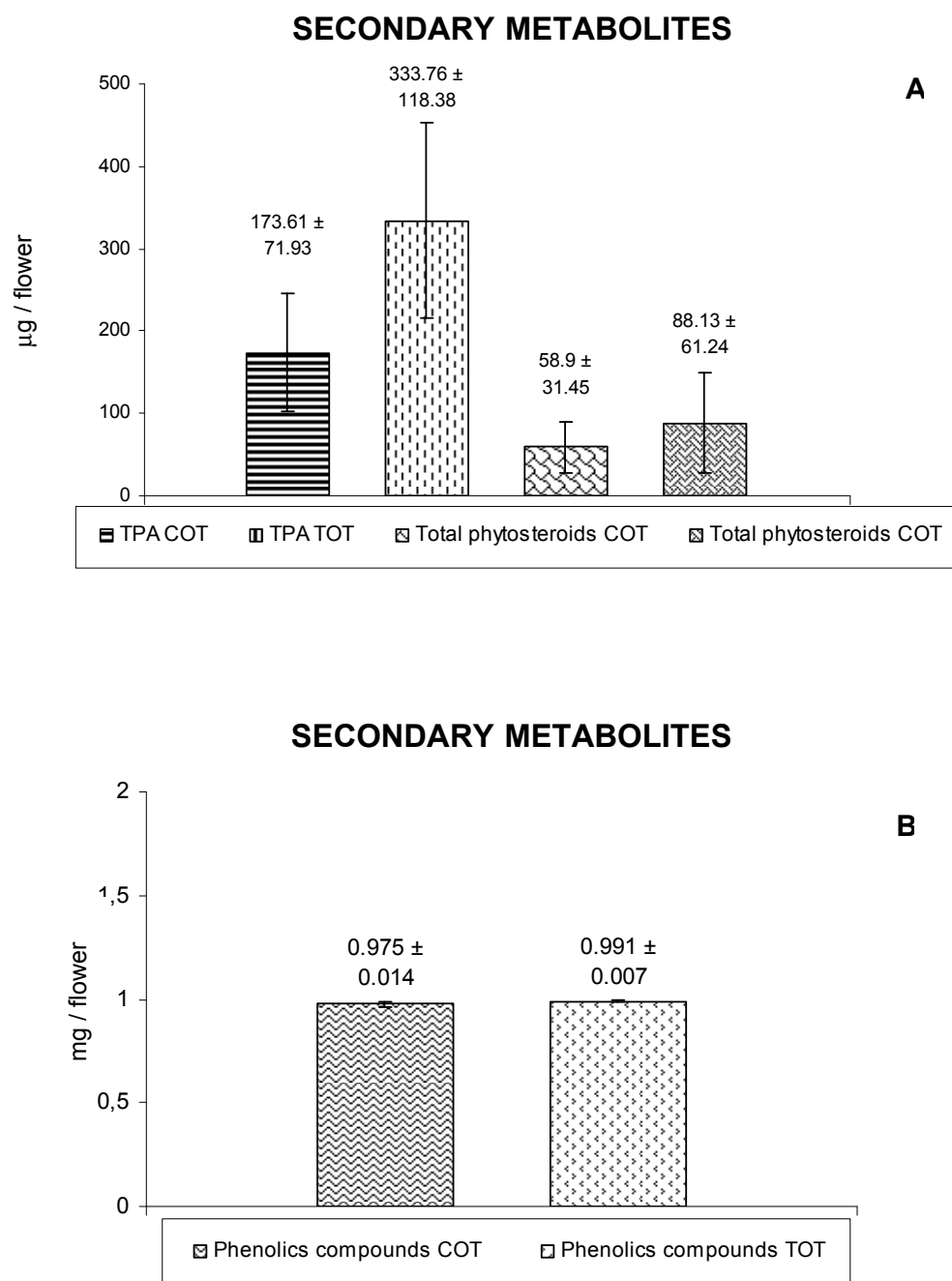


Fig. 2. Secondary metabolites contents in microgram per flower ($\mu\text{g}/\text{flower}$) from nectar of Conventional Orange Tree (COT) and Transgenic Orange Tree (TOT). A- Total purine alkaloids (TPA) and total phytosteroids; B- Phenolics compounds.