



**LUCIENE DE OLIVEIRA RIBEIRO**

**ANÁLISE DE GENES ASSOCIADOS A REGIÕES  
PROMOTORAS DE EXPRESSÃO DE CARÁTER  
TECIDO-ESPECÍFICO EM BANANEIRAS (*Musa*  
spp.)**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**LUCIENE DE OLIVEIRA RIBEIRO**

**ANÁLISE DE GENES ASSOCIADOS A REGIÕES  
PROMOTORAS DE EXPRESSÃO DE CARÁTER TECIDO-  
ESPECÍFICO EM BANANEIRAS (*Musa spp.*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador  
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Co-orientador  
Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

**LAVRAS - MG**

**2011**

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

Ribeiro, Luciene de Oliveira.

Análise de genes associados a regiões promotoras de expressão de caráter tecido-específico em bananeiras (*Musa spp*) / Luciene de Oliveira Ribeiro. – Lavras : UFLA, 2011.

66 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Promotores. 2. Expressão tecido-específica. 3. RT-PCR. 4. qPCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.7723

**LUCIENE DE OLIVEIRA RIBEIRO**

**ANÁLISE DE GENES ASSOCIADOS A REGIÕES  
PROMOTORAS DE EXPRESSÃO DE CARÁTER TECIDO-  
ESPECÍFICO EM BANANEIRAS (*Musa spp.*)**

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

APROVADA em 18 de julho de 2011.

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz                      EMBRAPA

Dra. Patrícia do Nascimento Bordallo                      EMBRAPA

Dr. Luciano Vilela Paiva  
UFLA  
(Orientador)

**LAVRAS - MG**

**2011**

*“E agora, eis o que diz o Senhor, aquele que te criou Jacó, e te formou, Israel: Nada temas, pois eu te RESGATO, eu te chamo pelo nome, és meu. Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo. E os rios não te submergirão; se caminhares pelo fogo, não te queimarás, e a chama não te consumirá. Pois eu sou o Senhor, teu Deus, o Santo de Israel, teu Salvador. Dou o Egito por teu RESGATE, a Etiópia e Sabá em compensação.” (Is 43, 1-3)*

A Deus, que cumpre suas promessas!

Aos meus pais, João Batista Ribeiro e Maria Nilcéia Oliveira Ribeiro, pelo amor incondicional, sem o qual jamais teria conseguido chegar até aqui.

**OFEREÇO.**

Ao Deiverson, por ser paciente e me mostrar que o amor tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha alegria e meu refúgio! Meu tudo! Gratidão!

Aos meus pais, João e Nilcéia, minha irmã Flaviane e familiares pelo amor e encorajamento.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG pelos recursos utilizados na condução dos experimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, pela oportunidade, paciência, ensinamentos e infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz pela co-orientação e confiança depositada.

A Dr<sup>a</sup> Patrícia Bordallo pelo suporte e disponibilidade.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Unidades Tabuleiros Costeiros (Aracajú - SE) e Agroindústria Tropical (Fortaleza- CE).

Ao Prof. Dr. Sandro Barbosa e Lenise pela amizade, apoio e direção dada, sem a qual nada seria possível.

Ao Prof. Dr. Breno Régis dos Santos pelos conselhos, amizade e companheirismo.

Ao amigo Luiz Gustavo, um agradecimento especial por todo suporte, amizade, aprendizado e paciência.

A todos do LCBM e LFMP, especialmente ao Horllys, Solange, Evânia, Flávia, Luana, Heliete, Anderson, José Renato, Gabriel, Marlúcia, Tânia, Ingrid, Manu, Dani, Samuel, André, Cris, Rafael, Fabrício, Marcelo Murad, Kalynka, Felipe, Daiane, Jéssica, Eula e Douglas pela ajuda e companheirismo.

Aos amigos do Grupo Missão Resgate pelas orações constantes, em especial à Danusa, Camila, Sílvia, Manu, Héllisson, Andréa, Breno, João Vítor, Aline, Cris, Rafa, Mateus, Bruno Bressani. Amo vocês.

Às amigas da república Biobergue, Thaís, Marinês e Flávia pela paciência e incentivo.

Aos amigos e familiares de Ilicínea, Alfenas e Lavras, em especial aos amigos de graduação, GOUs, PUCA, MR, Biogen e Setor de Fisiologia Vegetal.

Ao Deiverson por todo amor, cuidado, carinho, paciência, orações e incentivo. Amo-te!

***AGRADEÇO.***

## RESUMO

A bananeira é uma espécie pertencente à família Musaceae típica de regiões tropicais e subtropicais, que apresenta grande importância econômica e social no mundo, uma vez que constitui fonte de renda e alimento para milhões de pessoas. O cultivo da bananeira é afetado por diversos problemas causados por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos, além de estresses abióticos. Uma das estratégias para a solução desses problemas é a geração de novas variedades com resistência a doenças e pragas e mais tolerantes às adversidades climáticas. Isto se dá mediante o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, baseados em métodos convencionais ou biotecnológicos, que possibilitam a obtenção de genótipos superiores. Neste contexto, o emprego de técnicas de engenharia genética como a caracterização de promotores tecido-específicos favorece a aplicação de técnicas mais refinadas de manipulação do genoma como a cisgenia, a qual visa o manejo dos genes da própria espécie em questão. No presente trabalho, foram utilizadas sequências gênicas com potencial para expressão tecido-específica previamente selecionadas em um *virtual screening* realizado no banco de dados *DATAmusa*. A partir destas sequências foram desenhados *primers* que posteriormente foram submetidos a análise qualitativa (RT-PCR) e quantitativa (qPCR) em sete tecidos diferentes (Polpa verde, Polpa madura, Casca verde, Casca madura, Folha, Flor e Raiz) de duas cultivares de bananeira (Prata Anã e Grande Naine), pertencentes a grupos genéticos distintos (AAB e AAA, respectivamente). Dos 23 genes previamente selecionados, foi possível identificar após análise qualitativa, seis genes que apresentaram expressão tecido-específica. Estes foram avaliados quantitativamente (qPCR) e ao final foi possível identificar um gene tecido-específico para raiz de Prata Anã. Desta forma, identificando a sequência gênica deduz-se a presença do promotor tecido-específico.

Palavras-chaves: *Musa* spp., promotores tecido-específicos, RT-PCR, qPCR.

## ABSTRACT

The banana tree is a species of the family Musaceae typical of tropical and subtropical regions, which has an economic and social importance to the world, as a source of income and food for millions of people. The cultivation of bananas is affected by various problems caused by fungi, bacteria, viruses, nematodes and insects, and abiotic stresses. One of the strategies for solving these problems is the generation of new varieties with resistance to diseases and pests and more tolerant to adverse weather. This is done through the development of breeding programs based on conventional or biotechnological methods, which enable the achievement of superior genotypes. In this context, the use of genetic engineering techniques such as characterization of tissue-specific promoters favors the application of more refined techniques of manipulation of the genome as cisgenia, which aims at the management of the genes of their own species. In this study, we used gene sequences with potential for tissue-specific expression in a previously selected virtual screening performed in the database DATAmusa. From these sequences were designed primers that were subsequently subjected to qualitative analysis (RT-PCR) and quantitative (qPCR) in seven different tissues (Green pulp, Pulp ripe, Green bark, Mature bark, Leaves, Flowers and Root) of two cultivars banana (Prata Anã and Grande Naine), belonging to different genetic groups (AAA and AAB, respectively). From the 23 genes previously selected, it was possible to identify after the qualitative analysis, six genes that showed tissue-specific expression. They were evaluated quantitatively (qPCR) and in the end it was possible to identify a gene tissue-specific root Prata Anã. Thus, identifying the gene sequence we can deduce the presence of tissue-specific promoter.

Keywords: *Musa* spp., tissue-specific promoters, RT-PCR, qPCR.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Classificação taxonômica.....	12
2.2	Cultivares em estudo.....	12
2.2.1	Prata Anã.....	13
2.2.2	Grande Naine.....	14
2.3	Importância econômica e aspectos nutricionais da banana..	14
2.4	Doenças que incidem na bananicultura.....	15
2.4.1	Sigatoka Amarela.....	16
2.4.2	Sigatoka Negra.....	17
2.4.3	Mal do Panamá.....	17
2.4.4	Moko (Murcha bacteriana).....	18
2.4.5	Outros problemas.....	19
2.5	Melhoramento genético.....	20
2.6	Regiões promotoras de expressão gênica em plantas.....	22
2.7	PCR qualitativa (RT-PCR) e quantitativa (qPCR).....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Material botânico.....	27
3.2	Extração de DNA.....	27
3.3	Extração de RNA.....	28
3.4	Tratamento com DNase e PCR <i>Housekeeping genes</i> .....	29
3.5	Integridade e quantificação das amostras de RNA.....	31
3.6	Síntese de cDNA.....	32
3.7	Validação dos cDNA's obtidos.....	32
3.8	Seleção de genes de caráter tecido-específico (RT-PCR).....	33
3.9	qPCR (PCR quantitativo) .....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5	CONCLUSÃO.....	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## 1 INTRODUÇÃO

A bananeira (Musaceae) é uma planta herbácea, típica de regiões tropicais e apresenta grande importância econômica e social no mundo, constituindo fonte de renda e alimento para milhões de pessoas principalmente nos países em desenvolvimento.

No Brasil, a bananicultura é uma importante atividade agrícola, ocupando o segundo lugar em volume de frutas produzidas no país e a terceira posição em área colhida, sendo o estado da Bahia o maior produtor, seguido por São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais. Esta cultura é fácil de ser cultivada durante todo o ano, inclusive por pequenos produtores em solos e climas diferentes, além de contribuir para manter a fertilidade do solo. A maior parte da produção no Brasil é direcionada para o mercado interno, onde também representa um componente importante da dieta de comunidades mais pobres, oferecendo uma fonte de vitaminas e minerais.

Diversas cultivares de *Musa* spp. são atacadas por pragas e doenças como fungos, vírus, bactérias, insetos e nematóides. Fatores abióticos como seca e baixas temperaturas também comprometem a produção desta cultura. Assim, pesquisas vem sendo desenvolvidas visando à obtenção de cultivares resistentes e tolerantes a estas adversidades.

Os trabalhos de melhoramento convencional com bananeira são muito dispendiosos e demorados uma vez que a maioria das cultivares que abrangem as espécies comestíveis possui grande porte, alta poliploidia, pequena variabilidade genética, alta esterilidade (produção de frutos paternocárpicos) e, além disso, necessitam de grandes áreas para a realização dos trabalhos de campo.

Assim, técnicas biotecnológicas vêm sendo utilizadas nos programas de melhoramento da bananeira, visando à obtenção de novas variedades com

resistência a pragas e doenças e mais tolerantes às adversidades ambientais. Dentre as perspectivas atuais da engenharia genética destacam-se a identificação e caracterização de genes de interesse agrônômico e seus promotores tecido-específicos, possibilitando níveis de expressão do transgene somente nos tecidos desejados. Isso contribui para práticas de cisgenia (manipulação do próprio genoma do organismo em estudo) e, conseqüentemente, uma melhor aceitação comercial da engenharia genética, diminuindo questionamentos de biossegurança, além de prevenir a expressão gênica generalizada e contínua na planta.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar sequências gênicas potencialmente promotoras de caráter tecido-específico em duas cultivares de bananeira, utilizando análise qualitativa (RT-PCR) e quantitativa (qPCR).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Classificação taxonômica

As bananeiras são plantas pertencentes à classe Liliopsida, subclasse Zingiberidae, superordem Lilianae, ordem Zingiberales e família Musaceae a qual é dividida em três subfamílias: Heliconoideae, Strelitzoideae e Musoideae. Os gêneros Ensete e Musa pertencem à subfamília Musoideae, sendo que ao gênero Musa pertencem as bananeiras com frutos comestíveis. O gênero Musa está subdividido nas seções Australimusa, Callimusa, Rhodoclamys e Eumusa (BELALCÁZAR CARVAJAL, 1991; CRONQUIST, 1981).

A classificação taxonômica da bananeira é baseada na existência de duas espécies selvagens, *Musa acuminata* Colla (genoma A) e *Musa balbisiana* Colla (genoma B). Os estudos de Simmonds & Shepherd (1955) levaram à constatação de grupos genômicos diplóides (AA e AB), triplóides (AAA, AAB e ABB) e tetraplóides (AAAA, AAAB, AABB e ABBB), sendo esta classificação adotada em todo o mundo.

### 2.2 Cultivares em estudo

Além dos grupos genômicos, foi estabelecido o uso do termo subgrupo para denominar um complexo de cultivares provenientes de mutações de um único cultivar original, como nos casos dos grupos AAA (subgrupo Cavendish) e AAB (subgrupos Prata e Terra). A maioria dos cultivares comerciais são triplóides provenientes do grupo genômico AAA, sendo neste caso considerados *M. acuminata*. Também podem ser AAB e ABB, possuindo uma composição genômica mista. Apenas um pequeno grupo de cultivares é diplóide (AA) ou tetraplóide (AAAB) (EMEDIATO, 2009).

O grande número de cultivares existente vem da necessidade de suprir diferentes expectativas, tanto do ponto de vista comercial, quanto de sua

palatabilidade, textura, aparência, assim como as necessidades agrônômicas, como resistência a fatores bióticos e abióticos.

As bananeiras que fornecem frutos para alimentação são de cultivares triplóides, provenientes de cruzamentos interespecíficos de *M. acuminata* e *M. balbisiana* dos subgrupos Prata (AAB) e Cavendish (AAA) (ALVES, 1997; RANGEL, 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).

### **2.2.1 Prata Anã**

Esta cultivar apresenta frutos semelhantes aos de 'Prata' quanto à forma, tamanho, sabor e resistência ao transporte, com boa duração na prateleira e excelente aceitabilidade comercial, além de algumas vantagens em relação à 'Prata', como: menor altura da planta e maior produtividade, além de possuir porte médio (a alto), coração grande com brácteas resistentes e frutos pequenos. Embora de porte médio, produz muitas folhas de grande tamanho e normalmente apresenta filhos de porte igual ou superior à planta-mãe, o que causa grande sombreamento e exige menores densidades de plantio do que outras cultivares de porte equivalente (LICHTEMBERG et al., 1999).

É altamente susceptível a doenças como Sigatoka Negra, Sigatoka Amarela e Mal-do-Panamá, com perdas que podem variar de 70% a 100% da produção (ALVES, 1997). Apesar desta susceptibilidade a doenças, são tolerantes ao frio, apresentam altura entre 2-3,5m e um pseudocaule forte com aproximadamente 50cm de diâmetro, o que possibilita seu cultivo em regiões de muito vento. Com um bom potencial de produtividade em áreas irrigadas, produz cachos de 7,83 a 19,8 kg e uma média de 100 frutos por cacho, gerando

uma produção anual por hectare de 30 a 35 toneladas (MANICA, 1998; RANGEL, 2002).

### **2.2.2 Grande Naine**

As cultivares do subgrupo Cavendish são mais consumidas no Sudeste e no Sul do Brasil e usadas para exportação. Ao contrário da cv. Prata Anã apresenta porte médio a baixo, pouco menor que a 'nanição', com altura variando de 2-3 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 (DONATO et al., 2003; SILVA et al., 2006). Sob condições ideais de cultivo, apresenta alta produtividade, podendo atingir uma produção entre 50 e 60 t/ha/ciclo.

Contudo, esta cultivar apresenta instabilidade genômica, sendo também uma cultivar menos resistente a doenças do que outras cultivares do mesmo subgrupo, tais como a nanica e a nanição. Mesmo sendo resistente à doença conhecida como Mal do Panamá, uma das principais desvantagens agrônômicas desta variedade é justamente sua suscetibilidade às Sigatocas Amarela e Negra (ALVES, 1997; MANICA, 1998; RANGEL, 2002).

## **2.3 Importância econômica e aspectos nutricionais da banana**

De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), os principais países produtores de banana são Índia, Filipinas, China, Equador e Brasil. No Brasil, a fruta tem grande importância econômica e social, já que o país conta com uma produção de mais de 7 milhões de toneladas por ano (AGRIANUAL, 2011; FAOstat, 2011). Além de garantir ao país o quinto lugar no ranking dos maiores produtores mundiais, esta fruta é também fundamental para a complementação da dieta alimentar das populações de baixa renda.

A bananicultura brasileira se estende de Norte a Sul do Brasil, sendo o Nordeste a principal região produtora. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, os principais produtores da fruta em 2010 foram os estados da Bahia (1.425.947 t), São Paulo (1.243.222 t), Santa Catarina (655.636 t) e Minas Gerais (654.861 t) (AGRIANUAL, 2011).

Os seus atrativos comerciais, como alto valor nutritivo, preço acessível, gama de variedades e sabor, fazem com que esta cultura seja considerada a quarta mais importante em países em desenvolvimento, com uma produção mundial de cerca de 100 milhões de toneladas (FAOstat, 2011).

Além disso, o fruto possui alto teor calórico e vitamínico, é rico em carboidratos, proteínas, fibras, fósforo, potássio, cálcio, ferro, cobre, zinco, manganês e cobalto, e apresenta teores consideráveis de vitaminas A e C, riboflavina e tiamina. Devido a estes fatores, a bananeira é uma importante frutífera cujo fruto é incluso na dieta alimentar de diversos países em desenvolvimento e assume grande importância sócioeconômica, sendo um item relevante na balança comercial de muitos países, gerando recursos e empregos (FAOstat, 2009; STOVER & SIMMONDS, 1987).

#### **2.4 Doenças que incidem na bananicultura**

Como qualquer espécie cultivada em grandes áreas, a bananeira está sujeita a várias doenças e pragas. Dentre as doenças mais importantes estão Sigatoka Amarela, Sigatoka Negra e Mal-do-Panamá, todas causadas por fungos, além de outras doenças causadas por nematóides (*Radopholus similis*), vírus (BBTV, BSV e CMV), bactérias (*Ralstonia solanacearum* Smith), coleópteros (*Cosmopolites sordidus*), entre outros (CRONAUER & KRIKORIAN, 1986).

A bananicultura é comprometida basicamente por fatores bióticos, contudo os fatores abióticos também são considerados na obtenção de 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).

A quantidade e a qualidade das frutas são freqüentemente ameaçadas devido aos danos deixados na planta, que, dependendo da intensidade do ataque, pode torná-la improdutiva ou levar até a sua erradicação. Além disso, o controle químico mostra-se, muitas vezes, inadequado tanto do ponto de vista socioeconômico quanto ambiental. Na ausência de variedades melhoradas, o uso de pesticidas torna-se uma das únicas formas de controle cujo custo é elevado e acaba por estar fora do alcance da maioria dos pequenos agricultores, que são então prejudicados com consideráveis perdas na produção (SOUZA, 2002).

#### **2.4.1 Sigatoka Amarela**

A Sigatoka Amarela, também conhecida como Mal-de-Sigatoka ou cercosporiose, é causada pelo fungo *Mycosphaerella musicola* Zimm Leach (ZIMMERMAN, 1902). Dois tipos de esporos estão envolvidos no aparecimento da doença: o esporo sexuado (ascósporo), e o assexuado (conidiósporo). As diferenças de comportamento entre eles podem refletir na epidemiologia da doença, que é fortemente influenciada pelas condições climáticas como temperatura, umidade e pluviosidade elevada (EMEDIATO, 2009).

Os principais sintomas desta doença são a ocorrência de necrose em forma de estrias, que vão se unindo até formar uma mancha, comprometendo totalmente a folha. Nesse estágio, observa-se na parte central da mancha uma coloração cinza, com amarelecimento das bordas. Há estimativas de diminuição de 50% de produtividade e quantidade dos frutos devido à morte prematura de grandes áreas da superfície foliar, reduzindo a capacidade fotossintética da planta. Quando o ataque é severo, os frutos podem não amadurecer adequadamente; ataques menos severos resultam em diminuição do peso dos

cachos, frutos menores, amadurecimento prematuro antes ou depois da colheita, descoloração da polpa, além de alteração no aroma e sabor dos frutos (CORDEIRO et al., 2005; MEREDITH, 1970). Dentre as principais cultivares suscetíveis a este patógeno, estão as bananas conhecidas como Nanica, Nanicão, Prata e Pacovan. Por outro lado, a resistência ao fungo é constatada em plátanos como por exemplo Terra, D'Angola e Figo, assim como em bananas do tipo Mysore, Yangambi e Prata Zulu (TEIXEIRA et al., 1996).

#### **2.4.2 Sigatoka Negra**

A Sigatoka Negra é uma doença fúngica causada por *Mycosphaerella fijiensis* (LEACH, 1964a, b; RHODES, 1964). O fungo ataca a planta pelas folhas e é facilmente disseminado pelo vento, prejudicando principalmente as variedades suscetíveis como Cavendish e Prata (CORDEIRO et al., 2005). Atualmente, é considerada uma das doenças de bananeira de maior importância, principalmente em decorrência da sua rápida propagação e pelos severos danos que causa na produção como o amadurecimento precoce dos frutos, lesões que causam redução da área foliar e perdas de até 100% da produtividade (MOURICHON et al., 1997). Apesar da semelhança sintomatológica entre Sigatoka Negra e Sigatoka Amarela, há várias diferenças que podem ser facilmente observadas. Enquanto na amarela as folhas infectadas apresentam estrias de cor clara na face superior da folha, com lesões de frequência bem mais baixas e bordos regulares de forma elíptica, na negra as estrias são marrons e visíveis na face inferior da folha, com frequência de lesões bem mais alta e, nos estágios finais, estrias com bordos irregulares (FERRARI e NOGUEIRA, 2008).

#### **2.4.3 Mal do Panamá**

O Mal do Panamá ou Murcha de Fusarium é causada por uma das cepas mais destrutivas do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (E.F. Smith)

(SNYDER and HANSEN, 1940). Os sintomas mais comuns são descoloração vascular pardo-avermelhada do pseudocaule de forma periférica, mantendo o centro claro. O nome Murcha de Fusarium se dá pela progressiva murcha das folhas mais velhas para as mais novas, precedido pelo amarelecimento das mesmas (CORDEIRO et al., 2005; FOURIE et al., 2009).

São conhecidas quatro raças fisiológicas do patógeno. Dentre elas, as raças 1, 2 e 4 possuem relevância por incidirem em bananeiras de interesse comercial. O termo raça fisiológica vem sendo utilizado para descrever os patógenos da mesma espécie, morfologicamente semelhantes e com mesma virulência. Patógenos de distintas raças fisiológicas apresentam diferentes níveis de virulência. A raça 1 é mais encontrada incidindo nos cultivares Gros Michel e Prata. A raça 2 infecta bananeiras do subgrupo Figo (Bluggoe), enquanto a raça 3 só foi identificada em cultivares selvagens e em plantas ornamentais. Por outro lado, a raça 4 tem despertado maior atenção em torno da doença, por ser encontrada nos cultivares do subgrupo Cavendish, que inicialmente apresentavam resistência à doença (MOREIRA, 1999).

As principais formas de disseminação da doença são o contato dos sistemas radiculares de plantas saudias com esporos liberados por plantas doentes e, em muitas áreas, pelo uso de material de plantio contaminado. O fungo também é disseminado por água de irrigação, de drenagem, de inundação, assim como pelo homem, animais, entre outros (CORDEIRO et al., 2005).

#### **2.4.4 Moko (Murcha bacteriana)**

A doença denominada Moko ou Murcha bacteriana é causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* Smith, uma espécie complexa e tradicionalmente classificada em cinco “raças” baseadas na diferença de hospedeiros e propriedades bioquímicas (BUDDENHAGEN et al., 1962). O sintoma mais característico do Moko se manifesta por exsudação de pus

bacteriano, descoloração vascular centralizada no pseudocaule, frutos com desidratação da polpa, manchas negras em todo seu interior e murcha das folhas em qualquer fase do ciclo vegetativo (EYRES et al, 2005).

O Moko pode ser disseminado por insetos, através de solos infectados ou pelo contato com a raiz. Entretanto uma das principais formas de disseminação da doença ocorre devido ao mau uso das ferramentas pelos agricultores, que não esterilizam as mesmas entre o corte de cada planta, levando então a uma grande disseminação da doença em áreas de baixa incidência. Estas características, associadas à indisponibilidade de cultivares resistentes e de baixa tecnologia de produção, tornam a doença um problema muito sério para as culturas de banana (MATOS et al., 1996; STOVER, 1972; TAKATSU, 1986).

#### **2.4.5 Outros problemas**

Há um grande número de outras doenças que afetam a produção trazendo prejuízos para o produtor tais como a podridão mole, podridão da coroa, lesão de Johnston, mancha diagonal, pinta de deightoniela, ponta de charuto, antracnose, broca do rizoma, viroses (bunchy top, vírus do mosaico do pepino, vírus das estrias), doenças causadas por nematóides (*Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne* spp.), por insetos (*Cosmopolites sordidus*, *Opogona sacchari*, *Frankliniella* spp., *Chaetanaphothrips* spp., *Pentalonia nigronervosa*, *Opiphanes* spp., *Antichloris* spp., *Trigona spinipes*), entre outras.

Portanto, faz-se necessária a criação de tecnologias que permitam a obtenção de variedades com características agronômicas que atendam as necessidades do campo sem alterar as impostas pelo mercado consumidor a fim de auxiliar os programas de melhoramento da cultura.

## 2.5 Melhoramento genético

Embora a banana seja classificada como a quarta mais importante mercadoria comercializada no mundo, depois do arroz, trigo e milho (HARPER et al., 2002), o melhoramento genético clássico em *Musa* tem sido limitado já que a maioria das cultivares de interesse comercial são triplóides, com diferentes graus de esterilidade e produção de frutos por partenocarpia. O melhoramento foi alcançado com sucesso em algumas variedades do tipo Prata, porém não foi alcançado com a variedade Cavendish (SANTOS-SEREJO et al., 2006; SOUZA JÚNIOR et al., 2005).

A busca de variedades resistentes a estresses bióticos seja mediante a seleção dentro dos recursos genéticos existentes, seja mediante a geração de novas variedades por hibridização, é hoje a principal linha de ação visando o controle de diversas doenças.

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 (BORÉM, 1998; SOUZA JÚNIOR et al., 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 uma das alternativas (BECKER et al, 2000; BI et al., 2006; MAY et al., 1995; MEIYALAGHAN et al., 2006). 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 (BORÉM, 2001; CANDEIAS, 1991; SÁGI et al., 1998). Entretanto, alguns caracteres podem levar anos para serem transferidos.

A introdução via transgenia ou cisgenia (manejo dos genes da própria espécie em questão) de características desejáveis como 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, como superexpressão ou silenciamento gênico, caracterização de promotores, entre outros (CHEN et al., 2007; MACKINTOSH et al., 2007; SHEN et al., 2002).

Muitos destes genes têm sido identificados em projetos onde genomas inteiros foram seqüenciados 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.

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 (RANCÉ et al., 2002).

## 2.6 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).

Shahmuradov et al. (2003) explica que o termo promotor designa uma região da sequência genômica localizada “upstream” (acima) 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, elementos denominados TATA box, CAAT box e região dos GC box a cerca de 30, 100 e 200 pb do TSS, respectivamente. Estas sequências vão determinar o ponto correto para o início da 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, ativadores e silenciadores, além de estímulos endógenos e exógenos que podem agir para ativar ou reprimir a transcrição (BUTLER & KADONGA, 2002; GRIFFITHS et al., 2008; 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 de capacete ou CAP 5'. Sua função é proteger o RNA da ação de fosfatases e nucleases, conferindo maior estabilidade à molécula e também atuar como um facilitador para o reconhecimento desse RNA pelo sistema eucariótico de tradução. Na extremidade 3' é encontrada uma cauda de poli-adeninas (poli-

A) com cerca de 150 a 200 bases e tem como função acentuar a tradução, proteger o mRNA da ação de nucleases, além de contribuir para uma maior estabilidade da molécula. Outra característica do mRNA é o fato dele ser monocistrônico, 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, na sequência denominada promotor proximal encontram-se os principais elementos regulatórios e os sítios específicos de ligação dos fatores de transcrição. 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 é chamada de promotor núcleo que é a porção mínima capaz de dar início à transcrição basal e possui uma extensão de aproximadamente 40 nt, estando 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 pequenos RNAs (FEKLISTOV et al., 2006; LARSEN et al., 1995; LIM et al., 2004; PIERCE, 2004). 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 (GREEN et al., 2002; NEUTEBOOM et al., 2002; ZHENG & MURAI, 1997).

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. Este procedimento faria com que a maquinaria genética não promovesse uma expressão exagerada na planta inteira, a qual pode inclusive comprometer sua produtividade. Além disso, a utilização dos promotores obtidos de uma mesma família da planta poderia levar a uma maior aceitação da população em geral a esta tecnologia, diminuindo alguns questionamentos sobre a biossegurança de plantas geneticamente modificadas.

### **2.7. PCR qualitativa (RT-PCR) e quantitativa (qPCR)**

A reação em cadeia da polimerase (“Polymerase chain reaction”, PCR) é uma técnica de amplificação exponencial de cópias do DNA de interesse. Consiste em um método de síntese enzimática *in vitro* de seqüências específicas de DNA que ocorre em 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Foi descrita inicialmente por Mullis e colaboradores, em 1985, na amplificação do gene b-globina para diagnóstico pré-natal de anemia falciforme (SAIKI et al., 1985; MULLIS and FALOONA, 1987) e desde então tem sido utilizada em vários campos da ciência. A introdução da enzima DNA polimerase (termoestável), obtida da bactéria *Thermus aquaticus*, possibilitou a automação da técnica e a capacidade de amplificar exponencialmente cópias do DNA a partir de pouca quantidade de material (SAIKI et al., 1988). Para a realização da

PCR, existe a necessidade da obtenção do ácido nucléico e o uso dos seguintes componentes: água, tampão, dNTP, primers,  $MgCl_2$  e Taq DNA polimerase.

A denominação RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) é uma reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase. Não utiliza o DNA de cadeia dupla como molde e sim RNA de cadeia simples. A partir do RNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de DNA complementar (cDNA) na qual aplica-se a técnica de PCR para verificar a expressão gênica, uma vez que analisa o RNA responsável pela síntese protéica (BUSTIN and NOLAN, 2004).

A RT-PCR e a PCR convencional não apresentam valores quantitativos, por isso foi desenvolvido o PCR em tempo real (qPCR), que é uma técnica na qual o número absoluto de cópias da molécula do RNA-alvo é determinado, requerendo medidas precisas de uma curva de calibração externa para o gene. Esta técnica determina a expressão de um gene-alvo em relação a um gene expresso de maneira constitutiva (BURLEIGH, 2001). Além disso, por ser uma técnica mais sensível, a qPCR é capaz de detectar transcritos normalmente não detectáveis pela RT-PCR (SASSAKI, 2008).

As características relevantes da PCR em tempo real são rapidez, especificidade, sensibilidade e quantificação. A amplificação é dividida em 3 fases: a linha basal na qual não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência, a fase log em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo e a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos (BUSTIN and NOLAN, 2004).

Heid et al. (1996) modificaram o método utilizando ao invés do brometo de etídio, uma sonda duplamente marcada com fluoróforos capaz de se ligar especificamente ao DNA recém-sintetizado, método conhecido como TaqMan. Posteriormente, introduziu-se a utilização do SYBR Green I, um novo corante com maior seletividade pela ligação a duplas fitas de DNA (MORRISON et al.,

1998), constituindo-se numa alternativa ao TaqMan, mais simples, genérica e barata. Nessa reação em cadeia da polimerase em tempo real, a quantificação da expressão do gene-alvo é medida tomando-se, como referência, um gene endógeno (ou gene de referência), o qual deve ser expresso em quantidades equivalentes ao longo de todo o período de amostragem experimental.

Genes constitutivos ou de referência (*Housekeeping genes*) são genes expressos continuamente sob todas as circunstâncias por uma célula ou organismo, independentemente de influências do ambiente. Eles expressam componentes essenciais em quase todas as células, como proteínas ribossomais, tRNA, rRNA e componentes da RNA polimerase. O uso de um gene constitutivo procura minimizar as diferenças nas quantidades de RNA utilizadas na transcrição reversa, as quais podem variar por influência do tratamento experimental ou por diferentes eficiências de extração, bem como as variações que possam ocorrer durante cada reação e em cada tubo de reação (SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000). Um grupo restrito de genes constitutivos vem sendo utilizado para normalização da expressão de outros genes. Esse grupo inclui os genes da actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), tubulina, ciclofilina, ubiquitina e o RNA ribossomal 18S. Todavia, faz-se necessário que se faça um estudo individual para cada candidato a controle interno ao longo do modelo experimental (BUSTIN, 2000; 2002).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

#### 3.1. Material botânico

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

Após a coleta no campo experimental dos sete diferentes tecidos (folha, flor, raiz, polpa verde, polpa madura, casca verde e casca madura), os mesmos foram imediatamente lavados com água destilada, congelados em nitrogênio líquido e transportados ao LCBM onde foram armazenados em ultrafreezer (-80°C) até o momento da extração dos ácidos nucléicos.

#### 3.2. Extração de DNA

O DNA de cada cultivar, Prata Anã e Grande Naine, foi extraído utilizando o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilâmonio) descrito por Doyle & Doyle (1990) com modificações. Para tal, 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  $\beta$ -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 min. a 65°C sendo homogeneizado por inversão a cada 10 minutos. Após esta etapa, a solução foi centrifugada por 10 min. 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 min. 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 min. 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, cada amostra foi centrifugada a 11000 rpm por 20 min., 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 ultrapura.

### **3.3 Extração de RNA**

As diferentes amostras dos tecidos alvos foram maceradas em nitrogênio líquido. Os utensílios e materiais utilizados, tais como almofariz, pistilo e espátulas foram previamente lavados com álcool 70% e as ponteiros e microtubos novos foram autoclavados.

O protocolo de extração de RNA foi feito por meio do uso do reagente Concert™ Plant RNA (Invitrogen) de acordo com o manual do fabricante com algumas modificações. A cada microtubo de 1,5 mL contendo aproximadamente 100 mg de tecido macerado foram adicionados 500 µL do reagente Concert gelado (4°C) e homogeneizados em vórtex por 2 min. Em seguida, os

microtubos foram incubados horizontalmente por 10 min. à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi submetido à centrifugação por 5 min. a 4°C a 16000 rpm e o sobrenadante transferido para um novo microtubo já contendo 100 µL de NaCl 5M. Em seguida, foram adicionados 300 µL de clorofórmio e homogeneizados em vórtex por 1min. Para separação das fases, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 min. em uma temperatura de 4°C a 16000 rpm e a fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo. Foram adicionados aproximadamente 500 µL de isopropanol gelado seguido de uma homogeneização por inversão. As amostras foram incubadas *overnight* em temperatura de -20°C. Após, estas foram submetidas à centrifugação a 4 °C por 25 min. a 16000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado com 600 µL de etanol 75% gelado (-20°C) e os tubos levados à centrifugação a 16000 rpm por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado seco em temperatura ambiente e o RNA ressuspense em 20 µL de água ultrapura. As amostras foram quantificadas em Nanodrop® ND-1000 e armazenadas a -80°C.

### **3.4 Tratamento com DNase e PCR *Housekeeping genes***

Todas as amostras de RNA passaram por tratamento com a enzima DNase para remoção do DNA genômico utilizando a endonuclease TURBO™ DNase (Ambion). Este tratamento foi executado seguindo o protocolo do fabricante com modificações. Para tanto, utilizou-se um microtubo de 500 µL e para cada micrograma de RNA foram adicionadas 2 U da Turbo™ DNase juntamente com o seu respectivo tampão na concentração final de 1X, considerando um volume final de 100 µL. Este conjunto foi incubado em banho-maria a 37°C por 45 min. Após esta incubação, foram adicionados 100 µL de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico 25:24:1. A solução foi homogeneizada em vortex, centrifugada a 13000 rpm por 10 min. a 4°C e cerca de 85 µL da fase

aquosa foram coletados e transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL. A esta solução foram adicionados 8,5  $\mu$ L de acetato de sódio 3M, 5  $\mu$ L de glicogênio (Invitrogen) e 250  $\mu$ L de etanol absoluto gelado. Uma homogeneização foi realizada cuidadosamente e os microtubos foram incubados por 14-16 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após este período de incubação, os microtubos foram incubados por 5 min. em gelo e centrifugados por 1 hora e 30 min. a 13000 rpm em uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 500  $\mu$ L de etanol 70% gelado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Foi realizada uma centrifugação a 13000 rpm por 15 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo o sobrenadante descartado, o precipitado seco e ressuspensão em 30  $\mu$ L de água ultrapura.

Para verificar a eficiência do tratamento com DNase, ou seja, amostras de RNA livres de gDNA, foram feitas PCRs utilizando *primers* para os genes constitutivos listados na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados na PCR (Actina, Tubulina, EF1, L2)

Gene	Sequência do <i>primer</i>	T anel. ( $^{\circ}\text{C}$ )
Actina F	5'-CCCAAGGCAAACCGAGAGAAG-3'	61
Actina R	5'-GTGGCTCACACCATCACCAG-3'	
Tubulina F	5'-TGTTGCATCCTGGTACTGCT-3'	58
Tubulina R	5'-GGCTTTCTTGCACTGGTACAC-3'	
EF1 F	5'-CGGAGCGTGAAAGAGGAAT-3'	55
EF1 R	5'-ACCAGCTTCAAACCACCAG-3'	
L2 F	5'-AGGGTTCATAGCCACACCAC-3'	59
L2 R	5'-CCGAAGTGAAGAGCCCTAC-3'	

Para todas as amostras de RNA foram feitos um mix onde cada tubo continha: 6,35  $\mu$ L de água ultrapura autoclavada; 1X de GoTaq Flexi Buffer; 1,75 mM de  $\text{MgCl}_2$  (25mM); 0,6 mM de dNTP (10mM); 0,5 mM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (10mM) e 1 U de GoTaq DNA Polymerase (Promega) 5 U/ $\mu$ L, para um volume final de 15  $\mu$ L. A reação foi feita em duplicata, sendo que cada tubo continha 2  $\mu$ L de RNA na concentração de 35 ng/ $\mu$ L proveniente de cada tecido, exceto os utilizados como controles negativos e positivos. No

caso do controle negativo foi pipetado 2  $\mu\text{L}$  de água ultrapura ao invés do RNA. Para o controle positivo foi usado 2  $\mu\text{L}$  de DNA (35 ng/ $\mu\text{L}$ ) extraído de folha de bananeira (Prata Anã ou Grande Naine). Os tubos contendo os 15  $\mu\text{L}$  da reação foram levados ao termociclador *Eppendorf Mastercycler* assim programado: 95 °C por 2 minutos para desnaturação das fitas, 35 ciclos de 20 segundos a 95 °C; 20 segundos na temperatura de anelamento específica de cada *primer* e 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 1,5% (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.

As amostras de RNA tratadas com DNase que ainda apresentaram contaminação por gDNA foram submetidas a um novo tratamento com essa enzima. O procedimento de verificação por PCR foi repetido nas mesmas condições citadas anteriormente.

### **3.5. Integridade e quantificação das amostras de RNA**

Após a extração, a qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), em tampão TAE 1X (Tris-ácido acético) e corados em uma solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) a 0,6% (v/v). Este gel foi visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak<sup>®</sup>), sendo processada com o software Kodak<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> ND-1000, no modo *Standard* e opção de leitura de RNA. Com esta quantificação, foi determinada a concentração em ng/ $\mu\text{L}$  e a relação de pureza das amostras.

### 3.6. 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 *MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* e 4,2 µL de água ultrapura 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 para a correta síntese da primeira fita de cDNA: 10 min. 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 min. a 85 °C para inativá-la. As amostras foram armazenadas a -20°C.

### 3.7. Validação dos cDNA's obtidos

Os cDNAs foram validados por meio de RT-PCR utilizando os *primers* para os genes de referência listados no item 3.4, p. 30.

Para todas as amostras de cDNA foram feitos um mix a partir dos volumes de uma reação individual em que cada tubo continha: 7,35µL de água Milli-Q autoclavada; 1X de GoTaq Flexi Buffer; 1,75 mM de MgCl<sub>2</sub> (25mM); 0,6 mM de dNTP (10mM); 0,5 mM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (10mM) e 1 U de GoTaq DNA Polymerase (Promega) 5 U/µL, para um volume final de 15 µL. A reação foi feita em duplicata, sendo que cada par de microtubo de 200µL continha 1 µL de cDNA diluído 1:10 proveniente de cada tecido, exceto os utilizados como controles negativos e positivos. No caso do controle negativo foi pipetado 1µL de água ultrapura autoclavada ao invés do cDNA. Para o controle positivo foi usado 1 µL de DNA (35 ng/µL) extraído de folha de

bananeira (Prata Anã ou Grande Naine). Os tubos contendo os 15  $\mu\text{L}$  da reação foram levados ao termociclador *Eppendorf Mastercycler* assim programado: 95 °C por 2 min. para desnaturação das fitas, 35 ciclos de 20 segundos a 95 °C; 20 segundos a 61°C ou 58 °C (anelamento dos *primers* de actina e  $\beta$ -tubulina, respectivamente) e 20 segundos a 72 °C (extensão das novas fitas); 72 °C por 5 min. e 12 °C *hold*. O produto desta PCR foi inteiramente aplicado em um gel de agarose a 1,5% (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.

### 3.8. Seleção de genes de caráter tecido-específico (RT-PCR)

A seleção das sequências potencialmente promotoras associadas aos genes de caráter tecido-específico foi feita através da análise de 23 candidatos previamente identificados pelo *virtual screening* no banco de dados *DATAMusa*. Os *primers* utilizados foram desenhados a partir dessas sequências, que pela confidencialidade do projeto serão omitidas e apenas identificadas como EMB-B; EMB-E; EMB-I; EMB-08; EMB-09; EMB-14; EMB-15; EMB-16; EMB-17; EMB-19; EMB-22; EMB-23; EMB-24; EMB-26-B; EMB-28bis; EMB-32-B; EMB-34-B; EMB-35; EMB-36; EMB-37; EMB-50; EMB-51; EMB-53.

Para cada gene foi feita uma PCR onde em um mix havia: 7,35 $\mu\text{L}$  de água Milli-Q autoclavada; 1X de GoTaq Flexi Buffer; 1,75 mM de  $\text{MgCl}_2$  (25mM); 0,6 mM de dNTP (10mM); 0,5 mM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (10mM) e 1 U de GoTaq DNA Polymerase (Promega) 5 U/ $\mu\text{L}$ , para um volume final de 15  $\mu\text{L}$  preparado para cada amostra em duplicata. O *template* utilizado foi 1 $\mu\text{L}$  de cDNA diluído 1:10 de cada tecido, 1  $\mu\text{L}$  de DNA de cada cultivar para o controle positivo a 35 ng/ $\mu\text{L}$  e para o controle negativo 1  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

A amplificação dos fragmentos foi feita utilizando o termociclador *Eppendorf Mastercycler* com o seguinte programa: 95 °C por 2 minutos para desnaturação (DNA dupla fita), 35 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 20 segundos a 55-58 °C (dependendo da temperatura ideal de anelamento dos *primers*) e 20 segundos a 72 °C (extensão das novas fitas); com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. O produto de cada PCR foi inteiramente aplicado em um gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão TAE 1X e corado com 0,6% (v/v) de Brometo de Etídeo (10 mg/mL).

### **3.9 PCR quantitativo (qPCR)**

Para esta etapa foi utilizado 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 (Applied Biosystems). O cDNA individual de cada tecido e o *pool* de cada cultivar foram empregados como molde na análise da expressão gênica quantitativa tecido-específica.

Como genes de referência foram utilizados actina, tubulina, EF1 e L2 (conforme Tabela 1, item 3.4, p. 30).

Inicialmente foi realizado um ensaio para se determinar a eficiência da reação de amplificação. 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, anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto, finalizando com 1 segundo a 95 °C.

Foram feitas cinco diluições em série para os *pools* (Tabela 2) de cada cultivar, sendo os ensaios realizados com as amostras em triplicata.

TABELA 2: Diluição referente ao pool dos tecidos de cada cultivar a partir de um volume de 3 $\mu$ L de cDNA de cada tecido.

<b>Diluição</b>	<b>Concentração</b>		<b>Volume</b>
D0	1000 ng	3 $\mu$ L cDNA de cada tecido	21 $\mu$ L
D1	200 ng	15 $\mu$ l D0 + 60 $\mu$ l água	75 $\mu$ L
D2	40 ng	15 $\mu$ l D1 + 60 $\mu$ l água	75 $\mu$ L
D3	8 ng	15 $\mu$ l D2 + 60 $\mu$ l água	75 $\mu$ L
D4	1,6 ng	15 $\mu$ l D3 + 60 $\mu$ l água	75 $\mu$ L
D5	0,32 ng	15 $\mu$ l D4 + 60 $\mu$ l água	75 $\mu$ L

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

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração de RNA e remoção do DNA genômico

A qualidade do RNA extraído foi determinada por análise visual mediante eletroforese em gel de agarose (FIGURA 1) e a concentração e pureza determinadas por espectrofotometria (razões de absorvância 260/230 e 260/280).

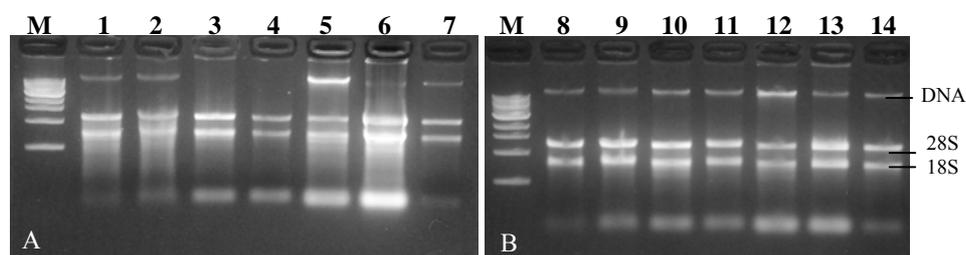


FIGURA 1: Gel de agarose 0,8% evidenciando as bandas 28S e 18S (RNA ribossômico) de diferentes tecidos de bananeira, cv. Prata Anã (A) e Grande Naine (B). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14).

A realização de apenas um tratamento com a enzima TURBO™ DNase não foi suficiente para a completa eliminação do gDNA presente nas amostras de RNA, conforme pode ser verificado mediante a realização de PCR com gene endógeno (*housekeeping*) (FIGURA 2).

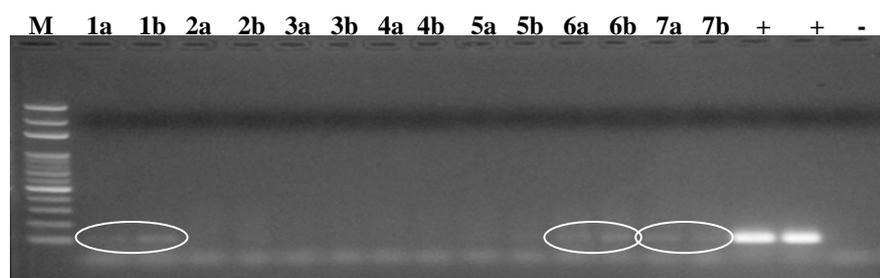


FIGURA 2 – Gel de agarose 1,2% com produto de PCR em duplicata (a e b) para o gene da tubulina evidenciando contaminação por gDNA no RNA de diferentes tecidos de bananeira, cultivar Prata Anã. Tecidos: Polpa Verde (1), Polpa Madura (2), Casca Verde (3), Casca Madura (4), Folha (5), Flor (6), Raiz (7), Controle positivo (+), Controle negativo (-).

Após um novo tratamento das amostras seguindo o mesmo procedimento anterior, a PCR mostrou que o gDNA foi completamente removido (FIGURA 3) pela ausência de amplicons nas amostras analisadas (1 a 7).

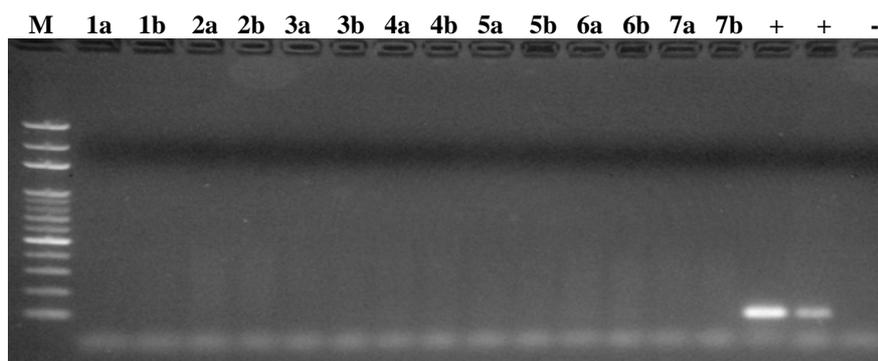


FIGURA 3 – Gel de agarose 1,2% com produto de PCR em duplicata (a e b) para o gene da tubulina evidenciando RNA de diferentes tecidos de bananeira, cultivar Prata Anã, livre de gDNA. Tecidos: Polpa Verde (1), Polpa Madura (2), Casca Verde (3), Casca Madura (4), Folha (5), Flor (6), Raiz (7), Controle positivo (+), Controle negativo (-)

A constatação de que as amostras de RNA estão livres de gDNA é uma etapa bastante importante no que diz respeito à confiabilidade dos resultados de RT-PCR e qPCR, os quais podem ser influenciados e/ou superestimados pela presença de DNA no cDNA.

#### 4.2 Validação dos cDNA's obtidos

Utilizando os *primers* para os genes constitutivos EF1 e tubulina (FIGURA 4) foi possível verificar a qualidade do cDNA.

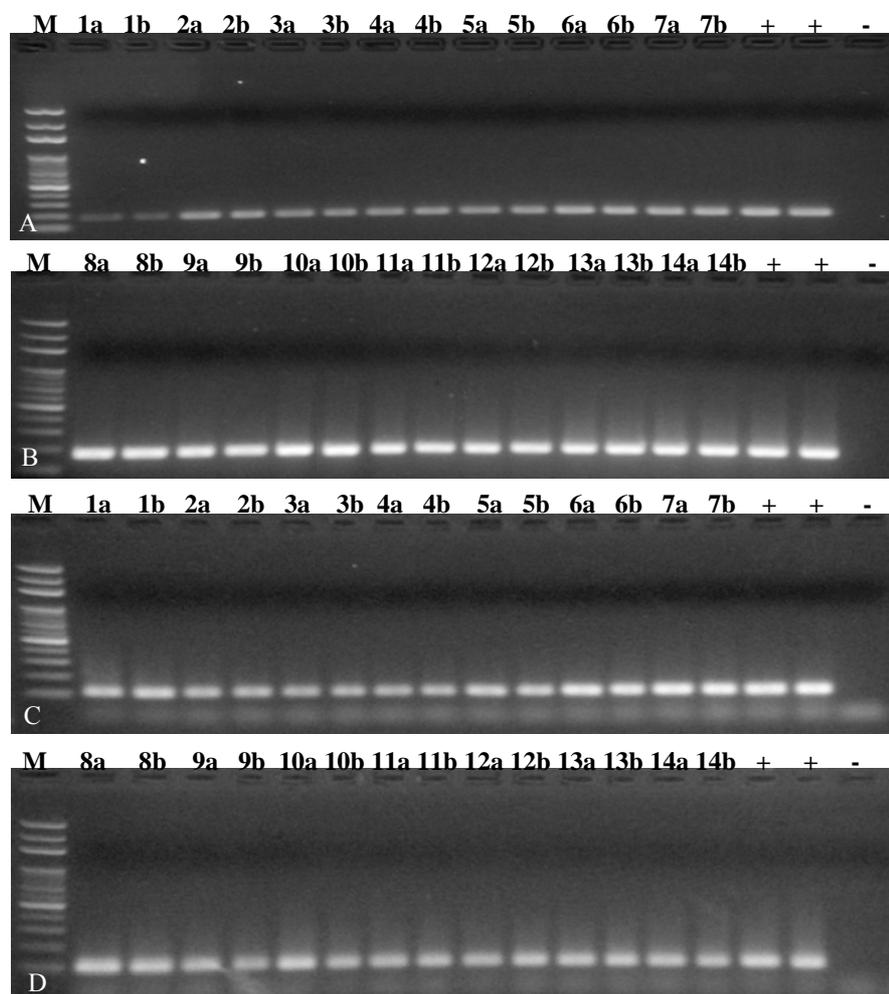


FIGURA 4 – Gel de agarose 1,5% com produto de PCR em duplicata (a e b) para os genes EF1 (A e B) e tubulina (C e D) evidenciando cDNA de Prata Anã (1 a 7) e Grande Naine (8 a 14). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14), Controle positivo (+), Controle negativo (-).

Após a verificação da qualidade dos cDNAs obtidos a partir de mRNAs extraídos de cada tecido em ambas cultivares, foi feita a análise de qPCR afim de obter genes endógenos para posterior normalização dos resultados. A principal característica de genes para normalização é a expressão constitutiva, a

qual não sofre variações significativas com os diferentes tratamentos. Assim, os genes tubulina e EF1 foram considerados os melhores para a normalização dos resultados devido à menor variação de expressão nos diferentes tecidos (FIGURA 5).

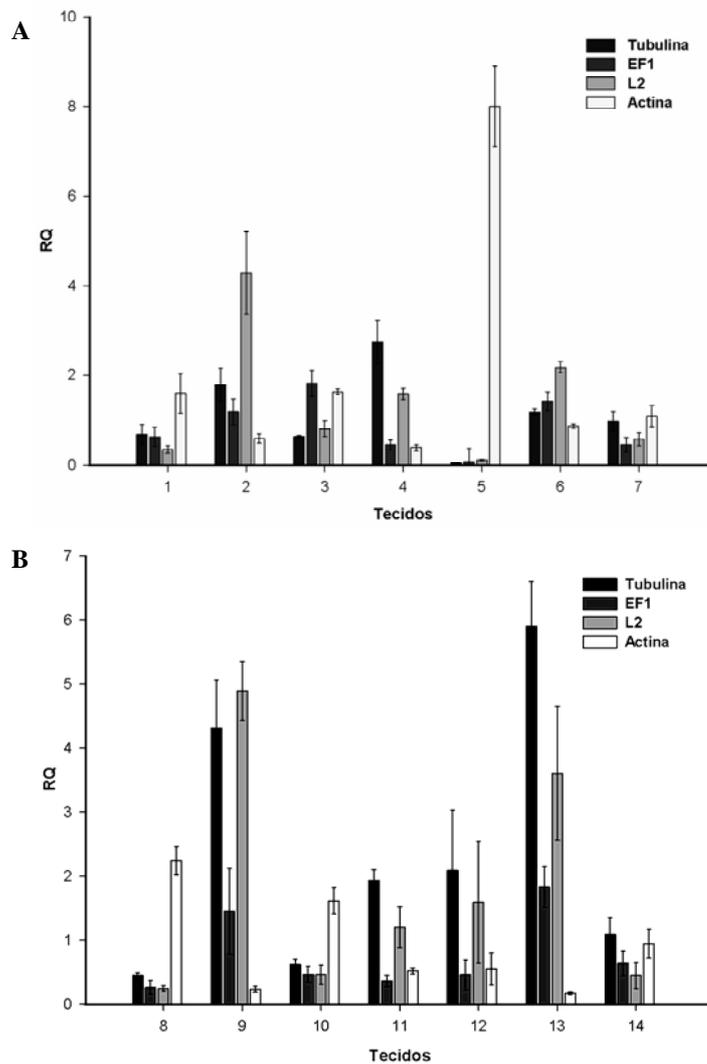


FIGURA 5: Perfil da expressão por qPCR para os *primers* dos genes endógenos: Tubulina, EF1, L2 e Actina em diferentes tecidos de bananeira, cv. Prata Anã (A) e cv. Grande Naine (B). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14).

### 4.3. Seleção de seqüências promotoras associadas a genes de caráter tecido-específico via RT-PCR e qPCR.

Três (EMB 16, EMB 28bis, EMB B) dos 23 candidatos apresentaram expressão tecido-específica mediante análise de RT-PCR .

O gene EMB 16 se mostrou específico para folha de Prata Anã, entretanto, para a variedade Grande Naine apresentou expressão em diferentes tecidos na RT-PCR (FIGURA 6).

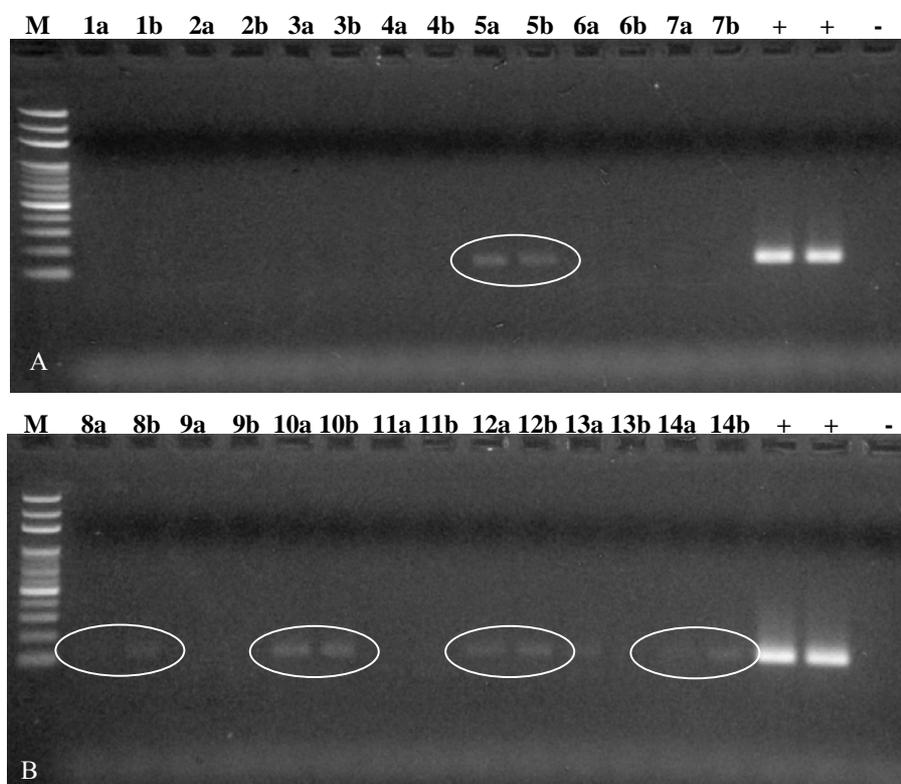


FIGURA 6 – Gel de agarose 1,5% com produto de PCR em duplicata (a e b) para o *primer* EMB-16 evidenciando expressão tecido-específica em folha de Prata Anã (A) e expressão em vários tecidos de Grande Naine (B). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14), Controle positivo (+), Controle negativo (-).

Na RT-PCR, a expressão do gene EMB 28bis mostrou-se específica em raiz de Prata Anã, porém não apresentou expressão em nenhum tecido de Grande Naine (FIGURA 7).

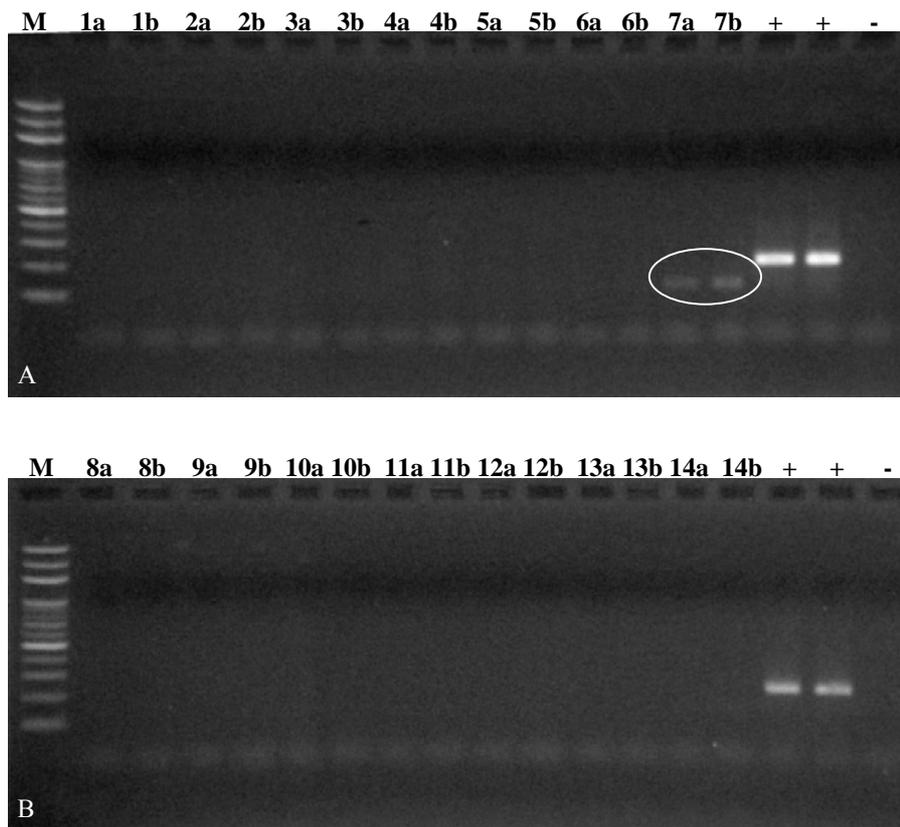


FIGURA 7 – Gel de agarose 1,5% com produto de PCR em duplicata (a e b) para o *primer* EMB-28bis evidenciando expressão tecido-específica em raiz de Prata Anã (A) e nenhuma expressão em Grande Naine (B). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14), Controle positivo (+), Controle negativo (-).

O gene candidato EMB B se mostrou específico para flor de Prata Anã, porém não apresentou expressão em nenhum tecido de Grande Naine na RT-PCR (FIGURA 8).

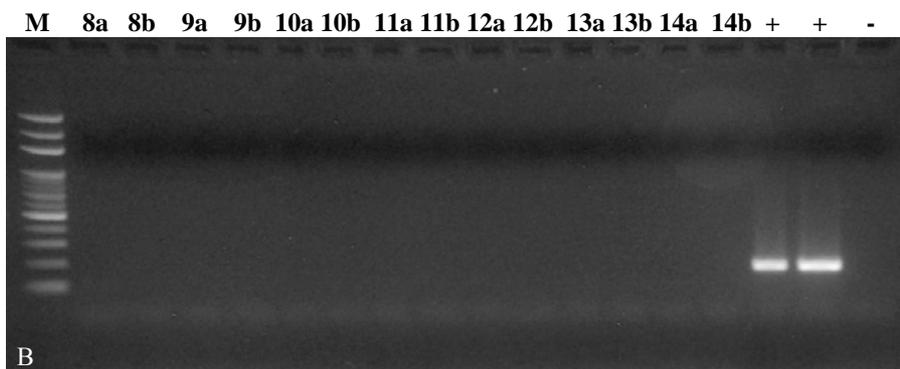
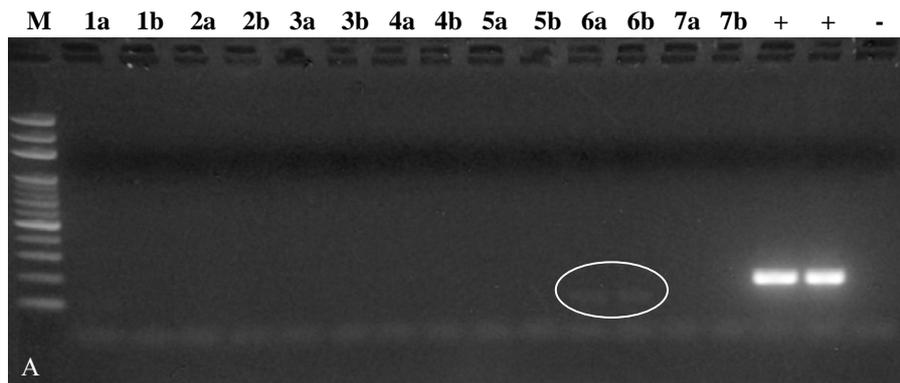


FIGURA 8 – Gel de agarose 1,5% com produto de PCR em duplicata (a e b) para o *primer* EMB-B evidenciando expressão tecido-específica em flor de Prata Anã (A) e nenhuma expressão em Grande Naine (B). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14), Controle positivo (+), Controle negativo (-).

Após a realização de qPCR, a alta sensibilidade dessa técnica permitiu constatar que apenas um gene (EMB 28bis) apresentou expressão tecido-específica, sendo expresso somente em raiz de Prata Anã (FIGURAS 9 e 10).

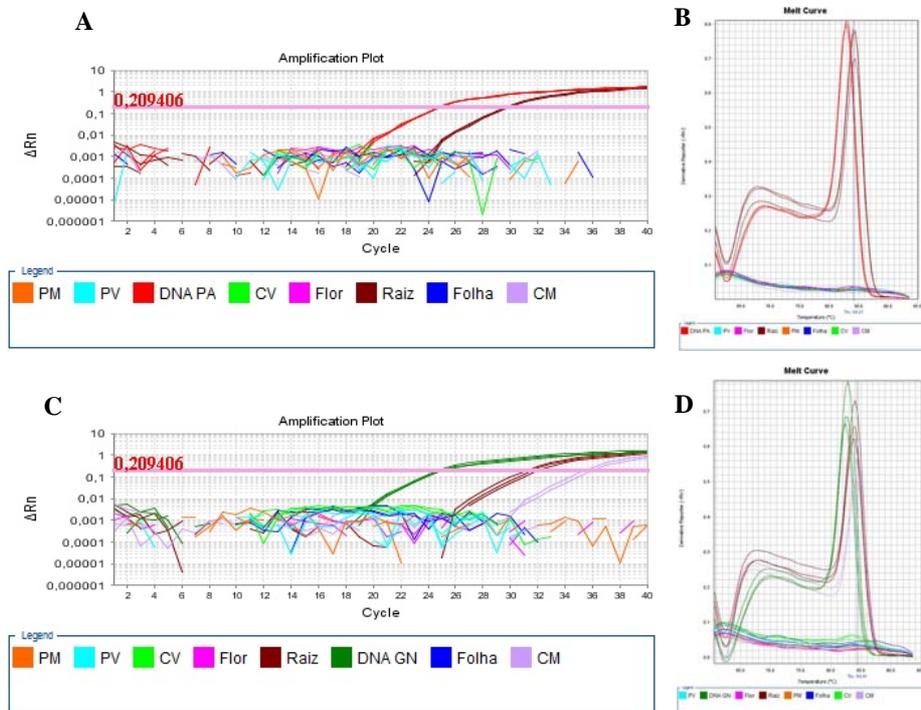


FIGURA 9: Gráfico de amplificação e curva de *melting* mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 28bis em Prata anã (A e B) e Grande naine (C e D).

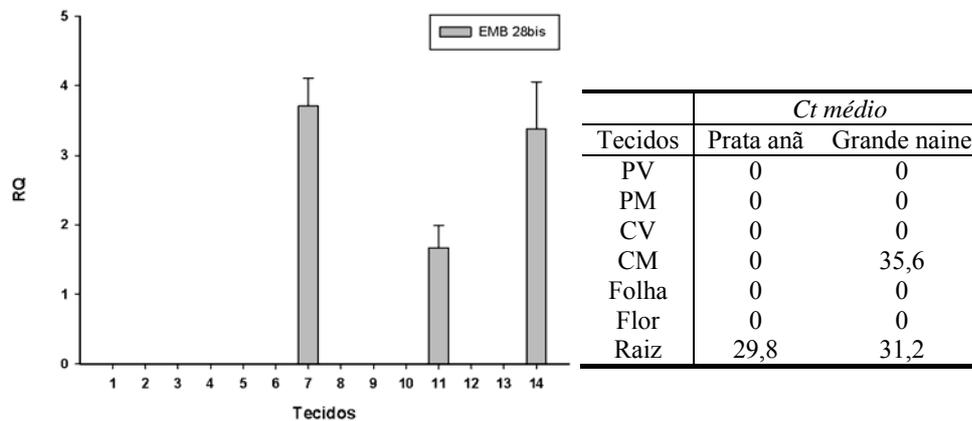


FIGURA 10: Perfil da expressão por qPCR para o *primer* EMB-28bis em diferentes tecidos de bananeira, cv. Prata Anã (1 a 7) e cv. Grande Naine (8 a 14). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14).

Conforme análise de Ct médio, a expressão em raiz de Prata Anã é maior que a expressão em raiz de Grande Naine, fato que pode justificar a ausência de banda no gel de agarose referente à raiz de Grande Naine quando se analisou os materiais por RT-PCR.

Da análise *in silico*, que identificou as sequências com as quais foram desenhados os *primers*, EMB 28bis correspondeu à sequência codante de um precursor da peroxidase catiônica. A expressão tecido-específica em raiz de Prata Anã e Grande Naine de um precursor da peroxidase catiônica 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 (BOERJAN, 2003; DARDICK, 2010; 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.

Para os demais genes, os resultados de qPCR mostraram que os dois candidatos (EMB 16 e EMB B) que apresentaram expressão tecido-específica via RT-PCR (folha e flor de Prata Anã, respectivamente), tiveram expressão em outros tecidos, via qPCR.

O gene EMB 16, apesar da expressão significativamente superior em folha de Prata Anã, também apresentou expressão considerável em flor e raiz desta cultivar. Esse gene também se mostrou expresso em quase todos os tecidos de Grande Naine, exceto em polpa madura (FIGURAS 11 e 12).

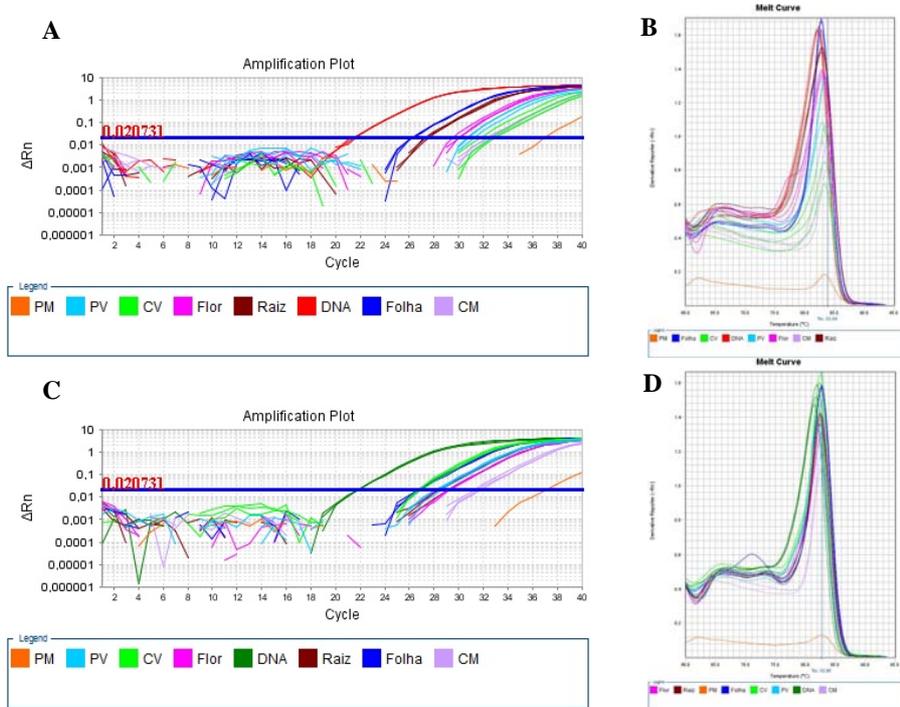


FIGURA 11: Gráfico de amplificação e curva de *melting* mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 16 em Prata Anã (A e B) e Grande Naine (C e D).

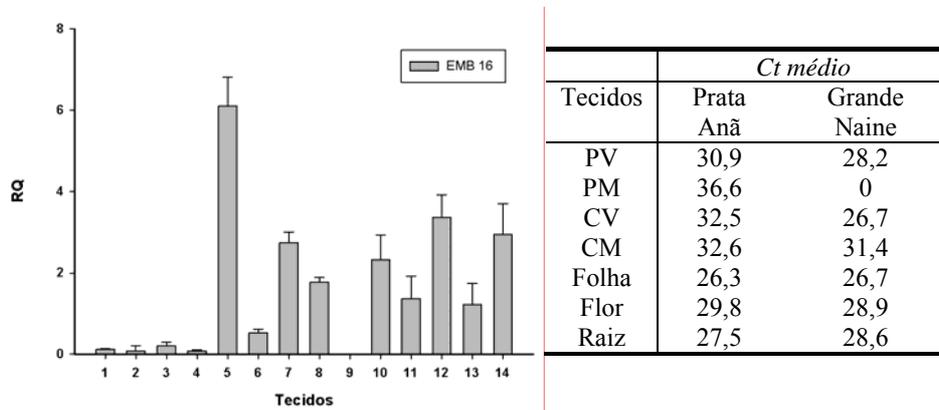


FIGURA 12: Perfil da expressão quantitativa relativa por qPCR para o *primer* EMB-16 em diferentes tecidos de bananeira, cv. Prata Anã (1 a 7) e cv. Grande Naine (8 a 14). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14).

De acordo com a análise *in silico* que identificou as sequências para o desenho dos primers, EMB 16 correspondeu à sequência codante relacionada a proteínas de resistência a doenças [RGA3 (RGA1-blb)] com expressão constitutiva, pertencente à família NBS-LRR, a qual contém repetições ricas em leucina. Numerosos RGAs (Genes Análogos de Resistência) pertencentes à família NBS-LRR foram recentemente caracterizados dos mais diversos cultivares dos genomas A e B de *Musa* (AZHAR & HESLOP-HARRISON, 2008; SONG et al., 2003).

Os genes de resistência possuem como produto normalmente aminoácidos ou estruturas protéicas com motivos bem conservados, fatores que podem se tornar uma importante ferramenta para a biotecnologia auxiliando em estudos de doenças em diversas plantas. (EMEDIATO, 2009; MILLER et al., 2008).

No gene EMB B, após avaliação dos resultados de qPCR, foi constatado a expressão em diversos tecidos das duas cultivares (FIGURAS 13 e 14).

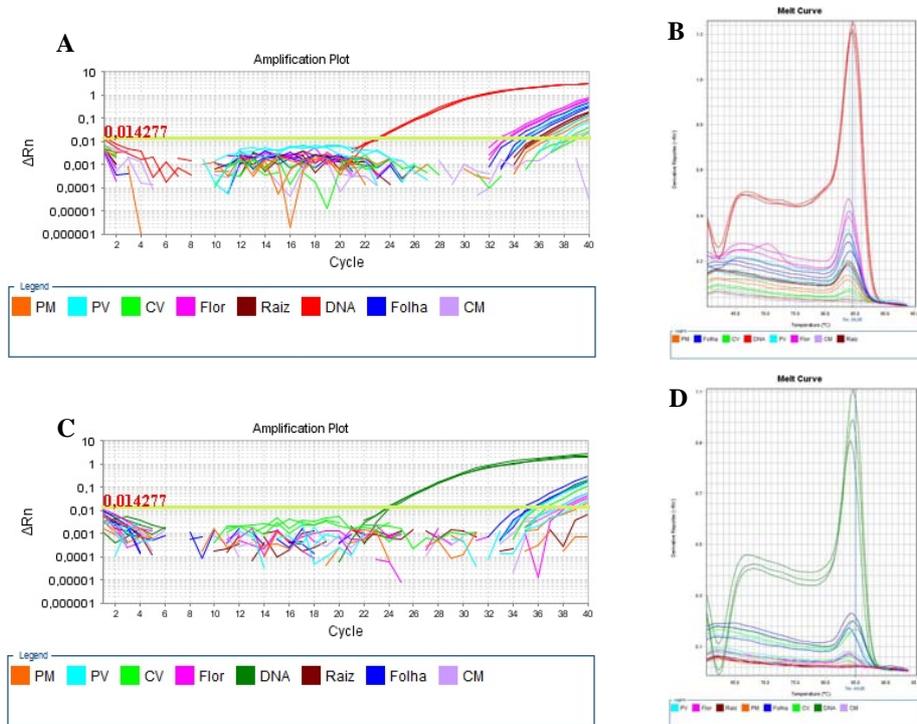


FIGURA 13: Gráfico de amplificação e curva de *melting* mostrando a expressão referente ao *primer* EMB B em Prata Anã (A e B) e Grande Naine (C e D).

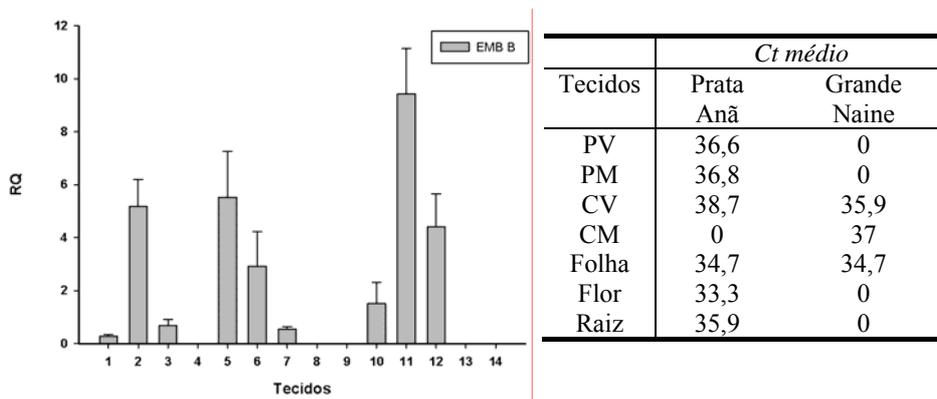


FIGURA 14: Perfil da expressão quantitativa relativa por qPCR para o *primer* EMB-B em diferentes tecidos de bananeira, cv. Prata Anã (1 a 7) e cv. Grande Naine (8 a 14). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14).

Além desses genes, outros resultados também se mostraram interessantes, como os encontrados para EMB 26, EMB 23 e EMB I.

O gene EMB 26 mostrou expressão em casca madura e raiz de Prata Anã e em polpa madura, casca madura e raiz de Grande Naine (FIGURA 15).

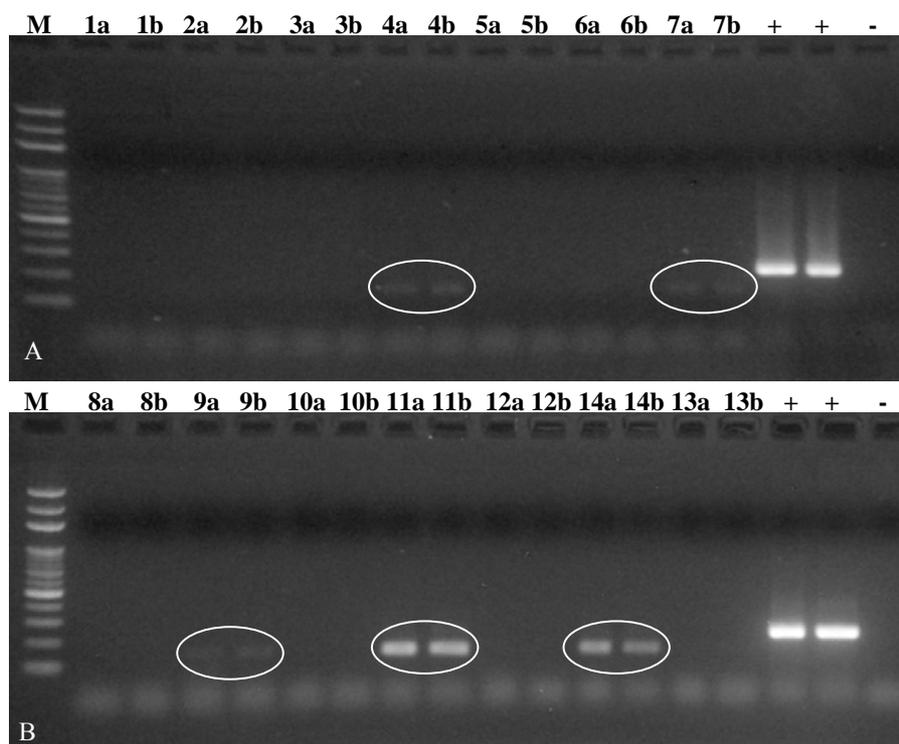


FIGURA 15 – Gel de agarose 1,5% com produto de PCR em duplicata (a e b) para o *primer* EMB-26 evidenciando expressão em Casca Madura e Raiz de Prata Anã (A) e expressão em Polpa Madura, Casca Madura e Raiz de Grande Naine (B). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14), Controle positivo (+), Controle negativo (-).

O resultados de RT-PCR foram confirmados via qPCR, inclusive evidenciando maior expressão nos tecidos com maior intensidade das bandas no gel de agarose.

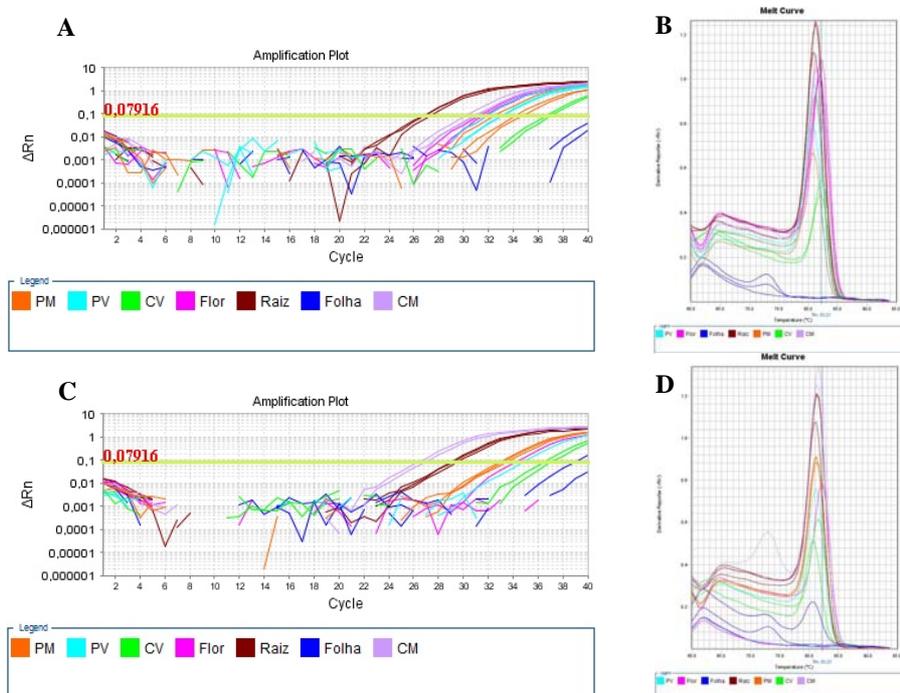


FIGURA 16: Gráfico de amplificação e curva de *melting* mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 26B em Prata Anã (A e B) e Grande Naine (C e D).

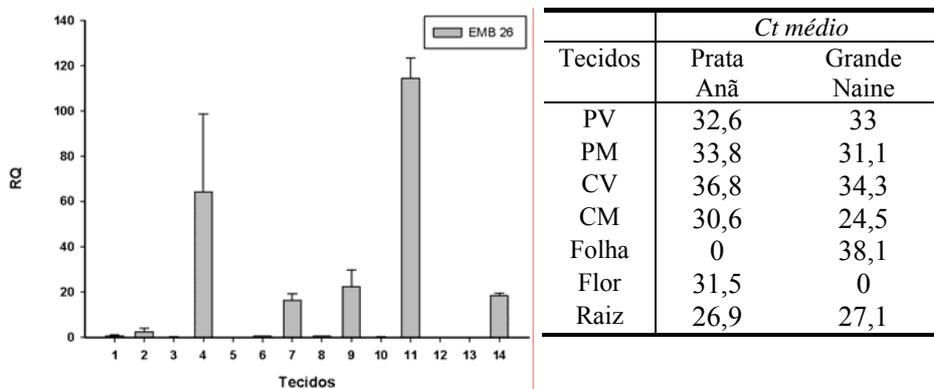


FIGURA 17: Perfil da expressão quantitativa relativa por qPCR para o *primer* EMB-26 em diferentes tecidos de bananeira, cv. Prata Anã (1 a 7) e cv. Grande Naine (8 a 14). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14).

Da análise *in silico*, EMB 26 correspondeu à sequência codante da citocromo P450 71D10, proteína envolvida na resposta a estímulos abióticos, metabolismo secundário, entre outros, cuja função está relacionada com atividade catalítica. Siminszky et al., 1999 relataram que as mono-oxigenases do citocromo P450 são proteínas presentes em microrganismos, plantas e animais e que fazem parte de um grupo grande e diversificado de isoenzimas (P450s) responsáveis por mediar uma gama de reações oxidativas. Diversos trabalhos sustentam o envolvimento de P450s no metabolismo e desintoxicação de numerosos herbicidas. Acredita-se que a metabolização diferencial de herbicidas representa um dos mecanismos que permite a certas espécies cultivadas serem mais tolerantes a um herbicida específico do que outra cultura ou espécies selvagens (DIDIERJEAN et al., 2002; INUI and OHKAWA, 2005; SHIOTA et al., 1994; SIMINSZKY et al., 1999).

O gene EMB 23 apresentou expressão em polpa verde, folha e flor de Prata Anã e em polpa madura e flor de Grande Naine (FIGURA 18).

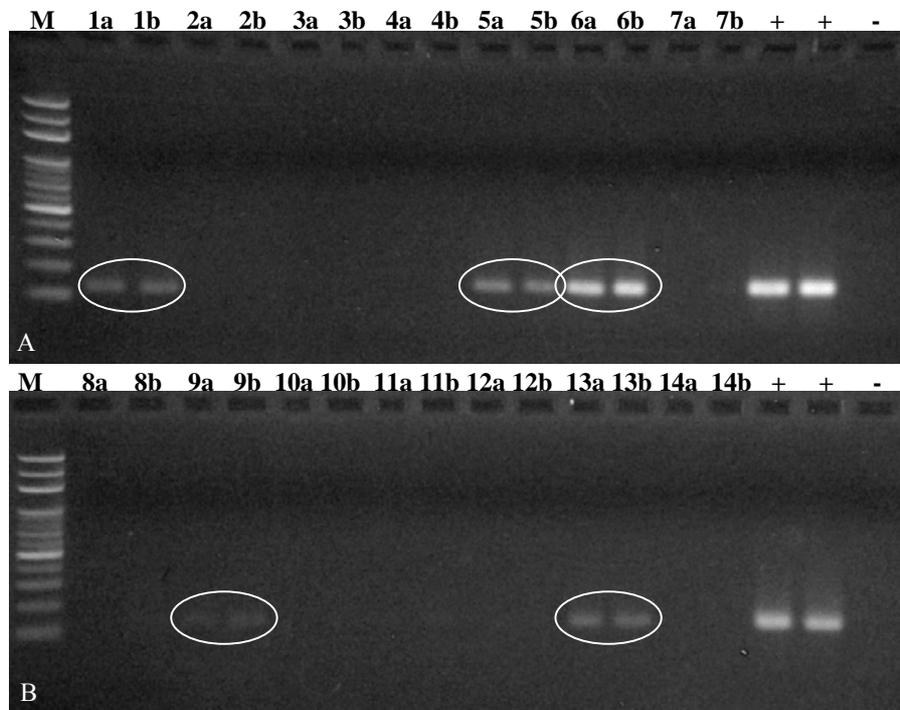


FIGURA 18 – Gel de agarose 1,5% com produto de PCR em duplicata (a e b) para o *primer* EMB-23 evidenciando expressão em Polpa Verde, Folha e Flor de Prata Anã (A) e expressão em Polpa Madura e Flor de Grande Naine (B). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14), Controle positivo (+), Controle negativo (-).

Esses resultados foram confirmados por qPCR, inclusive evidenciando maior expressão nos tecidos com maior intensidade das bandas no gel de agarose (FIGURAS 19 e 20).

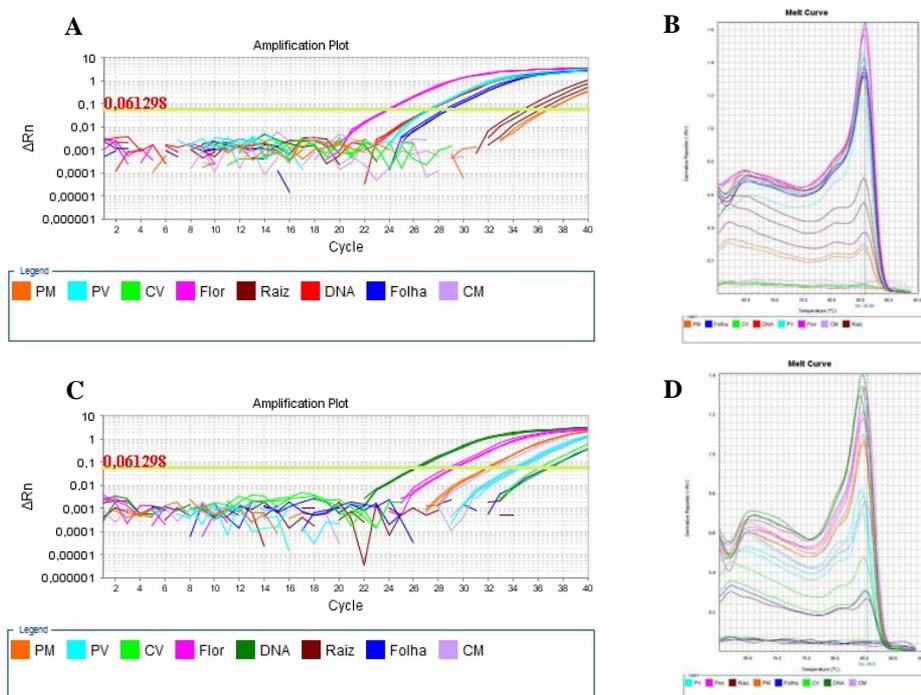


FIGURA 19: Gráfico de amplificação e curva de *melting* mostrando a expressão referente ao *primer* EMB 23 em Prata Anã (A e B) e Grande Naine (C e D).

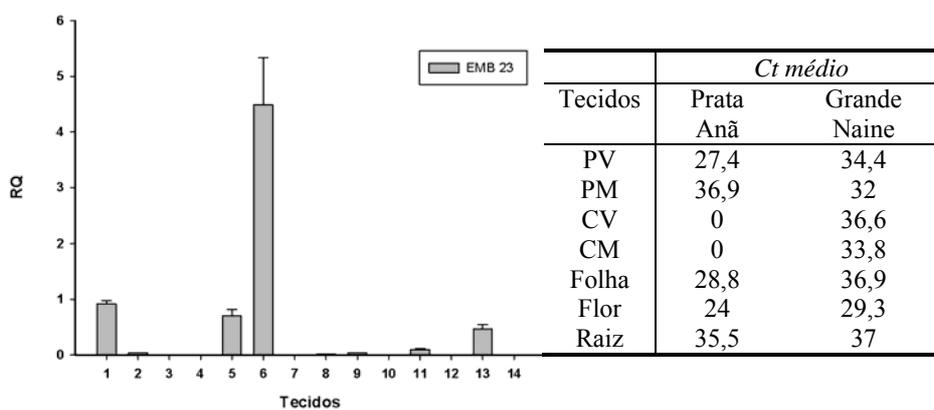


FIGURA 20: Perfil da expressão quantitativa relativa por qPCR para o *primer* EMB 23 em diferentes tecidos de bananeira, cv. Prata Anã (1 a 7) e cv. Grande Naine (8 a 14). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14).

Da análise *in silico*, EMB 23 correspondeu à sequência codante da proteína *18.2 kDa class I heat shock*, cuja expressão pode estar associada aos estágios iniciais da embriogênese somática. No banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) é relatado que essa proteína é induzida por estresse e pertence à família gênica “small heat shock” (HSP). Foi observada expressão diferencial de genes dessa família em raiz, folha e suspensão de microcalos de alfafa (*Medicago sativa* L.) em condições normais de cultivo *in vitro*. A transcrição de genes hsp pode ser induzida por temperatura elevada, tratamento com CdCl<sub>2</sub> e choque osmótico em células em cultura. Em alfafa, uma quantidade considerável de mRNA hsp foi detectado durante os primeiros estágios embriogênicos em embriões somáticos derivados da suspensão de microcalos sob condições de cultura normal. A expressão diferencial destes genes durante o desenvolvimento embrionário sugere um papel funcional específico para HSPs nas células vegetais no momento de transição no desenvolvimento *in vitro* (GYÖRGYÉY et al., 1991).

O gene EMB I se mostrou expresso em polpa verde, casca verde, folha e flor de Grande Naine (FIGURA 21).

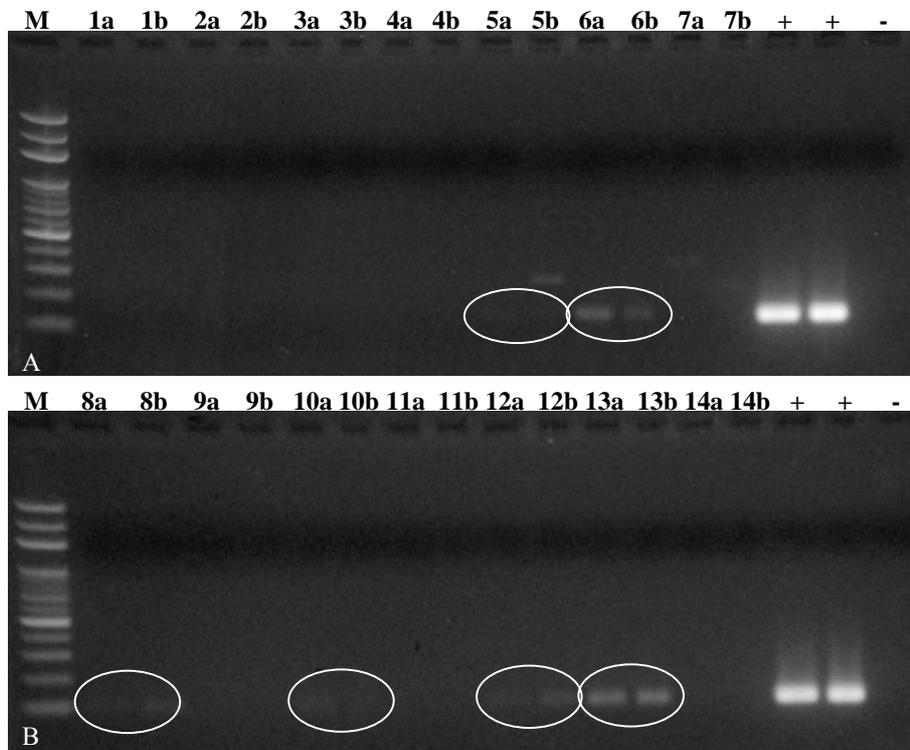


FIGURA 21 – Gel de agarose 1,5% com produto de PCR em duplicata (a e b) para o *primer* EMB-I evidenciando expressão em Folha e Flor de Prata Anã (A) e expressão em Polpa Verde, Casca verde, Folha e Flor de Grande Naine (B). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14), Controle positivo (+), Controle negativo (-).

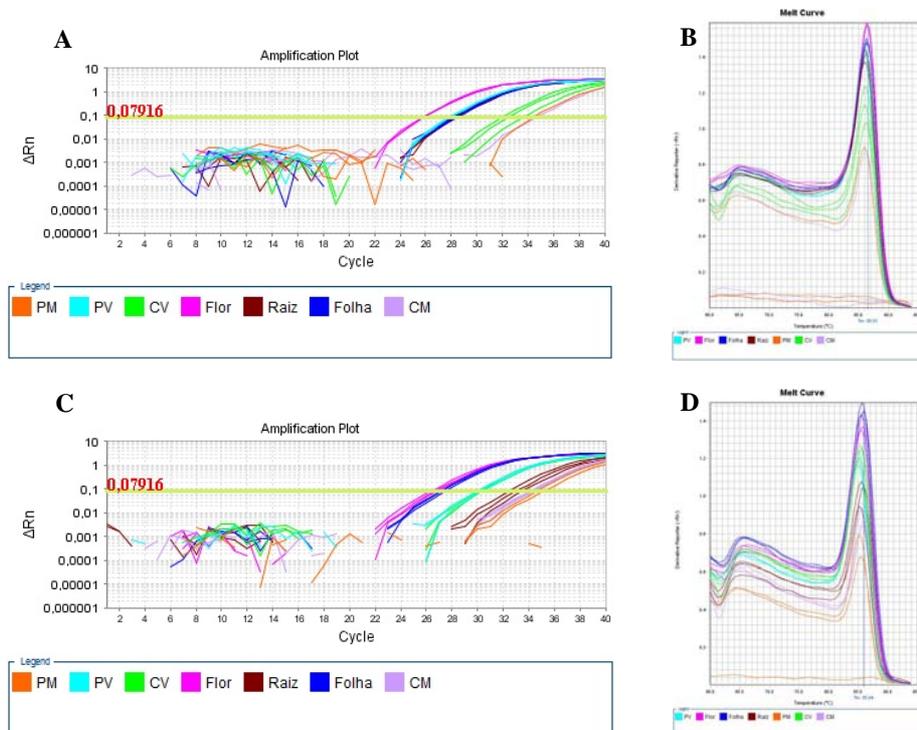


FIGURA 16: Gráfico de amplificação e curva de *melting* mostrando a expressão referente ao *primer* EMB I em Prata Anã (A e B) e Grande Naine (C e D).

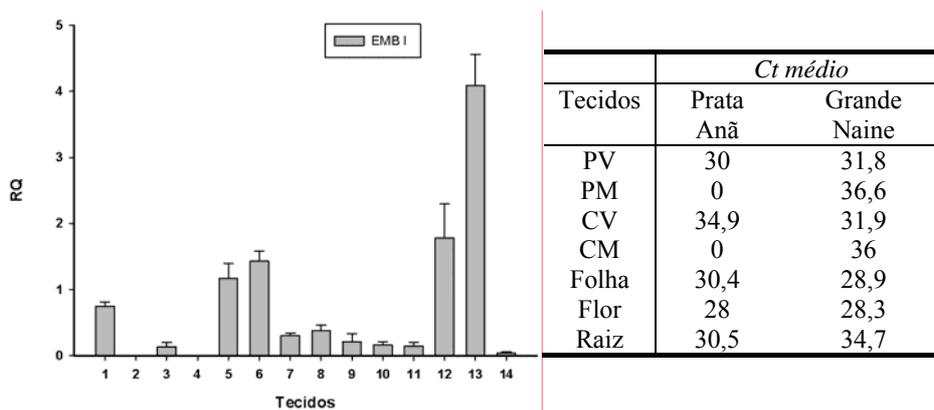


FIGURA 17: Perfil da expressão quantitativa relativa por qPCR para o *primer* EMB I em diferentes tecidos de bananeira, cv. Prata Anã (1 a 7) e cv. Grande Naine (8 a 14). Tecidos: Polpa Verde (1 e 8), Polpa Madura (2 e 9), Casca Verde (3 e 10), Casca Madura (4 e 11), Folha (5 e 12), Flor (6 e 13) e Raiz (7 e 14).

## 5 CONCLUSÕES

Foram encontrados 3 genes associados a promotores candidatos, via RT-PCR, com expressão de caráter tecido-específico. Entretanto, após qPCR, um único gene (EMB 28 bis, correspondente à região codante da peroxidase catiônica) apresentou expressão específica em raiz de Prata Anã.

Além disso, foram encontrados 5 candidatos interessantes que podem ser utilizados para transformação genética.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados têm potencial de gerar artigos científicos de alta qualidade, bem como, novos produtos que poderão gerar patentes adequando-se à lei de propriedade intelectual.

As perspectivas futuras perpassam pelos trabalhos com transformação genética utilizando o gene repórter GUS para avaliar a eficiência do promotor tecido-específico encontrado com genes de interesse econômico.

## REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2011.

ALVES, E. J. **A cultura da banana**: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1997. 585 p.

AZHAR, M.; HESLOP-HARRISON, J. S. Genomes, diversity and resistance gene analogues in *Musa* species. **Cytogenetics Genome Research**, Würzburg, v. 121, n. 1, p. 59-66, May 2008.

BECKER, D. K. et al. 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.

BELALCÁZAR CARVAJAL, S. L. **El cultivo del plátano en el trópico**. Cali: Impresora Feriva, 1991, 367 p.

BI, R. M. et al. 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.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 519-46, Jun. 2003.

BORÉM, A. **Escape gênico e transgênicos**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 206 p.

\_\_\_\_\_. **Melhoramento de plantas**. 22 ed. Viçosa, MG: UFV, 1998. 453 p.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas, Ba: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279 p.

BURLEIGH, S. Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in arbuscular mycorrhizas. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 5, p. 899-904, Apr. 2001.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Milan, v. 25, n. 2, p. 169-93, Oct. 2000.

\_\_\_\_\_. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. \_\_\_\_\_, Milan, v. 29, n. 1, p. 23-39, Aug. 2002.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, New York, v. 15, n. 3, Sept. 2004.

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.

CHEN, X. et al. 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.; MATOS, A.P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 99-117.

CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A. D. Banana (*Musa* spp.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biothecnology in Agriculture and Forestry Trees**. Berlin: Springer-Verlag, v. 1, p. 233-252, 1986.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. 1262 p.

DARDICK, C. D. et al. 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.

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](http://musalit.inibap.org/pdf/IN040529_en.pdf)>. Acesso em: 13 maio 2011.

DIDIERJEAN, L. et al. Engineering Herbicide Metabolism in Tobacco and Arabidopsis with CYP76B1, a Cytochrome P450 Enzyme from Jerusalem Artichoke, **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 179–189, Sept. 2002.

DONATO, S. L. R. et al. Avaliação de variedades e híbridos de bananeira sob irrigação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 348-351, ago. 2003.

DOYLE, J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EMEDIATO, F. L. **Caracterização de genes análogos de resistência (RGAs) em cultivares de *Musa acuminata* contrastantes em resistência à estresses bióticos**. 2009. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.

EYRES, N.; HAMMOND, N.; MACKIE, A. **Moko disease *Ralstonia solanacearum* (Race 2, Biovar 1)**. Australia, Department of agriculture and food Fact Sheet, n. 175, 2005.

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 16 fev. 2011.

FEKLISTOV, A. et al. A Basal Promoter Element Recognized by Free RNA Polymerase  $\sigma$  Subunit Determines Promoter Recognition by RNA Polymerase Holoenzyme. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 23, n. 1, p. 97-107, July. 2006.

FERRARI, J. T.; NOGUEIRA, E. M. C. **Como identificar e combater a sigatoka negra da bananeira**. 2008. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/Sigatoka/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Sigatoka/index.htm)>. Acesso em: 10 abr. 2011.

FOURIE, G. et al. Evolutionary Relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Vegetative Compatibility Groups. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 14, p. 4770-4781, July. 2009.

GREEN, J. et al. 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. et al. **Introduction to genetic analysis**. 9. ed. New York: W. H. Freeman, 2008. 838 p.

GYÖRGYÉY, J. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, New Zeland, v. 16, n. 6, p. 999-1007, Jun. 1991.

HARPER, G. et al. Detection of Banana streak virus in field samples of bananas from Uganda. **Annals of Applied Biology**, Great Britain, v. 1, n. 141, p. 247-257, Mar. 2002.

HEID, C. A. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Baltimore, v. 6, n. 10, p. 986-94, Oct. 1996.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 14 fev. 2011.

INUI, H and OHKAWA, H. Herbicide resistance in transgenic plants with mammalian P450 monooxygenase genes. **Pest Management Science**, Brighton, v. 61, p. 286–291, Jan. 2005.

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, Apr. 1995.

LEACH, R. Report on Investigations into the Cause and Control of the New Banana Diseases in Fiji, Black Leaf Streak. **Council Papers**, Suva, v. 38, 1964a.

LEACH, R. A new form of banana leaf spot in Fiji, black leaf streak. **World Crops**, Amherst, v. 16, p. 60-64, 1964b.

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

LIM, C. Y. et al. 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.

MACKINTOSH, C. A. et al. 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. 98 p.

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.

MATOS, A. P. et al. **Doenças da bananeira no Médio Solimões, Amazonas:** Moko, Mal do Panamá e Sigatoka Amarela. Informativo SBF, Brasília, 1996.

MAY, G. D. et al. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*: mediated transformation. **Nature Biotechnology**, Frankfurt, v. 13, n. 5, p. 486-492, May 1995.

MEIYALAGHAN, S. et al. 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.

MEREDITH, M.A. **Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach.** Surrey: CMI, 1970. 147 p.

MILLER, R. N. G. et al. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: isolation, RFLP marker development, and physical mapping. **BMC Plant Biology**, Paris, v. 8, p. 15, Jan. 2008.

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

MORRISON, T. B.; WEIS, J. J.; WITTEWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, New York, v. 24, n. 6, p. 954-962, Jun. 1998.

MOURICHON, X.; CARLIER, J.; FOURÉ, E. Sigatoka leaf spot diseases. **Musa Disease Fact Sheet.** France: INIBAP, n. 8, 4 p. 1997.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-catalyzed Chain Reaction. **Methods in Enzymology**, Pasadena, v. 155, p. 335, 1987.

NEUTEBOOM, L.W. et al. 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.

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

RANCÉ, I. et al. 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).

RHODES, P. L. A new banana disease in Fiji. **Commonwealth Phytopathological News**, v. 10, p. 38-41, 1964.

ROGERS, L. A. et al. 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, May 2005.

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](http://bananas.bioversityinternational.org/files/files/pdf/publications/focusen_genetictransformation.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2011.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, New York, v. 230, p. 1350-1354, Dec. 1985.

\_\_\_\_\_. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, New York, v. 239, p. 487-491, Jan. 1988.

SANTOS-SEREJO, J. A. et al. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT - BANANICULTURA: UM NEGÓCIO SUSTENTÁVEL. **Anais da Reunião internacional em Joinville**: Acorbat, 2006. v. 1, p. 10-23, 2006.

SASSAKI, F. T. **Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos a partir de informações do Banco FORESTs (Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium)** 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2008.

SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, New York, v. 20, n. 46, p. 69-81, Nov. 2000.

SHAHMURADOV, I. A. et al. PlantProm: a database of plant promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 1, p. 114-117, Jan. 2003.

SHEN, Y. G. et al. AhCMO, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, n. 6, p. 815-821, Nov. 2002.

SHIOTA, N. et al. Herbicide-Resistant Tobacco Plants Expressing the Fused Enzyme between Rat Cytochrome P4501A1 (CYP1 A1) and Yeast NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, p. 17-23, Sept. 1994.

SILVA. et al. Avaliação de clones de banana Cavendish. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 832-837, set. 2006.

SIMINSZKY, B. et al. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. **Plant Biology**, Paris, v. 96, p. 1750–1755, Feb. 1999.

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, Dec. 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.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, v. 27, p. 64-67, Feb. 1940.

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

SONG, J. et al. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 16, p. 9128-9233, Aug. 2003.

SOUZA JÚNIOR, M. T. et al. **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, 2002.

STOVER, R. H.; SIMMONDS, N.W. Bananas. In: \_\_\_\_\_. **Fruit physiology, biochemistry and nutritional values**. 3. ed. New York: J.Wiley, 1987. p. 386-395.

STOVER, R. H. **Banana, plantain and abaca disease**. Washington, Commonwealth Mycological Institute, 1972. 318 p.

TAKATSU, A. Riscos e consequências da disseminação do Moko para outras regiões do Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE MOKO DA BANANEIRA, MANAUS, AM, 1986. **Anais...** Cruz das Almas, Ba: Embrapa-CNPMPF, Documento 19. Embrapa-CNPMPF, 1986. p. 54-59.

TEIXEIRA, L. A. J. et al. Suscetibilidade de oito cultivares de bananeira à sigatoka-amarela na região de Marília (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 1, 1996.

WATSON, J. D. et al. **Biologia molecular do gene**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 728 p.

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, 1997.

ZIMMERMAN, A. Über einige tropischer Kulturpflanzen beobachtete Pilze. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 8, n. 219, Sept. 1902.