

**CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS
POTENCIALMENTE PROMOTORAS DE
EXPRESSÃO GÊNICA CARÁTER TECIDO-
ESPECÍFICA DE BANANEIRAS (*MUSA SPP.*)
UTILIZANDO RT-PCR E QPCR**

LUIZ GUSTAVO TEIXEIRA DA SILVA

2010

LUIZ GUSTAVO TEIXEIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS POTENCIALMENTE
PROMOTORAS DE EXPRESSÃO GÊNICA CARÁTER TECIDO-
ESPECÍFICA DE BANANEIRAS (*MUSA SPP.*) UTILIZANDO RT-PCR
E QPCR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Luiz Gustavo Teixeira da.

Caracterização de sequências potencialmente promotoras de expressão gênica caráter tecido-específica de bananeiras (*Musa spp.*) utilizando RT-PCR e qPCR / Luiz Gustavo Teixeira da Silva. – Lavras: UFLA, 2010.

70 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Promotores tecidos-específicos. 2. cDNA. 3. Extração de RNA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.65

LUIZ GUSTAVO TEIXEIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS POTENCIALMENTE
PROMOTORAS DE EXPRESSÃO GÊNICA CARÁTER TECIDO-
ESPECÍFICA DE BANANEIRAS (*MUSA SPP.*) UTILIZANDO RT-PCR
E QPCR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 29 de março de 2010

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz EMBRAPA

Dra. Patrícia do Nascimento Bordallo EMBRAPA

Prof. Luciano Vilela Paiva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais Oscar (*in memorian*) e Tereza, irmãos Sérgio e Ismael e namorada Viviane os quais de uma forma ou de outra ajudaram, torceram e incentivaram a chegar até aqui.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de fazer o curso de pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Ao Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva pela oportunidade, orientação, paciência, incentivo e condicionar a realização do trabalho.

Ao Dr. Leandro Eugênio Cardamone Diniz pela co-orientação, por estar sempre disponível e de forma prestativa.

A Dra. Patrícia do Nascimento Bordallo pelo suporte e disponibilidade.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Subunidades de Tabuleiros Costeiros (Aracajú - SE); Agroindústria Tropical (Fortaleza- CE); Milho e Sorgo (Sete Lagoas – MG).

Ao Prof. PhD. Antônio Chalfun Júnior pelas ajudas e conselhos.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) nas pessoas de Eula e Fabrício pelo suporte no desenvolvimento do trabalho.

As secretárias do programa de Biotecnologia Vegetal Ana e Magda pelas ajudas.

Anderson, Douglas, Gabriel e Leonardo pela grande ajuda no final do trabalho.

Ubiraci e Miguel (EMBRAPA Milho e Sorgo) por me ajudarem e acolherem em Sete Lagoas.

Aos colegas de curso e laboratório Brenda, Horllys, Kalynka, Luciene, Márcia Fabiana, Rodrigo, Romário e Vanessa que palpitarão, torcerão, apoiaram e preocuparam durante todo o tempo.

Ao Amaral, Lamartine, Profa. Édila e Elenir por socorrerem com reagentes e equipamentos na hora do aperto.

Aos meus familiares que torcerão e apoiaram.

A “*dona patroa*” Viviane pelo companheirismo e que soube compreender as minhas muitas ausências.

AGRADEÇO

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Morfologia e classificação botânica.....	3
2.2 Origem e dispersão da cultura pelo mundo.....	5
2.3 Produção e importância sócioeconômica e nutricional da banana...	6
2.4 Genoma e Citogenética de <i>Musa spp.</i>	8
2.5 Grande Naine.....	10
2.6 Prata Anã.....	11
2.7 Doenças da bananeira.....	12
2.8 Melhoramento genético.....	18
2.9 Regiões promotoras de expressão gênica em plantas.....	21
2.10 Rede genoma banana Brasil.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Extração de RNA.....	27
3.1.1 Reagente Concert™ (Invitrogen).....	27
3.1.2 TRI Reagente® (Sigma).....	28
3.1.3 RNeasy Mini Kit (Qiagen).....	29
3.1.4 NucleoSpin® RNA Plant (Macherey – Nagel).....	30
3.1.5 Borato Quente.....	31
3.1.6 CTAB rápido.....	32
3.2 Tratamento com DNase.....	34
3.3 Isolamento de DNA.....	35

3.4	Quantificação e Integridade das amostras de RNA e DNA.....	36
3.5	Síntese de Cdna.....	36
3.6	Validação dos cDNA's obtidos.....	37
3.7	Identificação das sequências promotoras de expressão gênica tecido-específicas.....	38
3.8	RT-PCR e qPCR.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	Extração de RNA.....	42
4.2	Remoção de DNA genômico das amostras de RNA e síntese do DNA complementar	44
4.3	Busca e validação de sequências promotoras através de RT-PCR e PCR em tempo real.....	46
5	CONCLUSÕES.....	60
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

1	Casca Madura de Grane Naine
2	Casca Verde de Grande Naine
3	Flor de Grande Naine
4	Folha de Grande Naine
5	Polpa Madura de Grande Naine
6	Polpa Verde de Grande Naine
7	Raiz de Grande Naine
8	Casca Madura de Prata Anã
9	Casca Verde de Prata Anã
10	Flor de Prata Anã
11	Folha de Prata Anã
12	Polpa Madura de Prata Anã
13	Polpa Verde de Prata Anã
14	Raiz de Prata Anã
a e b	Precedidas de números de 1 a 14 determina repetição da mesma amostra.
µg	micrograma
µL	microlitro
CTAB	brometo de cetil trimetilamônio
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase/ RNase	endonucleases
dNTP	deoxirribonucléico trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamonotetracético
EGTA	ácido etileno glicol tetrácido

EST	Expressed Sequence Tags
g	grama (unidade de peso) / gravidade (centrífuga)
GN	Grande Naine
LiCl	Cloreto de Lítio
M	Molar (unidade de molaridade)
mM	micro molar
min	minuto
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	mililitro
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	logaritmo do inverso da concentração de H ⁺
PA	Prata Anã
PVP	polivinilpirrolidona
PVPP	polivinilpolipirrolidona
qPCR	PCR em tempo real
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
RT PCR	reação da polimerase em cadeia a partir da transcrição reversa
seg	segundo
U	Unidade

RESUMO

SILVA, Luiz Gustavo Teixeira da. **Caracterização de sequências potencialmente promotoras de expressão gênica de caráter tecido-específica de bananeira (*Musa spp.*) utilizando RT-PCR e qPCR.** 2010. 70p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A bananeira é uma planta tropical de grande importância econômica. Seu fruto é amplamente consumido em todo mundo e sua produção é de grande impacto social, pois fixa a mão de obra no campo e movimenta a economia local, gerando renda e empregos diretos e indiretos. A bananicultura enfrenta problemas em sua produção ligados aos fatores bióticos, sendo os mais danosos os causados por fungos, e também por fatores abióticos como ventos e déficit hídrico que também interferem no ciclo produtivo da bananeira causando prejuízos em sua produção. Sendo a segunda fruta mais produzida no mundo em 2008 com uma produção de 89.099.503 t (FAO, 2010), a banana apresenta diferentes graus de esterilidade, e isso dificulta os programas de melhoramento convencionais. Neste contexto, o emprego de técnicas de engenharia genética, destacando dentre elas a caracterização de promotores tecido-específicos, desponta como uma alternativa bastante viável, favorecendo a aplicação de técnicas mais refinadas da manipulação do genoma, como emprego da cisgenia que visa o manejo dos genes da própria espécie em questão. No presente trabalho, foi utilizado sequências gênicas previamente selecionadas através de um *virtual screening* no banco de dados *DATAmusa*. Estas sequências permitiram desenhar *primers* que posteriormente foram submetidos a uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando cDNA obtidos do RNA extraído de sete diferentes tecidos de duas cultivares de bananeira, Grande Naine e Prata Anã afim de identifica-las no genoma da bananeira em caráter tecido-específico. Desta forma, identificando a sequência gênica deduz-se a presença do promotor tecido específico, que a partir de sua caracterização, pode-se avançar pelas novas fronteiras conquistadas com a evolução da engenharia genética, como por exemplo, a cisgenia, que consiste na manipulação do próprio genoma do organismo em estudo.

Palavras-chave: Promotores tecidos-específicos; cDNA; *Musa spp*; Extração de RNA; RT-PCR;

* Orientador: Luciano Vilela Paiva - UFLA

ABSTRACT

SILVA, Luiz Gustavo Teixeira da. **The use of RT-PCR and qPCR techniques to characterise sequences potentially able to promote tissue-specific gene expression based on banana (*Musa spp.*)** 2010. 70 p. Dissertation (Master in plant biotechnology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The banana tree is a tropical plant of great economical importance. Its fruit is worldwidely consumed and its production exerts a great social impact, for it keeps the labor on the field which steers the local economy, hence creating income through direct and indirect jobs. The banana crop has been facing many biotic problems mainly caused by fungi as well as by abiotic stress such as winds and drought. Such problems has affected the crops productive cycle thus reducing its production. Being the second most produced fruit in the world 2008, with a 89.099t yield (FAO, 2010), this species presents different degree of sterility which affects the conventional breeding programs. The employment of genetic engineering techniques could be used to solve such problems. Thus, the characterization of promoters that drives the specific tissue gene expression becomes of great importance, for it also allows the use of genes from the same species in a cisgenic approach. In the current work, gene sequences previously selected through virtual screening taken from DATAmusa gene bank, were analyzed. In order to study the promoter expression, these sequences allowed designing primers for PCR reactions having cDNA obtained from seven different tissues collected from Grande Naine and Prata Anã cultivars. Therefore once the tissue gene expression is characterized, we can identify powerful promoters for cisgenic approach.

Key words: tissue-specific promoters; cDNA; *Musa spp*; RNA Extraction; RT-PCR;

* Adviser: Luciano Vilela Paiva

1 INTRODUÇÃO

Musa é um gênero que apresenta espécies com diferentes números de ploidia e, na sua maioria, frutos sem sementes. Estas características dificultam as estratégias de melhoramento em bananeira, altamente necessárias em função de sua importância econômica e alimentar para a maioria dos países em desenvolvimento da faixa tropical do globo. Nestas regiões, seu cultivo encontra as condições ideais de temperatura e umidade, porém enfrenta importantes problemas fitossanitários, causados, principalmente, por fungos. Portanto, há necessidade de integrar estratégias para impedir que patógenos desenvolvam resistência aos controles químicos visto que esta é uma cultura altamente dependente de fungicidas.

Neste processo, destaca-se a importância da obtenção de variedades capazes de manter um nível de produção em ambientes até então desfavoráveis, sob influência de problemas de ordem biótica e abiótica.

Utilizando-se do conhecimento de fatores climáticos e de genes que conferem resistência ou tolerância a ataques de patógenos, a engenharia genética, é uma ciência promissora quanto ao emprego de técnicas de transformação genética, tornando-a uma ferramenta valiosa para os programas de melhoramento, sobretudo da bananeira.

O gene é uma sequência cromossômica formada por um conjunto de ácidos nucleicos que integram o DNA. De grande importância, contém a informação genética específica correspondente à transcrição de um RNA que dará origem a uma cadeia polipeptídica. Atuando em concomitância com o ambiente, resulta na expressão de um caráter, citando, por exemplo, o caso dos vegetais cuja resistência a fatores bióticos e abióticos permite que se desenvolvam em ambientes desfavoráveis.

As práticas de engenharia genética atuais utilizam genes constitutivos para a produção de transgênicos e uma nova fronteira se abre com a atual abordagem de identificar e caracterizar genes e seus promotores tecido-específicos, possibilitando níveis de expressão do transgene somente nos tecidos desejados. Isso contribui para práticas de cisgenia e uma melhor aceitação comercial da engenharia genética, diminuindo questionamentos de biossegurança, além de prevenir a expressão gênica generalizada e contínua na planta, gerando gasto desnecessário de energia e podendo interferir em sua produtividade.

Nesse contexto e utilizando RT-PCR e qPCR, o objetivo deste trabalho foi o de identificar e caracterizar sequências gênicas com caráter tecido-específico em bananeira assim como seus respectivos promotores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Morfologia e classificação botânica

As bananeiras são plantas herbáceas, completas, perenes, embora muitos produtores a considerem uma cultura de ciclo anual (Borges & Souza, 2004) e de exuberância ímpar, dada pela forma e dimensão de suas folhas. Formada por tronco (caule) curto, subterrâneo, denominado rizoma, sendo este um órgão de reserva onde se inserem suas raízes adventícias e fibrosas.

A parte visível da planta facilmente confundida como caule é o pseudocaul, resultado da união das bainhas foliares rodeando o rizoma, terminado por uma copa de folhas longas e largas, com uma desenvolvida nervura central.

Do centro de sua copa, surge uma inflorescência com brácteas ovaladas que, normalmente, apresentam coloração roxo-avermelhada, de onde emergem flores femininas agrupadas, formando uma penca que dará origem aos frutos por partenocarpia. O restante do eixo da inflorescência é constituído de flores masculinas, sendo possível que, nas regiões de transição, algumas espécies apresentem flores hermafroditas que se encontram dentro de um “coração”, inicialmente volumoso e onde, após a formação das pencas, observam-se somente as flores masculinas (Figura 1) (Granato, 1913; Simão, 1971; Su et al., 1986; Moreira, 1987; Cordeiro & Matos, 2005).

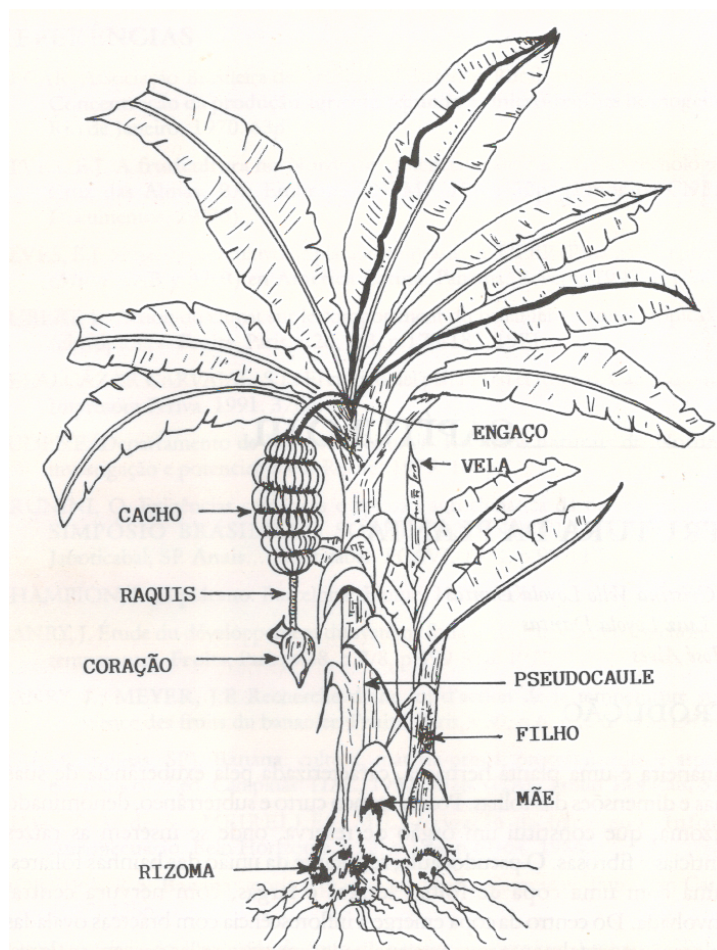


FIGURA 1 Bananeira adulta (Alves, 1997). A morfologia de uma planta completa é bem caracterizada mostrando todos os seus órgãos.

Seus frutos inicialmente verdes tornam-se amarelos ao atingirem a fase de maturação. Passada esta fase, inicia-se um processo de escurecimento do fruto, indicando a morte da planta. Entretanto, observa-se a formação de rebentos emergentes em sua base durante o desenvolvimento da planta. Esta

característica é responsável pela renovação permanente dos bananais (Granato, 1913; Simão, 1971; Su et al., 1986; Moreira, 1987).

Corforme o sistema de classificação sugerido por Cronquist (1981) e Belalcázar Carvajal (1991), a bananeira (*Musa* spp.) pertence à classe Liliopsida, subclasse Zingiberidae, superordem Lilianae, ordem Zingiberales, família Musaceae. A família Musaceae é dividida em três subfamílias: Heliconoideae, Strelitzoideae e Musoideae, sendo que nesta última, figura o gênero *Musa* que é subdividido em 4 seções, *Callimusa*, *Australimusa*, *Rhodoclamys* e *Eumusa* que comportam as bananeira com frutos comestíveis.

2.2 Origem e dispersão da cultura pelo mundo

Segundo Moreira (1987), não se pode indicar com exatidão a origem da bananeira, pois ela se perde nas mitologias grega e indiana. Alguns teóricos apontam que a banana é originária do sul da Ásia, Índia e Indonésia. Dizem ser a mais antiga fruta de que se tem notícia, citada em textos budistas de até 500 AC (Dantas, 1987; Guerra, 2006). Sua dispersão aconteceu com as navegações portuguesas, supondo-se que através de suas viagens, os grandes navegadores conheceram esta fruta e começaram a cultivá-la por onde passavam. Além destas localidades, há referência de sua presença na Malásia e nas Filipinas, onde é cultivada a mais de 4.000 anos e muitos autores sugerem que a maioria das cultivares de bananeira teve origem no continente Asiático. Contudo, existem centros secundários de origem localizados na África Oriental e nas Ilhas do Pacífico, além de outro centro de diversidade na África Ocidental (Moreira, 1987).

As condições ideais para o cultivo da banana são encontradas nas regiões tropicais entre as latitudes de 30° Norte e 31° Sul (Figura 3)(Loesecke, 1950; Simmonds, 1962; Moreira, 1987; Alves, 1997).

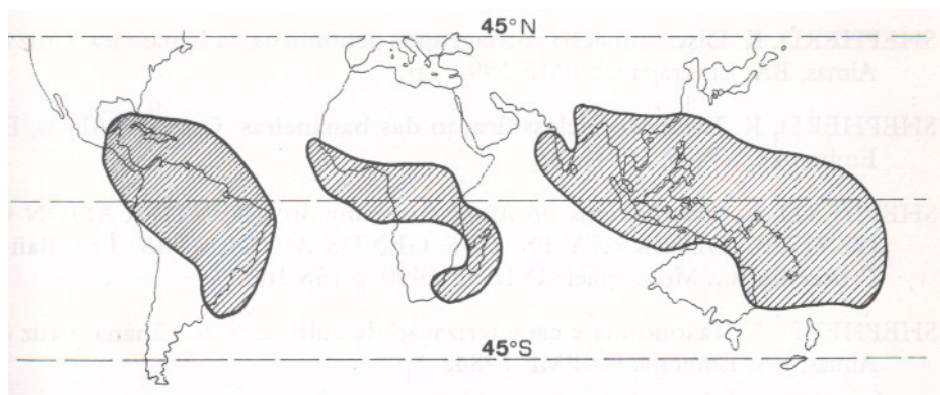


FIGURA 2 Regiões produtoras de banana e plátano no mundo (INIBAP, 1985; citado por Alves, 1997).

No Brasil, as bananeiras existem desde antes do seu descobrimento. Existem relatos feitos por Cabra dando conta de que, ao aqui chegar, encontrou os indígenas com o fruto “*in natura*”. Entretanto, somente nos séculos XV e XVI, colonizadores portugueses começaram a plantação sistemática de bananeiras nas ilhas atlânticas, no Brasil e na costa ocidental africana (Moreira, 1987).

Comumente encontrada em alguns países da América Latina, o plátano é outro tipo de banana, bastante apreciado pela população local e possui características que o diferenciam da banana, como teor de umidade menor, alto teor de amido, concentração de açúcar mais baixa e um teor de ácidos mais alto (Manica, 1998; Silva et al., 2001).

2.3 Produção e importância sócioeconômica e nutricional da banana

A banana (*Musa sp.*) é uma espécie cultivada em diversos países tropicais e possui um importante papel social e econômico. É a frutífera tropical mais difundida no mundo, apresentando grandes áreas cultivadas e grandes

volumes de comercialização (Manica, 1997; Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2009).

A banana tem seu consumo em diferentes formas *in natura*, frita, assada, cozida, em calda, doces caseiros ou em produtos industrializados. Além disso, suas propriedades nutricionais a tornam um alimento sem restrições, recomendada para todas as idades, inclusive crianças (Manica, 1998; Lichtemberg, 1999). Com seu grande valor nutritivo, fornece sais minerais como fósforo, potássio, magnésio, além das vitaminas Tiamina (Vitamina B1), Riboflavina (Vitamina B2), Inositol, Carotenos (Vitamina A) entre outros nutrientes (Departamento de Agricultura dos EUA 2010).

Com estas características tão peculiares, a banana assume grande importância alimentar e sócioeconômica, sendo esta commodity um item relevante na balança comercial de muitos países, gerando recursos e empregos (FAO, 2009).

De acordo com a FAO (2010), a banana foi a 15ª cultura e a segunda fruta mais produzida no mundo em 2008, com uma produção de 89.099.503 t tendo uma área de plantio de mais de 5.110.000 hectares. Os principais países produtores são: Índia (23.204.800 t), Filipinas (8.687.624 t), China (8.042.702 t), Brasil (7.116.808 t) e Equador (6.701.146 t).

No continente americano, a produção total em 2008 foi de 25.398.402 toneladas, sendo o Brasil o maior produtor, com uma área total colhida de 513.656 hectares e uma produção de 7.116.808 t. Em seguida, aparecem o Equador (6.701.146 t) e o México (2.701.146 t).

No Brasil, a bananicultura se diferencia das características de cultivo da maioria das regiões produtoras do mundo no que diz respeito tanto à diversidade climática, quanto ao uso de cultivares, bem como a sua comercialização, no que diz respeito, às exigências do mercado consumidor, por exemplo. De modo

geral, os cultivos seguem os padrões tradicionais com o emprego de baixa tecnologia e baixos índices de capitalização (Alves, 1997).

A bananicultura brasileira se estende de Norte a Sul do Brasil e segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2010), sua produção é destacada nos estados da Bahia (1.407.741 t), São Paulo (1.238.087 t), Santa Catarina (624.205 t) e Minas Gerais (619.986 t).

Fundamental para a complementação da dieta das populações de baixa renda de alguns países, no Brasil, a banana é consumida de forma diferente, como sobremesa e praticamente toda fruta produzida é comercializada no mercado interno, sendo a exportação limitada em função da qualidade inferior do produto produzido no país. A maioria dos bananicultores é composta por pequenos produtores, gerando mais de 500 mil empregos diretos (Guerra, 2006; IBGE, 2010; Silva et al., 2001).

2.4 Genoma e Citogenética de *Musa spp.*

O termo genoma, quando aplicado aos eucariotos, define o grupo de cromossomos correspondente ao conjunto haplóide (n) de um organismo (Torres et al., 2000).

A maioria dos cultivares de banana comestível evoluiu das espécies selvagens *Musa acuminata*, cujo genoma é identificado com as letras AA e *Musa balbisiana*, sendo seu genoma BB. Estas duas espécies são diplóides e constam de dois níveis cromossômicos ($2n = 22$). Portanto, estes cultivares devem conter combinações de genomas completos dessas espécies parentais. Tais genomas são denominados respectivamente pelas letras A, representando a espécie *M. acuminata* e B, a espécie *M. balbisiana* (Figura 3) (Simmonds & Shepherd, 1995 citado por Alves et al, 1997; Dantas & Soares Filho, 2006).

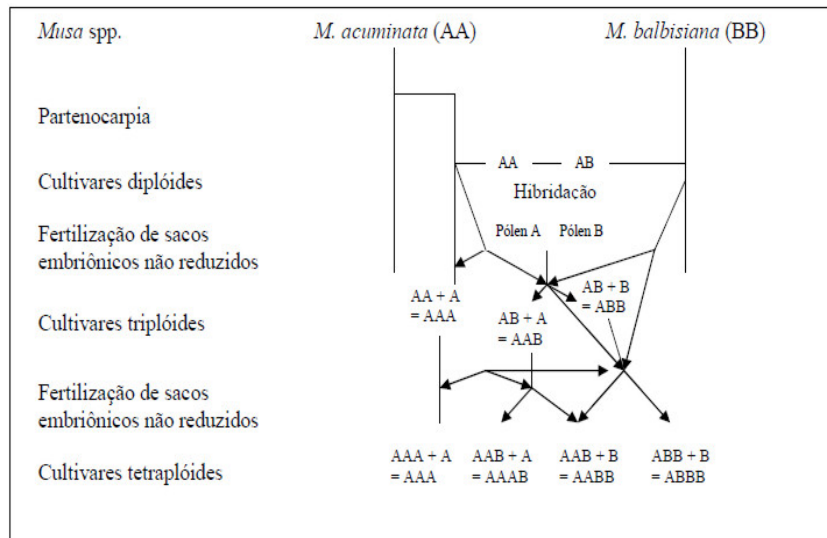


FIGURA 3 Evolução das variedades comestíveis de banana a partir das espécies parentais (Simmonds & Shepherd, 1955). O diagrama mostra como houve a hibridação entre *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla originando as cultivares comerciais utilizadas atualmente.

Neste sentido, atualmente são descritos quatro níveis de organização cromossômica para os cultivares de banana: haplóide (com 11 cromossomos – A e B), diplóide (com 22 cromossomos – AA e AB), triplóide (33 cromossomos – AAA, AAB e ABB) e tetraplóide (44 cromossomos – AAAA, AAAB, AABB e ABBB) (Simmonds & Shepherd, 1995 citado por Alves et al., 1997 e Dantas & Filho, 2006).

A maioria das bananeiras em uso para alimentação é de cultivares triplóides, provenientes de cruzamentos interespecíficos de *M. acuminata* e *M. balbisiana* dos subgrupos Prata (AAB) e Cavendish (AAA) (Alves, 1997; Rangel et al., 2002).

O estudo citogenético da bananeira é dificultado pelo fato de os cromossomos serem extremamente pequenos, não sendo visíveis quando

separados em uma célula que não esteja em divisão mitótica. Sua visualização pode ser feita quando apresentam forma de longos filamentos finos localizados no núcleo. Além disso, a frequência com que ocorrem translocações (anomalia cromossômica causada pelo rearranjo de partes entre cromossomos não homólogos) e o fato de os cromossomos sofrerem uma contração durante a prófase, deixando-os totalmente espiralados e compactados dentro da membrana externa do núcleo faz com que a caracterização estrutural dos cromossomos se torne uma prática muito complexa (Shepherd, 1984a citado por Alves, 1997).

Cultivares

A vasta gama de cultivares existente vem da necessidade de suprir diferentes expectativas, quer seja do ponto de vista comercial, quanto de sua palatabilidade, textura, aparência, assim como as necessidades agrônômicas, tais como resistência a fatores bióticos e abióticos (Alves, 1997; Rangel et al., 2002).

Dentre estas, destacam-se para a produção a cultivar Prata-anã, do subgrupo Prata (AAB), muito consumida no mercado interno e a cultivar Grande naine (AAA), do subgrupo Cavendish, preferida pelo mercado internacional (Borges & Souza, 2004).

2.5 Grande Naine

Exemplar do subgrupo cavendish, esta cultivar apresenta instabilidade genômica, sendo também uma cultivar menos resistente do que outras cultivares do mesmo subgrupo, tais como a nanica e a nanição.

Apesar disso, possui grande semelhança com o cultivar nanição, sendo de porte um pouco menor que esta. Apresenta uma altura que pode variar de 2,0 a 3,0 metros, produz cachos de forma ligeiramente cônica, com peso entre 19,2 e 45,4 kg, contendo de 9 a 12 pencas com 145 a 197 frutos por cacho. Sob condições ideais de cultivo tem alta produtividade, podendo atingir entre 50 e 60 t/ha/ciclo. No Brasil, sua produção é voltada ao mercado externo que apresenta

grande demanda por frutos de qualidade. Entretanto, mesmo sendo resistente à doença conhecida como Mal do Panamá, uma das principais desvantagens agronômicas desta variedade é justamente sua suscetibilidade às Sigatokas Amarela e Negra (Alves, 1997; Manica, 1998; Rangel et al., 2002) (Tabela 3).

2.6 Prata Anã

As plantas desta cultivar são tolerantes ao frio, apresentam um tamanho que varia entre 2,0 e 3,5 m, possuem um pseudocaule forte com cerca de 50 cm de diâmetro, o que a faz uma boa candidata a regiões de muito vento. Com um bom potencial de produtividade em áreas irrigadas, produz cachos com 7,83 a 19,8 kg e uma média de 100 frutos por cacho, gerando uma produção anual/ha de 30 a 35 t. Entretanto, esta cultivar é muito suscetível às Sigatokas Amarela e Negra e ao Mal do Panamá, sendo seu plantio restrito a áreas de baixa incidência dessas doenças. Além disso, ela também é muito atacada pela broca da bananeira (Alves, 1997; Manica, 1998; Rangel et al., 2002) (Tabela 3).

TABELA 1 Características fitopatológicas parciais* das cultivares de banana Prata-anã e Grande Naine.

Características	Variedades	
	Prata Anã	Grande Naine
Grupo Genômico	AAB	AAA
Subgrupo	Prata	Cavendish
Sigatoka amarela	S	S
Sigatoka negra	S	S
Mal do Panamá	MS	R
Moko	S	S
Nematóide	S	S
Broca do rizoma	MR	S

*adaptado de Alves (1997), onde: S = Suscetível; MS = Moderadamente Suscetível; MR = Moderadamente resistente; R = Resistente.

2.7 Doenças da bananeira

O cultivo da bananeira é afetado por muitos problemas fitossanitários causados por diversos agentes patogênicos. Os fungos são indiscutivelmente os agentes infecciosos que causam os maiores danos para a bananicultura brasileira causando diversas doenças pré e pós-colheita, tais como: Mal-do-Panamá, Sigatoka Amarela e Sigatoka Negra (Alves, 1997; Nogueira, 2005, Rangel et al., 2002).

As pragas e doenças são responsáveis por severas perdas na produção de banana, que, dependendo dos fatores envolvidos, pode chegar a até 100 %, uma vez que, em muitos casos, não existe nenhuma alternativa de controle (Alves, 1997; Raga, 2005).

Desta forma, as bananas comerciais representam no mundo uma das culturas que mais pulverizações recebem promovendo riscos para o meio

ambiente e para a saúde humana. Somente para o fungo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causador da Sigatoka Negra, aplica-se anualmente mais fungicida do que para todos os outros patógenos juntos (gasto superior a 2,5 bilhões de dólares). A necessidade de aplicação massiva de fungicidas para controlar este fungo, representa uma ameaça para a produção mundial de bananas e para o meio ambiente (Alves, 1997; Nogueira, 2005; Raga, 2005).

A Sigatoka Amarela é causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola* Zimm Leach fase sexuada ou *Pseudocercospora musae* Zimm Deighton, forma assexuada e é uma doença limitante para cultivares Nanicão, Nanica e Grande Naine pertencentes ao grupo genômico AAA. Com os sintomas aparecendo nas folhas jovens, onde inicia por pequenos pontos com leve descoloração, evoluindo para estrias cloróticas e manchas necróticas. Com sua evolução, a morte precoce da folha é precedida pelo enfraquecimento da planta, levando a uma queda na produção, que pode chegar a 50% (Alves, 1997; Rangel et al., 2002 e Nogueira, 2005).

Os mesmos autores descrevem o modo similar de ação dos mecanismos de infestação e sintomatologia da Sigatoka Negra, que é semelhante à amarela, salvo sua agressividade e seu agente diferente. A Sigatoka Negra ataca tanto as folhas jovens como as velhas, deixando um volume maior de áreas necrosadas resultando em prejuízos na colheita bem mais significativos dos que ocasionados pela Sigatoka Amarela (Alves, 1997; Rangel et al., 2002; Nogueira, 2005).

O mal do Panamá ou fusariose é uma doença causada por um fungo de solo (Rangel et al., 2002), chamado de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense e tem a capacidade de ficar em estágio de dormência por muitas décadas (Stover, 1972 apud Nogueira, 2005).

Há uma crescente preocupação com esta doença, fato este consumado pelo fato de as medidas de controle serem ineficazes e pela descoberta da raça 4 do patógeno, afetando variedades do subgrupo cavendish. São conhecidas 4

raças deste patógeno, sendo as que ameaçam as bananeiras as raças 1, 2 e 4 (Sun, 1978).

A sintomatologia das plantas atacadas pode ser observada tanto interna como externamente (Alves, 1997). Observa-se um amarelecimento progressivo das folhas, das mais velhas para as mais novas, ocorrendo a murcha e quebra do pecíolo junto ao pseudocaule, deixando a planta com um aspecto de guarda-chuvas fechado (Cordeiro et al., 1993 apud Alves, 1997).

Os sintomas internos, observados por cortes transversais e longitudinais do pseudocaule ou do rizoma das plantas, se resumem à descoloração vascular passando por pontuações pardo-avermelhadas e posterior escurecimento de acordo com a evolução da doença. Tais sintomas podem ser ocasionados pela oxidação de fenóis na presença do fungo (Stover, 1972; Kimati & Galli, 1980 apud Alves, 1997, Nogueira, 2005).

De fácil disseminação e responsável por grandes perdas na produção de banana, a bactéria *Ralstonia solanacearum* Smith, raça 2 (Nogueira, 2005) possui cinco estirpes conhecidas e é a causadora do moko ou murcha bacteriana (Alves, 1997). Essa doença se instala em qualquer nível de desenvolvimento da planta, não encontrando resistência em nem uma variedade. Oferecendo um nível considerável de dificuldade em seu combate, o agente causal sobreviver por anos no sistema radicular de ervas daninhas de forma assintomática. Este conjunto de fatores faz do moko uma das doenças mais graves da cultura da banana. (Alves, 1997; Nogueira, 2005; Costa, 2007).

Alves (1997) relata que as perdas causadas pelo moko em um bananal podem chegar a sua totalidade, pois os frutos afetados não servem para serem consumidos. Outro agravante é sua disseminação também ocorrer por insetos, o que aumenta a probabilidades de uma rápida disseminação.

Segundo Rangel et al.(2002) e Costa (2007), a incidência do Moko ocorre em reboleiras e os frutos apresentam uma desidratação da polpa, com

manchas pretas em todo seu interior. O Moko leva a planta à morte em poucas semanas e a única medida a ser tomada é a erradicação das plantas doentes, bem como das plantas vizinhas que, apesar do aspecto sadio, precisam ser erradicadas. A erradicação se faz com aplicação de um herbicida, como o Glifosato, no pseudocaule.

Conforme Manica (1997), outras moléstias e pragas merecem atenção. São consideradas problemas secundários, mas que afetam a qualidade da produção trazendo prejuízos para o produtor.

A podridão mole ataca o rizoma e estende-se ao pseudocaule até ao ápice. Sua característica principal é um odor fétido exalado pela planta. No pseudocaule, há um acúmulo de grande quantidade de líquido e, nas folhas, apresenta uma sintomatologia que pode ser confundida com moko ou sigatoka amarela (Alves, 1997; Manica, 1997).

As doenças do engaço e frutos são identificadas tanto na pré-colheita quanto na pós-colheita, gerando um grande número de perdas. Os patógenos envolvidos são diversos e geralmente o que provoca a doença é uma associação destes (Alves, 1997)

A podridão da coroa acontece devido ao corte das pencas da banana. A partir desta lesão, há penetração de organismos capazes de decompor os tecidos da coroa, dificultando o manuseio dos frutos, com perdas para a boa aparência de um fruto sadio e, conseqüentemente, de seu valor de mercado (Manica, 1997).

As doenças do fruto ocorrem tanto na pré como na pós-colheita, causando significativa queda no valor de mercado ou até mesmo impedindo a comercialização do fruto (Maninca, 1997).

A lesão de johnston causada pelo fungo *Pyricularia grisea*, além de atingir as folhas, ataca tanto os frutos maduros quanto os verdes, causando manchas necróticas (Trindade et al., 2002).

A mancha diagonal é causada pelos fungos *Cercospora hayi* e *Fusarium spp* e atingem frutos verdes e maduros deixando marcas nas cascas podendo atingir a polpa (Manica, 1997; Cordeiro, 2003).

Conhecida como Pinta de deightoniela, a doença é causada pelo fungo *Deightoniella torulosa*, que é responsável por manchas nos frutos, tanto verdes como maduros. A doença pode ser evitada controlando a incidência de folhas e flores mortas nas proximidades da planta (Borges & Souza, 2004).

Ponta de charuto é uma doença relacionada pela associação dos fungos *Verticillium theobromae* e *Trachysphaera fructigena*. Pode-se descrever a sintomatologia como o surgimento de necrose preta nos frutos verdes que progride até a ponte. O tecido afetado pela necrose cobre-se de fungos e faz lembrar a cinza da ponta de um charuto (Alves, 1997).

Dentre estas doenças ditas secundárias a que desperta mais atenção é a Antracnose. Causada pelo fungo *Colletotrichum musa*, afeta frutos com ou sem ferimentos, manifestando-se, geralmente, na fase de maturação. É conhecida duas fases da doença, a que acomete frutos maduros resultante de infecção latente e antracnose não latente, atingindo frutos verdes que sofrem ferimentos, geralmente no transporte. O seu principal sintoma é o amadurecimento precoce do fruto e sua característica é a formação de manchas escuras (Borges & Souza, 2004).

As viroses não são uma grave ameaça para os bananais brasileiros (Alves, 1997), porém Manica (1997) relata que na África, Ásia e Austrália os prejuízos causados por vírus são constantes, levando a um controle sistemático. Alves (1997) destaca como as viroses mais importantes a *bunchy top*, vírus do mosaico do pepino e o vírus das estrias.

Os nematóides são vermes de solo que têm sua disseminação dependente do manejo, seja por meio de mudas, ferramentais contaminados ou por meio de irrigação e/ou água das chuvas. São responsáveis por causarem lesões nas raízes,

nanismo na planta, prolongamento do estágio vegetativo, redução do número de raízes ativas, clorose foliar, diminuição da produção e do tamanho dos frutos, até tombamento e morte das plantas. Dentre as espécies conhecidas, algumas são merecedoras de mais atenção, são eles o nematóide cabernícola, *Radopholus similis*; nematóide das lesões, *Pratylenchus coffeae*; nematóide espiralado, *Helicotylenchus multincinctus* e o nematóide das galhas, *Meloidogyne spp* (Alves, 1997; Borges & Souza, 2004).

Dentre as pragas que atacam o bananal, a mais grave é a broca do rizoma. As larvas do coleóptero *Cosmopolites sordidus* é a responsável pela decorrência de formação de galerias no rizoma que debilitam a planta, além de facilitar a ocorrência de danos indiretos, causados por outros organismos (Manica, 1997).

Sendo uma praga de preocupação basicamente regional, a traça da bananeira foi responsável por grandes perdas no estado de São Paulo na década de 70 e, em menor escala, no norte de Santa Catarina. As larvas da Lepidóptera *Opogona sacchari* causam o apodrecimento dos frutos após criarem galerias onde se instalarão (Alves, 1997).

Causando problemas na aparência dos frutos, a Tripes da erupção dos frutos é causada por um inseto do gênero *Frankliniella spp*. Seus ovos são depositados na epiderme da casca de frutos jovens levando ao surgimento de pontuações de cor marrom, ásperas ao tato, o que diminui a aceitação dos frutos, embora não haja interferência na qualidade da fruta (Borges & Souza, 2004).

Outro tipo de Tripes é causado pelo inseto do gênero *Chaetanaphothrips spp* e recebe o nome Trieps da ferrugem dos frutos. A sintomatologia é basicamente o surgimento de manchas marrons na casca do fruto, lembrando a ferrugem e, dependendo do grau de evolução, pode ocasionar rachaduras na casca (Borges & Souza, 2004).

O pulgão *Pentalonia nigronervosa* é um hemíptera atinge a bananeira. Ele suga a seiva das plantas podendo levar a um enrugamento da folha terminal, morte das folhas mais velhas e também está relacionada a sua presença a virose bunchy top (Alves, 1997).

As lagartas desfolhadoras não são um perigo iminente para os bananais, os gêneros spp, *Opiphanes spp* e *Antichloris spp* são lepidópteras que normalmente se encontram em equilíbrio no agroecossistema. Quando em excesso, interferem na quantidade de fotoassimilados que seriam translocados para rizoma e frutos (Mesquita & Alves, 1984b apud Alves, 1997).

A hemíptera *Trigona spinipes* popularmente chamada de abelha arapua é responsável por manchar os frutos e também uma das responsáveis pela disseminação do agente causal do moko (Alves, 1997; Kimati et al., 1997).

Embora os fatores que comprometam a cultura sejam basicamente causados por fatores bióticos, os que são desencadeados por fatores abióticos também são considerados na hora de se obter novas características de interesse para a cultura. Destes fatores, destacam-se as secas ou déficit hídrico, ventos e baixas temperaturas (Becker et al, 2000; Dickman, 2004).

Desta forma, é de interesse criar tecnologias que permitam a obtenção de variedades com características agrônômicas que atendam as necessidades do campo sem alterar as impostas pelo mercado consumidor a fim de auxiliar os programas de melhoramento da cultura.

2.8 Melhoramento genético

A crescente demanda mundial por alimentos de melhor qualidade e, principalmente, livres de doenças é um desafio que tem promovido um avanço significativo em diversas áreas da produção vegetal. Dentre estas, se destaca o melhoramento genético vegetal (Borém, 1998).

O melhoramento genético de plantas visando melhorias agronômicas vem sendo realizado pelo homem há milhares de anos utilizando-se de procedimentos clássicos, funcionais, de cruzamentos controlados.

Em *Musa*, esta tecnologia de melhoramento genético clássico é limitada, sendo a maioria das cultivares de interesse comercial triplóides, com diferentes graus de esterilidade e produção de frutos por partenocarpia. O sucesso desta metodologia foi alcançado em algumas variedades do tipo Prata, que não foi alcançado com a variedade Cavendish, por exemplo, (Santos-Serejo, 2006; Souza Júnior, 2005).

Com o advento da biologia molecular, somado ao desenvolvimento de técnicas biotecnológicas avançadas, o melhoramento genético de plantas via engenharia genética tornou-se uma ferramenta importante na obtenção de plantas genotipicamente superiores em um curto período de tempo, sendo, portanto, de grande interesse para o setor agrícola e principalmente bananeiro (Borém, 1998, Souza Júnior, 2005).

Estas novas tecnologias têm se destacado principalmente devido à possibilidade de obtenção de resultados uniformes e direcionados para características desejáveis. Dentre os inúmeros métodos biotecnológicos mundialmente utilizados para o melhoramento, a produção de plantas geneticamente modificadas destaca-se como um dos mais importantes. A transgenia tem permitido o melhoramento de genótipos selecionados por métodos convencionais através da introdução de um ou poucos genes que, em muitos casos, são encontrados em espécies distantes e que não poderiam ser transferidos via recombinação, o que acontece obrigatoriamente entre indivíduos sexualmente compatíveis. Por outro lado, se fossem transferidos levariam anos para obtenção do genótipo desejado (Candeias, 1991; Sági et al., 1998; Borém, 2001; Coutinho Filho 2006).

O melhoramento de espécies perenes através da obtenção de organismos geneticamente modificados tem sido apontado como uma alternativa ao melhoramento clássico. Nesse contexto, a introdução via transgenia de características desejáveis como a resistência a fatores bióticos e abióticos tende a ser facilitada, uma vez que um grande número de genes envolvidos nessas respostas ou induzidos por tais fatores em diferentes espécies vem sendo identificado e caracterizado. A disponibilidade de tais genes tem ampliado ainda mais as possibilidades de manipulações por processos biotecnológicos (May et al., 1995; Kazan et al., 1998; Becker et al., 2000; Shen et al., 2002; Bi et al., 2006; Meiyalaghan et al., 2006; Chen et al., 2007, Mackintosh et al., 2007).

Muitos destes genes têm sido identificados em projetos onde genomas inteiros foram seqüenciados, como nos casos de *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), arroz (Yu et al., 2002), cana de açúcar (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp, 2009), eucalipto (Fapesp, 2001) ou em projetos nos quais foram seqüenciados milhares de cDNAs oriundos de bibliotecas construídas a partir de diferentes órgãos/tecidos e em diferentes condições de estresse, também conhecidos como projetos ESTs (Expressed Sequence Tags). Como exemplo do último caso, na área vegetal destaca-se o projeto MusaGeneBR da Rede Genoma Banana Brasil, composta pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Universidade Católica de Brasília e a Universidade Federal de Lavras.

Os projetos de sequenciamento acima citados são de extrema importância. Entretanto, sabe-se que a simples identificação de um gene não é garantia para a sua utilização na obtenção de transgênicos. A produção eficiente de uma proteína heteróloga em uma planta depende, por exemplo, da obtenção de altos níveis de transcrição do gene introduzido e, para isso, promotores altamente ativos e específicos são necessários (Rance et al., 2002).

2.9 Regiões promotoras de expressão gênica em plantas

O promotor é o processador central da regulação da expressão de um gene uma vez que contém os sítios de ligação para os fatores de transcrição (TFs) e para a RNA polimerase responsável pela transcrição gênica. Compreende, por definição, a região 5' da sequência a ser transcrita, podendo se estender por algumas centenas de pares de base (pb) (Griffiths et al., 2008; Watson et al., 2006).

Com mais detalhe, Shahmuradov et al. (2003) explica que o termo promotor designa uma região da sequência genômica localizada “upstream” ao sítio de início da transcrição (TSS - Transcription start site).

Os genes de eucariotos possuem uma região promotora onde normalmente são encontrados múltiplos elementos conservados de controle, alguns dos quais redundantes e, dentre eles, os elementos denominados TATA box, a uma distância de 30 pb do sítio de início da transcrição (TSS), CAAT box, a cerca de 100 pb do sítio +1 e os GC box a cerca de 200 pb deste local. Estas sequências vão determinar o ponto correto para dar início à transcrição, assim como a taxa, o local e o momento em que o processo se desenvolverá. Esta rede de sinalização responsável pela modulação transcricional é de grande complexidade, devendo-se considerar ainda as diversas interações destes elementos com fatores de transcrição, enhancers e silencers, além de estímulos endógenos e exógenos que podem agir para ativar ou reprimir a transcrição (Griffiths et al., 2008; Butler & Kadonaga, 2002; Watson et al., 2006). Vale salientar que o mRNA de eucariotos apresenta na sua extremidade 5' um revestimento de 7-metilguanossina ligado por um trifosfato e recebe o nome Capacete ou CAP 5'. Sua função é proteger o RNA da ação de fosfatases e nucleases, conferindo maior estabilidade a molécula e também atua como um facilitador para a captura desse RNA pelo sistema eucariótico de tradução. Na extremidade 3', é encontrada uma cauda de poli-adeninas com cerca de 150 a

200 bases e tem como função acentuar a tradução, protege o mRNA da ação de nucleases, além de contribuir para uma maior estabilidade da molécula. Outra característica do mRNA é o fato de ele ser monocistônico, ou seja, codifica apenas para uma proteína (Griffiths et al., 2008; Snustad & Simmons, 2006).

Smale (2001) e Butler & Kadonga (2002) relatam que o promotor pode ser dividido em três partes de modo a identificar seus elementos. Segundo estes autores, podemos encontrar na região localizada a – 250 a + 250 nucleotídeos do ponto TSS uma sequência denominada promotor proximal. Nela, encontram-se os principais elementos regulatórios e os sítios específicos de ligação dos fatores de transcrição (Smale, 2001; Shahmuradov, 2003).

Com uma influência mais fraca do que o promotor proximal, o promotor distal é localizado na região upstream ao gene podendo conter sequências regulatórias adicionais e sítios de ligação para fatores de transcrição específicos (Smale, 2001; Shahmuradov, 2003).

A terceira parte em que se pode dividir um promotor é chamada de promotor núcleo. Ele é a porção mínima capaz de dar início à transcrição basal. Com uma extensão de aproximadamente 40 nucleotídeos, é localizado em torno do TSS, podendo ficar upstream e downstream. Nele, além dos sítios de ligação dos fatores de transcrição, encontram-se as regiões de acoplamento das RNA Polimerases I, II e III, responsáveis respectivamente pela transcrição do RNA ribossômico, mensageiro e transportador, sendo a RNA Polimerase III também responsável pela síntese de small RNAs. (Larsen et al., 1995; Smale, 2001; Butler & Kadonaga, 2002; Pierce, 2004; Lim et al., 2004; Feklistov et al., 2006).

Desta forma, podemos dizer que as regiões promotoras são elementos-chave em processos biotecnológicos a fim de garantir a correta e efetiva expressão de um gene de interesse.

A maioria dos organismos transgênicos relatados na literatura foram obtidos através da utilização de promotores constitutivos, sendo os mais

comumente empregados o promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor (CaMV 35S), os promotores dos genes que codificam respectivamente a nopalina sintetase (NOS) e octopina sintetase (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens* e o promotor do gene que codifica a ubiquitina (Ubi-1) de milho. Apesar dos grandes avanços obtidos com o emprego desses promotores, existem grandes restrições econômicas, ambientais e de biossegurança relacionadas à expressão indiscriminada (constitutiva) de genes heterólogos (Zheng & Murai, 1997; Green et al., 2002; Neuteboom et al., 2002).

Neste sentido, a utilização de promotores tecido-específicos e induzíveis pode suavizar estes problemas por limitar a expressão do transgene aos tecidos e às condições necessárias, além da utilização dos promotores obtidos de uma mesma família da planta, o que pode promover uma maior aceitação da população com esta tecnologia.

A obtenção de promotores tecido-específicos que assegurem altos níveis de expressão somente em tecidos e condições desejáveis é importante para se obter uma melhor aceitação comercial da engenharia genética. A utilização de promotores adequados ajudaria a diminuir alguns questionamentos sobre a biossegurança de plantas geneticamente modificadas. Além disso, este procedimento faria com que a maquinaria genética não promovesse uma expressão exagerada na planta inteira, a qual pode inclusive comprometer sua produtividade. Assim, a expressão de um transgene em um órgão ou condição específica é bem vinda no melhoramento genético molecular de plantas.

2.10 Rede genoma banana Brasil

O projeto de pesquisa intitulado "Análise da Estrutura Primária do Genoma A de *Musa acuminata*", financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e executado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em parceria com a Universidade Católica de Brasília (UCB) e o

Centro Francês de Pesquisa Agrícola para o Desenvolvimento Internacional (CIRAD), no período de fevereiro de 2002 a junho de 2005, resultou na criação do DATAMusa.

O DATAMusa é hoje o segundo maior banco de dados de genômica de banana e é composto de informações de genômica estrutural (sequências completas de clones de biblioteca de BAC, de transcriptoma (Expressed Sequence Tags - ESTs) e de análogos de genes de resistência (Resistance Genes Analogs - RGAs). A parte referente ao transcriptoma no DATAMusa é resultado da produção e caracterização de sete bibliotecas de cDNA e teve o intuito de descobrir os genes expressos em folhas submetidas ao estresse de temperatura, folhas infectadas com o patógeno *Mycosphaerella fijiensis* em estágio precoce e tardio de infecção, flor masculina, raízes de plantas in vitro e casca verde de *Musa acuminata*. No total, foram produzidas 17.113 sequências, restando 13.297 sequências de alta qualidade após a análise de qualidade e limpeza destas.. A análise destas sequências permitiu a identificação de 5.317 clusters, sendo 1.647 contigs e 3.570 singlets, os quais foram denominados *Musa acuminata* Assembled EST Sequences (MaAES). Dos 5.317 MaAES, 1.975 (37.2%) não apresentaram homologia com as sequências depositadas nos bancos de dados públicos.

Após este marco, os pesquisadores brasileiros investiram esforços para promover a rede Genoma Banana Brasil - MusaGeneBR. Esta rede -- hoje composta pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Embrapa Meio Norte, Universidade Católica de Brasília e Universidade Federal de Lavras tem como objetivo realizar o estudo da genômica funcional ou transcriptoma da bananeira. Isso permitirá a elucidação detalhada da função de milhares de genes envolvidos nos processos de

diferenciação e desenvolvimento e/ou processos envolvidos nas respostas às alterações do ambiente biótico/ou abiótico.

Assim, espera-se ampliar as possibilidades de melhoramento genético e de transgenia direcionados para a cultura da banana, com vistas à geração de novas variedades superiores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nas dependências no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG.

Foram utilizadas plantas de bananeiras das cultivares Grande Naine (grupo AAA – Sub-grupo Cavendish) e Prata-Anã (grupo AAB – sub-grupo Prata). Exemplares destas cultivares não variantes somaclonais, mantidas no campo experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras – MG foram selecionadas como fonte de diferentes tecidos para execução deste trabalho.

Os tecidos (7) foram obtidos dos seguintes órgãos: raiz; folha, flor masculina (coração), polpa e casca verde e madura.

Após a coleta no campo experimental, os tecidos foram imediatamente lavados com água destilada, congelados em nitrogênio líquido (-193 °C) e transportados ao Laboratório Central de Biologia Molecular onde foram armazenados no ultrafreezer a uma temperatura de -80 °C até o momento da extração. Alguns frutos verdes de ambas as cultivares foram separados e submetidos a um processo natural de amadurecimento e, posteriormente, separados em casca e polpa, sendo congelados logo em seguida.

Em função da escassa disponibilidade de relatos científicos e considerando que a composição tissular da bananeira é rica em compostos fenólicos, tais como terpenóides e outros metabólitos secundários que promovem degradação e oxidação dos ácidos nucléicos durante os procedimentos de extração fez a necessidade da realização de testes de otimização de diferentes protocolos de extração de RNA.

Os tecidos de raiz e flor masculina de ambas cultivares foram selecionados e submetidos a seis diferentes métodos de extração de RNA, o que

permitiu confrontar os resultados das extrações seguindo os diferentes protocolos e escolher a metodologia que melhor resultado apresentou.

3.1 Extração de RNA

Os métodos de extração de RNA escolhidos foram: Concert (Invitrogen), TRI Reagente[®] (Sigma), RNeasy Mini Kit (Qiagen), NucleoSpin RNA Plant (Macherey – Nagel), Borato quente (Birtic & Kranner, 2006), CTAB rápido (Gambino et al., 2008).

Para cada um dos protocolos testados, os utensílios e materiais utilizados no processo como um todo, tais como almofariz, pistilo, espátulas, microtubos e ponteiras, foram tratados com uma solução de dietil pirocarbonato (DEPc) a 0,5% com o objetivo de inativar RNAses. Posteriormente, este material foi autoclavado e mantido em condições estéreis até o momento do uso. Entretanto, esse procedimento foi abandonado após a realização de uma extração na qual não foram tomadas medidas de esterilização do material em autoclave nem o uso de DEPc, apenas um processo de lavagem com álcool 70% foi realizado.

Para o processo de extração de RNA, são utilizadas amostras dos tecidos de interesse em pó. Desta forma, os tecidos são macerados utilizando-se nitrogênio líquido, o que permite a obtenção de um pó bem fino.

3.1.1 Reagente Concert[™] (Invitrogen)

O protocolo de extração de RNA utilizando Concert foi realizado de acordo com o manual do fabricante: Concert[™] Plant RNA Reagent (Invitrogen). A cada microtubo de 2 mL contendo aproximadamente 100 mg de tecido macerado, foram adicionados 500 µL do reagente Concert gelado (4 °C) e homogeneizados em vórtex. Em seguida, os microtubos foram incubados por 5 minutos a temperatura ambiente, deixados horizontalmente para aumentar a superfície de contato tecido X reagente melhorando a extração do RNA do

interior celular. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação por 2 minutos a temperatura ambiente a 11400 RPM e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e homogeneizados em vórtex, em seguida, foram adicionados 300 µL de clorofórmio e a solução tecido x reagentes dos tubos foram homogeneizados por inversão. Para separação das fases, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos em uma temperatura de 4 °C a 11400 RPM e a fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo. Foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado seguido de uma agitação em vórtex durante 5 segundos. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos, e submetidas à centrifugação a 4 °C pelo mesmo intervalo de tempo a 11400 RPM. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado (-20°C) e os tubos levados à centrifugação a 11400 RPM por 1 minuto em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido com auxílio de uma micropipeta, o RNA foi ressuspenso em 20 µL de água Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) e armazenado a -80 °C para posterior quantificação.

3.1.2 TRI Reagente® (Sigma)

O RNA total foi obtido utilizando TRI Reagente® (Sigma), conforme recomendações do fabricante. A cada microtubo de 2 mL contendo aproximadamente 100 mg de tecido macerado, foi adicionado 1 mL do Tri Reagente. O conteúdo dos microtubos foi homogeneizado em vórtex e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação a 4 °C por 10 minutos a 11400 RPM. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo onde foram adicionados 200 µL de clorofórmio e homogeneizados por 15 segundos. Para separar as fases, as amostras foram submetidas à centrifugação na velocidade de 11400 RPM

durante 20 minutos a 4° C sendo coletado e transferido 750 µL da fase aquosa superior para um novo microtubo. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de isopropanol e a solução homogeneizada por inversão e incubada por 60 minutos a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C e 11400 RPM e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado e os microtubos submetidos a uma nova centrifugação a 11400 RPM por 5 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi removida do tubo com auxílio de uma micropipeta, o RNA foi ressuspenso em 20 µL de água ultrapura e armazenado a -80 °C para posterior quantificação.

3.1.3 RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Seguindo as orientações do fabricante, o RNA total foi extraído utilizando aproximadamente 100 mg de tecido macerado onde foram adicionados 450µL do tampão RLT e homogeneizado vigorosamente com vortex. Em seguida, o material foi coletado e transferido para uma coluna QIAshredder spin inserida em um tubo de coleta de 2 mL sendo levado à centrifugação a 15000 RPM por 2 minutos. Cerca de 400 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. A este volume foram adicionados 200µL de etanol absoluto e os 600 µL resultantes foram transferidos para uma nova coluna RNeasy spin inserida em um microtubo de coleta de 2 mL. Efetuou-se uma nova centrifugação por 15 segundos a 10000 RPM, sendo o filtrado descartado. Em seguida, foram adicionados 700 µL do tampão RW1 na coluna RNeasy e novamente efetuou-se uma centrifugação por 15 segundos a 10000 RPM para lavar a membrana da coluna. O filtrado foi descartado. Em seguida adicionou-se 500 µL do tampão RPE na coluna RNeasy spin e, em seguida, centrifugada a 10000 RPM por 15 segundos para mais uma limpeza da membrana da coluna. Mais uma vez, foram adicionados 500 µL do tempão RPE na coluna que, em seguida, foi centrifugada por 2 minutos a 10000 RPM. O

microtubo de coleta de 2 mL foi trocado e a coluna foi novamente centrifugada por 1 minuto a 15000 RPM para a completa retirada de tampão da coluna. A coluna foi inserida em um novo microtubo de coleta de 1,5 mL, tendo sido adicionado 30 μ L de água RNase-free diretamente da membrana e efetuou-se uma centrifugação a 10000 RPM por 1 minuto, sendo o filtrado coletado. Esta etapa de centrifugação foi repetida com o intuito de recuperar o máximo de RNA. Todo o procedimento foi realizado na presença de gelo e com as centrifugações a 4 °C. Finalizado o processo, o RNA obtido foi armazenado a -80 °C para posterior quantificação.

3.1.4 NucleoSpin® RNA Plant (Macherey – Nagel)

Seguindo as orientações do fabricante, o volume de 350 μ L do tampão RA1 (*Lysis buffer*) e 3,5 μ L de β -mercaptoetanol foi acrescentado a 100 mg de tecido macerado. O tecido macerado com tampão foi agitado vigorosamente em vortex e transferida para a coluna NucleoSpin® Filter acoplada a um microtubo de coleta de 2 mL. Efetuou-se uma centrifugação a 10900 RPM por 1 minuto, sendo o filtrado coletado com cuidado para não perturbar o sedimento formado. Este volume filtrado foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 350 μ L de etanol 70%.

Realizou-se uma cuidadosa homogeneização desta solução através da micropipeta (Eppendorf) puxando e soltando o material. O material foi transferido para uma coluna NucleoSpin® Filter, acoplada a um microtubo de coleta e submetido a uma centrifugação a 10900 RPM, 30 segundos. Posteriormente, foram adicionados mais 350 μ L do tampão MDB (*Membrane Desalting buffer*) sobre a membrana e efetuou-se uma nova centrifugação a 10900 RPM por 1 minuto, objetivando a completa secagem da coluna. Em seguida, foram aplicados 95 μ L do mix de reação da rDNase diretamente no

centro da membrana de sílica da coluna e este material foi incubado em temperatura ambiente por 15 minutos.

Após o tratamento com a rDNase, foram adicionados 200 μ L do tampão RA2 (*wash buffer*) na coluna, sendo este conjunto submetido a uma centrifugação por 30 segundos a 10900 RPM. Em seguida, a coluna foi acoplada a um novo microtubo de coleta de 2 mL, foram adicionados sobre a membrana 600 μ L do tampão RA3 (*wash buffer concentrate*) e realizou-se uma nova centrifugação por 30 segundos a 9300 RPM, a coluna foi acoplada a um novo microtubo de coleta de 2mL, foram adicionados 250 μ L do tampão RA3 e este conjunto foi submetido a uma nova centrifugação por 2 minutos a 10900 RPM, visando a completa secagem da coluna. Posteriormente, esta coluna foi acoplada a um novo microtubo de coleta de 1,5 mL, foram adicionados 30 μ L de água RNase-free diretamente sobre a membrana e este conjunto submetido à centrifugação a 10900 RPM por 1 minuto.

O filtrado foi coletado e repetida a etapa com o intuito de recuperar o máximo de RNA. Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente, exceto no intervalo de tempo necessário para colocar o tampão RA1 no macerado, os tubos já preparados permaneceram no gelo. Após a extração, o RNA foi armazenado a -80 °C para posterior quantificação.

3.1.5 Borato Quente

O método do Borato Quente (BQ) foi adaptado do protocolo descrito por Birtic & Kranner (2006), onde o tampão de extração é formado de Tetraborato decahidratado de sódio 0,2 M, contendo Etileno glicol bis; (2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-ácido tetra-acético 30 mM; sódio dodecil sulfato (SDS) 1% (p/v); Sódio dexicholate 1% (p/v), com pH 9.0 ajustado com hidróxido de sódio 1 M. Para cada 1 mL de tampão, foram adicionados 0,12 g de polivinilpirrolidone (PVP 40) e 1,5 μ L de ditioneitol (DTT), sendo esta solução aquecida a 80 °C

para dissolução completa dos reagentes. Em seguida, o volume de 0,4 μ L de β -mercaptoetanol foi adicionado ao microtubo de 2 mL que continha 100 mg de tecido macerado. Ainda foram acrescentados a este microtubo 1 mL do tampão de extração e 1 mg de Proteinase K (Amresco) (p/v). Esta solução foi agitada em vortex e colocada em banho maria a 45 °C por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 80 μ L de Cloreto de Potássio 2 M, as amostras foram incubadas no gelo por 45 minutos e, em seguida, centrifugadas a 13000 RPM por 20 minutos a 4 °C. Aos 600 μ L recuperados foi acrescentado 200 μ L de Cloreto de Lítio 10 M estocado a -20 °C, sendo as amostras incubadas a -20 °C por 14-16 horas para precipitação do RNA. Após esse período, foi realizada uma centrifugação a 13000 RPM por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 750 μ L de Cloreto de Lítio 2 M duas vezes com uma centrifugação de 10 minutos a 13000 RPM, intercalando as lavagens. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco e, em seguida, ressuspendido em 20 μ L de água ultra pura autoclavada. Esta solução foi agitada em vortex, novamente centrifugada a 13000 RPM por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. As amostras foram armazenadas a -80 °C para posterior quantificação.

3.1.6 CTAB rápido

Utilizando dois tipos de soluções tampão, o método CTAB rápido (CTABr) foi adaptado do protocolo descrito por Gambino et al. (2008). O primeiro tampão de extração continha, 2% (p/v) de CTAB, 2,5% (p/v) de PVP-40; 2M NaCl; 100mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0 e 2% (v/v) de β -mercaptoetanol (Sigma–Aldrich) adicionado ao tampão imediatamente antes do uso. O segundo tampão de extração -- identificado como SSTE -- continha, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0; 1% (p/v) de SDS e 1 M de NaCl. Para cada 1 mL de

tampão previamente aquecido a 65 °C, foram adicionados 200 mg de tecido macerado e, como opcional, 1,0 mg de proteinase K (Amresco) (p/v). A solução foi aquecida a 50 °C em banho maria por 30 minutos e, em seguida, centrifugada por 10 minutos a 13000 RPM, sendo a fase aquosa transferida para um novo micro-tubo de 2 mL. A esta solução foi adicionado igual volume de Clorofórmio Álcool-Isoamílico (24:1). Efetuou-se uma centrifugação por 10 minutos a 13000 RPM, sendo o sobrenadante recuperado e transferido para um novo microtubo. Esta etapa foi repetida uma vez. Posteriormente, adicionou-se 1/3 do volume coletado de cloreto de lítio a 10 M. Em seguida, a solução foi incubada por 30 minutos a -20 °C e, na sequência, centrifugada por 20 minutos a 4 °C e 15000 RPM. A fase aquosa foi descartada e o precipitado foi ressuspenso em 500 µL do tampão SSTE pré-aquecido a 65 °C e 500 µL de Clorofórmio Álcool-Isoamílico (24:1). Esta solução foi homogeneizada em vortex e centrifugada por 10 minutos, 13000 RPM e 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 0,7 volumes de isopropanol gelado (-20 °C). Este conjunto foi centrifugado a 15000 RPM a 4 °C por 15 minutos, sendo o precipitado, de difícil visualização, lavado com 300 µL de álcool 70%, centrifugado novamente por 5 minutos, 11000 RPM a 4 °C, seco e ressuspenso em 20 µL de água Milli-Q tratada com DEPC 0,1% (v/v) autoclavada e armazenado a -80 °C.

Embora fornecido RNA de boa qualidade, o método CTABr, proporcionou RNA em baixa concentração, sendo necessário o agrupamento das repetições dos mesmos tecidos com o objetivo de concentrar estas amostras via liofilização. Foi utilizado o liofilizador do fabricante LIOBRAS modelo L101

por 6 horas a uma temperatura de -40 °C. Em seguida, o RNA liofilizado foi ressuspenso em água Milli-Q autoclavada, tratada com DEPC 0,1% em um volume referente à metade do que se encontrava o volume proveniente da união dos tubos e então quantificado.

3.2 Tratamento com DNase

Todas as amostras de RNA passaram por um tratamento para remoção do DNA genômico utilizando a endonuclease TURBO™ DNase (Ambion). Este tratamento foi executado seguindo o protocolo utilizado no *Laboratory of Tropical Crop Improvement* da Universidade Católica de Leuven (KUL) na Bélgica, com a substituição do tampão de ativação da enzima nele descrito pelo tampão que acompanha o kit da Turbo™ DNase. Para tanto, utilizou-se um microtubo de 500 µL e para cada µg de RNA foram adicionadas 2 unidades da Turbo™ DNase juntamente com o seu respectivo tampão na concentração final de 1x, considerando um volume final de 50µL. Este conjunto foi incubado em banho maria a 37 °C por 45 minutos. Após esta incubação, foram adicionados 50 µL de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico 25:24:1. A solução foi homogeneizada em vortex, centrifugada a 4 °C por 10 minutos e 13000 RPM e cerca de 45 µL da fase aquosa foram coletados e transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL. A esta solução foram adicionados 4,5 µL de acetato de sódio 3M, 5µL de glicogênio (Invitrogen) e 136,25 µL de etanol absoluto gelado (-20 °C). Uma homogeneização foi realizada cuidadosamente e os microtubos foram incubados por 14-16 horas a -80 °C. Após este período de incubação, os microtubos foram incubados por 5 minutos em gelo e centrifugados por 1 hora e 30 minutos a 13000 RPM em uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70% gelado (-20°C). Foi realizada uma centrifugação a 13000 RPM por 15 minutos a 4 °C, sendo o

sobrenadante descartado, o precipitado seco e ressuspenso em 30 µL de água Milli-Q tratada com 0,1% (v/v) de DEPC autoclavada.

3.3 Isolamento de DNA

Com o objetivo de termos um DNA de banana para ser utilizado como controle positivo das amostras na etapa de RT-PCR e qPCR, foi necessário a extração de DNA das cultivares Grande Naine e Prata Anã.

Para tanto, cerca de 200 mg de folha de cada cultivar foram maceradas em um cadinho contendo nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Este macerado foi transferido para um microtubo de 2 mL onde foi acrescentado 1 mL do tampão CTAB (2% p/v de CTAB, 2,5% p/v de PVP-40; 2 M NaCl; 100 mM tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0).

A solução contendo o tampão de extração e o tecido macerado foi pré-aquecida a 65 °C e adicionou-se 2% (v/v) de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Fez-se uma homogeneização por 30 segundos com ajuda de um vortex e, em seguida, o microtubo foi incubado em banho maria por 40 minutos a 65 °C sendo homogeneizado por inversão a cada 10 minutos. Após esta etapa, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 11000 RPM, sendo que 600 µL da fase aquosa foram recuperados e transferidos para um novo microtubo de 2 mL onde foram acrescentados 600 µL da mistura Clorofórmio: Álcool Isoamílico, 24:1 (v/v).

Esta solução foi homogeneizada em vortex por 30 segundos e submetida a uma nova centrifugação a 11000 RPM por 10 minutos. Cerca de 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo onde foram adicionados 4 µL de Rnase A na concentração estoque de 100 µg/mL (Amresco). Fez-se uma incubação a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, foram adicionados 240 µL de Álcool Isopropílico, PA gelado. Esta mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a -20 °C por 1 hora. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 11000 RPM por 20 minutos, o

sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com 400 μL de etanol absoluto e, em seguida, seco. Como último passo, realizou-se a ressuspensão deste precipitado em 30 μL de água Milli-Q tratada com 0,1% (v/v) de DEPC. Todo o procedimento foi feito em temperatura ambiente.

3.4 Quantificação e Integridade das amostras de RNA e DNA

Após a extração, a qualidade do RNA total e do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), em tampão TAE 1X (Tris-ácido acético-EDTA e corados em uma solução de brometo de etídeo (10mg/mL) a 0,6% (v/v). Este gel foi visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak[®]), sendo processada com o software Kodak[®] 1 D Limited Edition versão 3.6.1. Finalizada a verificação da integridade das amostras, as que demonstraram ser de boa qualidade e eram provenientes do mesmo tecido e cultivar foram agrupadas em um único tubo e este material foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop[®] ND-1000, no modo *Standard* e opção de leitura de RNA e DNA, conforme o tipo de amostra. Com esta quantificação, foi determinado a quantidade em ng/ μL e a relação de pureza das amostras.

3.5 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi feita utilizando o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Primeiramente, o RNA foi diluído a uma concentração de 1 μg em um volume final de 10 μL . Em seguida, foi preparado um mix contendo tampão 10X RT *buffer* na concentração de 1x; 4mM do mix de dNTP's (100 mM); 1x dos RT *Random Primers*; 1 μL de *MultiScribeTM Reverse Transcriptase* e 4,2 μL de água Milli-Q tratada com 0,1% (v/v) de DEPC autoclavada, totalizando 10 μL . Deste modo, a cada solução de 10 μL contendo 1 μg de RNA, foi acrescentado 10 μL deste mix. Os tubos

foram levados ao termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient*, programado com as condições impostas pelo fabricante do kit para a correta síntese da primeira fita de cDNA: 10 minutos a 25 °C para o anelamento dos *primers*; 2 horas a 37 °C para ação da enzima sintetizar a fita do DNA complementar e 5 minutos a 85 °C para inativá-la. Ao final do processo, o cDNA foi quantificado no modo *standart* do Nanodrop® na opção de leitura de ssDNA, determinando assim, a quantidade em ng/μL da amostra. Imediatamente após este procedimento, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

3.6 Validação dos cDNA's obtidos

Os cDNAs foram validados via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos cujo alvo de amplificação é o gene ubíquo que codifica actina em banana sendo sua sequência senso: 5'GAGAAGATACAGTGTCTGGA 3' e antisseno: 5'ATTACCATCGAAATATTTAAAAG 3'. Para todas amostras de cDNA e DNA, foi feito um mix de várias amostras a partir dos volumes de uma reação individual contendo: 9,6 μL de água Milli-Q tratada com 0,1% (v/v) de DEPc autoclavada; 1x de tampão com MgCl₂ (Sigma-Aldrich) para Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich) 5U/μL; 0,2mM de dNTP's (RBC); 0,5 mM dos *primers forward* e *reverse* (IDT) e 0,5U da enzima Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich), para um volume de 13 μL. A reação foi feita em duplicata, sendo que cada par de microtubo de 200μL continha 2 μL de cDNA diluído a 60 ng/μL proveniente de cada tecido, exceto os utilizados como controles negativos e positivos. No caso do controle negativo, foram usados dois microtubos, sendo pipetado 2 μL de água Milli-Q DEPc autoclavada ao invés do cDNA. Já para o controle

positivo, foram usados quatro microtubos onde pipetou-se 2 μL de DNA extraído de banana a 35 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ao invés de cDNA. Devido ao fato do *primer* utilizado ter sido desenhado a partir de uma sequência contendo uma região intrônica, as bandas observadas no gel de agarose apresentaram tamanhos distintos para o cDNA (231 pb) e para o DNA (300 pb) devidamente identificados por um DNA *ladder* (GE Healthcare) com fragmentos de 100 pb. Os tubos contendo os 15 μL da reação foram levados ao termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient* assim programado: 95 °C por 2 minutos para desnaturação (DNA dupla fita), 35 ciclos de 20 segundos a 95 °C; 20 segundos a 55 °C (anelamento dos *primers*), 20 segundos a 72 °C (extensão das novas fitas), 72 °C por 5 minutos e 12 °C *hold*. O produto desta PCR foi inteiramente aplicado em um gel de agarose a 1,2% (p/v), em tampão TAE 1x e corado com 0,6% (v/v) de Brometo de Etídeo na concentração de uso de 10 mg/mL .

3.7 Identificação das sequências promotoras de expressão gênica tecido-específicas

A identificação das sequências potencialmente promotoras tecido específicas foi feita através de sete PCR's onde um mix contendo 9,6 μL de água Milli-Q tratada com 0,1% (v/v) de DEPC autoclavada; 1x de tampão com MgCl_2 (Sigma-Aldrich) para Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich) 5U/ μL ; 0,2mM de dNTP's (RBC); 0,5 mM dos *primers forward e reverse* (IDT) e 0,5U da enzima Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich), para um volume de 13 μL foi preparado para cada amostra em duplicata. O *template* utilizado foi 2 μL de cDNA de cada tecido na concentração de

60ng/μL, 2μL de DNA de cada cultivar para o controle positivo a 30ng/μL e para o controle negativo 2μL de água ultrapura.

A síntese e amplificação dos fragmentos foi feita utilizando o termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient* assim programado: 95 °C por 2 minutos para desnaturação (DNA dupla fita), 35 ciclos de 20 segundos a 95 °C; 20 segundos a 60 °C (anelamento dos *primers*), 20 segundos a 72 °C (extensão das novas fitas), 72 °C por 5 minutos e 12 °C *hold*. O produto de cada PCR foi inteiramente aplicado em um gel de agarose a 1,2% (p/v), em tampão TAE 1x e corado com 0,6% (v/v) de Brometo de Etídeo na concentração de uso de 10 mg/mL.

Os *primers* utilizados foram desenhados a partir das sequências candidatas anteriormente selecionadas por um virtual *screening* no banco de dados do genoma da banana, *DATAMusa*, o qual hospeda informações de genoma estrutural (sequências consenso de clones BACs), sequências expressas (ESTs) e de Análogos de Genes de Resistência (RGAs), que pela confidencialidade do projeto serão omitidas e apenas identificadas como 011M; EMB 27; EMB 28; EMB 29; EMB 31; EMB 33 e EMB 38. Outra modificação se refere à temperatura de anelamento utilizada no programa do termociclador, que desta vez foi de 60°C.

3.8 RT-PCR e qPCR

O cDNA individual de cada tecido e o *pool* de cada cultivar selecionada no ensaio de RT-PCR (EMB 27; EMB 28; EMB 31 e EMB 33) foram empregados como molde na análise da expressão gênica quantitativa tecido-específica. Para esta etapa, utilizamos o aparelho ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) com o seu respectivo software 7500 versão 2.0.1 e o sistema de corante fluorescente SYBR Green I detectável pelo seu acúmulo durante os ciclos da reação.

Como normalizador (controle endógeno) foi utilizado gene da actina, cujo os primers foram anteriormente utilizados na etapa de RT-PCR.

Inicialmente foi realizado um ensaio para se determinar a eficiência da reação de amplificação do normalizador através da seguinte série de diluições dos cDNA's: 1:10, 1:25, 1:50, 1:100.

Os parâmetros de ciclagem utilizados para as reações foram: 2 minutos a 50 °C, ativação da enzima a 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação (a partir do segundo ciclo), anelamento e extensão a 55 °C por 1 minuto, finalizando com 1 segundo a 95 °C.

Adicionalmente, foi conduzida uma etapa de desnaturação lenta, com elevação da temperatura de 1 °C por minuto para a construção da curva de dissociação. Neste sentido, a melhor diluição apresentou amplificação somente em ciclos tardios, a partir do ciclo 29. Diante do exposto, fez-se necessária a utilização de λDNA para antecipar os ciclos de amplificação. Desta forma, foram feitas seis diluições em série para as amostras individuais (Tabela 2) e para os *pools* (Tabela 3) de cada cultivar conforme, sendo os ensaios realizados com as amostras em duplicata, repetindo a ciclagem anterior.

TABELA 2 Diluição referente às amostras individuais de cada tecido e cultivar a partir de um estoque de cDNA contendo 12µL.

Diluição	Concentração real		Vol. feito
D1	32	8ul cDNA + 0.5ul λDNA (50x) + 16.5ul Agua	25ul
D2	8	10ul d1 + 30ul λDNA (1x)	40ul
D3	2	10ul d2 + 30ul λDNA (1x)	40ul
D4	0.5	10ul d3 + 30ul λDNA (1x)	40ul
D5	0.125	10ul d4 + 30ul λDNA (1x)	40ul
D6	0.03125	10ul d5 + 30ul λDNA (1x)	40ul

TABELA 3 Diluição referente ao pool dos tecidos de cada cultivar a partir de um volume de 2,5µL de cDNA de cada tecido.

Diluição	Concentração real		Vol. feito
D1	32	16ul cDNA + 1ul λDNA (50x) + 33ul Agua	50ul
D2	8	20ul d1 + 60ul λDNA (1x)	80ul
D3	2	20ul d2 + 60ul λDNA (1x)	80ul
D4	0.5	20ul d3 + 60ul λDNA (1x)	80ul
D5	0.125	20ul d4 + 60ul λDNA (1x)	80ul
D6	0.03125	20ul d5 + 60ul λDNA (1x)	80ul

A reação de quantificação foi realizada, para todos os ensaios, utilizando-se as seguintes quantidades: 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix 2X; 0,4µL (10 mM) dos *primers* R e F; 1 µL do mix de cDNA (cDNA + λDNA) e 3,6 µL de água Milli-Q, perfazendo um volume final de 10 µL.

A diluição D2 foi escolhida para a realização do ensaio em triplicata para a quantificação absoluta da expressão dos genes candidatos e determinação dos ciclos de amplificação (C_T). Foi avaliada a expressão dos 4 genes validados pela RT-PCR e confirmados pela qPCR utilizando a mesma ciclagem aplicada ao *primer* da actina, porém com a temperatura de anelamento e extensão de 60 °C.

Sem os resultados do normalizador, foi feito um gráfico representado pela base de calculo da equação $2^{-C_{Tmean}}$, na qual C_{Tmean} considera-se a média dos C_T das amostras em triplicata. A aplicação desta equação não permite a avaliação da expressão relativa entre os genes e os tecidos, apenas uma avaliação gráfica de presença e ausência de expressão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de RNA

Dos seis métodos de isolamento de RNA testados, quatro foram descartados por apresentarem baixo rendimento e baixa qualidade do RNA isolado (dados não mostrados). Os dois métodos que apresentaram RNA de alta qualidade (íntegros, não degradados) foram os protocolos do Borato Quente (Birtic & Kranner, 2006) (BQ) e CTAB rápido (Gambino et al., 2008) (CTABr), com alterações relacionadas à utilização de proteinase K, à temperatura de precipitação e à velocidade de centrifugação.

O método BQ proporcionou alto rendimento e boa qualidade assim como o método CTABr, que proporcionou RNA de excelente qualidade, porém com baixo rendimento, talvez pelo fato de este método ser originalmente destinado à extração em larga escala (Chang et al., 1993). Esse baixo rendimento obrigou a realização de várias extrações de cada tecido para que, somadas, possibilitassem a obtenção da quantidade necessária de RNA .

O processo de extração via CTABr leva 4h, enquanto via BQ leva 2 dias. Dadas as qualidades de RNA próximas entre os dois, o fator tempo foi preponderante em relação ao rendimento para a escolha do CTABr como método a ser adotado.

A banana é rica em polifenóis e polissacarídeos e estes compostos dificultam a purificação de RNA (Liu et al., 1998; Birtic & Kranner, 2006; Junping et al., 2006). Possivelmente, o sucesso de ambos os métodos se deve ao fato de conterem em seus protocolos PVP e β -ME, responsáveis pela redução de oxidantes e compostos fenólicos (Jaakola, 2001), e também LiCl, considerado o melhor agente precipitador de RNA (Rubio-Piña & Vázquez-Flota, 2008). Além destes, o próprio detergente CTAB contribui para a separação entre polissacarídeos e ácidos nucleicos (Chang et al., 1993).

A qualidade do RNA extraído pelo método CTABr foi determinada por análise visual mediante eletroforese em géis de agarose (Figura 4) e a concentração e pureza determinadas por espectrofotometria (Figura 5), já que a qualificação apenas por espectrofotometria não é ideal, pois, embora considere a presença de contaminantes para determinar a pureza (Manning, 1991; Logemann et al., 1997), considera também RNA degradado na quantificação.

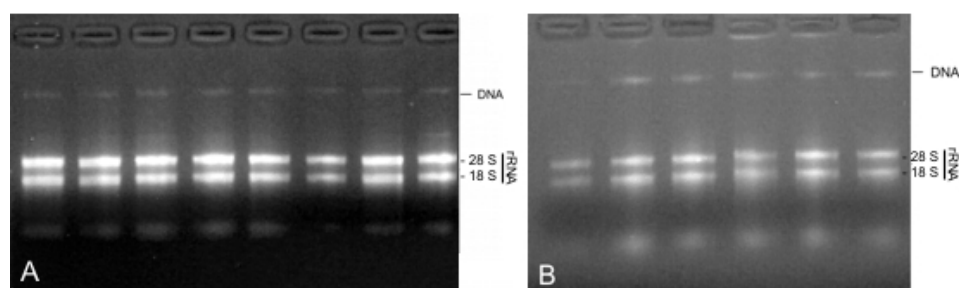


FIGURA 4 Géis de agarose a 1,2% corados com brometo de etídeo onde foi aplicado RNA total e se observa as bandas 28S e 18S referente ao rRNA (RNA ribossômico) obtido de várias extrações de raiz (A) e de polpa madura (B) de Prata Anã pelo método CTABr.

Desse modo, (i) pela razão de absorvância entre 260 e 230 nm, indicativa de contaminação por compostos polissacarídicos e/ou polifenólicos; (ii) pela razão entre 260 e 280 nm, indicativa de contaminação por proteínas, ambas razões consideradas ideais quando os valores ficam limitados entre 1,8 e 2,2, segundo manual do fabricante do aparelho (Figura 5), e (iii) pelo padrão de bandas eletroforéticas do rRNA 18S e 28S (Figura 4), pode-se concluir que o RNA extraído pelo CTABr foi de alta qualidade para ser usado nas etapas seguintes do trabalho.

Sample	ng/ul	260/280	260/230	Constant	Sample	ng/ul	260/280	260/230
Grande Naine					Prata Anã			
Casca Madura	137.46	2.08	2.21	40.00	Casca Verde	19.11	2.16	2.02
Casca Verde	104.84	2.07	2.19	40.00	Flor	67.03	1.92	2.38
Flor	82.91	1.95	1.27	40.00	Folha	42.21	1.97	2.30
Folha	128.29	2.05	2.19	40.00	Polpa Madura	70.47	2.04	2.24
Polpa Madura	82.01	2.23	2.03	40.00	Polpa Verde	21.66	2.13	2.10
Polpa Verde	36.58	2.18	1.91	40.00	Raiz	43.44	1.85	1.85
Raiz	154.95	2.09	2.22	40.00	Casca Madura	278.15	2.07	2.29

FIGURA 5 Quantificação e grau de pureza, determinadas por espectrofotometria, de amostras de RNA referentes aos 7 tecidos de Grande Naine e 7 de Prata Anã extraídos com CTABr.

4.2 Remoção de DNA genômico das amostras de RNA e síntese do DNA complementar

A remoção do DNA genômico (gDNA) utilizando o kit TURBO™ DNase (Ambion) foi eficiente de acordo com a eletroforese (Figura 6). Porém, a amplificação via PCR do DNA complementar (cDNA) utilizando *primers* para uma região de *exons* intercalados com um *intron*, que geram *amplicons* de diferentes tamanhos para gDNA e cDNA, mostrou contaminação por gDNA (Figura 7). No entanto, um novo tratamento das amostras contaminadas com o kit mostrou que o gDNA foi removido após PCR utilizando *primers* para o gene constitutivo da actina (Figura 8).

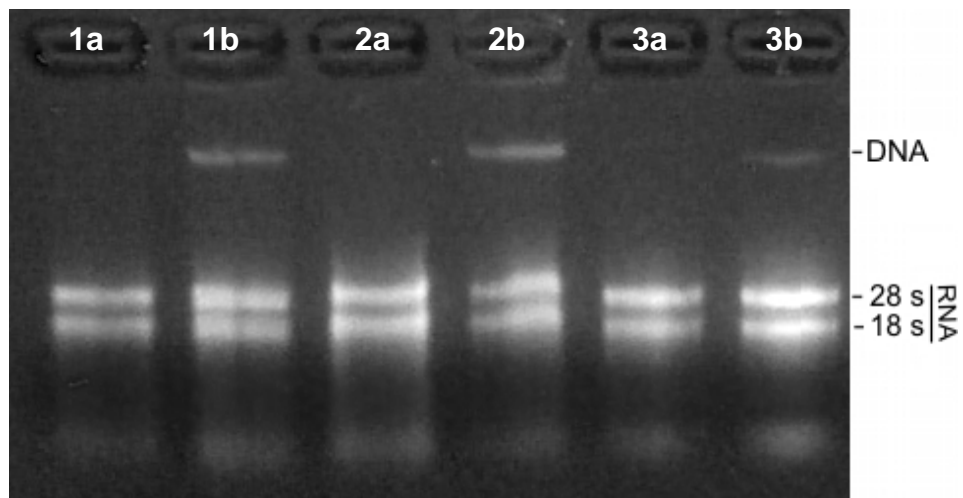


FIGURA 6 Gel de agarose a 1 % com amostras de RNA tratadas com o kit TURBO™ Dnase (Ambion). 1-Casca Madura GN; 2-Casca Verde GN; 3-Flor GN. a-amostras tratadas; b-amostras não tratadas.

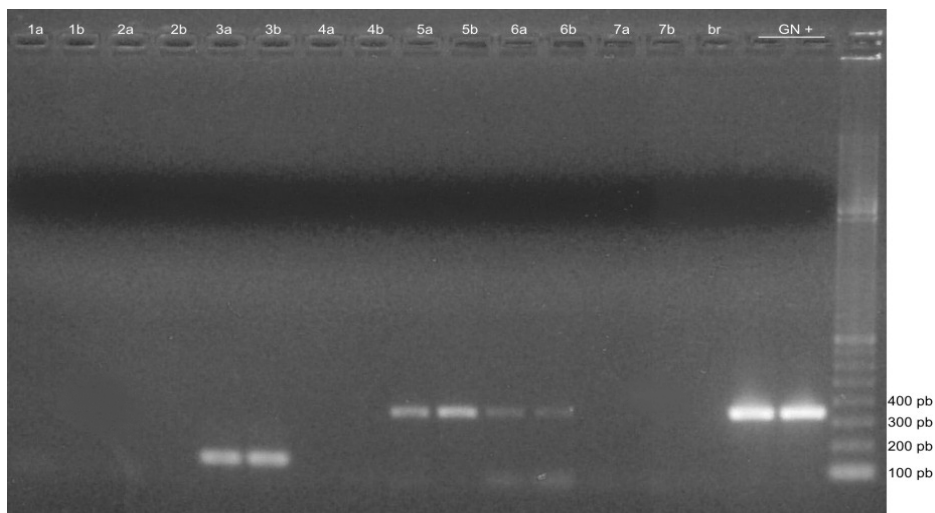


FIGURA 7 Gel de agarose a 1,2% com produto da PCR mostrando contaminação por gDNA nas amostras de cDNA 3a e 3b (amostras não contaminadas com gDNA amplificando apenas cDNA); 5a, 5b e 6a, 6b (amostras contaminadas amplificando gDNA); GN+ (controle positivo de gDNA); br (controle negativo).

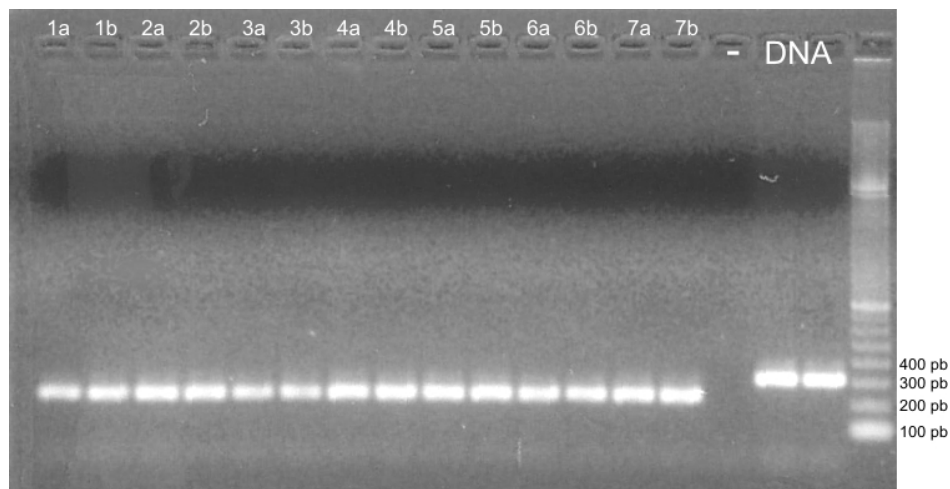


FIGURA 8 Gel de agarose a 1,2% com *amplicons* de cDNA livre de contaminação por utilizando *primers* para o gene constitutivo actina, demonstrando a remoção do gDNA destas amostras antes contaminadas (5 a, b e 6 a, b).

4.3 Busca e validação de sequências promotoras através de RT-PCR e PCR em tempo real

Os dados obtidos pela PCR em tempo real (Figuras 10A, 10B, 10C, 11A, 11B, 11C, 12A, 12B, 12C, 13A, 13B, 13C, 14A, 14B, 14C, 15A, 15B E 15C) foram comprometidos pelo fato de o normalizador escolhido (actina) não ter gerado padrões de amplificação condizentes com o esperado para uma expressão basal e, portanto, a expressão diferencial entre tecidos não pôde ser quantificada.

Em função dos diferentes ciclos necessários para se registrar cada amplificação, pode-se afirmar diferenças relativas de expressão entre os tecidos que confirmam os resultados da RT-PCR (Figuras 9 A, 9 B1, 9 B2, 9 C1, 9 C2 e D).

Desse modo, dos 7 pares de *primers* desenhados para os genes relacionados aos promotores candidatos, testados contra os cDNAs obtidos a partir dos 7 tecidos de GN e PA analisados, 4 promotores com expressão diferencial foram validados.

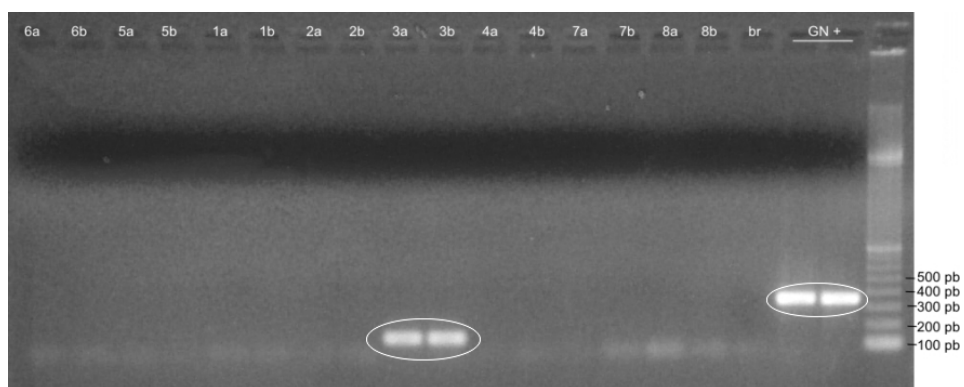


FIGURA 9A Expressão tecido-específica (flor 3a e 3b; GN) mostrada por um *amplicon* de cDNA com 137 pb e outro de gDNA com 341 pb gerados pelo *primer* Emb 27.

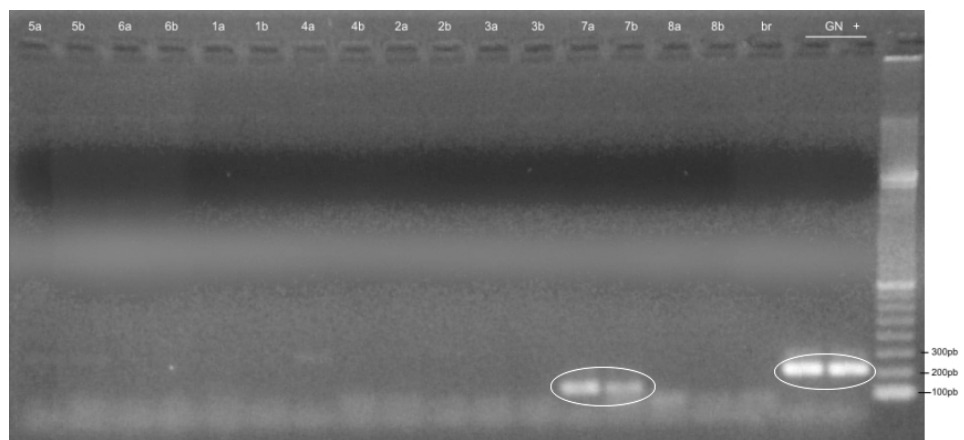


FIGURA 9B1 Expressão tecido-específica em GN (raiz, 7a e 7b) observada pelo *amplicon* de cDNA com 128 pb e outro de gDNA com 217 pb gerados pelo *primer* Emb 28;

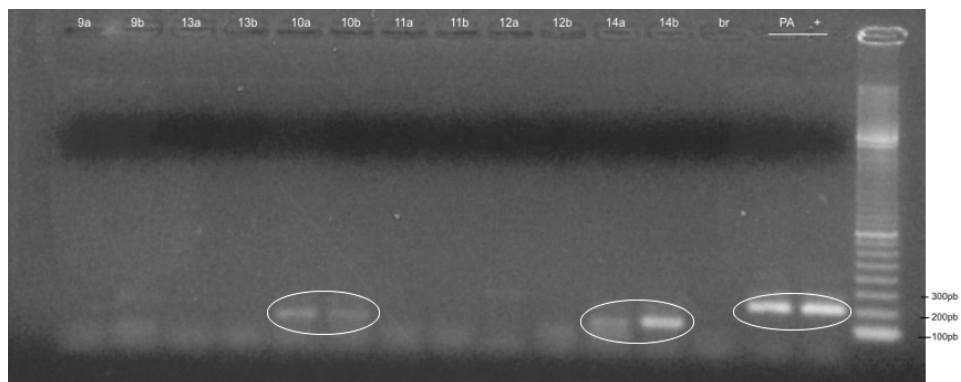


FIGURA 9B2 Expressão não tecido-específica em PA (flor 10a e 10b e raiz 14a e 14b) observada pelo *amplicon* de cDNA com 128 pb e outro de gDNA com 217 pb gerados pelo *primer* Emb 28;

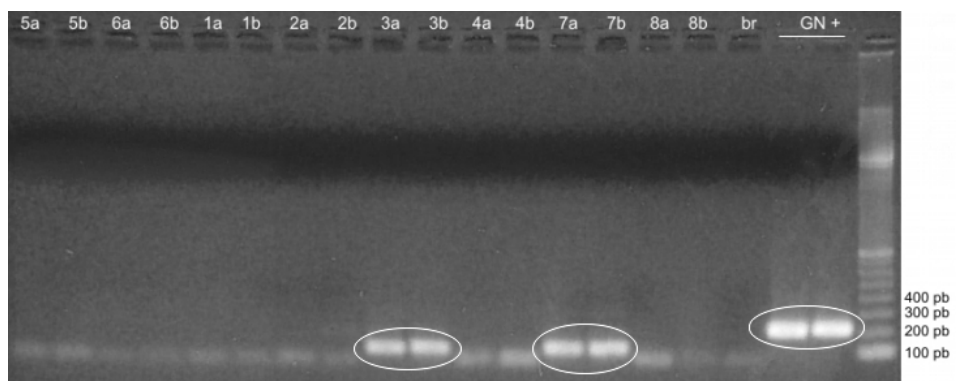


FIGURA 9C1 Expressão em flor (3a e 3b) e raiz (7^a e 7b) de GN observada pelo *amplicon* de cDNA com 120 pb e outro de gDNA com 209 pb gerados pelo *primer* Emb 31.

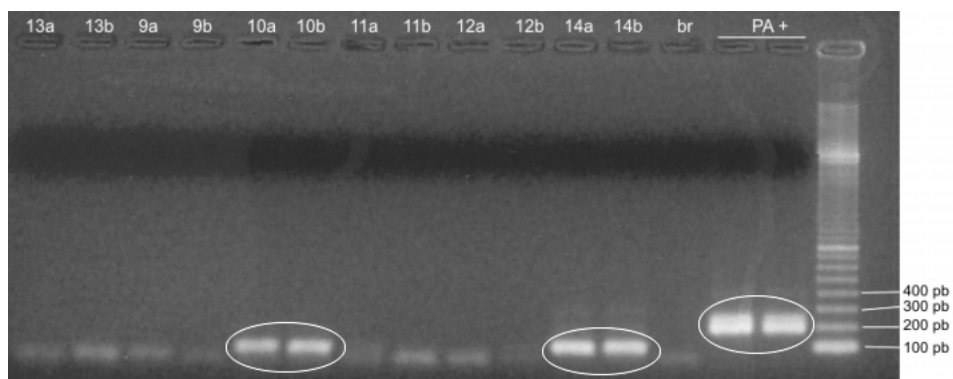


FIGURA 9C2 Expressão em flor (10a e 10b) e raiz (14a e 14b) de PA observada pelo *amplicon* de cDNA com 120 pb e outro de gDNA com 209 pb gerados pelo *primer* Emb 31.

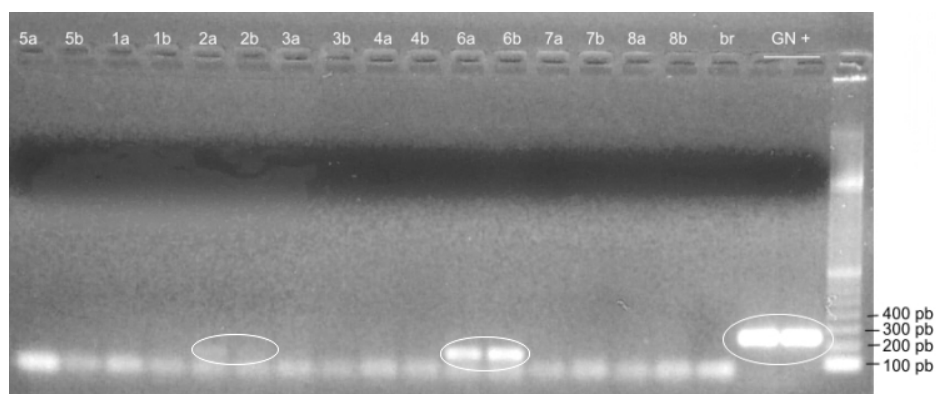


FIGURA 9D Expressão em GN (casca verdes 2a e 2b e polpa 6a e 6b) observada pelo *amplicon* de cDNA com 129 pb e outro de gDNA com 241 pb gerados pelo *primer* Emb 33;

Da análise *in silico*, que identificou as sequências com as quais foram desenhados os *primers*, Emb 27 correspondeu à sequência codante de uma aldeído redutase (Figura 9 A); Emb 28, de um precursor da peroxidase catiônica (Figura 9 B1 e 9 B2); Emb 31, de subunidade de uma proteína associada à anáfase (Figuras 9 C1 e 9 C2); e Emb 33, de uma cisteíno peptidase (Figura 9 D).

A única entrada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para aldeído redutase em plantas foi encontrada em *Arabidopsis* e caracterizada como uma proteína associada a rotas metabólicas envolvendo ácido fólico e seus derivados. No entanto, não identificamos qual a função biológica associada ao fato da expressão tecido-específica em flor de bananeira do seu respectivo gene (Figura 9 A).

A expressão tecido-específica em raiz de GN e em flor e raiz de PA de um precursor da peroxidase catiônica (*primer* EMB 28 e Figuras 9 B1 e 9 B2) é condizente com o fato de as peroxidases estarem envolvidas no estresse oxidativo (Martindale & Holbrook, 2002) e, dentre elas, as da classe III, encontradas no espaço extracelular ou nos vacúolos de plantas, estarem envolvidas tanto na degradação de peróxidos de hidrogênio relacionados a respostas a estresses, quanto no catabolismo da auxina e biossíntese de lignina e de flavonóides (Dardick, 2010; Boerjan, 2003; Rogers et al., 2005). Isto porque, além da atividade do gene desta enzima no metabolismo normal destes tecidos, o processo de coleta pode ter induzido o gene a uma rápida e maior transcrição, haja vista a velocidade com que sofre oxidação qualquer tecido de bananeira submetido a estresse mecânico.

A expressão em flor e raiz de GN e PA (*primer* EMB 31 e Figuras 9 C1 e 9 C2) de uma subunidade de uma proteína associada à anáfase também é condizente a provável alta taxa de divisão celular destes tecidos em fase de desenvolvimento, como é o caso da flor, ou em fase de crescimento constante, como é o da raiz.

A expressão tecido-específica de uma cisteíno peptidase em polpa verde de GN (*primer* EMB 33 e Figura 9 D) talvez esteja associada à família da papaína pelo fato desta família representar o principal componente proteínico do látex de frutos verdes de mamão (Ménard & Storer, 1998). No entanto, cisteíno peptidases são encontradas também em sementes germinando e em

tecidos senescendo (Granell et al., 2003). Pouco se sabe sobre o papel biológico da papaína, mas devido a sua abundância, localização e inespecificidade proteolítica, Ménard & Storer (2003) supõem que seja um papel de proteção contra ataque de fungos e insetos.

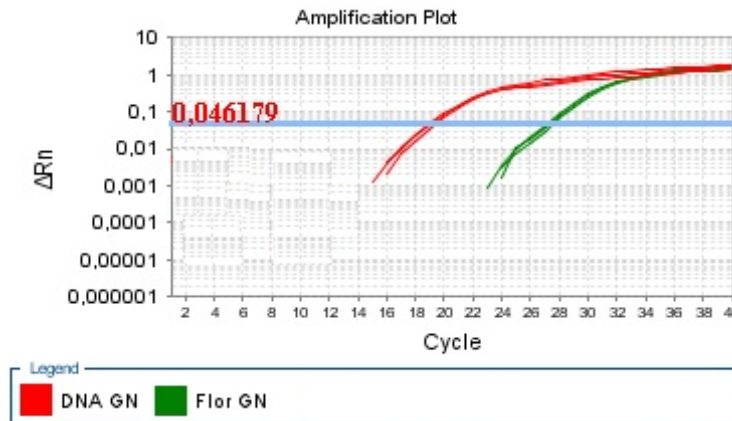


FIGURA 10A Gráfico de amplificação mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 27.

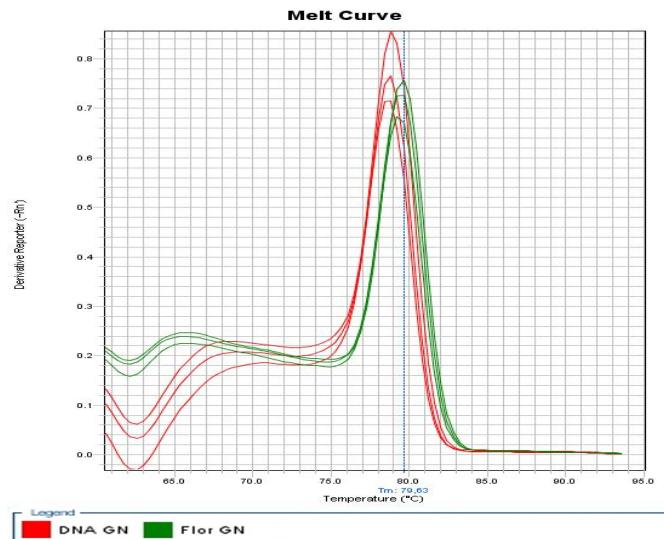


FIGURA 10B Curva de *melting* do *primer* EMB 27.

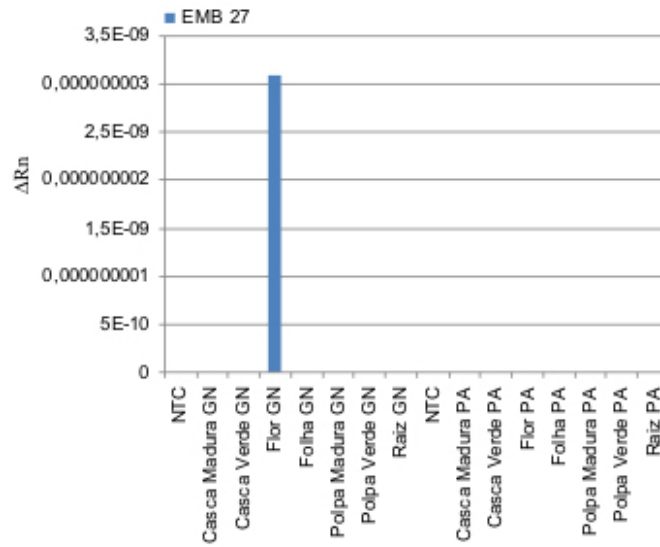


FIGURA 10C Análise da amplificação por qPCR do *primer* EMB 27.

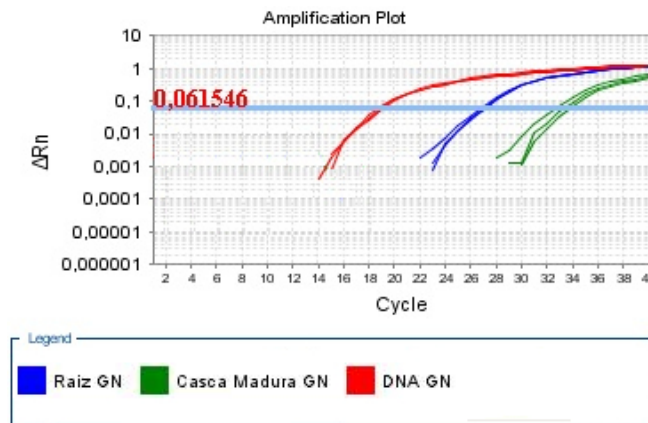


FIGURA 11A Gráfico de amplificação mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 28.

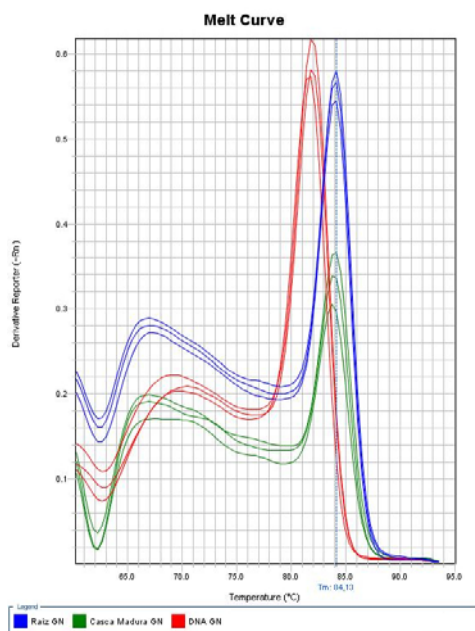


FIGURA 11B Curva de *melting* do *primer* EMB 28.

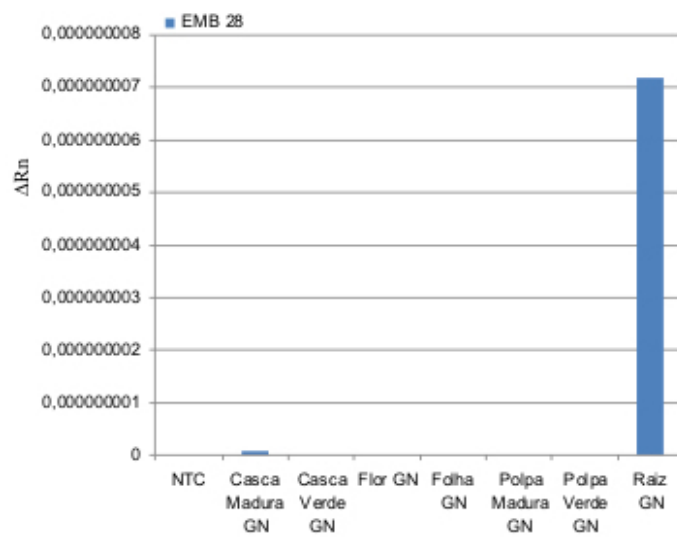


FIGURA 11C Análise da amplificação por qPCR do *primer* EMB 28.

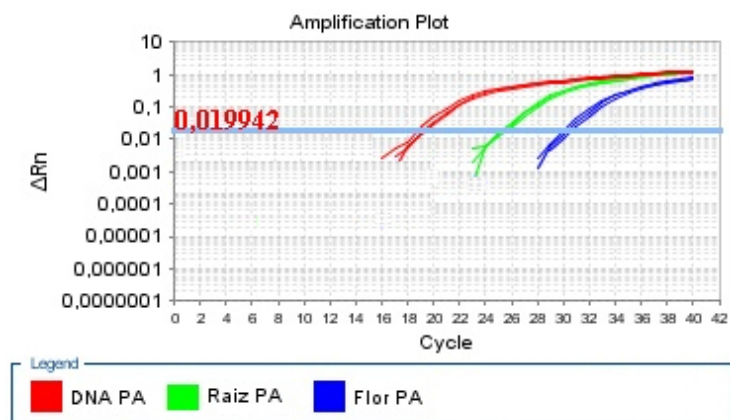


FIGURA 12A Gráfico de amplificação mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 28.

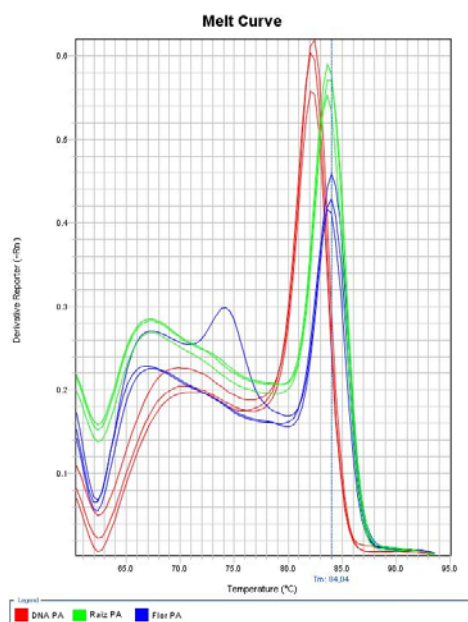


FIGURA 12B Curva de *melting* do *primer* EMB 28.

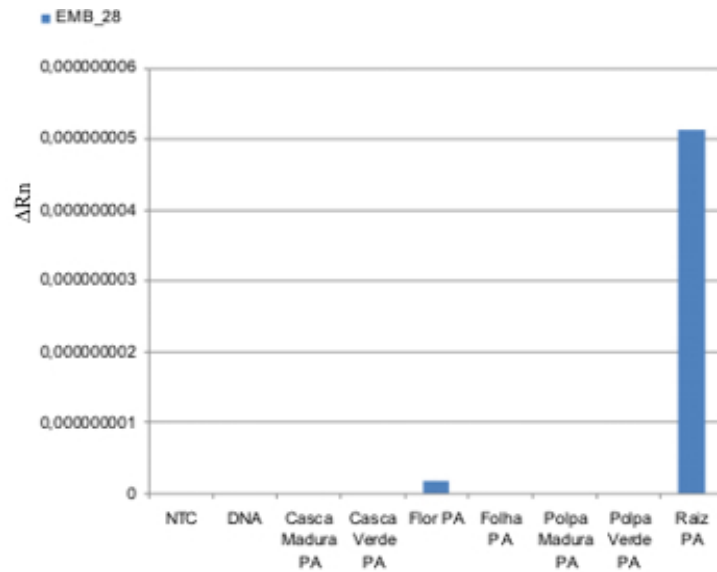


FIGURA 12C Análise da amplificação por qPCR do *primer* EMB 28.

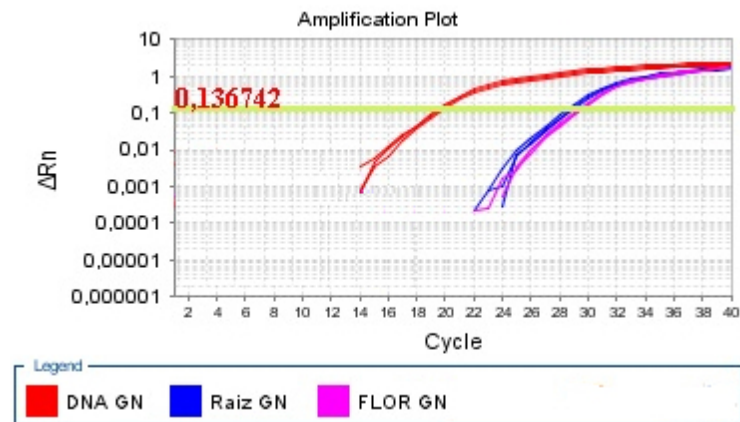


FIGURA 13A Gráfico de amplificação mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 31.

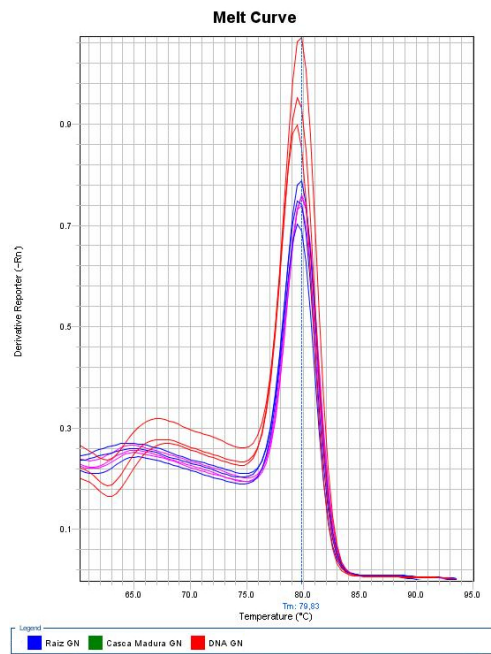


FIGURA 13B Curva de *melting* do *primer* EMB 31.

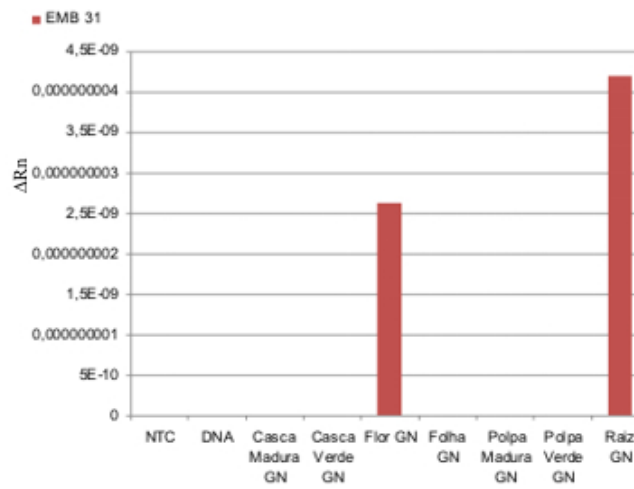


FIGURA 13C Análise da amplificação por qPCR do *primer* EMB 31.

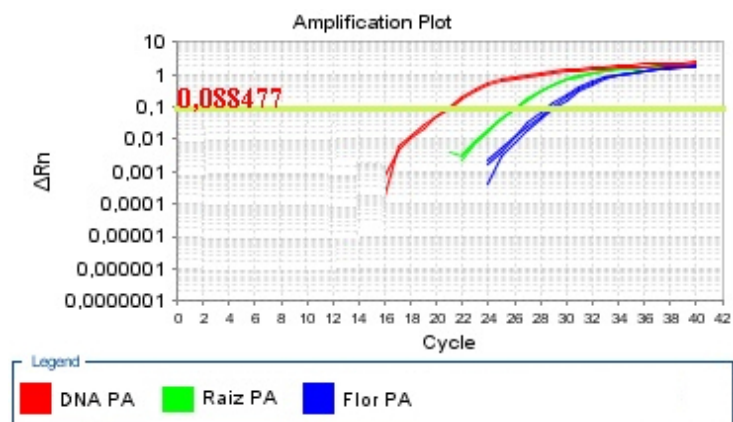


FIGURA 14A Gráfico de amplificação mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 31.

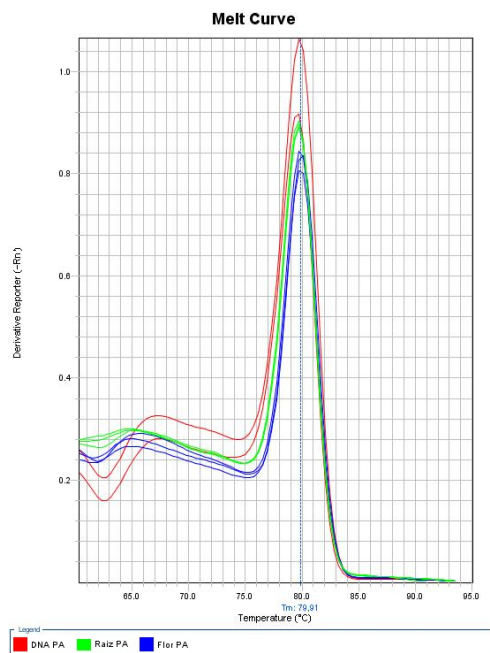


FIGURA 14B Curva de *melting* do *primer* EMB 31.

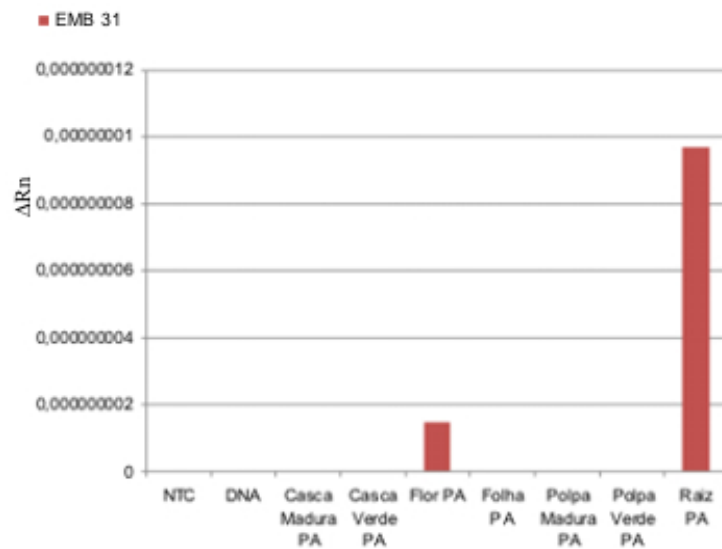


FIGURA 14C Análise da amplificação por qPCR do *primer* EMB 31.

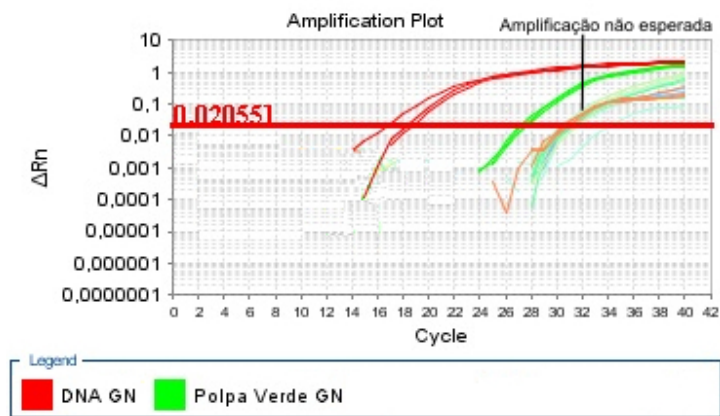


FIGURA 15A Gráfico de amplificação mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 33.

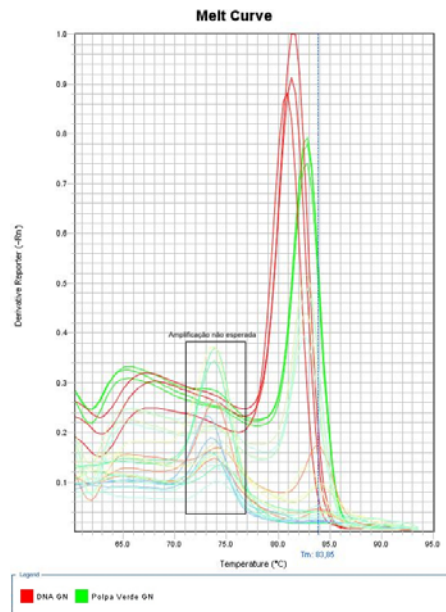


FIGURA 15B Curva de *melting* do *primer* EMB 33.

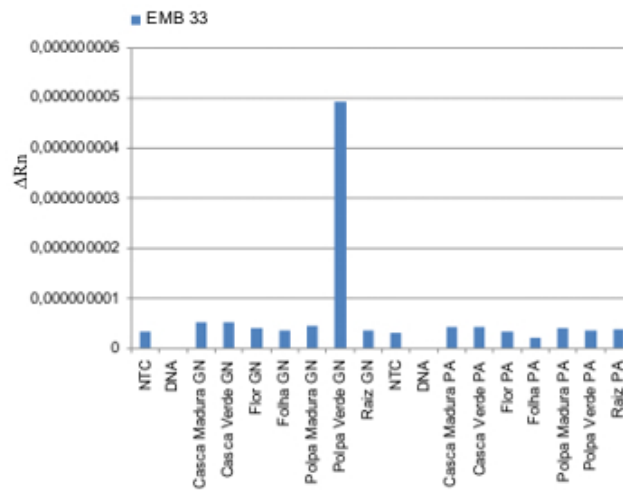


FIGURA 15C Análise da amplificação por qPCR do *primer* EMB 33.

5 CONCLUSÕES

Em função do tempo de execução e dos reagentes específicos que eliminam a interferência dos compostos polifenólicos e polissacarídicos, o método do CTABr é o mais indicado para extração de RNA de tecidos de banana, ricos nestes compostos.

Apesar de não ter sido quantificada a expressão diferencial dos tecidos testados, os dados entre RT-PCR e PCR em tempo real foram consistentes e permitiram confirmar a expressão diferencial de 4 promotores, 2 dos quais foram tecido-específicos.

Os promotores tecido-específicos são muito úteis no emprego da prática da cisgenia, uma nova tecnologia que embora baseada nos mesmos processos da transgenia, não utiliza genes estranhos ao organismo em questão e sim os genes da própria espécie.

Destes promotores, talvez o que seja mais interessante para futuros programas de melhoramento envolvendo transgenia seja o promotor da cisteíno peptidase (EMB 33), que se mostrou ativo de modo temporal em fases pré-consumo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. J. A. **Cultura da banana**: aspectos técnicos socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: Embrapa/CNPMPF, 1997.
- ANDRIOLI, A. I. Agricultura Familiar e Sustentabilidade Ambiental. **Revista Espaço Acadêmico**, Maringá, n 89, out. 2008. Disponível em: <<http://www.espacoacademico.com.br/089/89andrioli.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2010.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 408, n. 6814, p. 796-815. Dec. 2000.
- ARAGÃO, F. J. L. **Organismos transgênicos**: explicando e discutindo a tecnologia. Barueri: Manole, 2003. 115p.
- ARRILLAGA, I.; GIL-MASCARELL, R.; GISBERT, C. E. SALES; MONTESINOS C.; SERRANO R.; MORENO V. Expression of the yeast *HAL2* gene in tomato increases the in vitro salt tolerance of transgenic progenies. **Plant Science**, Limerick, v. 136, n. 2, p. 219-226, Sept. 1998.
- BARRETT, A.; RAWLINGS N.; WOESSNER J. (Ed.). **Handbook of proteolytic enzymes**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2003. CD-ROM.
- BECKER, D. K.; DUGDALE, B.; SMITH M. K.; HARDING R. M.; DALE J. L. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv 'Grand Nain' via microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, n. 3, p. 229-234, Jan. 2000.
- BI, R. M.; JIA, H. Y.; FENG, D. S.; WANG, H. G. Production and analysis of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) with improved insect resistance by the introduction of cowpea trypsin inhibitor gene. **Euphytica**, Wageningen, v. 151, n. 3, p. 351-360, Oct. 2006.
- BIRTIC, S.; KRANNER, I. Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharide- and lipid-rich seeds. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 17, n. 3, p. 144-148, May 2006.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 519-46, June 2003.

- BORÉM, A. **Escape gênico e transgênicos**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 206p.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 22 ed. Viçosa, MG: UFV, 1998. 453 p.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **O Cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.
- BOTANICAL CLASSIFICATION OF MAGNOLIOPSIDA (DICOTYLEDON)
Disponível em: <<http://www.f-lohmueller.de/botany/Cronquist/Cronquist0.htm>>. Acesso em: 13 dez. 2009.
- BUTLER, J. E. F.; KADONGA, J. T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 16, n. 20, p. 2583-2592, Oct. 2002.
- CANDEIAS, J. A. N. A engenharia genética. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 3-10, fev. 1991.
- CARJAVAL, S. B.; SALAZAR, M. C. A.; CAYÓN, S. G.; LOZADA, Z. J. E.; CASTILLO, L. E.; VALENCIA, M. J. A. Manejo de Plantaciones. In: BELALCÁZAR, S.; TORO, J.; JARAMILLO, R. (ED). **El cultivo del plátano en el tropico**. Colômbia: INIBAP/ICA/CDCT/ CIID, 1991. p.149-242. (Manual de Asistencia Tecnica, 50).
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 11, n. 2, p.113-116, June 1993.
- CHEN, X.; WANG, Z.; WANG, J.; WANG, M.; ZHAO, L.; WANG, G. Isolation and characterization of Brittle2 promoter from Zea Mays and its comparison with Ze19 promoter in transgenic tobacco plants. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.88, n. 1, p. 11-20, Jan. 2007.
- CORDEIRO, Z. J. M. **Sistema de Produção de banana para o Estado do Pará**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. (Sistema de produção, 9). Disponível em < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaPara/doencas.htm>>. Acesso em: 5 abr. 2010.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Expressão da Resistência de Variedades de Banana à Sigatoka Amarela. **Fitopatologia Brasília**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 532-534, set./out 2005.

COSTA, J. N. M. **Sistema de produção para a cultura da banana no Estado de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa, 2007.

COUTINHO FILHO, U. **Noções de engenharia genética**. Uberlândia: UFU, 2006. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/nocoos-de-engenharia-genetica-pdf-a17532.html>>. Acesso em: 13 mar. 2010.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S.S. Classificação botânica, origem e evolução. **Banana para exportação: aspectos técnicos da produção**. 2.ed. Brasília: Embrapa/SPI, 1997. p. 9-12. (Publicações Técnicas Frupex , 18).

DARDICK, C. D.; CALLAHAN, A. M.; CHIOZZOTTO, R.; SCHAFFER, R. J.; PIAGNANI, M. C.; SCORZA, R. Stone formation in peach fruit exhibits spatial coordination of the lignin and flavonoid pathways and similarity to Arabidopsis dehiscence. **BMC Biomedical Chromatology**, Chinchester, v. 8, n. 13, p. 1-17, Feb. 2010.

DARDICK, C. D.; CALLAHAN, A.M.; CHIOZZOTTO, R.; SCHAFFER, R. J.; PIAGNANI, M. C.; SCORZA, R. Stone formation in peach fruit exhibits spatial coordination of the lignin and flavonoid pathways and similarity to Arabidopsis dehiscence. **BMC Biomedical chromatology**, Chinchester, v. 9, p. 8-13, Feb. 2010.

DICKMAN, M. B.; Can Model Plants Help banana improvement through biotechnology? **Infomusa**, Montpellier, v. 13, n.2, p. 8-11, 2004. Disponível em: <http://musalit.inibap.org/pdf/IN040529_en.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Impacto ambiental das atividades agrícolas**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/espec.html>>. Acesso em: 13 mar. 2010.

FEKLISTOV, A.; BARINOVA, N.; SEVOSTYANOVA, A.; HEYDUK, E. BASS, I.; VVEDES NKAYA, I.; KUZNEDELOV, K.; MERKIENE, E.; STAVROVSKAYA, E.; KLIMASAUSKAS, S.; NIKIFOROV, V.; HEYDUK, T.; SEVERINOV, K.; KULBACHINSKIY, A. A Basal Promoter Element Recognized by Free RNA Polymerase s Subunit Determines Promoter Recognition by RNA Polymerase Holoenzyme. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 23, n. 1, p. 97-107, July 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rome, 2010. Disponível em: < <http://www.fao.org/>>. Acesso em: 11 jan. 2010.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: <www.fapesp.br>. Acesso em: 15 dez. 2009.

GAMBINO, G.; IRENE PERRONE, I.; GRIBAUDO, I. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. **Phytochemical Analysis**, v. 19, n. 6, p. 520-525, May 2008.

GRANATO, L. **A cultura da Bananeira**. São Paulo: Pocai Waiss, 1913.76p.

GRANELL, A.; CERCÓS, M.; CARBONELL, J. Plant cysteine proteinases in germination and senescence. In: BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, F. J. (Ed.). **Handbook of proteolytic enzymes**. 2. ed. London: Elsevier, 2003. p. 578-583

GREEN, J.; VAIN, P.; FEARNEHOUGH, M.T.; WORLAND, B.; SNAPE, J.W.; ATKINSON, H. J. Analysis of the expression patterns of the Arabidopsis thaliana tubulin-1 and Zea mays ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 4, p. 197-205, Apr. 2002.

GRIFFITHS, A.J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W. M. **Introduction to genetic analysis**. 9. ed. New York: W. H. Freeman, 2008. 838 p.

GUERRA, M. P. **Tópicos sobre a cultura da bananeira**. Florianópolis: UFSC, 2006. Apostila. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Banana3.pdf>>. Acesso em: 7 set. 2009.

HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 1, p. 197-300, Oct. 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 3 mar. 2010.

JAAKOLA, L.; PIRTTILA, A.M.; HALONEN, M.; HOHTOLA, A. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. **Molecular Biotechnology**, Washington, v. 19, n. 2, p. 201-203, Oct. 2001.

JUNPING, Z.; JING, S.; WEIXIN, C. An effective method for high-quality RNA Isolation from banana fruit. **Plant Molecular Breeding Report**, Dodrecht, v. 4, n. 1, p. 143-146, 2006.

KAZAN, K.; GOULTER, K. C.; WAY, H. M.; MANNERS, J. M. Expressions of a pathogenesisrelated peroxidase of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco and canola and its effect on disease development. **Plant Science**, Limerick, v.136, n. 2, p. 207-217, Sept. 1998.

KAZAN, K.; MURRA, Y. F.; GOULTER, K.; LLEWELLYN, D.; MANNERS, J. Induction of cell death in transgenic plants expressing a fungal glucose oxidase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, n. 6, p. 555-562, Nov./Dec. 1998.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 706p.

LARSEN, N. I. ; ENGELBRECHT, J. ; BRUNAK, S. Analysis of eukaryotic promoter sequences reveal a systematically occurring CT-signal. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n. 7, p. 1223-1230, 1995.

LICHTEMBERG, L. A. Colheita e pós-colheita da banana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p. 73-90, jan./fev. 1999.

LIM, C. Y. ; SANTOSO, B. ; BOULAY, T. ; DONG, E. ; OHLER, W. ; KADONAGA, J. T. The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 18, n. 13, p. 1606-1617, July 2004.

LIU, J. J.; GOH, C. J.; LOH, C. S.; LIU, P.; PUA, E. C. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 16, n. 1, p. 1-6, Jan. 1998.

LOESECKE, H. W. V. **Bananas**. New York: Interscience, 1950. 189p.

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for isolation of RNA from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 163, n. 1, p. 16-20, May 1987.

LOHMUELLER, F. A. **The Botanical System of the Plants: The Botanical Classification of Magnoliopsida (Dicotyledon) by Cronquist.** Abteilungen: Übersicht Pflanzen, 1981. Disponível em: < <http://www.lohmueller.business.t-online.de/botany/Cronquist/Cronquist0.htm>>. Acesso em: 22 jan. 2010.

MACKINTOSH, C. A.; LEWIS, J.; RADMER, L. E.; SHIN, S.; HEINEN, S. J.; SMITH, L. A.; WYCKOFF, M. N.; DILL-MACKY, R.; EVANS, C. K.; KRAVCHENKO, S.; BALDRIDGE, G. D.; ZEYEN, R. J.; MUEHLBAUER, G. J. Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium head blight. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, n. 4, p.479-488, Apr. 2007.

MANICA, I. **Bananas: do plantio ao amadurecimento.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 1998. 98p.

MANNING, K. Isolation of nucleic acid from plants by differential solvent precipitation. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 195, n. 1, p. 45-50, May 1991.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia de plantas.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333p.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 192, n. 1, p. 1-15, July 2002.

MAY, G. D.; AFZA, R.; MASON, H. S.; WIECKO, A.; NOVAK, F. J.; ARNTZEN, C. J. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*: mediated transformation. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 13, n. 5, p. 486-492, May 1995.

MEIYALAGHAN, S.; JACOBS, J. M. E.; BUTLER, R. C.; WRATTEN, S. D.; CONNER, A. J. Transgenic potato lines expressing *cry1Ba1* or *cry1Ca5* genes are resistant to potato tuber moth. **Potato Research**, Wageningen, v. 49, n. 3, p. 203-216, Oct. 2006.

MÉNARD, R.; STORER, A. C. Papain. In: BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, F. J. (Ed.). **Handbook of proteolytic enzymes.** London: Academic Press, 1998. p. 555-557

MOREIRA, R. S. **Banana: teoria e prática de cultivo**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 332p.

NEUTEBOOM, L.W., KUNIMITSU, W.Y., WEBB, D., CHRISTOPHER, D.A. Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Science**, Limerick, v. 163, n. 5, p. 1021-1035, Nov. 2002.

NOGUEIRA, E. M. C. **Moko ou murcha bacteriana da bananeira**. São Paulo: Instituto Biológico, Centro de pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade. 2005. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/XIII%20RIFIB/nogueira.pdf>>. Acesso em: 20 mar.2010.

PHILLIPS, R. B. **Taxonomy of flowering plants**. Washington: Colby, 1995. Disponível em: <<http://www.colby.edu/info.tech/BI211/Families.html>>. Acesso em: 19 jan. 2010.

PIERCE, B. A. **Genética: um enfoque conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 758p.

RAGA, A. **Principais pragas da bananeira e métodos de controle**. São Paulo: Instituto Biológico, Centro de pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade. 2005. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/XIII%20RIFIB/raga.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2010.

RANCÉ, I.; NORRE, F.; GRUBER, V. THEISEN, M. Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. **Plant Science**, Limerick, v. 162, n. 5, p. 833-842, May 2002.

RANGEL, A. **Cultura da banana**. Campinas: CATI, 2002. 91 p. (Boletim Técnico, 234)

ROGERS, L. A.; DUBOS, C.; CULLIS, I. F.; SURMAN, C.; POOLE, M. WILLMENT, J.; MANSFIELD, S. D.; CAMPBELL, M. M. Light the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 416, p. 1651-63, June 2005.

RUBIO-PIÑA, C.; VAZQUEZ-FLOTA, D. Isolation of functional total RNA from *Argemone mexicana* tissues. **Plant Biotechnology**, Santiago, v. 11, n. 4, p. 1-5, Oct. 2008.

SÁGI, L.; REMY, S.; SWENNEN, R. **Genetic transformation for the improvement of bananas**: a critical assessment. Montpellier: INIBAP, 1998. Disponível em < http://bananas.bioversityinternational.org/files/files/pdf/publications/focusen_genetictransformation.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2010.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; MORAIS, L. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, F. V. D.; KOBAYASHI, A. K.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT - BANANICULTURA: UM NEGÓCIO SUSTENTÁVEL, 27., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: ACORBAT, 2006. v. 1, p. 10-23.

SHAHMURADOV, I. A.; GAMMERMAN, A. J.; HANCOCK, J. M.; BRAMLEY, P. M.; SOLOVYEV, V. V. PlantProm: a database of plant promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 1, p. 114-117, Jan. 2003.

SHEN, Y. G.; DU, B. X.; ZHANG, W. K.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. *AhCMO*, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 6/7, p. 815-821, Nov. 2002.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Melhoramento genético da bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 196, p.11-19, jan./fev. 1986.

SILVA, S. O. Cultivares de Banana para exportação. In: ALVES, E. J.; DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S. S.; SILVA, S. O.; OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, L. S.; CINTRA, F. F. D.; BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G.; OLIVEIRA, S. L.; FRANCELLI, M.; CORDEIRO, Z. J. M.; SOUZA, J. S. **Banana para exportação**: aspectos técnicos da produção. Cruz das Almas: MAARA/SDR/BA/EMBRAPA/SPI, 1995. p. 13-18. (Frupeex. Publicações Técnicas, 18) Disponível em: < http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2899.pdf>. Acesso em: 15 set. 2009.

SILVA, S. O.; BORGES, A. L.; CALAFANGE, P. L. PASSOS, A. R.; ALVARADO, L. B.; BOHORQUEZ, N. C. **Processamento de banana**: pratos doces e salgados e bebidas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/receitas/Receitas%20de%20banana.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2010.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. Piracicaba: Ceres, 1971. 418p.

SIMMONDS, N. W. **The evolution of the bananas**. Londres: Longman, 1962. 165p.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origin of the cultivated bananas. **The Botany Journal of Linnean Society of London**, London, v. 55. n. 359, p. 302-312, 1955.

SMALE, S. T. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 19, p. 2503-2508, Oct. 2001.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Principles of genetics**. 4. ed. Hoboken: J. Wiley, 2006. 866p.

SOUZA JÚNIOR, T. S.; SANTOS, C. M. R.; MARTINS, N. F.; SILVA, F. R.; TOGAWA, R. C.; CASSIANO, L. P.; ALMEIDA, E. R. P.; COELHO, M. C. F.; CAETANO, A. R.; CIAMPI, A. Y.; PIFFANELLI, P.; MILLER, R. N. G.; **Transcriptoma de musa acuminata no DataMusa**. Brasília: Embrapa, 2005 (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

SOUZA, S. A. C. D. **Avaliação da variabilidade genética em musa spp. Utilizando marcadores microssatélites**. 2002. 99p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

STEVENS, P. F. (2001 onwards) **Angiosperm Phylogeny Website**: version 9. St Louis: University of Missouri, 2008. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 20 fev. 2010.

SU, H. J.; HWANG, S. C.; KO, W. H. Fusarial wilt of cavendish bananas in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 9, p. 814-818, Sept. 1986.

SUN, E. J.; SU, H. J.; KO, W. H. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 from soil or host tissue by cultural characters. **Phytopathology** Saint Paul, v. 68, n. 11, p. 1672-1673, Apr. 1978.

TEIXEIRA, M. A. **Resistência de genótipos de bananeira a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e variabilidade genética com base em marcadores moleculares RAPD**. 2007. 82p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia vegetal**. Brasília: Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, 2000. 128p.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C.; MENEZES, A. J. E. A. *Pyricularia Grisea* causando lesões necróticas em folhas de bananeira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 322, maio/jun. 2002.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. National Agricultural Library. **Bananas, raw**. Beltsville, 2010. Disponível em: <<http://desearch.nal.usda.gov/cgi-bin/dexpldcgi?qry1956410581;31>>. Acesso em: 24 fev. 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. National Agricultural Library. Plantains, raw. Beltsville, 2010. Disponível em: <<http://desearch.nal.usda.gov/cgi-bin/dexpldcgi?qry1801157006;3>>. Acesso em: 24 fev. 2010.

WATSON, J. D.; BAKER, T.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Biologia molecular do gene**. 5. ed. Porto Alegre : Artmed, 2006. 728 p.

YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G. K. S.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J.; SUN, J.; TANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, X.; LIN, W.; YE, C.; TONG, W.; CONG, L.; GENG, J.; HAN, Y.; LI, L.; LI, W.; HU, G.; HUANG, X.; LI, W.; LI, J.; LIU, Z.; LI, L.; LIU, J.; QI, Q.; LIU, J.; LI, L.; LI, T.; WANG, X.; LU, H.; WU, T.; ZHU, M.; NI, P.; HAN, H.; DONG, W.; REN, X.; FENG, X.; CUI, P.; LI, X.; WANG, H.; XU, X.; ZHAI, W.; XU, Z.; ZHANG, J.; HE, S.; ZHANG, J.; XU, J.; ZHANG, K.; ZHENG, X.; DONG, J.; ZENG, W.; TAO, L.; YE, J.; TAN, J.; REN, X.; CHEN, X.; HE, J.; LIU, D.; TIAN, W.; TIAN, C.; XIA, H.; BAO, Q.; LI, G.; GAO, H.; CAO, T.; WANG, J.; ZHAO, W.; LI, P.; CHEN, W.; WANG, X.; ZHANG, Y.; HU, J.; WANG, J.; LIU, S.; YANG, J.; ZHANG, G.; XIONG, R.; LI, Z.; MAO, L.; ZHOU, C.; ZHU, Z.; CHEN, R.; HAO, B.; ZHENG, W.; CHEN, S.; GUO, W.; LI, G.; LIU, S.; TAO, M.; WANG, J.; ZHU, L.; YUAN, L.; YANG, H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 79-92, Apr. 2002.

ZHENG, Z., MURAI, N. A distal promoter regions of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. **Plant Science**, Limerick, v. 128, n. 1, p. 59-65, Jan. 1997.