UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Identificação de genes com variação de expressão
durante o amadurecimento da banana
pela aplicação de técnicas de análise diferencial**

Adriana de Godoy

Tese para obtenção do grau de
Doutor

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo

2006

18.805

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012661

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Godoy, Adriana de
G589i   Identificação de genes com variação de expressão durante
o amadurecimento da banana pela aplicação de técnicas de
análise diferencial / Adriana de Godoy. -- São Paulo, 2006.
131 P.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental
Orientador: Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Banana : Bioquímica dos alimentos 2. Controle gênico
3. Expressão gênica 4. Regulação gênica I. T. II. Nascimento,
João Roberto Oliveira do, orientador.

641.3477 CDD

Adriana de Godoy

**Identificação de genes com variação de expressão
durante o amadurecimento da banana
pela aplicação de técnicas de análise diferencial**

Comissão Julgadora
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Doutor João Roberto Oliveira do Nascimento/Presidente

Prof. Dra. Marila Gaspar Mais / 1º Examinador

Prof. Dr. Marco Aurélio Silva Tiné / 2º Examinador

Prof. Dr. Eduardo Purgatto / 3º Examinador

Prof. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi / 4º Examinador

São Paulo, 26 de julho de 2006.

A Celso, Carmen e Gustavo pela ajuda e incentivo no decorrer
de toda minha formação pessoal e profissional
e

À Luciana e Luiz
pelo companherismo e apoio
incondicional no meu Doutorado

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof. Dr. João R. O. Nascimento pela paciência, atenção e por ter me iniciado em um novo universo do conhecimento, ao Prof. Dr. Franco M. Lajolo por todo suporte e infra-estrutura laboratorial oferecida para a execução dos experimentos, ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto pela parceria e atenção dispensada, à Prof^a. Dr^a. Beatriz Cordenunsi pelas amostras de banana, à Prof^a. Dr^a. Maria Inês Genovese pelas oportunidades, ao Prof. Dr. Fernando Moreno por ceder seu laboratório para alguns dos experimentos. E aos demais docentes do departamento que contribuíram para minha formação. Às amigas Fernada e Janaina pelos parâmetros fisiológicos das bananas.

Aos amigos que sempre estiveram presentes no decorrer do meu doutorado: Amanda, Ana Paula, Maurício, Milana e Thomas.

Aos meus colegas de bancada que me ajudaram em alguns dos experimentos: Adair, Clarice, Fernanda, João Paulo, Renato, Marcelo e Rodrigo.

Aos meus colegas de laboratório: Aderuza, Ana Cris, Cláudia, Claudinéia, Eliana, Jack, Lena, Malu, Márcia, Patrícia, Priscila, Rosecler, Neuza e Selma.

Aos técnicos: Alberto, Lúcia, Márcia, Marcelo e Tânia.

Aos funcionários da FCF e em especial a Lurdinha por todo o suporte e assistência.

À CAPES pela bolsa e à FAPESP pelo apoio financeiro ao laboratório projeto temático (02/12452-9).

SUMÁRIO

1. RESUMO	9
2. ABSTRACT	10
3. INTRODUÇÃO	11
4. OBJETIVO	22
5. MATERIAIS E MÉTODOS	23
5.1. Frutos	23
5.2. Extração de RNA total	24
5.3. Quantificação de RNA e DNA	25
5.4. Eletroforese em gel de agarose	25
5.5. Síntese da fita-única de cDNA	26
5.6. Síntese de cDNA dupla-fita	26
5.7. Purificação de RNA poli A ⁺ a partir de RNA total	26
5.8. “Differential display” RT-PCR	27
5.8.1. Isolamento e re-amplificação dos fragmentos de DNA	31
5.9. Biblioteca de subtração	33
5.9.1. Síntese de cDNA fita-única e dupla-fita de amostra “tester” e “driver”	33
5.9.2. Digestão com <i>Rsa</i> I e ligação do adaptador na amostra “tester”	34
5.9.2. Digestão com <i>Rsa</i> I e ligação do adaptador na amostra “tester”	35
5.9.3. Hibridizações	35
5.9.4. Amplificação por PCR	36
5.10. Purificação dos fragmentos de DNA	37
5.11. “Northern-blotting” reverso	37
5.12. Análise densitométrica.	40
5.13. Clonagem	41
5.14. Sequenciamento	42
5.15. “Northern-blotting”	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1. Amostragem de bananas	45
6.1.1. Primeira amostragem de bananas	45
6.1.2. Segunda amostragem de bananas	47
6.2. Extração de RNA total	49
6.3. “Differential Display” RT-PCR	51
6.3.1. Clone DD-V1	62
6.3.2. Clone DD-V2	66
6.3.3. Clone DD-V3	70
6.3.4. Clone DD-V4	72
6.3.5. Clone DD-M1	74
6.3.6. Clone DD-M2	78
6.3.7. Clone DD-M3	83
6.3.8. Clone DD-M4	88

6.3.9. Clone DD-M5	92
6.4. Biblioteca de subtração de cDNA	94
6.4.1. Clone BS-1	96
6.4.2. Clone BS-2	102
6.4.3. Clone BS-3	107
6.4.4. Clone BS-4	112
6.4.5. Clone BS-5	116
7. CONCLUSÃO	119
8. REFERÊNCIAS	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resumo da técnica “differential display” RT-PCR	29
Figura 2	Resumo da técnica biblioteca de subtração de cDNA	34
Figura 3	Parâmetros fisiológicos do amadurecimento da banana	47
Figura 4	Parâmetros fisiológicos do amadurecimento da banana	49
Figura 5	Eletroforese de RNA total	51
Figura 6	Gel de “differential display” RT-PCR	56
Figura 7	Northern-blotting” reverso	60
Figura 8	Northern-blotting” reverso	60
Figura 9	DD-V1 resultados Tblastx	64
Figura 10	DD-V2 resultados Tblastx	68
Figura 11	DD-V3 resultados Tblastx	72
Figura 12	DD-V4 resultados TblastX	74
Figura 13	DD-M1 resultados Tblastx	76
Figura 14	DD-M2 resultados Tblastx	80
Figura 15	DD-M2 "northern blotting"	81
Figura 16	DD-M3 resultados Tblastx	85
Figura 17	DD-M3 "northern blotting"	86
Figura 18	DD-M4 resultados Tblastx	91
Figura 19	DD-M5 resultados Tblastx	94
Figura 20	BS-1 resultados Tblastx	98
Figura 21	BS-1 "northern blotting"	102
Figura 22	BS-2 resultados Tblastx	104
Figura 23	BS-2 "northern blotting"	107
Figura 24	BS-3 Tblastx	110
Figura 25	BS-3 "northern blotting"	113
Figura 26	BS-4 Tblastx	115
Figura 27	BS-4 "northern blotting"	117
Figura 28	BS-5 Tblastx	119

ABREVIATURAS

DPC	dias pós-colheita
DTT	ditiotretitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
SDS	dodecil sulfato de sódio
RNA	ácido ribonucleico
DNA	ácido desoxirribonucleico
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
TE	Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)
Tris	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol
dNTP	desorribonucleotídeo trifosfato
20 X SSC	NaCl 3 M e citrato de sódio 0,3 M
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
RT	transcriptase reversa
PCR	reação em cadeia da polimerase
PVC	policloreto de vinila
UV	ultra-violeta
bp	pares de base

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido Aspártico
E	Ácido Glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Triptofano
V	Valina
W	Treonina
Y	Tirosina

1. RESUMO

No amadurecimento ocorrem alterações bioquímicas que têm impacto nas características organolépticas dos frutos, tais como cor, sabor, odor, maciez, etc e também na composição química com reflexos no valor nutricional. Nesse processo altamente coordenado, em que enzimas são sintetizadas *de novo*, a expressão gênica desempenha um papel importante em seu controle. Porém no que tange a frutos tropicais, em especial a banana (fruto de estudo), as informações relativas ao controle de expressão gênica, se restringem a algumas enzimas-chave. Assim sendo, uma abordagem ampla, e não restrita somente a alguns genes, pode contribuir para o entendimento da regulação de algumas etapas metabólicas do amadurecimento. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi identificar genes com variação de expressão durante o amadurecimento da banana. O trabalho experimental foi feito com dois tipos de amostras, uma referente ao período pré-climatérico e a outra ao climatérico. Para tanto, foram utilizadas duas técnicas com princípios diferentes: “differential display” RT-PCR e a biblioteca de subtração de cDNA, de modo a otimizar e ampliar a possibilidade de se obterem genes diferentes, e que, por ventura, fossem obtidos por uma técnica, mas não por outra. Ambas metodologias tiveram como ponto de partida a extração de RNA de amostras de banana referentes aos dois períodos em estudo. Ao utilizar a técnica “differential display” RT-PCR foram obtidos nove genes com variação de expressão, quatro com aumento de expressão em bananas pré-climatéricas, similares à imunofilina, translocador de adenina nucleotídeo, proteína de cloroplasto e proteína bacteriana e cinco com aumento de expressão no período climatérico, similares à aquaporina, legumina, desoxiguanosina quinase, NADH dehidrogenase e proteína bacteriana. Com a biblioteca de subtração de cDNA foram obtidos cinco genes com aumento de expressão em bananas climatéricas, os quais foram similares à expansina, omega-3-desaturase, taumatina, NADH mitocôndrial e metalotioneína.

2. ABSTRACT

During ripening many biochemistry modifications have impact in organoleptical characteristics of fruits, like colour, flavor, softness, etc and also in chemical composition (nutritional value). In this process highly coordinated, which enzymes are *de novo* synthesized, gene expression has an important role in this control. However, in tropical fruits, especially banana (fruit chosen), some information relative to gene expression control, are restricted to some key enzymes. An approach, not only restricted to some genes, can contribute to understand some ripening metabolic steps. So, the objective of this work was to obtain and identify genes with altered expression in banana ripening, defining two analysis phases, about respiratory period and ethylene pick. The experimental work used two kinds of sample, one of them before climacteric period and the other after climacteric period. They were applied two techniques with different principles: differential display RT-PCR and cDNA subtraction library, to optimize and increase the possibility to obtain different genes, and which can be obtained by one technique but not in other. Both methodologies had the same first step, the RNA extraction. Following, genes with altered expression were obtained, identified and confirmed. In differential display RT-PCR were obtained nine genes, four of them had an increase of expression before climacteric bananas and they were similar to immunophilin, adenine nucleotide translocator, chloroplast protein and bacterial protein and five with an increase of expression after climacteric which were similar to aquaporin, legumin, desoxiguanosine kinase, NADH dehydrogenase and bacterial protein. Using cDNA subtraction library were obtained five genes with an increase of expression in post-climacteric bananas and these sequences were similar to expansin, omega-3-desaturase, thaumatin, NADH mitochondrial and methionine.

3. INTRODUÇÃO

Os frutos, durante o amadurecimento, tornam-se mais atrativos para os consumidores por uma série de modificações bioquímicas que resultam em alterações de alguns parâmetros de qualidade como sabor, aroma, textura e cor. Além disso, as alterações provenientes desse processo têm impacto nutricional, incluindo variações nas quantidades de fibras (composição e teor), antioxidantes, vitaminas e carboidratos. Esse processo tem sido muito estudado não só com a finalidade de se esclarecer os mecanismos de regulação envolvidos, já que é um processo em que ocorrem alterações marcantes em um curto espaço de tempo, mas também pela importância na nutrição humana, considerando o relevante aporte de nutrientes em nossa dieta proveniente de frutos (ADAMS-PHILLIPS; BARRY; GIOVANNONI, 2004; BARRY et al., 2005). Porém, se por um lado variações decorrentes do amadurecimento são positivas pela maior valorização do fruto com mudanças desejáveis, por outro, essas transformações também têm implicações econômicas na medida em que ocorre um aumento nas perdas nos períodos pré e pós-colheita pela menor resistência do fruto a danos mecânicos, devido à alterações da parede celular e lamela média que resultam em amaciamento da polpa. Outro motivo que contribui para um aumento das perdas é a maior susceptibilidade ao ataque de agentes patogênicos, que pode ser facilitado por injúrias mecânicas. A maior fragilidade dos frutos nesse período exige cuidados adicionais no armazenamento e também no transporte, como por exemplo, a utilização de embalagens especiais e/ou o uso de atmosfera modificada. Esses fatores elevam o custo do produto significativamente, na medida em que as perdas expressivas decorrentes desse período ou as medidas preventivas para reduzi-las estarão embutidas no valor final de venda desse produto ao consumidor.

Em relação à banana, objeto de estudo da presente tese, é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo explorada na maioria dos países tropicais. A produção mundial atingiu 45 milhões de toneladas em 1990, destacando-se o Brasil como o segundo país produtor e, também, como o maior consumidor, sendo responsável por cerca de 12,1% desse total (FAO, 1991).

As alterações do amadurecimento podem ser claramente observadas na banana, sendo marcantes no período pós-colheita. No estágio pré-climatérico, a casca do fruto é verde, indicando um alto teor de clorofila (DRURY et al., 1999); a textura tanto da casca quanto da polpa é rígida, o que dificulta injúrias mecânicas e ataques de agentes patogênicos; o teor de amido é elevado, em torno de 25% (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995) e o teor de polifenóis é alto, sendo esse um dos fatores responsáveis pelo sabor adstringente peculiar na banana verde (CLENDENNEN; MAY, 1997; SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993). O amadurecimento requer a síntese de novas proteínas e de mRNA, e esse processo anabólico requer energia e suprimento de carbono, que são fornecidos através da respiração. No período climatérico ocorre uma elevação na atividade respiratória e na biossíntese do hormônio etileno, o qual é necessário para a coordenação e finalização do amadurecimento de frutos climatéricos (GIOVANNONI, 2001; SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993). A magnitude da taxa respiratória pode variar enormemente entre frutos climatéricos. Porém, é importante notar que, em geral, frutos com altas taxas respiratórias como a banana, por exemplo, tendem também a amadurecerem mais rapidamente e, conseqüentemente, se tornam mais perecíveis. Com o início do período climatérico ocorrem mudanças na banana, como, por exemplo, a degradação da clorofila presente na casca que resulta na cor amarela característica do fruto maduro (DRURY et al., 1999), a modificação na textura da polpa que se torna mais macia

graças à ação de enzimas que degradam os polímeros da parede celular, como a poligalacturonase e pectina-metil-esterase (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993) e o teor de amido diminui para menos de 1%, devido à conversão do amido a açúcares pela ação de amilases no período climatérico (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995). Na banana madura também ocorre a produção e a liberação de uma grande variedade de compostos voláteis como ésteres, álcoois, cetonas, aldeídos que contribuem para o aroma característico da banana (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993).

Como exemplificado no caso da banana, o amadurecimento de frutos é um processo com muitas particularidades e sob esse aspecto representa uma oportunidade para investigações relativas aos mecanismos de regulação envolvidos. Esse processo envolve mudanças específicas na expressão gênica e no metabolismo celular, já que o fenótipo maduro é resultado dessas alterações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem no final do desenvolvimento do fruto (WILKINSON et al., 1995).

As complexas transformações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem no amadurecimento resultam, pelo menos em parte, de alterações nas quantidades ou atividades de várias enzimas ou outras proteínas presentes no fruto (WILKINSON et al., 1995). Nesse processo, várias proteínas já foram identificadas, mas muitos mRNA específicos não foram ainda identificados ou isolados. Considerando a complexidade desse processo quanto à regulação e coordenação, não surpreende que ele esteja sob controle gênico (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993; WILKINSON et al., 1995). De fato, o isolamento de genes relacionados ao amadurecimento de frutos tem levado não somente ao estudo dos efeitos diretos de genes específicos no amadurecimento, mas, também, ao isolamento e análise da regulação gênica e elucidação dos mecanismos envolvidos. Como exemplo, os

avanços significativos no entendimento da regulação molecular de parâmetros individuais do amadurecimento, especialmente em relação ao metabolismo de parede celular e na biossíntese e resposta ao etileno que foram obtidos nos últimos anos. O resultado desse conhecimento tem contribuído em muito para uma visão mais completa do controle molecular do amadurecimento e tem, adicionalmente, auxiliado na obtenção de soluções para problemas na produção e na qualidade de frutos (GIOVANNONNI, 2001; MOORE et al., 2002). Em síntese, a habilidade de identificar pontos relevantes do controle do amadurecimento, tais como degradação da parede celular e do amido, maciez, síntese de etileno, pigmentos, carotenóides, flavonóides, vitaminas e compostos aromáticos voláteis, tem como potencial de aplicação a manipulação de características nutricionais ou parâmetros de qualidade associados ao amadurecimento (CLENDENNEN; MAY; 1997; MOORE et al., 2002; SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993). A aplicação de técnicas de modificação genética também abre a possibilidade da manipulação do amadurecimento e esse fato pode resultar em vantagens comerciais significativas, já que em relação à conservação a estocagem de frutos emprega refrigeração ou é acompanhada de atmosfera modificada na qual o oxigênio é mantido em baixos níveis e o conteúdo de dióxido de carbono é aumentado, para diminuir a taxa respiratória do fruto e consequentemente retardar as modificações resultantes do amadurecimento que são mais significativas após o pico respiratório. Outra vantagem do conhecimento de elementos gênicos regulatórios e consequentemente da possibilidade de manipulação do amadurecimento pode ser a resistência à pragas como no caso dos cultivares de banana (CLENDENNEN; MAY; 1997; SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993).

Apesar da importância, o estudo da expressão gênica e seu controle durante o amadurecimento estão concentrados em alguns frutos climatéricos, como por exemplo, o tomate, que tem sido ao longo dos anos o modelo de escolha em razão de características como; comodidade de semeadura, porte, velocidade de crescimento, número e tamanho dos frutos, sazonalidade, forma de propagação e pelo período relativamente curto de produção. Todos esses fatores contribuíram para a escolha do tomate como um modelo experimental de sucesso (GIOVANNONI, 2001; MOORE et al., 2002). Embora haja grande variedade anatômica e fenotípica entre os frutos, algumas mudanças bioquímicas que ocorrem durante o amadurecimento são conservadas em muitas espécies de plantas. Por exemplo, pesquisas realizadas em diversas espécies indicam que no início do amadurecimento ocorre um aumento coordenado na expressão gênica e na atividade enzimática de muitas proteínas envolvidas no metabolismo de parede celular, síntese de pigmentos e metabolismo de açúcares (SEYMOUR; TAYLOR; TUCKER, 1993). Essas informações sugerem que o mecanismo genético que regula o amadurecimento de frutos é altamente conservado. Porém, pouco se conhece sobre as características genéticas dessas vias, embora inúmeros experimentos feitos usando o tomate tenham levado à hipótese do amadurecimento em frutos climatéricos, como o tomate, banana, maçã e pêssego, seja regulado por vias dependentes e independentes de etileno (ADAMS-PHILLIPS et al., 2004; GIOVANNONI, 2004). De fato, o envolvimento do etileno na regulação do amadurecimento tem sido observado em estudos inibitórios, pela análise de variedades modificadas geneticamente com expressão alterada de genes envolvidos na biosíntese e na sinalização de etileno e pela caracterização de mutantes (LANAHAN et al., 1994; WILKINSON et al., 1995). Além disso, sabe-se que a expressão de muitos genes que codificam enzimas responsáveis pelo fenótipo maduro é regulada pelo etileno. A

evidência do envolvimento de uma via etileno-independente no amadurecimento surgiu da caracterização de variedades de tomates mutantes, nas quais algumas características típicas do processo de amadurecimento foram afetadas. Esses mutantes não apresentaram um aumento na produção do etileno e mostraram uma inibição da expressão gênica relacionada com o amadurecimento, embora a expressão gênica, mas não o amadurecimento tenha sido parcialmente restaurado pelo tratamento com etileno, o que indicou a presença de genes que responderam a esse hormônio (LANAHAN et al., 1994; ZEGZOUTI et al., 1999).

A manipulação gênica do amadurecimento pode trazer vantagens consideráveis, como foi observado no tomate, em que experimentos em transgênicos com baixa expressão de poligalacturonase resultaram em mudanças significativas na textura com benefício potencial para a indústria de processamento (YODER, 1993). Nesse caso, foi notado um aumento na viscosidade do suco e derivados desses frutos, bem como uma ampliação no tempo de prateleira e uma maior resistência a ataques de patógenos e a injúrias mecânicas durante o transporte e armazenamento. O melhoramento dessas propriedades físicas pode ter acontecido devido à redução na separação intracelular dos frutos em que a poligalacturonase foi suprimida, resultando em um aumento da integridade dos tecidos (KRAMER et al., 1992; LANGLEY et al., 1994; SCHUCH et al., 1991). Ainda em tomates transgênicos, segundo Kalamaki (2003), experimentos com supressão da expressão da expansina, proteína envolvida no desarranjo da parede celular no amadurecimento, apresentaram um aumento na viscosidade de sucos e molhos. Entretanto, em estudos de viscosidade de suco ou molhos de tomates transgênicos com aumento de expressão da expansina, ocorreu uma elevação significativamente maior na viscosidade quando comparado com a

viscosidade do grupo controle ou a do grupo com expressão suprimida dessa enzima. A análise do tamanho dos polissacarídeos da parede celular dessa amostra indicou um acréscimo na despolimerização de pectinas solúveis. O aumento de expressão pode ter favorecido a hidratação da parede celular, resultando em uma expansão no tamanho das partículas e no aumento da viscosidade de produtos. Assim, nesse caso a manipulação da expressão, tanto aumento como supressão, pode resultar em modificações na consistência e também mostra que as alterações na expressão de determinados genes podem resultar em uma característica final do produto aparentemente diferente da esperada (KALAMAKI et al., 2003).

Apesar do melhor entendimento geral do amadurecimento, obtido com vários estudos em tomates, ao considerar frutos tropicais como a banana, por exemplo, não se têm muitas informações a respeito da função e participação de vários genes na regulação do amadurecimento. Uma maneira de se obter informações que auxiliem nesse entendimento pode ser feita pela identificação de genes que possam estar associados com as principais modificações trazidas pelo amadurecimento. Essas informações podem ser geradas através da medida das concentrações individuais de espécies de mRNA presentes nas amostras de estágios de desenvolvimento diferentes, cujas variações de expressão podem estar associadas com funções metabólicas específicas (KUHN, 2000). Através da análise de transcritos pode-se isolar novas seqüências e compará-las com outras já identificadas, auxiliando na determinação da função dessas novas seqüências. O isolamento de seqüências expressas em amostras sob condições específicas permite o sequenciamento e a comparação dessas sequências com outras já inseridas em bancos de dados como o

“GenBank”. E a partir dessa comparação é possível se ter uma visão mais abrangente sobre os padrões de expressão de genes envolvidos no processo em estudo.

Embora estudos dessa natureza já tenham sido realizados com a banana (CLENDENNEN; MAY, 1997; MEDINA-SUÁREZ, 1997) o número de genes com variação de expressão obtida foi relativamente baixo e também não houve coincidência entre todos resultados. Assim, considerando as grandes diferenças no fenótipo da banana verde e madura, é possível que as diferenças entre as informações obtidas por esses autores estejam relacionadas não só com alguns parâmetros do fruto analisado tais como cultivar, condições ambientais, estágio do amadurecimento, condições de armazenamento, etc, como também com o princípio da técnica utilizada para análise de expressão. Assim sendo, é possível acreditar que novos genes com variação de expressão durante o amadurecimento podem ser obtidos ao se aplicarem técnicas diferentes que permitam avaliar os transcritos nesse período.

Dentre as técnicas mais abrangentes que podem ser utilizadas no estudo do amadurecimento de frutos estão o “macroarray” e “microarray”, em que arranjos de seqüências de DNA são imobilizados e posteriormente hibridizados com uma amostra que se deseja comparar ou avaliar a variação de expressão (GIOVANNONI, 2004; KUHN, 2001). Nesse tipo de análise é possível comparar o perfil de expressão de um grande número de genes em paralelo. As mesmas seqüências imobilizadas podem ser hibridizadas diversas vezes com diferentes tipos de amostras marcadas, possibilitando análises de amostras em diferentes estágios de desenvolvimento. Posteriormente, o sinal que indica o grau de hibridização da amostra em que se deseja comparar com o DNA imobilizado é avaliado, para verificar se houve

ou não hibridização e em caso positivo pode-se determinar qual o grau de hibridização entre as duas amostras. Se houver hibridização, significa que a amostra em estudo apresenta seqüências similares às amostras imobilizadas e esse sinal pode ser quantificado. A escala do “macroarray” é menor, ou seja, o número de seqüências imobilizadas e o custo são significativamente mais baixos, não requerendo uma grande estrutura laboratorial para realizar a análise, porém o volume de resultados é extremamente menor quando comparado com o “microarray”. Já o “microarray” possibilita uma análise em maior escala, possibilitando a comparação de inúmeras seqüências ao mesmo tempo. Porém, essa técnica requer condições que elevam demasiadamente o gasto inicial a ser empregado com o ambiente controlado, equipamentos de alto custo e pessoal técnico especializado que acabam por impossibilitar o uso dessa técnica em diversos laboratórios. Além disso, um aspecto determinante para o sucesso dessas análises é que exista um significativo volume de informações gênicas de espécies disponíveis, como por exemplo, os bancos de EST (“expressed sequence tag”).

Sabendo que o controle da síntese de enzimas ou outras proteínas que estejam envolvidas na regulação pode resultar do controle de transcrição dos RNAm, técnicas que comparem os perfis de mRNA presentes em diferentes etapas do amadurecimento como pré-climatérico e climatérico, ou metodologias que avaliem mudanças significativas de expressão no fruto verde e maduro podem ser aplicadas na tentativa de identificar outros genes com variação de expressão no amadurecimento. Outras técnicas que podem ser utilizadas são aquelas que excluam ou subtraíam da análise os mRNA comuns em ambas etapas para que sejam analisados somente os mRNA característicos, ou exclusivos de uma etapa do amadurecimento.

Além do “macroarray” e “microarray”, outras técnicas que têm como princípio a análise de transcritos, mas que se baseiam em estratégias distintas, podem ser empregadas. São exemplos dessas técnicas a biblioteca de subtração de cDNA e o “differential display” RT-PCR (“reverse transcription polymerase chain reaction”), dentre outras que já foram aplicadas no estudo de variação de expressão gênica em plantas (JIANG et al., 2000; KUHN, 2000).

A biblioteca de subtração, por exemplo, foi utilizada na caracterização de genes reguladores que são expressos em óvulos de batatas após fertilização (GERMAIN et al, 2005), na avaliação das alterações de expressão em tecidos de polpa de manga normais e com lesões (VASANTHAIAH, 2006), na caracterização de transcritos que são diferentemente expressos em folhas de macieira resistentes ao ataque de um patógeno, *Venturia inaequalis* (DEGENHARDT et al, 2005), na identificação e caracterização de genes diferentemente expressos na resistência de trigo infectado com *Tilletia tritici* (LU et al, 2005) e na identificação e caracterização de um cDNA expresso em laranja “Valência” que codifica uma lipoproteína de transferência durante abscisão (WU; BURNS, 2003), entre outros trabalhos.

Outra técnica, empregada no estudo de plantas foi o “differential display” RT-PCR, o qual possibilita a comparação de dois ou mais perfis de transcrição que se deseja avaliar, extrair e analisar aquelas sequências em que haja variação de expressão. O “differential display” RT-PCR foi empregado para isolar e caracterizar um gene similar a taumatina em pimentas (KIM et al, 2002), na caracterização de genes que respondem ao etileno em tomates e outros genes envolvidos no amadurecimento do tomate em trabalho realizado por Zegouti et al (1999), na identificação de genes de

defesa contra o ataque do fungo *Botrytis cinerea* em tomates desenvolvido por Campy e Gonzalez-Bosch (2003) e na identificação de genes com variação de expressão em folhas de *Citrus unshiu* expostas ao frio por Lang et al (2005), etc.

Essas metodologias também diferem, em geral, quanto ao número de transcritos obtidos e a sensibilidade. Assim, considerando as diferenças entre as metodologias, o emprego de mais de uma técnica na análise das mesmas amostras, pode proporcionar um efeito complementar, uma vez que um gene obtido em uma metodologia pode não ser identificado por outra. Enfim, a aplicação de mais de uma metodologia, com princípios e sensibilidades diferentes, aumentaria a possibilidade de se identificar novos genes com variação de expressão que estejam envolvidos no amadurecimento da banana.

Assim, técnicas de análise diferencial podem ser aplicadas para fornecer informações que auxiliem no melhor entendimento dos mecanismos de regulação das vias metabólicas, afetados durante o amadurecimento. Futuramente, é possível que esse conhecimento possa auxiliar no entendimento da regulação de aspectos bioquímicos importantes para a qualidade do fruto, que poderão ser controladas através de manipulação gênica, seja para a obtenção de características desejáveis no aspecto produtivo, como resistência a organismos patogênicos e à injúrias mecânicas (reduzindo perdas no pré e pós-colheita), seja na modificação de características organolépticas desejáveis que tenham impacto na qualidade percebida pelo consumidor, como realce de sabor e aroma, ou mesmo em um incremento do valor nutricional.

4. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi identificar genes com variação de expressão durante o amadurecimento da banana, utilizando duas técnicas distintas, o “differential display” RT-PCR e a biblioteca de subtração de cDNA.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Frutos

Os frutos de bananeira (*Musa acuminata*), cultivar Nanicão, foram obtidos no mercado local, com no máximo um dia após a colheita. Parte das amostras recebidas foi denominada como frutos pré-climatéricos, as bananas foram descascadas e as polpas foram fatiadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C . A outra parte das amostras foi sub-dividida em duas frações denominadas: controle e etileno. A fração etileno foi exposta a etileno exógeno por 12h, a concentração de 100 ppm e em um fluxo de 7L/min. A seguir, ambas amostras foram acondicionadas em câmara sob condições controladas, onde a temperatura foi mantida a 20°C e umidade a 75 % até completa maturidade. O amadurecimento foi acompanhado pela medida diária da respiração e da produção de etileno por cromatografia gasosa acoplada com detector de ionização de chama para etileno (FID) e detector de condutividade térmica para CO_2 (TCD) de acordo com Purgatto et al (2002). Ao longo do climatério foram tomadas amostras dos frutos, as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C . Desse modo foram preparadas duas amostras, representativas de frutos pré-climatéricos e climatéricos, para comparações dos perfis de transcritos. Para as técnicas utilizadas nesse trabalho foram analisados dois perfis de amostras, coletadas em anos diferentes, respeitando os procedimentos já descritos. A primeira coleta foi feita para a técnica de “differential-display” RT-PCR e a segunda coleta foi utilizada para a biblioteca de subtração de cDNA e para as análises de “northern-blotting”. Como bananas do mesmo cultivar, mas de colheitas diferentes foram utilizadas no decorrer dos experimentos, se fez

necessária à adoção de um critério para homogeneizar as seleções das amostras utilizadas nas técnicas do presente trabalho. O critério teve como parâmetro o pico climatérico das bananas analisadas. Na seleção de amostras, as denominadas pré-climatéricas foram aquelas com no máximo um dia pós-colheita, coletadas antes do período pré-climatérico e as climatéricas foram aquelas coletadas logo após os picos respiratório e de etileno.

5.2. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de bananas pré-climatéricas e climatéricas com base no protocolo descrito por Lopez-Gómez & Gómez-Lim modificado (1992). A partir de 3g de amostra congelada triturada com gral e pistilo em nitrogênio líquido foram adicionados 10 mL de solução extratora consistindo de Tris-borato 150 mM (pH 7,5), EDTA a 50 mM, 2% de SDS e 1% de mercaptoetanol. A homogeneização foi feita com pistilo até que o material descongelasse. A seguir, o extrato foi centrifugado e ao sobrenadante retirado foram adicionados 1,1 mL de acetato de potássio 5 M e 2,5 mL de etanol absoluto. O sobrenadante foi extraído sucessivamente, após cada centrifugação, com 10mL de clorofórmio gelado, 10 mL de fenol:clorofórmio (1:1) e 10 mL de clorofórmio. Todas as centrifugações foram a 4 °C por 10 min a 12000 X g. A fase aquosa foi coletada e o volume foi medido. A partir desse volume, foram adicionados 0,42 volumes de solução de cloreto de lítio 10 M e a solução foi mantida a -20 °C por 15 horas para precipitação do RNA total.

Após esse período, a solução contendo RNA total foi centrifugada por 1 hora a 12000 X g e o precipitado foi retomado em 2mL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, 0,1 mM EDTA pH 8). O RNA foi então precipitado pela adição de 6 mL de etanol

absoluto e 200 μ L de solução de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e incubado a -20°C por 2 horas. A recuperação do RNA foi feita por centrifugação a 4°C por 1 hora a 12000 X *g* e depois disso o RNA precipitado foi solubilizado em 200 μ L de TE.

5.3. Quantificação de RNA e DNA

Para determinar a concentração do RNA extraído, foram feitas leituras de alíquotas do RNA obtido de frutos pré-climatéricos e climatéricos em espectrofotômetro a 260 nm (A_{260}), considerando que 1 unidade densidade de ótica a 260 nm corresponde a 40 μ g de RNA por mL. A relação entre as leituras a 260 nm e 280 nm fornece uma estimativa da pureza do RNA extraído em relação a contaminantes como proteínas. No caso do RNA a relação adequada deve variar entre 1,8 e 2,0, e o valor mais próximo de 2,0 indica uma maior pureza (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforeses em gel de agarose com brometo de etídeo, e a visualização das bandas correspondentes as frações 18S e 28S do RNA foram visualizadas em trans-iluminador UV. Na quantificação de DNA plasmidial, 1 unidade de densidade ótica a 260 nm corresponde a 50 μ g de DNA por mL e o valor da relação entre as leituras 260 nm e 280 nm também varia entre 1,8 e 2,0, sendo que o valor adequado é o mais próximo de 1,8 (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

5.4. Eletroforese em gel de agarose

As separações de RNA e cDNA foram feitas por eletroforese em gel de agarose (1 a 2 %) em tampão TPE [Tris-fosfato a 0,09 M (pH 7,5) e EDTA a 0,002 M] com adição de brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL, para permitir a visualização das

bandas sob luz ultra-violeta. A tensão aplicada na eletroforese foi de 80 volts por 15 a 30 min.

5.5. Síntese da fita-única de cDNA

Para a síntese da fita-única de cDNA foram utilizados 5 µg de cada RNA total de cada amostra, pré-climatéricas e climatéricas, extraído e quantificado segundo item 5.2. O preparo da fita-única de cDNA foi feito utilizando o kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen) seguindo o protocolo do fornecedor.

5.6. Síntese de cDNA dupla-fita

A dupla-fita foi feita adicionando-se à reação obtida na etapa anterior 4ng/µl de “primers” hexaméricos de seqüências aleatórias e DNA polimerase I. A dupla-fita foi sintetizada utilizando 10 U de enzima DNA polimerase I em tampão TRIS-HCL 20 mM (pH 7,5) contendo dNTP 0,2mM, KCl 75 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgCl₂ 5 mM e DTT 1 mM em um volume final de 300 µl.

5.7. Purificação de RNA poli A⁺ a partir de RNA total

Para a obtenção de 10 µg da fração poli A⁺ do RNA de bananas pré-climatéricas e climatéricas utilizou-se cerca de 1 mg de RNA total de cada amostra para a purificação com o kit “PolyATtract® System 1000” (Promega), que tem como princípio a hibridização de nucleotídeos oligo(dT) biotinilados com a cauda poli A⁺ do mRNA. Em seguida esses híbridos foram capturados usando estreptavidina ligada às partículas paramagnéticas. Essas partículas ao se aproximarem de uma estante de separação imantada ficaram concentradas na parede do tubo e após sucessivas

lavagens com solução 0,5 X SSC (NaCl a 0,075 M e citrato de sódio a 7,5 mM) o mRNA foi eluído das partículas pela adição de água.

5.8. “Differential display” RT-PCR

A análise por “differential display” RT-PCR utilizada foi baseada em um protocolo modificado, descrito por Diachenko et al. (1996). O resumo esquemático da técnica está apresentado na Figura 1.

Inicialmente foram feitas reações de amplificação por PCR utilizando diluições da fita-única de cDNA equivalente a 1 ng/1µL de amostras de RNA total de bananas pré-climatéricas e climatéricas. As reações tiveram volume final de 10 µL e as concentrações dos reagentes foram: 1 µM de uma combinação distinta de cada “primer” P e T, dNTP 50 µM, α -[³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol) 50 nM, 1 unidade *Taq* DNA Polimerase Recombinante, MgCl₂ 3,5 mM, em tampão Tris-HCl 20mM (pH 8,4) e KCl 50 mM. Para evitar evaporação e alteração na concentração dos reagentes das reações foram adicionados 10 µL de óleo mineral à superfície das misturas de reação. Os primers utilizados nas reações de PCR estão apresentados a seguir.

“Primers” senso arbitrários

- P1 5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATG CTG GGG A-3'
- P2 5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATC GGT CAT AG-3'
- P3 5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATG CTG GTG G-3'
- P4 5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATG CTG GTA G-3'
- P5 5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGA TCT GAC TG-3'
- P6 5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATG CTG GGT G-3'
- P7 5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATG CTG TAT G-3'
- P8 5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATG GAG CTG G-3'
- P9 5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATG GGC AGG-3'
- P10 5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGC ACC GTC C-3'
- P11 5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATG TGG GAG C-3'

Figura 1. Resumo esquemático da técnica "differential display" RT-PCR

“Primers” reversos

T1	5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TAA-3'
T2	5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TAC-3'
T3	5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TAG-3'
T4	5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TCA-3'
T5	5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TCC-3'
T6	5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TCG-3'
T7	5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TGA-3'
T8	5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TGC-3'
T9	5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TGG-3'

Os “primers” senso arbitrários utilizados apresentaram um tamanho entre 24 a 26 bases e têm as 16 bases da porção 5' iguais, diferindo entre si nas bases próximas às regiões 3'. Já os “primers” reversos possuíam um tamanho de 30 bases sendo que somente as duas bases mais próximas à região 3' variaram.

Os parâmetros de temperatura e tempo da reação de PCR foram: 1 ciclo a 94°C por 5 min, 40°C por 5 min e 72°C por 5 min; 2 ciclos a 94°C por 2 min, 40°C por 5 min e 72°C por 5 min e 22 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 2 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 7 min. Nos 22 ciclos finais foi utilizada uma temperatura mais elevada para aumentar a estringência na amplificação dos produtos de reação obtidos nos três ciclos iniciais da reação de PCR; assim, pode-se conseqüentemente aumentar a especificidade dos produtos de reação obtidos.

Ao término das reações foram adicionados 4,5 µL de uma solução desnaturante contendo 97% de formamida, 0,3% de azul de bromofenol, 0,3% de xileno cianol e EDTA 10 mM. Essas reações foram desnaturadas a 85 °C por 2 min e resfriadas em gelo, antes da aplicação em duplicata de 3 µL nos géis de poliacrilamida.

Os produtos de reação de amplificação de cDNA, utilizando os “primers” P e T, obtidos a partir de cDNA de bananas pré-climatéricas e climatéricas foram aplicados em duplicata lado a lado no gel para facilitar a comparação e a seleção das bandas presentes. As separações dos produtos das reações de amplificação foram feitas por eletroforese em géis de poliacrilamida a 5% com espessura de 0,3 mm, contendo 8M de uréia em tampão TBE (Tris-borato 0,045 M e EDTA 0,001 M), também usado como tampão de corrida na cuba Sequi-Gen® II 38 X 50 cm (Biorad). Para atingir a temperatura constante a 50 °C durante a corrida de separação foi aplicada 120 W potência por 3 horas. Em cada gel foram feitas 18 separações de produtos de reação de PCR, já que para cada par de amostras, derivada de banana pré-climatérica e climatérica, a reação de PCR teve o “primer” P fixado, e esse foi combinado com 9 “primers” T diferentes.

Após as separações eletroforéticas, os géis foram retirados da cuba de corrida e transferidos para folhas de papel 3MM (Whatman), que serviram como suporte. Em seguida os géis foram embalados cuidadosamente com filmes plásticos de PVC para evitar possíveis quebras, já que o gel era muito frágil devido a sua fina espessura. O gel foi acondicionado em cassete, para exposição ao filme de Raio-X e deixado a -80 °C por 16 horas. No decorrer desse período ocorreu a sensibilização do filme pela emissão radiotiva do material incorporado nos produtos de reação. Após esse período, os filmes foram revelados para a visualização das bandas correspondentes aos cDNA marcados radioativamente. A partir das comparações entre as marcações no filme foi possível avaliar os possíveis fragmentos diferentemente expressos.

5.8.1. Isolamento e re-amplificação dos fragmentos de DNA

O critério utilizado na seleção dos fragmentos foi, principalmente, a diferença entre a intensidade das bandas que foi avaliada através do filme por autoradiografia. Para isso, foi feita uma comparação entre corridas correspondentes, uma proveniente da amostra pré-climatérica e a outra da amostra climatérica, já que os produtos de reação de PCR das duas amostras foram aplicadas lado a lado. Deste modo a única diferença entre o par de amostras foi a origem do cDNA utilizado. O filme revelado serviu como referência para a localização das bandas selecionadas indicando o posicionamento dessas amostras no gel pelo alinhamento com o filme. A visualização das bandas foi feita com luz visível emitido por um trans-iluminador que foi colocado sob o filme.

A seguir, as bandas contendo os fragmentos de cDNA foram recortadas com o uso do bisturi e transferidas para tubos contendo 200 μ L de tampão TE [Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 0,1 mM (pH 8,0)]. A eluição desses fragmentos de DNA foi feita a 92°C por 15 min. A solução contendo os fragmentos foi diluída 5 vezes, sendo adicionados 2,5 μ L dessa solução à reação de PCR. A amplificação dos fragmentos foi feita por PCR com os mesmos pares de “primers” utilizados na produção da banda selecionada. A reação de PCR foi feita com as seguintes concentrações finais de reagentes em 50 μ L de solução: “primers” P e T 1 μ M, dNTP 50 μ M de cada nucleotídeo, 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase Recombinante, MgCl₂ 3,5 mM, em tampão Tris-HCl 20mM (pH 8,4) e KCl 50 mM. Foram empregadas as seguintes condições de temperatura e tempo nos 25 ciclos de reação: 94°C por 1 min, 60°C por 1

min, 72°C por 2 min. Quando a re-amplificação dos fragmentos não foi obtida com a diluição 5 vezes, foram feitas outras tentativas de re-amplificação com duas diluições: 1 e 10 vezes.

5.9. Biblioteca de subtração

A construção da biblioteca de subtração de cDNA foi feita a partir do cDNA preparado com kit “Clontech PCR-Select cDNA Subtraction” (Clontech). O resumo esquemático está na Figura 2. A biblioteca de subtração de cDNA foi empregada para a identificação de genes com aumento de expressão em bananas climatéricas.

5.9.1. Síntese de cDNA fita-única e dupla-fita de amostra “tester” e “driver”

A biblioteca de subtração de cDNA tem como princípio a hibridização de duas amostras distintas de cDNA para posterior seleção dos elementos presentes em apenas uma delas. A população de cDNA que contém os transcritos exclusivos dessa amostra e que se deseja identificar é chamada “tester” e a população de cDNA de referência para comparação, na qual os transcritos de interesse não estão presentes ou presentes em muito menor quantidade, é chamada de “driver”. A amostra “tester” foi proveniente de RNA poli A⁺ de bananas climatéricas e a amostra “driver” de bananas pré-climatéricas.

Para a construção da biblioteca de subtração, inicialmente o RNA total de bananas pré-climatérica e climatérica foi extraído e quantificado de acordo com o protocolo descrito no item 5.2. Para as preparações das amostras de cDNA “tester” e “driver” foram utilizados 2 µg de poli A⁺, purificado do RNA total de cada amostra, e a preparação foi feita segundo item 5.6. A síntese da fita-única de cDNA foi feita conforme mencionado no item 5.5. e a dupla-fita de cDNA de acordo com o item 5.6.

Figura 2. Resumo esquemático da técnica biblioteca de subtração de cDNA

5.9.2. Digestão com *Rsa* I e ligação do adaptador na amostra “tester”

A enzima de restrição *Rsa* I utilizada na digestão do cDNA e os adaptadores foram fornecidos com o kit “Clontech PCR-Select cDNA Subtraction” (Clontech) e o procedimento utilizado foi o descrito pelo fabricante.

Tanto o cDNA “tester” proveniente de RNA de bananas climatéricas quanto o “driver” derivado de bananas pré-climatéricas foram digeridos com a enzima *Rsa* I (sítio de clivagem: GT↓AC). Porém, após a digestão, somente a amostra “tester” foi subdividida em duas alíquotas e cada uma delas foi ligada à adaptadores diferentes (adaptador 1 e adaptador 2). A enzima utilizada na ligação foi a T4 DNA ligase, seguindo as condições de reação recomendadas pelo fabricante do kit. As seqüências dos adaptadores estão apresentadas a seguir:

Adaptador 1 5'– CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT–3'

Adaptador 2 5'– CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAG CGT GGT CGC GGC CGA GGT–3'

Nas amostras “driver” as extremidades de cDNA digeridas com a enzima de restrição *Rsa* I não foram ligadas com os adaptadores.

5.9.3. Hibridizações

Nessa etapa foram feitas duas hibridizações, sendo que na primeira delas cada uma das duas amostras de cDNA de banana climatérica “tester”, já subdivididas para a ligação com adaptadores diferentes (1 ou 2) na etapa anterior, foram hibridizadas separadamente com amostras de cDNA de banana pré-climatérica (“driver”) em excesso, resultando na primeira subtração. Na segunda

hibridização, as duas alíquotas do “tester” da primeira hibridização foram misturadas e, novamente, uma quantidade de “driver” foi adicionada em excesso a essa mistura, para uma nova subtração de genes comuns a ambos os estágios fisiológicos. As quantidades e concentrações dos reagentes utilizados foram feitas conforme o manual fornecido com o kit “Clontech PCR-Select cDNA Subtraction” (Clontech).

5.9.4. Amplificação por PCR

Nessa etapa foram feitas duas reações de PCR com uma alíquota da segunda subtração. Na primeira reação, denominada PCR-1, utilizou-se o “primer 1”, que possui uma região de pareamento comum aos dois adaptadores ligados anteriormente. A segunda reação, denominada PCR-2, teve como molde uma alíquota diluída da PCR-1 que continha fragmentos de cDNA já amplificados. Na segunda reação (PCR-2), foram utilizados dois “primers”: “nested primer 1” e “nested primer 2”. As seqüências dos “primers” utilizados estão apresentadas a seguir:

PCR primer 1	5'– CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
Nested PCR primer 1	5'– TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T-3'
Nested PCR primer 2	5'– AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT-3'

Os reagentes e as quantidades utilizadas seguiram as recomendações do kit “Clontech PCR-Select^{TM} subtraction kit” (Clontech). Na PCR-1 os parâmetros empregados foram: incubação a 75 °C por 5 min, 94 °C por 30 s; 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 66 °C por 30 s e 72 °C por 1,5 min seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os parâmetros utilizados na PCR-2 foram: incubação a 75°C por 5 min, 20 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1,5 min seguido de uma extensão final de 72 °C por 5 min.

5.10. Purificação dos fragmentos de DNA

As reações de amplificação foram separadas por eletroforese de acordo com o item 5.3. Além das reações foi também adicionado no gel o padrão 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), que serviu como uma referência para determinar o tamanho dos fragmentos separados. A seguir, a região do gel contendo os fragmentos de cDNA superiores a 100 bp foi recortada, transferida para tubos e os cDNA foram purificados usando o Kit de purificação “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (Amersham Biosciences). Para a eluição usou-se tampão TE [Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 0,1 mM (pH 8,0)].

5.11. “Northern-blotting” reverso.

A aplicação do “differential display” RT-PCR permitiu isolar várias bandas selecionadas com potencial variação de expressão, devido ao grande número de combinações de “primers” testados. No entanto, uma vez que essa metodologia pode originar resultados falso-positivos (DIACHENKO et al., 1996, DONSON et al, 2002, MATZ; LUKYANOV, 1998) foi necessária a confirmação das bandas selecionadas como diferentemente expressas. A técnica empregada para essa confirmação foi a de “northern-blotting” reverso.

Para aplicar o “northern-blotting” reverso foi necessário fazer primeiramente a transferência do cDNA das amostras a serem testadas para uma membrana. Para tanto, alíquotas de cDNA de bandas diferentemente expressas foram

amplificadas, purificadas e adicionadas a duas membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Biosciences). A transferência dessas alíquotas foi feita utilizando o Bio-Dot® (Bio-Rad), que permite a transferência simultânea de até 96 amostras, em um arranjo compatível com uma placa de microtitulação com 8 linhas e 12 colunas. Nessa etapa o cDNA foi fixado às membranas de nylon para serem posteriormente hibridizadas com sondas produzidas a partir de cDNA de bananas pré-climatéricas e climatéricas.

Para a transferência, as soluções contendo os cDNAs foram aquecidas a 95 °C por 5 min, resfriadas em gelo por 3 min e a seguir foram adicionados volumes iguais de solução 20 X SSC (NaCl a 3 M e citrato de sódio a 0,3 M). As membranas foram previamente umedecidas com solução 10 X SSC (NaCl a 1,5 M e citrato de sódio a 0,15 M). Em seguida, foram tratadas com solução desnaturante contendo NaCl a 1,5 M e NaOH a 0,5 M por 5 min e neutralizadas com solução de NaCl a 1,5M, Tris-HCl 0,5 M (pH 7,2) e EDTA 0,001 M por 1 min. Após secagem das membranas a temperatura ambiente por 5 min, os cDNAs foram fixados permanentemente às membranas, aplicando-se luz ultravioleta 120mJ/cm² através do “cross-linker” UVC 500 (Hoefer).

Para o “northern-blotting” reverso, uma das membranas do par de duplicatas foi hibridizada com sonda de cDNA radioativa produzida a partir do RNA total dos frutos pré-climatéricos enquanto a outra membrana foi hibridizada com a sonda proveniente de frutos climatéricos. Para o preparo de cada sonda de cDNA foram utilizados 25 µg de RNA total e 2µg de Oligo (dT)₁₂₋₁₈, em um volume de 25µL em água tratada com DEPC. Essa solução foi desnaturada a 65°C por 3 min e foram

adicionados 35 μL de uma mistura contendo MgCl_2 7 mM, 1,7 unidades de RNAout^{TM} (Inibidor recombinante de ribonuclease), DTT 1,5 mM, dATP 1,5 mM, dGTP 1,5 mM, dCTP 1,5 mM de cada, α -[³²P]-dCTP 0,5 Ci/ μM , 2,8 U de transcriptase reversa em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) e KCl 50 mM. A reação foi incubada a 42 °C, por 50 min e ao término desse período, foram adicionados 2 μL de dCTP 25mM, sendo a solução re-incubada a 42°C por 45 min e a reação foi finalizada pelo aquecimento a 70 °C por 15 min. Após resfriamento em gelo foram adicionadas 3 unidades de RNase H de *E. coli* e foi feita a incubação a 37 °C por 20 min para a eliminação de RNA remanescente.

As sondas foram purificadas por filtração em gel em colunas contendo Sephadex G-50 (Amersham Biosciences) para a remoção dos nucleotídeos marcados não-incorporados. A seguir, as reações foram desnaturadas por aquecimento a 100 °C por 5 min e mantidas em gelo por 5 min, antes da adição às soluções de hibridização.

Cada uma das duas membranas foi acondicionada em um frasco, onde foi feita a pré-hibridização por 1 h a 65 °C em 15 mL de solução de hibridização constituída por 5 X SSC (NaCl a 0,75 M e citrato de sódio a 0,075M), 5 X Denhardt's (0,1% de albumina bovina sérica, 0,1% de ficol e 0,1% de PVP-90), 0,5 % de SDS e 0,4mg de DNA de Salmão. Após a pré-hibridização, as soluções foram descartadas e substituídas por igual volume da mesma solução para a adição de sondas provenientes de RNA de amostras de bananas pré-climatéricas e climatéricas, que foram adicionadas em cada um dos dois frascos. A incubação foi feita a 65 °C durante 16 horas.

Depois das incubações as membranas foram lavadas segundo protocolo da membrana Hybond N+ (Amesham Biosciences) e expostas a filmes de raios-X de acordo com SAMBROOK; FRITSCH e MANIATIS (1989). Os filmes expostos às membranas foram revelados e as comparações entre os sinais das hibridizações com os dois tipos de cDNA marcados no filme foi feita posteriormente, pela análise densitométrica.

5.12. Análise densitométrica.

As imagens dos filmes foram digitalizadas para serem comparadas por densitometria. As regiões das membranas que hibridizaram com os cDNA marcados formaram manchas circulares com coloração mais intensa, sendo que a intensidade dessa marcação foi proporcional à quantidade da sonda hibridizada à membrana.

Para quantificar os sinais presentes nas imagens provenientes das marcações da hibridização com cada sonda, foram calculados os “volumes de marcação” com o uso do programa “Molecular Analyst^{TM} / PC” (Bio-rad), para a análise dos dados. O “volume de marcação” é a razão entre a área de marcação e a densidade ótica. O valor de fundo da imagem da membrana foi descontado, para minimizar possíveis interferências nos valores obtidos para cada ponto.

Para avaliar as diferenças de sinais de marcação de um mesmo ponto hibridizado, com cada sonda de cDNA proveniente de bananas pré-climatéricas ou climatéricas, foi feita a razão entre os valores dos “volumes de marcação”. A

amostra foi considerada como diferentemente expressa quando a relação entre esses valores “volumes de marcação” derivados de amostras foi superior a 0,5.

5.13. Clonagem

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose, purificados com o “GFX gel band purification kit” (Amersham biosciences) e as bandas selecionadas foram clonadas, utilizando o kit “TOPO TA Cloning® for Sequencing” (Invitrogen) ou kit “pGEM® -T” ou o kit “pGEM® -T Easy Vector Systems” (Promega).

As ligações entre os vetores e os fragmentos de DNA e a clonagem foram feitas de acordo com as instruções dos manuais fornecidos com os kits. As transformações das bactérias foram feitas segundo Clark (1996). As bactérias (*E.coli*) já transformadas foram pré-incubadas sob agitação mínima a 37 °C por 1 hora em meio LB (1% de NaCl, 1% de triptona e 0,5% de extrato de levedura) com ampicilina 50 µg/mL. Após esse período as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar 2% com a mesma concentração de ampicilina do meio da pré-incubação. À superfície das placas foram incorporados 100µl de IPTG 100mM e 20µl de X-Gal 50mg/ml e, posteriormente, as mesmas placas foram incubadas por 16h a 37°C.

Após o período de incubação algumas colônias formadas na superfície da placa foram selecionadas, transferidas para tubos contendo 5 mL de LB-ampicilina e submetidas a incubação a 37°C por 16h. Em seguida foi feita a purificação do DNA plasmidial utilizando o Kit “QIAprep Spin Miniprep” (QIAGEN). Para determinar

a concentração do DNA extraído foi feita a quantificação do DNA plasmidial como descrito no item 5.3.

Para avaliar os tamanhos dos insertos nos plasmídeos foi feita uma reação de PCR com “primers” M13 senso e reverso do kit de clonagem utilizado “TOPO TA Cloning® for Sequencing” (Invitrogen) ou kit pGEM® -T ou o kit “pGEM® -T Easy Vector Systems” (Promega). Em seguida foi feita uma eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR com a adição do padrão 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), que serviu como um indicador para a determinação dos tamanhos dos insertos. Os valores dos tamanhos dos insertos foram usados no cálculo da quantidade de amostra a ser tomada para a reação de sequenciamento.

5.14. Sequenciamento

O seqüenciamento dos clones foi feito em seqüenciador automático DNA ALFexpress™ II (Amersham Biosciences) por separação eletroforética em gel de poliacrilamida. A marcação fluorescente das moléculas de DNA foi feita com o kit “Thermo Sequenase Cy5 Dye terminator Sequencing” (Amersham Biosciences). Os géis foram feitos com reagente comercial Reprogel™ (Amersham Biosciences) para eletroforese em gel de poliacrilamida. As reações e os géis de sequenciamento foram feitos de acordo com o protocolo fornecido com os kits. No preparo das reações para aplicação no gel de sequenciamento foram utilizados 250 fmol de cada clone.

As condições de separação empregadas no seqüenciador foram: tempo de corrida 700 min, voltagem 1500 V, corrente 60 mA, potência 25 W e

temperatura 55°C. Para análise das seqüências e controle das condições da corrida de separação foi utilizado o programa “ALF Win Sequence Analyser 2.11” (Amersham Biosciences).

Os dados do sequenciamento dos clones provenientes de bananas pré-climatéricas e climatéricas foram comparados com as seqüências disponíveis no banco de seqüências de DNA, “GenBank” (BENSON et al 2000), por meio do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) segundo Altschul et al (1990), disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

O programa clustalX (THOMPSON et al, 1997) foi empregado para alinhar seqüências com variação de expressão em banana com outras seqüências obtidas a partir dos resultados do BLAST. Os aminoácidos correspondentes a cada códon foram obtidos pelo programa Clone Manager versão 4.0

5.15. “Northern-blotting”

Além das seqüências obtidas pela biblioteca de subtração de cDNA, duas seqüências obtidas por “differential display” RT-PCR tiveram a expressão confirmada por “northern-blotting”.

Os “northern-blotting” foram feitos de acordo com SAMBROOK; FRITSCH e MANIATIS (1989). O RNA de bananas 1, 3 e 7 DPC, provenientes da segunda coleta de frutos, foi extraído e quantificado de acordo com o item 4.2. e a quantidade de cada RNA utilizada foi de 10 µg para a separação eletroforética em gel de agarose-formaldeído em tampão MOPS (3-[N-morpholino ácido propanesulfônico]) 1

M, acetato de sódio 40 mM, EDTA 5mM (pH 8). A membrana utilizada foi a Hybond N+ (Amersham Biosciences) e a transferência do RNA foi feita por capilaridade segundo SAMBROOK; FRITSCH e MANIATIS (1989). As fixações do RNA às membranas foram feitas com aplicação de luz UV segundo o protocolo do fornecedor. As sondas foram feitas a partir de 25ng de DNA dos fragmentos de interesse utilizando o kit "Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads" (-dCTP) (Amersham Biosciences) e seguindo o seu protocolo de preparo. As sondas foram purificadas em colunas de filtração em gel contendo Sephadex G-50 (Amersham Biosciences) e antes de serem adicionadas na solução de hibridização foram desnaturadas por aquecimento a 98 °C por 5 min e mantidas em gelo até o seu uso. As membranas permaneceram por uma hora a 65 °C em 15 mL de solução de pré-hibridização contendo 5 X SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M) 5 X Denhardt's (0,1% de albumina bovina sérica, 0,1% de ficol e 0,1% de PVP (polivinil pirrolodona-90), 0,5 % de SDS e 0,4mg de DNA de Salmão para hibridização (Sigma). Após esse período, a solução foi substituída por igual volume da mesma solução utilizada na pré-hibridização. A essa solução foi então adicionada a sonda e o período de hibridização foi de 16 h. As membranas foram lavadas inicialmente por incubação duas vezes usando 40 mL de uma solução 2 X SSC (NaCl 0,3 M, citrato de sódio 0,03 M), 0,1 % SDS por 10 min a 25 °C, seguida de uma lavagem com 40mL de solução 1 X SSC (NaCl 0,15 M, citrato de sódio 0,015 M) e 0,1% SDS incubado por 15 min a 65 °C. As revelações dos filmes expostos às membranas foram feitas segundo SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS (1989).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Amostragem de bananas

6.1.1. Primeira amostragem de bananas

O RNA extraído na primeira amostragem de bananas foi utilizado na técnica de “differential-display” RT-PCR. As amostras pré-climatéricas utilizadas foram aquelas com no máximo 1 DPC (dia pós-colheita). As amostras climatéricas utilizadas para a aplicação da técnica de “differential-display” RT-PCR foram amadurecidas naturalmente. As informações contidas na Figura 3 exemplificam as tomadas de amostras para a técnica “differential display” RT-PCR, as amostras climatéricas utilizadas foram coletadas com 17 DPC, conforme o critério de seleção adotado mencionado no item 5.1.

Figura 3. Parâmetros fisiológicos durante o amadurecimento da banana. As bananas utilizadas na técnica de “differential display” RT-PCR foram expostas ao etileno endógeno. A produção de CO₂ na respiração (A) e etileno (B) foi monitorada diariamente até o completo amadurecimento. As amostras pré-climatéricas foram aquelas com 1 DPC e as climatéricas foram aquelas com 17 DPC.

6.1.2. Segunda amostragem de bananas

O RNA utilizado na técnica da biblioteca de subtração de cDNA foi obtido através de uma segunda amostragem de bananas. As amostras climatéricas utilizadas para a aplicação da técnica da biblioteca de subtração de cDNA, foram expostas ao etileno exógeno a 100 ppm e com um fluxo de 7L/min. As amostras pré-climatéricas utilizadas foram aquelas com no máximo 1 DPC (dia pós-colheita). A Figura 4 mostra as informações referentes a segunda tomada de amostras, as amostras climatéricas utilizadas na técnica de subtração de cDNA foram coletadas com 7DPC, conforme critério de seleção mencionado no item 5.1.

Figura 4. Parâmetros fisiológicos durante o amadurecimento da banana. As bananas utilizadas na técnica de biblioteca de subtração de cDNA foram expostas a etileno exógeno (100 ppm). A produção de CO_2 na respiração (C) e de etileno (D) foi monitorada diariamente até o completo amadurecimento. As amostras pré-climatéricas foram aquelas com no máximo 1 DPC e as climatéricas foram aquelas com 7 DPC.

6.2. Extração de RNA total

Certos estados fisiológicos como crescimento ou desenvolvimento apresentam elevada atividade metabólica e nesses processos acontecem diversas alterações em um curto período de tempo. Nesses períodos, incrementos na síntese de RNA são necessários para suprir necessidades aumentadas de síntese protéica característica desses processos bioquímicos. Assim, a partir da extração de RNA, pode-se obter um perfil de transcritos e obter informações a respeito da variação de expressão para atender as necessidades requeridas durante esses processos fisiológicos. No entanto em termos práticos ao se considerar tecidos vegetais, a extração de RNA pode ser dificultada pela existência de grande quantidade de carboidratos, polifenóis ou outros compostos que se liguem ou co-precipitem com o RNA (LOPEZ-GÓMEZ & GÓMEZ-LIM, 1992). Os compostos fenólicos são oxidados facilmente formando quinonas que se ligam a ácidos nucleicos, neste caso o RNA se torna inadequado (degradado) para se fazer a transcrição reversa (SALZMAN et al., 1999). A qualidade do RNA extraído é essencial para uma boa transcrição reversa, e essa transcrição deve realmente refletir quantidades e diferenças presentes nas duas amostras de RNA de banana em análise, pois os resultados do presente trabalho foram obtidos a partir dessa comparação.

A integridade do RNA total extraído foi avaliada através das bandas ribossomais características que puderam ser visualizadas após a separação por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. O RNA total é constituído em sua maior fração de RNA ribossomal, seguido de RNA transportador e somente uma pequena porção de

1 a 5 % constitui o mRNA. Assim, alíquotas de RNA total extraído de bananas pré-climatéricas e climatéricas foram aplicadas em gel de agarose para a eletroforese. O resultado foi a presença de duas bandas bem definidas características do RNA ribossomal, a 18S e a 28S, que são mostradas na Figura 5. Além disso, a intensidade das bandas do RNA extraído foi similar tanto para amostras extraídas de frutos pré-climatéricos quanto de climatéricos. Esse é um fato importante a ser considerado, a fim de que as diferenças encontradas entre as duas amostras em etapas subsequentes do trabalho fossem referentes a alterações nos dois estágios em estudo, e não às diferenças nas quantidades iniciais de RNA utilizada, ou a presença de interferências provenientes da degradação do RNA, por exemplo.

A relação entre a leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda a 260 e 280 nm foi dentro da faixa esperada de 1,8 a 2,0. A partir da leitura foi possível quantificar as extrações de RNA, cuja média foi de 90 $\mu\text{g/g}$ de polpa de banana.

Figura 5. Eletroforese de RNA total de bananas pré-climatéricas (PrC) e climatéricas (C) em gel de agarose 1,5%. As alíquotas de RNA PrC e RNA C foram aplicadas lado a lado no gel de agarose. As duas bandas visíveis são características de RNA ribossomal (18S e 28S). A boa definição das mesmas no gel é indicadora da integridade do RNA extraído.

6.3. “Differential Display” RT-PCR

A primeira técnica escolhida para isolamento e identificação de genes diferentemente expressos no estudo do amadurecimento da banana foi o “differential display” RT-PCR. Os resultados já obtidos por outros autores mostram que essa técnica é uma importante ferramenta usada na investigação de genes raros envolvidos no ciclo de vida da planta sem usar informações diretamente provenientes do isolamento e purificação de proteínas. Esse processo permitiu ao final a obtenção de painéis comparativos dos perfis de bandas de cDNA. Deste modo foi possível separar e identificar seqüências de cDNA com variação de expressão e assim detectar mRNA expressos diferentemente, bem como recuperar e clonar os cDNAs correspondentes. Algumas vantagens do “differential-display” RT-PCR sobre os outros métodos são: a simplicidade, a capacidade de monitorar um processo em diversos estágios, o uso de RNA total em lugar de poli (A)⁺, o fato dos resultados poderem ser avaliados lado a lado pela comparação dos géis de poliacrilamida, a produção de fragmentos de cDNA que podem ser seqüenciados, identificados e confirmados posteriormente (KANG et al., 1998; KUHN, 2001; LIEVENS; GOORMACHTIG; HOLSTER, 2001). Esse processo de confirmação pôde ser feito através da análise por “northern-blotting” reverso das bandas selecionadas como diferencialmente expressas até então (KANG et al., 1998; KUHN, 2001; LIEVENS; GOORMACHTIG; HOLSTER, 2001). Nesse estudo a metodologia foi aplicada para identificar genes expressos com variação de expressão tanto na amostra pré-climatérica de banana como na climatérica.

A técnica de “differential display” RT-PCR empregada nesse trabalho seguiu o protocolo de Diachenko et al. (1996) que emprega “primers” mais longos que aqueles empregados na técnica original segundo, Liang e Pardee (1992), que usa “primers” com 10 bases. O tamanho dos “primers” influencia diretamente na temperatura ideal de pareamento sendo que os primers menores requerem uma temperatura mais baixa. Cada “primer” P senso possui 25 bases enquanto que cada “primer” T reverso possui 29 bases. O tamanho mais longo dos “primers” permitiu que os três ciclos iniciais de PCR fossem de baixa estringência, com temperatura de pareamento de 40 °C, já nos demais ciclos a temperatura empregada na reação foi aumentada para 60 °C (DIACHENKO et al, 1996), e esse fato proporcionou uma melhora quanto à seletividade na amplificação dos fragmentos de cDNA. Uma outra característica da metodologia empregada foi o baixo número de ciclos da reação de PCR, 25 ciclos, diminuindo a chance da produção de fragmentos de cDNA com baixa especificidade devido ao pareamento inespecífico dos “primers”. Nas reações de PCR foram incorporados nucleotídeos marcados radioativamente α -[³²P]-dCTP e depois esses produtos de reação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Para a análise de variação de expressão de genes no amadurecimento da banana, utilizando a técnica de “differential display” RT-PCR, foram feitos onze diferentes géis no total, para separar os produtos de PCR originados a partir de todas combinações de “primers” P e T. Em cada gel de separação foram aplicados os produtos de reação referentes à combinação de cada um dos onze “primers” P senso utilizados (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P10 e P11) com todos os reversos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 e T9). As reações de PCR originadas a partir de cDNA diferentes, ou seja, provenientes de RNA de bananas pré-climatéricas e

climatéricas, mas com o mesmo par de “primers”, foram aplicadas lado a lado para facilitar a comparação posterior, bem como a seleção das bandas. Deste modo, os géis resultaram na separação das reações de PCR feitas com 99 combinações diferentes de “primers”, em um total de 188 reações, utilizadas para a amplificação dos cDNAs obtidos a partir do RNA de bananas pré-climatérica e climatéricas.

Na seleção das bandas contendo fragmentos diferentemente expressos foram adotados vários critérios. Inicialmente foi feita uma avaliação do filme considerando as diferenças nas intensidades de cada corrida de separação dos produtos de PCR (marcações de fundo), para verificar se uma corrida apresentou uma marcação muito mais intensa que a outra, ou mesmo se houve falha na reação de PCR, detectada pela ausência de imagem da respectiva corrida em razão da não incorporação de material radioativo nos produtos de reação. As corridas que apresentaram essas diferenças foram desconsideradas, para evitar que falhas decorrentes das reações de amplificações pudessem interferir na comparação entre as amostras. O segundo critério adotado foi a exclusão de bandas que estivessem presentes na mesma altura do gel com diversas combinações de pares de “primers” em uma mesma corrida, já que as bandas contendo fragmentos presentes nessa faixa, poderiam ser resultado de amplificações inespecíficas. O terceiro critério foi descartar bandas referentes a pequenos fragmentos localizados na parte inferior do gel, pois fragmentos pequenos dificultariam a obtenção de uma similaridade significativa na comparação com outras seqüências inseridas no “GenBank”, já que quanto menor o tamanho de fragmento maior a possibilidade de se obterem fragmentos similares ao acaso. O quarto critério foi avaliar a proximidade com outras bandas, para retirar somente a banda de interesse e não outras bandas vizinhas; fato que aconteceu

algumas vezes na parte superior do gel devido à compactação dos fragmentos em razão da resolução relativamente menor nessa região dos géis. Finalmente, o critério mais importante foi a comparação das intensidades entre as bandas de cada par, de modo a garantir que esses aumentos de intensidades pudessem refletir alterações de expressão das seqüências selecionadas. Um gel típico obtido com a técnica de “differential display” RT-PCR, no qual estão visíveis as bandas separadas por eletroforese e produzidas por PCR, está apresentado na Figura 6.

Na re-amplificação dos fragmentos selecionados, algumas vezes ocorreu a formação de produtos de reação inespecíficos. Esse fato foi confirmado pela presença de bandas não muito bem definidas quando da separação dos produtos de reação de PCR em gel de agarose. Nesse caso, algumas ações foram necessárias, tais como a alteração na diluição de amostra a ser submetida à re-amplificação. Essas medidas foram adotadas para obter uma banda mais definida, ou seja, com menor possibilidade de co-amplificação de outros fragmentos.

Figura 6. Imagem do filme exposto ao gel de "differential display" RT-PCR originado a partir de RNA de bananas pré-climatéricas (PrC) e climatéricas (C). Os produtos de reações de PCR, elaborados com combinações de pares de "primers" (um "primer" P senso fixo e nove "primers" T reversos), originaram cDNA com incorporação de α -[^{32} P]-dCTP, para marcação das sequências. Esses produtos de reação, obtidos com um mesmo par de "primers", foram aplicados lado a lado no gel de poliacrilamida. Após a separação eletroforética, o gel foi exposto a filme, e esse filme ficou marcado pelas sequências radiotivas. Ao se considerar um mesmo par de bandas, a banda com maior intensidade foi selecionada. Algumas das bandas selecionadas estão indicadas com setas brancas na figura. As bandas que apresentaram forte intensidade na mesma região com diversas combinações de "primers" foram desconsideradas e estão indicadas na figura com setas pretas. Os números de 1 a 9 indicam as reações com combinações de "primers" P6 e cada um dos "primers" T, de 1 a 9 respectivamente.

De um total inicial de 208 bandas selecionadas como diferentemente expressas, que foram submetidas à re-amplificações por reação de PCR com o mesmo par de “primers” empregados na reação para o “differential display” RT-PCR, foram obtidos apenas 118 fragmentos após as tentativas de re-amplificações, sendo que 63 fragmentos derivaram da amostra de bananas pré-climatéricas e 55 das bananas climatéricas. Os fragmentos não amplificados podem não ter sido adequadamente extraídos do gel ou podem ter sofrido radiólise, já que compostos radioativos liberam energia suficiente para promover a hidrólise da água, que possibilita a formação de radicais livres, e esses podem reagir com os compostos diluídos nesse meio e ocasionar modificações, inclusive nas bases que constituem os fragmentos. Assim, algumas regiões de pareamento de “primers” podem ter sofrido degradação e isso dificultaria a re-amplificação. Uma outra possibilidade que pode ter influenciado a baixa re-amplificação dos fragmentos foi a presença de uréia, reagente desnaturante empregado na matriz do gel, que pode ter dificultado, em algumas reações, a ação da enzima utilizada na amplificação.

A técnica “differential display” RT-PCR pode apresentar resultados falso-positivos devido à contaminação da seqüência, que produziu a banda selecionada, por outras seqüências não diferencialmente expressas, mas que estejam sobrepostas à banda de interesse, ou que estejam nas adjacências da banda de interesse, possibilitando a co-extração de outros fragmentos. Assim, foi necessária a confirmação das seqüências selecionadas como diferentemente expressas usando a técnica de “northern-blotting” reverso. As membranas preparadas com cDNA re-amplificado foram hibridizadas com sondas produzidas a partir de cDNA de banana

pré-climatéricas e climatéricas. Os tempos de exposição dos filmes de raios-X às membranas variaram de 3 a 26 horas, para a obtenção dos melhores resultados. Isto porque, apesar da mesma quantidade dos fragmentos selecionados ter sido adicionada em cada uma das duas membranas, as intensidades dos sinais emitidos pelas sondas ligadas aos fragmentos das membranas foram proporcionais à abundância relativa na população de seqüências pré-climatéricas e climatéricas dos fragmentos de cDNA imobilizados nas membranas. Assim, os sinais obtidos refletiram a abundância dos fragmentos nas amostras (pré-climatérica ou climatérica) que deram origem às sondas. Quando o filme foi exposto às membranas hibridizadas com as duas sondas, por um tempo de exposição muito longo, as diferenças entre as amostras das duas membranas hibridizadas com as sondas foram minimizadas, já que o longo tempo de exposição foi suficiente para compensar uma hibridização menor e também saturar o filme para aquelas amostras que tiveram pouca hibridização da sonda. Entretanto, tempos de exposição muito curtos foram inadequados para avaliação das amostras com sondas pouco abundantes, já que a análise de possíveis diferenças ficou mais difícil de ser quantificada. Assim, devido a todas essas considerações, o tempo adequado de exposição adotado foi empírico e variou conforme a quantidade e abundância da seqüência imobilizada na membrana na população de mRNA utilizada para fazer a sonda. Essas diferenças foram consideradas para proporcionar a melhor avaliação possível na quantificação das diferenças relativas a variação de expressão das amostras. O arranjo dos vários fragmentos de cDNA dispostos em uma mesma membrana permitiu analisar várias amplificações de cDNA paralelamente, com uma mesma sonda radioativa, resultando na simplificação e aceleração do processo de análise. As bandas purificadas foram aplicadas nas duas membranas na mesma

posição relativa, para facilitar a comparação e a confirmação dos fragmentos diferentemente expressos.

A análise visual para avaliar as diferenças de intensidade nas marcações do filme (relativas a um mesmo par de amostras, mas hibridizado com as duas sondas diferentes em cada membrana) não seria suficientemente sensível, pois algumas amostras aparentavam marcações muito similares o que dificultaria análise acurada de possíveis diferenças. Assim sendo foi feita a análise densitométrica para avaliar a diferença entre as densidades óticas. De um total de 118 bandas isoladas e re-amplificadas com variação de expressão, a análise densitométrica confirmou apenas 14 bandas provenientes do fruto pré-climatérico e 11 bandas do fruto climatérico, o que reforça a necessidade de confirmação posterior no emprego da técnica de “differential display” RT-PCR (DIACHENKO et al., 1996; KUHN, 2001). Algumas amostras selecionadas com aumento de expressão nos frutos pré-climatéricos estão apresentadas na Figura 7 e alguns fragmentos com aumento de expressão nos frutos climatéricos estão na Figura 8.

Figura 7. "Northern-blotting" reverso de fragmentos isolados pela técnica de "differential display" RT-PCR. Os fragmentos de cDNA selecionados como diferentemente expressos em banana no estágio pré-climatérico e climatérico pela técnica de "differential display" RT-PCR foram aplicados em membranas e confirmadas por "northern-blotting" reverso. As relações entre os "volumes de marcação" das amostras pré-climatérica e climatérica indicam a abundância dos respectivos mRNA.

Figura 8. "Northern-blotting" reverso de fragmentos isolados pela técnica de "differential display" RT-PCR. Os fragmentos de cDNA selecionados como diferentemente expressos em banana no estágio climatérico e pré-climatérico pela técnica de "differential display" RT-PCR foram aplicados em membranas e confirmadas por "northern-blotting" reverso. As relações entre os "volumes de marcação" das amostras pré-climatérica e climatérica indicam a abundância dos respectivos mRNA.

Após a seleção dos fragmentos pela análise densitométrica, foram feitas tentativas de clonagem para os 25 fragmentos selecionados. Todavia, apenas 16 deles foram efetivamente ligados ao vetor. Deste modo, alguns dos fragmentos selecionados pela análise densitométrica não puderam ser seqüenciados. Os 16 fragmentos restantes (nove da amostra pré-climatérica e sete da amostra climatérica) tiveram tamanhos que variaram de 89 a 427 bp e suas seqüências foram comparadas com outras seqüências já inseridas no "GenBank", utilizando o programa Tblastx. Esse programa se mostrou mais adequado na análise dos fragmentos obtidos, por ser indicado para seqüências de nucleotídeos com tamanho maior que 20 bp e por considerar outras prováveis proteínas traduzidas a partir das seqüências de nucleotídeos já inseridas nesse banco de dados.

Em relação à amostra de banana pré-climatérica, dentre os nove clones seqüenciados correspondentes aos mRNA mais abundantes nessa amostra, quatro deles denominados clones DD-V1, DD-V2, DD-V3 e DD-V4 apresentaram significativa similaridade com outras seqüências depositadas no "GenBank". Nas amostras de banana madura dos sete clones seqüenciados, cinco deles denominados DD-M1, DD-M2, DD-M3, DD-M4 e DD-M5 apresentaram significativa similaridade com seqüências presentes no "GenBank", baseando-se no "E-value" obtido pela comparação com outras seqüências. Uma vez que o "E-value" relaciona-se com a probabilidade de encontrar fragmentos similares ao acaso no "GenBank", quanto mais baixo o valor do "E-value" mais significativa é a similaridade. No presente trabalho, o valor de E-value para considerar as seqüências silimilares a outras já disponíveis no "GenBank" foi igual ou menor a e^{-5} . Esse "valor de corte" foi escolhido ao se avaliar os

resultados de outros trabalhos que utilizam esse número na comparação de seqüências. As demais seqüências tiveram E-value alto, ou seja, baixa similaridade com outras seqüências já depositadas.

Quando os fragmentos obtidos foram comparados com as seqüências do "GenBank", algumas dificuldades adicionais impediram a obtenção de resultados mais conclusivos. Por exemplo, fragmentos de pequeno tamanho nem sempre permitem uma comparação com significativa similaridade com outros fragmentos do "GenBank". Além disso, como o pareamento de um dos dois "primers" é sempre feito a partir da extremidade 3' do mRNA, é muito provável que algumas seqüências analisadas tiveram a amplificação em regiões não-codificadoras ou com baixa conservação entre diferentes espécies. Esses fatos dificultaram a identificação por comparação dos resultados com os dados do banco de seqüências. Apesar disso, a possibilidade de que alguns fragmentos obtidos só venham a apresentar similaridade com outros somente no futuro, na medida em que forem adicionadas novas seqüências, não deve ser descartada. Ao se avaliar as seqüências obtidas na comparação do programa Tblastx, levou-se em consideração que os fragmentos obtidos pela técnica de "differential display" RT-PCR apresentavam a cauda poli A⁺ na posição 3' das seqüências. Como os "primers" T utilizados na técnica pareavam com a porção 3' do cDNA, todas as seqüências dos fragmentos obtidos no sequenciamento que foram analisados pelo programa Tblastx apresentaram o sentido 5'→3'.

6.3.1. Clone DD-V1

Um dos clones contendo um fragmento de cDNA significativamente mais expresso na banana pré-climatérica foi denominado de clone DD-V1 e apresentou 222 pb. A sequência de nucleotídeos obtida no sequenciamento foi comparada com outras seqüências já inseridas no "GenBank", utilizando o programa Tblastx e os resultados obtidos estão na Figura 9. A partir da comparação, foi possível detectar a similaridade com proteínas vegetais tais como *Vicia faba*, *Arabidopsis thaliana* e *Zea mays*, identificadas como prováveis imunofilinas. O alinhamento da sequência do clone DD-V1 com outras seqüências obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A1). A Tabela 1 mostra informações quanto aos tamanhos das seqüências similares ao fragmento clonado e a maior porcentagem de identidade encontrada com outras seqüências foi de 88%. As informações sobre a sequência de nucleotídeos do clone DD-V1 e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A2).

Originalmente identificadas como receptores de drogas imunossupressoras, as imunofilinas englobam duas famílias de proteínas de ligação: as proteínas FK-506 ou FKBP e ciclosporinas ou ciclofilina. Presentes em bactérias, animais e plantas, essas proteínas são caracterizadas pela atividade enzimática de isomerização de polipeptídeos peptidil-prolil-*cis-trans* (ROMANO et al., 2005). A descoberta das primeiras imunofilinas em plantas data do início dos anos 90, com a identificação em *Lycopersicon esculentum*, *Arabidopsis thaliana* e *Zea mays* (ROMANO et al., 2005).

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E- Value
gi 54651164	gb BT016383.1	Zea mays clone Contig216 mRNA sequenc		57.4	1e-06
gi 54111524	gb AY754697.1	Zea mays immunophilin mRNA, complete		57.4	1e-06
gi 21206975	gb AY103897.1	Zea mays PCO108516 mRNA sequence		57.4	1e-06
gi 58530788	dbj AP008208.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...		56.5	2e-06
gi 50913002	ref XM_467909.1	Oryza sativa (japonica cultivar-gro		56.5	2e-06
gi 51964403	ref XM_506987.1	PREDICTED Oryza sativa (japonica...		56.5	2e-06
gi 47497353	dbj AP004159.3	Oryza sativa (japonica cultivar-g...		56.5	2e-06
gi 37991104	dbj AK121481.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...		56.5	2e-06
gi 32973868	dbj AK063850.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...		56.5	2e-06
gi 45544870	gb AY490245.1	Lycopersicon esculentum CONSTANS i...		55.6	4e-06
gi 56805600	dbj AP007284.1	Lotus corniculatus var. japonicus...		53.3	2e-05
gi 30697998	ref NM_125831.2	Arabidopsis thaliana FKBP12; FK5...		53.3	2e-05
gi 20148470	gb AY081564.1	Arabidopsis thaliana immunophilin ...		53.3	2e-05
gi 16649116	gb AY059928.1	Arabidopsis thaliana immunophilin ...		53.3	2e-05
gi 2618602	dbj AB008268.1	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chr		53.3	2e-05
gi 2104958	gb U96925.1	Vicia faba immunophilin (FKBP12)		53.3	2e-05
gi 2104956	gb U96924.1	Arabidopsis thaliana immunophili		53.3	2e-05
gi 21402999	gb AY084289.1	Arabidopsis thaliana clone 10243 mRNA		52.8	3e-05

Figura 9. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone DD-V1 proveniente de bananas pré-climatéricas e selecionado pela técnica de “differential display” RT-PCR, com as sequências de nucleotídeos depositadas no “GenBank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 1. Comparação da sequência do clone DD-V1, obtida em banana no período pré-climatérico, com outras sequências depositadas no “GenBank”.

Acesso “GenBank”	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
AY754697.1	<i>Zea mays</i> / imunofilina / mRNA	88 %	761
AY081564.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> / imunofilina / RNAm	85 %	510
U96925.1	<i>Vicia faba</i> / imunofilina / mRNA	77 %	574

De um modo geral, as imunofilinas estão envolvidas com mecanismos de imunossupressão em animais, transdução de sinal, conformação de proteínas e outras funções celulares. Sabendo-se que as imunofilinas têm atividades imunossupressoras Luan et al. (1993) fizeram experimentos em *V. faba* utilizando imunossupressores específicos como sondas. Esses experimentos mostraram a localização de imunofilinas em cloroplastos e a partir deles foram descobertas duas novas famílias de imunofilinas.

Embora algumas das imunofilinas sejam muito conservadas em plantas, animais e leveduras, a função dessas proteínas em plantas superiores parece estar associada com a sua localização específica em cloroplasto, e esse fato explica o crescente número de imunofilinas vegetais identificadas. Algumas imunofilinas foram apresentadas como chaperonas dos tipos pCyP B e pFKB13, e assim sendo, elas podem ter função no processamento, no tipo e nas propriedades funcionais adequadas de proteínas que são importadas para o cloroplasto (VITTORIOSO et al., 1998). Outras imunofilinas de plantas desempenham funções importantes no desenvolvimento, atuando em processos de regulação hormonal como resposta a citoquinina e outros fatores. A importância das imunofilinas no desenvolvimento de plantas pode ser estimada pela observação de mutantes de *A. thaliana* que tiveram um gene similar a FKBP inativo, uma vez que esses mutantes apresentaram o controle da proliferação celular afetado. A importância das imunofilinas em funções envolvidas com o desenvolvimento pode ser destacada pelos fenótipos diferentes apresentados por mutantes de *A. thaliana*, que apresentaram um comprometimento no desenvolvimento. Estudos recentes mostram

que o gene que codifica uma proteína similar a FKBP73 é essencial para o desenvolvimento normal da planta. Uma mutação desse gene causou um defeito significativo no desenvolvimento do meristema (VITTORIOSO et al., 1998). Outro estudo identificou-a como uma proteína similar a ciclofilina que apresenta um papel importante na função do cloroplasto (FULGOSI et al., 1998). Estudos complementares usando técnicas moleculares e genéticas podem ainda esclarecer a função da imunofilina em vários processos de sinalização e desenvolvimento de plantas (ROMANO et al., 2005).

Como as imunofilinas podem atuar como chaperonas elas podem auxiliar na conformação adequada das proteínas que serão necessárias no amadurecimento de bananas. É provável que o papel dessa proteína esteja relacionado com a intensa síntese protéica que ocorre durante o amadurecimento. Assim, elas podem indiretamente contribuir na atividade de algumas enzimas que atuam para que ocorram todas as mudanças características desse período. Se a presença dessa imunofilina é importante ou determinante para o amadurecimento normal, é algo que ainda deve ser estabelecido.

6.3.2. Clone DD-V2

O segundo clone obtido denominado de DD-V2, com aumento de expressão na banana pré-climatérica, apresentou 343 pb. A sua seqüência de nucleotídeos, quando comparada com aquelas disponíveis no “GenBank”, apresentou similaridade com proteínas das plantas *Triticum turgidum*, *Arabidopsis thaliana*, *Castanea sativa* e *Lupinus albus*, como apresentado na Figura 10. A maior similaridade desse fragmento foi com uma proteína translocadora de nucleotídeo adenina (ANT). O alinhamento da seqüência do clone DD-V2 com outras seqüências obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A3). A Tabela 2 mostra informações dos tamanhos e da porcentagem de identidade dos fragmentos com maior similaridade ao fragmento DD-V2 clonado. O maior valor de identidade desse fragmento foi de 98 %. O alinhamento da seqüência DD-V2 obtida com outras seqüências de aminoácidos depositadas no “GenBank” estão em anexo (vide-anexos Figura A4).

A ANT é o principal canal da membrana mitocondrial. A função da ANT é de transportar os nucleotídeos e garantir a troca do ADP extra-mitocondrial por ATP intra-mitocondrial. A ANT catalisa a troca de ATP, sintetizada pela fosforilação oxidativa na matriz mitocondrial com o ADP citossólico. Análises de permeabilidade de sistemas bicamadas e de proteoliposoma, mostraram que a ANT também pode formar poros (KOULINTCHENKO; KONSTANTINOV; DIETRICH, 2003; VIEIRA et al., 2000).

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E- Value
gi 1297065 emb X95863.1 TTANT1	T.turgidum ant gene (154...	116	2e-34
gi 16174 emb X65549.1 ATAT	A.thaliana ANT1 mRNA for ade...	111	3e-34
gi 12322715 gb AC012562.5 AC012562	Arabidopsis thaliana...	114	5e-34
gi 30680569 ref NM_180210.1	Arabidopsis thaliana ADP, ...	114	5e-34
gi 14596052 gb AY042814.1	Arabidopsis thaliana adenyla...	114	5e-34
gi 23198345 gb BT000381.1	Arabidopsis thaliana adenyla...	114	5e-34
gi 18491188 gb AY074529.1	Arabidopsis thaliana putativ...	114	5e-34
gi 16225457 gb AF417306.1	Castanea sativa putative ade...	116	3e-33
gi 1297067 emb X95864.1 TTANT2	T.turgidum ant gene (149...	111	6e-33
gi 9955539 emb AL391710.1 ATT6I14	Arabidopsis thaliana ...	115	8e-33
gi 16159 emb X68592.1 ATANT	A.thaliana mRNA for adenos...	115	9e-33
gi 30684425 ref NM_121352.2	Arabidopsis thaliana ADP, ...	115	9e-33
gi 2780193 emb AJ003197.1 LAAJ3197	Lupinus albus mRNA f...	116	1e-32
gi 218144 dbj D12637.1 RICATADPT	Oryza sativa (japonica...	115	2e-32
gi 2463663 gb AF006489.1 AF006489	Gossypium hirsutum ad...	111	3e-32
gi 944841 emb X80023.1 TTADPATP	T.turgidum mRNA for ADP...	110	4e-32
gi 47084426 gb AC098572.2	Oryza sativa (japonica culti...	110	5e-31
gi 22165 emb X15711.1 ZMANTG1	Maize gene for mitochondr...	114	1e-30
gi 21213138 gb AY109420.1	Zea mays CL2269_1 mRNA sequence	114	1e-30
gi 21207467 gb AY104389.1	Zea mays PCO082855 mRNA sequ...	108	1e-30

Figura 10. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone DD-V2 proveniente de bananas pré-climáticas, selecionado pela técnica de “differential display” RT-PCR, com as sequências de nucleotídeos depositadas no “GenBank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 2. Comparação da sequência do clone DD-V2, obtido a partir de banana no período pré-climático, com outras sequências depositadas no “GenBank”.

Acesso “GenBank”	Vegetal / proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
X95863.1	<i>Triticum turgidum</i> / ANT/ DNA	98 %	1549
X65549.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> / ANT/ mRNA	94 %	1393
AF417306.1	<i>Castanea sativa</i> / ANT/ mRNA	98 %	653(parcial)
AJ003197.1	<i>Lupinus albus</i> / ANT / mRNA	98 %	1606

A energia necessária para o transporte está no potencial do interior da membrana gerado pela cadeia de transporte de elétrons. Na mitocôndria de plantas a presença do ANT foi primeiramente sugerida com o uso de atractilósideo (ATR), uma substância que inibe o estágio 3 da respiração iniciada por ADP na mitocôndria de *Brassica oleracea*.

Uma diferença entre a ANT de origem animal e de vegetal foi o fato de a ANT vegetal, proveniente de *Zea mays*, ter transportado com baixa eficiência GDP e GTP, além de ADP e ATP. Essa descoberta feita por Genchi et al (1991) sugere que os transportadores não diferem quanto à ligação de substrato, mas sim em relação ao transporte do canal. Em plantas, o transporte de ADP e ATP ocorrem não somente na mitocôndria, mas também em plastídeos (LALOI, 1999).

Talvez o aumento de expressão desse transportador esteja relacionado com as transformações metabólicas necessárias quando da elevação das taxas respiratórias da banana no pico respiratório mitocondrial. Assim, a elevação da expressão ainda no fruto pré-climatérico, pode estar relacionada com um aumento prévio na síntese de transportadores, que serão necessários para o adequado mecanismo fisiológico e bioquímico, no incremento do processo respiratório que ocorrerá no climatério.

A ANT desempenha uma função importante na síntese de ATP, para o armazenamento de energia. Estudos realizados por Pozueta-Romero; Viale; Akazawa (1991) indicam que existe um transportador de ATP/ADP que também

pode ser encontrado em alguns plastídeos como os amiloplastos. Os amiloplastos em suas atividades de síntese de amido consomem energia, porém eles não têm mecanismos eficientes para gerar ATP, assim existe um fluxo de adenilatos entre o citosol e a matriz do amiloplasto para suprir as necessidades energéticas do amiloplasto. Deste modo o aporte de ADP requerido pelo amiloplasto pode ser fornecido pela mitocôndria (POZUETA-ROMERO; VIALE; AKAZAWA, 1991). Assim não se deve descartar a hipótese de que o fragmento obtido com maior expressão na banana pré-climatérica seja responsável por um transportador de ATP/ADP no amiloplasto.

6.3.3. Clone DD-V3

O terceiro clone, denominado DD-V3, foi obtido a partir de bananas pré-climatéricas apresentou um tamanho de 272 pb. A seqüência de nucleotídeos obtida no sequenciamento foi comparada com outras seqüências depositadas no “GenBank” e a maior similaridade desse fragmento foi com uma seqüência de cloroplasto de *Acorus calamus*, cujo acesso ao “GenBank” é AJ879453, as informações obtidas na comparação estão descritas na Figura 11. O E-value obtido foi $3e^{-06}$ e o score foi 30 e a identidade foi 92%. O alinhamento entre os aminoácidos obtidos no fragmento de banana e *Acorus calamus* está em anexo (vide-anexos Figura A5) e a seqüência de nucleotídeos e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A6).

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E- Value
gi 74381688 emb AJ879453.1	Acorus calamus chloroplast, complete			42.3	8e-05
gi 58802760 gb AY916449.1	Phalaenopsis aphrodite subsp. form...			31.3	0.087
gi 13928184 dbj AB042240.3	Triticum aestivum chloroplast DNA, c			33.1	0.29
gi 42474731 emb BX817134.1	CNS0ADZT Arabidopsis thaliana Full...			32.7	0.93
gi 68162395 emb CR940307.5	M.truncatula DNA sequence from cl...			32.2	1.9

Figura 11. Reprodução do resultado obtido da comparação da seqüência do clone DD-V3, proveniente de bananas pré-climáticas e selecionado pela técnica de “differential display” RT-PCR, com as seqüências de nucleotídeos depositadas no “GenBank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

6.3.4. Clone DD-V4

O quarto clone, denominado DD-V4, selecionado a partir de bananas pré-climatéricas, e que foi obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR apresentou um tamanho de 126 bp. Esse fragmento obteve similaridade com proteínas de membranas bacterianas na comparação com outras seqüências do “GenBank”, os resultados obtidos na comparação estão na Figura 12. O alinhamento da seqüência obtida a partir de banana com as seqüências bacterianas está em anexo (vide-anexos Figura A7). A seqüência de nucleotídeos obtida no sequenciamento e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão apresentados em anexo (vide-anexos Figura A8). A maior identidade entre o fragmento clonado obtido a partir de banana pré-climatéricas foi de 56 % com uma seqüência bacteriana.

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E- Value
gi 83629191 gb AY552545.2		Uncultured marine gamma proteobact...		62.5	1e-08
gi 56178122 gb AE017340.1		Idiomarina loihiensis L2TR, complete		60.2	7e-08
gi 56126533 gb CP000026.1		Salmonella enterica subsp. enteric...		59.3	1e-07
gi 29140506 gb AE014613.1		Salmonella enterica subsp. enteric...		59.3	1e-07
gi 62126203 gb AE017220.1		Salmonella enterica subsp. enteric...		59.3	1e-07
gi 16418723 gb AE008705.1		Salmonella typhimurium LT2, sectio...		59.3	1e-07
gi 30180701 emb BX321862.1		Nitrosomonas europaea ATCC 19718, co		59.3	1e-07
gi 16501496 emb AL627266.1		Salmonella enterica serovar Typhi...		59.3	1e-07
gi 56384585 gb AE005174.2		Escherichia coli O157:H7 EDL933, comp		58.8	2e-07
gi 48994873 gb U00096.2		Escherichia coli K-12 MG1655, complete		58.8	2e-07
gi 47118301 dbj BA000007.2		Escherichia coli O157:H7 DNA, comple		58.8	2e-07
gi 26111730 gb AE014075.1		Escherichia coli CFT073, complete gen		58.8	2e-07
gi 85674274 dbj AP009048.1		Escherichia coli W3110 DNA, complete		58.8	2e-07
gi 24080789 gb AE005674.1		Shigella flexneri 2a str. 301, comple		58.8	2e-07
gi 15529631 gb AF407013.1	AF407013	Escherichia coli outer mem...		58.8	2e-07
gi 30043918 gb AE014073.1		Shigella flexneri 2a str. 2457T, comp		58.8	2e-07
gi 4567045 gb AF120927.1	AF120927	Shigella flexneri outer mem...		58.8	2e-07
gi 81239530 gb CP000034.1		Shigella dysenteriae Sd197, complete		58.8	2e-07
gi 81244029 gb CP000036.1		Shigella boydii Sb227, complete genom		58.8	2e-07
gi 73854091 gb CP000038.1		Shigella sonnei Ss046, complete genom		58.8	2e-07
gi 37509034 dbj BA000037.2		Vibrio vulnificus YJ016 DNA, chromos		57.9	3e-07
gi 27362705 gb AE016795.1		Vibrio vulnificus CMCP6 chromosome I		57.9	3e-07
gi 84778498 dbj AP008232.1		Sodalis glossinidius str. 'morsitans		57.0	6e-07
gi 47118310 dbj BA000031.2		Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210...		57.0	6e-07

Figura 12. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone DD-V4 proveniente de bananas pré-climatéricas e selecionado pela técnica de “differential display” RT-PCR, com as sequências de nucleotídeos depositadas no “GenBank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

6.3.5. Clone DD-M1

O clone denominado DD-M1 foi obtido a partir de bananas climatéricas e apresentou um tamanho de 306 pb. Sua sequência de nucleotídeos obtida foi comparada com outras seqüências armazenadas no “GenBank” e a partir dessa comparação foram constatadas similaridades com proteínas de *Medicago truncula*, *Oryza sativa*, *Zea mays* e *Glycine Max*, como indicado na Figura 13. A similaridade desse fragmento foi com pequenas proteínas de membrana de arroz e milho. No caso desse último, a similaridade foi com uma família de proteínas conhecidas por aquaporinas. Alguns tamanhos de fragmentos similares ao fragmento obtido em bananas climatéricas estão expostos na Tabela 3. O alinhamento dessa sequência de aminoácidos com outras seqüências similares obtidas a partir do Tblastx está em anexo (vide-anexo Figura A9. A sequência de nucleotídeos obtida no sequenciamento e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexo Figura A10).

As aquaporinas são proteínas que cosntituem os canais de membranas e elas pertencem à família de proteínas denominada de proteínas de canais de membrana (MIP). Algumas delas são capazes de transportar, além da água, pequenas moléculas sem carga como glicerol, uréia e CO₂.segundo Chaumont et al. (2001) e Marjanovic et al. (2005).

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E Value
gi 21306634 gb AC123593.1	Genomic sequence for Medicago trun...	61.6	1e-07		
gi 58530787 dbj AP008207.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	61.1	2e-07		
gi 55770734 ref XM 550409.1	Oryza sativa (japonica cultivar-gro	61.1	2e-07		
gi 55769596 ref NM 189568.2	Oryza sativa (japonica cultivar-gro	61.1	2e-07		
gi 32991394 dbj AK106185.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	61.1	2e-07		
gi 32991382 dbj AK106173.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	61.1	2e-07		
gi 32979405 dbj AK069381.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	61.1	2e-07		
gi 13122417 dbj AP003047.2	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	61.1	2e-07		
gi 42821738 dbj AK109424.2	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	61.1	2e-07		
gi 13447812 gb AF326497.1 AF326497	Zea mays small basic membr...	58.3	1e-06		
gi 21039825 gb AC121763.1	Genomic sequence for Glycine max (...	56.1	6e-06		
gi 13447814 gb AF326498.1 AF326498	Zea mays small basic membr...	54.7	1e-05		

Figura 13. Reprodução do resultado obtido da comparação da seqüência do clone DD-M1, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de “differential display” RT-PCR, com as seqüências de nucleotídeos depositadas no “Genbank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 3. Comparação da seqüência DD-M1, obtida em banana no período climatérico, com outras seqüências depositadas no “GenBank”..

Acesso “GenBank”	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
AC123593	<i>Medicago truncula</i> / ----- / DNA	63 %	-
XP_550409.1	<i>Oryza sativa</i> / membrana / mRNA	65 %	1125
AF326497.1	<i>Zea mays</i> / membrana / mRNA	66 %	1084
AC121763.1	<i>Glycine max</i> / ----- / DNA	75 %	-

De acordo com a sua localização no interior da célula as aquaporinas são divididas em quatro subfamílias: proteínas intrínsecas de membrana de plasma (PIPs), proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs), proteínas nodulinas-intrínsecas (NIPs) e proteínas intrínsecas pequenas (SIPS). O fragmento obtido na banana é similar às SIPS que foi recentemente identificada em *A. thaliana* e *Z. mays* como sendo uma proteína intrínseca de membrana (CHAUMONT et al., 2001, MARJANOVIC et al., 2005).

Em *L. esculentum* uma proteína de membrana associada ao amadurecimento (TRAMP), apresentou homologia com a família de proteínas de canais de membrana denominada de MIP. Esta família de proteínas está associada ao “stress” hídrico, e são definidas como proteínas integrais de membrana hidrofílicas que têm como função servir como canais facilitando a passagem de pequenos solutos através de membranas.

No amadurecimento de *V. vinifera* ocorre grande acúmulo de hexoses provenientes da sacarose. O acúmulo de açúcar é importante na uva, pois é o principal parâmetro de qualidade para a produção do vinho. No desenvolvimento da uva existe um acúmulo coordenado de açúcares e de agentes antifúngicos, incluindo taumatinas, proteínas de transferência de lipídeos e chitinases (PICAUD et al, 2003). A importância do fluxo de açúcares para qualidade da uva e o aumento de substâncias que oferecem resistência a patógenos, bem como a estreita correlação entre o fluxo hídrico e o de açúcares, mostra a importância do conhecimento entre as vias fisiológicas e moleculares no desenvolvimento e amadurecimento da uva.

Isto porque a condutividade hídrica de muitas membranas biológicas é controlada principalmente pela presença de proteínas especializadas na mediação do fluxo de água entre membranas. A existência de proteínas de membrana intrínsecas de plasma (PIP) e proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPS) aumenta fortemente a condutividade hídrica dessas membranas (PICAUD et al, 2003).

De forma similar ao observado em uvas e tomates também na banana climatérica ocorrem diversas modificações que poderiam requerer um aumento no transporte de substâncias via membrana. No pico respiratório as aquaporinas poderiam facilitar as trocas gasosas do pico respiratório, como a liberação de CO₂ do fruto (MARJANOVIC et al., 2005). Outra modificação que acontece no decorrer do amadurecimento é o incremento na concentração de açúcares, alterando a concentração osmótica do fruto, assim as aquaporinas podem ser requisitadas para atuar no balanço osmótico no fruto, transportando substâncias via membrana nesse período. Deste modo essa pode ser que uma proteína importante para o amadurecimento normal da banana, ou seja, sua presença deve ser necessária para que o acúmulo de açúcares solúveis, a partir da degradação do amido, não cause “stress” osmótico no fruto.

6.3.6. Clone DD-M2

O clone DD-M2 obtido a partir da amostra de banana climatérica e teve um tamanho de 330 pb e apresentou similaridade com leguminas de *Zea mays* e *Asarum europaeum* e com uma proteína de reserva de *A. thaliana* como pode ser visto na Figura 14. O fragmento isolado em banana madura apresentou um “E-value” baixo quando comparado com uma legumina presente em *Z.mays*. O alinhamento dessa seqüência de aminoácidos com outras seqüências depositadas no “GenBank” está em anexo (vide-anexos Figura A11). A seqüência de nucleotídeos obtida no sequenciamento e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A12). A maior identidade dessa seqüência foi 46 % com uma seqüência de *Lycopersicon esculentum*. O tamanho de alguns fragmentos similares ao fragmento obtido no presente estudo estão na Tabela 4.

O tamanho médio do inserto de cDNA de legumina de diversos vegetais está entre 1200 - 1600 bp. O tamanho obtido para esse fragmento na banana no período climatérico durante a análise do “northern blotting” está entre 1000 - 1500 bases, as amostras referentes a 3 e 7 DPC apresentaram aumento de expressão da seqüência similar a legumina, os resultados estão na Figura 15.

Sequences producing significant alignments:					Score (Bits)	E Value
gi	47104245	gb	BT012830.1	Lycopersicon esculentum clone 113884F	74.8	2e-11
gi	37730875	gb	AY183450.1	Zea mays legumin-like protein mRNA, c	71.2	2e-10
gi	28950667	gb	AF372987.1	Zea mays legumin-like protein (cl2-1)	68.9	1e-09
gi	28950669	gb	AF372988.1	Zea mays legumin-like protein (cl2-2)	68.4	1e-09
gi	37991398	dbj	AK121775.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	67.0	4e-09
gi	42473937	emb	BX813669.1	CNS0ADG8 Arabidopsis thaliana Full...	62.9	6e-08
gi	42473443	emb	BX816053.1	CNS0AD1S Arabidopsis thaliana Full...	62.9	6e-08
gi	30680334	ref	NM_100650.2	Arabidopsis thaliana cupin famil...	62.9	6e-08
gi	15294233	gb	AF410308.1	AF410308 Arabidopsis thaliana At1g0775	62.9	6e-08
gi	12248028	gb	AF334728.1	Arabidopsis thaliana clone C00144 ...	62.5	8e-08
gi	32993909	dbj	AK108700.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	60.6	3e-07
gi	42474483	emb	BX814489.1	CNS0ADSD Arabidopsis thaliana Full...	60.2	4e-07
gi	42467267	emb	BX821835.1	CNS0A857 Arabidopsis thaliana Full...	59.7	6e-07
gi	42473392	emb	BX815878.1	CNS0AD2N Arabidopsis thaliana Full...	59.3	8e-07
gi	1296434	emb	X95508.1	AELEG10GN A.europaeum mRNA for legumin-1	53.3	5e-05

Figura 14. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone DD-M2, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de “differential display” RT-PCR, com as sequências de nucleotídeos depositadas no “GenBank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 4. Comparação da sequência DD-M2, obtida em banana no período climatérico, com outras sequências depositadas no “GenBank”.

Acesso “GenBank”	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
BT012830.1	<i>Lycopersicon esculentum</i> / -- / mRNA	46 %	1307
AY183450.1	<i>Zea mays</i> / legumina / mRNA	45 %	1330
AK121775.1	<i>Oryza sativa</i> / -- / mRNA	39 %	1506
NM_100650.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> / de reserva / / mRNA	39 %	1413
X95508.1	<i>Asarum europaeum</i> / legumina / DNA	36 %	1572

Identidade provável baseado na proteína com maior similaridade	Tamanho esperado (bases)	Tamanho Obtido (bases)	Dias pós-colheita (DPC)
Legumina	1200 a 1600	1000 a 1500	

Figura 15. Confirmação por "northern-blotting" de fragmento isolado pela técnica de "differential display" RT-PCR de banana climatérica. A partir de 10 µg de RNA extraído de banana 1, 3, 7 DPC foi feita a separação por eletroforese em gel de agarose-formaldeído para transferência à membrana de nylon. A seguir, foi feita a hibridização com sonda do fragmento similar a legumina, para a exposição da membrana ao filme. A comparação dos resultados obtidos no sequenciamento com outras seqüências disponíveis no "GenBank" utilizando o programa Tblastx, resultou na similaridade com legumina. Os resultados mostram que a expressão desses genes no fruto climatérico (3 e 7 DPC) foi maior, confirmando o aumento de expressão nesse período.

As leguminas pertencem à família de proteínas de reserva originalmente descoberta em Leguminaceae, mas posteriormente encontradas em diversas outras plantas superiores, incluindo monocotiledôneas (BREITENEDER; RADAUER, 2004, SALES et al., 2001, YAMAGATA et al., 2003 e ZAKHAOV et al, 2004).

As leguminas também foram localizadas em outras partes de vegetais além das sementes. Em ervilhas e feijão-fava o mRNA de leguminas foi detectado no pólen e a expressão durante a microesporogênese e a embriogênese parece ser uma característica geral de vários genes de proteínas de sementes. A atividade de promotores de proteínas de sementes também foi detectada em famílias taxonômicas distantemente relacionadas com Leguminosae, como Linaceae e Solanaceae (ZAKHAOV et al., 2004).

Em milho um transcrito de legumina foi identificado em bibliotecas de cDNA proveniente do endosperma do milho selvagem e doce. Quanto à localização, esse cDNA parece estar em pequenos corpos proteicos essencialmente idênticos a aqueles encontrados em leguminosas. Segundo Yamagata (2003), para avaliar as mudanças de expressão da legumina durante o desenvolvimento do milho foi feito um "northern blotting" utilizando o RNA extraído do milho selvagem e doce em 0, 14 e 28 dias pós-polinização. Em todas as variedades o transcrito de legumina teve baixa expressão em 7 DPC, aumentou substancialmente em 14 DPC e diminuiu em 28 DPC (YAMAGATA et al., 2003). Comparando os valores obtidos por Yamagata et al (2003) com os do "northern-

blotting” obtido nesse estudo com banana com 1, 3, e 7 DPC, observam-se algumas semelhanças já que o aumento de expressão mais significativo também ocorreu nas etapas finais de amadurecimento.

Algumas leguminas estão associadas com mecanismos de defesa de plantas e são proteínas capazes de desencadear reações alérgicas em alguns indivíduos. Como é o caso da legumina denominada amandina, uma proteína encontrada em amêndoas (LEE et al, 2005), e também outras leguminas encontradas na soja, amendoim, ervilha, nozes, coco e castanha de caju. As proteínas alergênicas derivadas de alimentos de origem vegetal pertencem a vários grupos de proteínas de defesa, aumentando a resistência das plantas ao “stress” biológico (BREITENEDER; RADAUER, 2004).

No caso da banana madura a susceptibilidade a patógenos é maior após o período climatérico, não só pelo aumento no teor de açúcares, mas também devido a fragilidade da casca pela despolimerização da parede celular. Como em certos vegetais, algumas leguminas estão relacionadas com o mecanismo de defesa, o aumento de expressão de um gene similar a legumina em banana, pode estar relacionado com o mecanismo de defesa, na tentativa de dificultar o ataque de agentes patogênicos.

6.3.7. Clone DD-M3

O clone DD-M3, obtido a partir da amostra de banana climatérica apresentou um tamanho de 319 pb. A seqüência de nucleotídeos obtida no sequenciamento foi comparada com outras seqüências já inseridas no "GenBank", utilizando o programa Tblastx e os resultados obtidos estão na Figura 16. Essa comparação mostrou similaridade com desoxiribonucleotídeo quinase de *V. vinifera*, *L. esculentum*, *O. sativa* e *A. thaliana*. A seqüência obtida apresentou um "E-value" baixo (e^{-59}) quando comparado com outras seqüências do "GenBank". O alinhamento da seqüência do clone DD-M3 com outras seqüências obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A13). A Tabela 5 mostra informações quanto aos tamanhos das seqüências similares ao fragmento clonado, a maior porcentagem de identidade encontrada com outras seqüências foi de 88%. As informações sobre a seqüência de nucleotídeos do clone DD-M3 e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A14).

Para esse fragmento foi feito o "northern-blotting" e ao avaliar a hibridização da sonda na membrana observou-se que o tamanho aparente foi próximo de 1000 bases, sendo esperado algo entre 1100 a 2000 bases. A marcação da sonda teve maior intensidade na amostra de RNA de banana aos 3 DPC, seguida pela amostra com 7 DPC, confirmam a expressão aumentada desse gene durante o período climatérico da banana como foi possível observar na Figura 17.

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E Value	
gi	37780991	gb	AY194363.1	Vitis vinifera putative deoxyguano...	221	3e-59
gi	33325042	gb	AF514776.1	Lycopersicon esculentum dCK/dGK-li...	215	1e-57
gi	32981763	dbj	AK071740.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	215	3e-57
gi	50931484	ref	XM 475270.1	Oryza sativa (japonica cultivar-gro	215	3e-57
gi	32969438	dbj	AK059420.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	214	5e-57
gi	32986484	dbj	AK101275.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	212	1e-56
gi	30698838	ref	NM 105862.3	Arabidopsis thaliana ATP binding...	210	9e-56
gi	63003831	gb	BT022033.1	Arabidopsis thaliana At1g72040 gene,	210	9e-56
gi	21208897	gb	AY105819.1	Zea mays PC0069666 mRNA sequence	207	6e-55
gi	58530791	dbj	AP008211.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	137	3e-53
gi	51339051	gb	AC130600.3	Oryza sativa (japonica cultivar-gr...	137	4e-53
gi	8927685	gb	AC069273.4	AC069273 Arabidopsis thaliana chromo...	132	4e-52
gi	38532336	gb	AY459335.1	Oryza sativa (japonica cultivar-gr...	135	1e-49
gi	76559722	emb	CT009492.5	M.truncatula DNA sequence from cl...	137	7e-49
gi	15430624	dbj	AP003922.2	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	135	2e-48
gi	20146488	dbj	AP004669.3	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	135	4e-48
gi	58530787	dbj	AP008207.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	135	1e-43
gi	34908729	ref	NM 190823.1	Oryza sativa (japonica cultivar-gro	135	6e-40

Figura 16. Reprodução do resultado obtido da comparação da seqüência do clone DD-M3, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de “differential display” RT-PCR, com as seqüências de nucleotídeos depositadas no “GenBank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 5. Comparação da seqüência DD-M3, obtida em banana no período climatérico, com outras seqüências depositadas no “GenBank”.

Acesso “GenBank”	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
AY194363.1	<i>Vitis vinifera</i> / deoxyguanosine kinase / mRNA	88 %	331(parcial)
AF514776.1	<i>Lycopersicon esculentum</i> / desoxiribonucleosideo quinase / mRNA	88 %	1098
AK071740.1	<i>Oryza sativa</i> / ----- / mRNA	88 %	1741
NM_105862.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> / carreador de ATP/ mRNA	82 %	2099

Identidade provável baseado na proteína com maior similaridade	Tamanho esperado (bases)	Tamanho obtido (bases)	Dias pós-colheita (DPC)		
			1	3	7
Desoxiguanosina quinase	1100 a 2000	1000			

Figura 17. Análise por “northern-blotting” de fragmento isolado pela técnica de “differential-display” RT-PCR de banana. A partir de 10 µg de RNA extraído de banana 1, 3, 7 DPC foi feita a separação por eletroforese em gel de agarose-formaldeído, seguida de transferência para a membrana de nylon. A seguir, foi feita hibridização com sonda radioativa do fragmento similar a desoxiguanosina quinase com maior expressão em banana climatérica para a exposição da membrana ao filme. A comparação dos resultados obtidos no sequenciamento com outras seqüências disponíveis no “GenBank” utilizando o programa Tblastx, resultou na similaridade com desoxiguanosina quinase. Os resultados mostram que a expressão desses genes no fruto climatérico (principalmente 3 DPC) foi maior, confirmando o aumento de expressão.

As quinases são enzimas que transferem o grupo fosfato, que contém muita energia, para outras moléculas, no processo denominado fosforilação. Elas podem regular a atividade de outras enzimas que atuam no amadurecimento através da fosforilação dessas enzimas. As nucleotídeos quinases podem eficazmente transferir o fosfato do nucleotídeo trifosfato para um outro difosfato. Na maioria dos mecanismos dependentes de ATP quinases, o acceptor seqüestra diretamente o fosfato do grupo doador. Uma característica das nucleotídeos quinases é que elas não têm especificidade, ou seja, o fosfato que é doado e o acceptor de fosfato pode ser qualquer nucleotídeo ou desoxinucleotídeo. O ATP que geralmente tem uma função de doador pode produzir deoxinucleosídeo trifosfato, (desoxi)NTP, necessários tanto para a síntese de RNA e DNA como também para a síntese de GTP e dATP (HUANG et al., 2005).

No metabolismo, o suprimento de nucleotídeos para a síntese de RNA e DNA pode ser feito através da biossíntese *de novo*. No entanto, esta via exige um grande gasto energético por exigir a hidrólise de dois ATPs. Em geral, as células podem suprir a necessidade de nucleotídeos pela reutilização de nucleotídeos pré-formados. Somente quando as células estão sob rápido crescimento ou sob grandes mudanças no desenvolvimento é que uma grande quantidade de novos nucleotídeos é requerida, sendo necessário, por esse motivo, um grande fluxo na via biossíntese *de novo* (WEERS; THORNBURG, 1999).

Pelo fato de ocorrerem diversas alterações bioquímicas na banana madura e essas transformações requerem uma grande quantidade de

nucleotídeos, que serão necessários em última instância para a produção de proteínas ou enzimas envolvidas nas mudanças marcantes desse período, a expressão aumentada de um gene relativo à reutilização de bases que constituem os ácidos nucléicos pode ser necessária para suprir o aumento da demanda de nucleotídeos nesse período. Contudo, uma vez que essa função pode ser bastante inespecífica, fica difícil atribuir uma função desse gene em uma via específica do metabolismo.

6.3.8. Clone DD-M4

Dentre os clones seqüenciados a partir de bananas climatéricas, o clone denominado DD-M4, apresentou um tamanho de 279 pb. A seqüência de nucleotídeos obtida foi comparada com outras seqüências depositadas no “GenBank” e os resultados estão na Figura 18. Essa comparação mostrou similaridade com seqüências de *Phoenix dactylifera* e *Nicotiana tomentosiformis* entre outras, sugerindo tratar-se de uma NADH desidrogenase de cloroplasto. O menor valor de “E-value” obtido na comparação dessa seqüência com as seqüências do “GenBank” foi $6e^{-40}$. O alinhamento da seqüência do clone DD-M4 com outras seqüências obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A15). A Tabela 6 mostra informações quanto aos tamanhos das seqüências similares ao fragmento clonado, a maior porcentagem de identidade com outras seqüências foi de 96%. As informações sobre a seqüência de nucleotídeos do clone DD-M4 e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A16).

Em tecidos verdes de plantas ocorre a fotorespiração que acontece em três organelas, cloroplasto, peroxisomo e mitocôndria. No cloroplasto, esse processo é dependente de luz e acontece com aporte de O_2 e liberação de CO_2 . Na fotorespiração a cadeia de transporte de elétrons fornece substratos de alta energia como ATP e NADPH para a fotossíntese.

Os cloroplastos de plantas superiores têm subunidades de NADH dehidrogenase e alguns produtos de peptídeos dessa enzima têm sido encontrados em membranas de tilacóides. A NADH dehidrogenase, também conhecida como NADH ubiquinona oxidoredutase, faz parte da cadeia de transporte de elétrons do

complexo I e catalisa a transferência de NADH para a coenzima Q. Nesse processo, o complexo também transporta prótons através da membrana de cloroplasto contribuindo com potencial eletroquímico para a produção de ATP. Os peptídeos codificados pelos genes de cloroplastos são homólogos às subunidades da NADH-ubiquinona redutase que é codificada pelos genes mitocondriais ou genes *nad*. (ENDO et al., 1999, JOET et al., 2001, MAIER et al., 1992).

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E- Value
gi 31580968 dbj AB098248.1	Nicotiana tomentosiformis ndhA ge...	139	6e-40		
gi 28195671 gb AY166803.1	Phoenix dactylifera NADH dehydroge...	163	2e-38		
gi 77799536 dbj AB237912.1	Nicotiana sylvestris chloroplast DNA	139	2e-39		
gi 76559634 emb Z00044.2 CHNTXX	Nicotiana tabacum chloroplast ge	139	2e-39		
gi 88656783 gb DQ386163.1	Solanum tuberosum cultivar Desiree ch	139	2e-39		
gi 88656873 gb DQ383815.1	Helianthus annuus cultivar line HA...	138	3e-39		
gi 34481608 emb AJ506156.2 ATR506156	Amborella trichopoda chloro	146	3e-33		
gi 74381688 emb AJ879453.1	Acorus calamus chloroplast, complete	148	7e-34		
gi 51235292 gb AY582139.1	Panax ginseng chloroplast, complete g	139	9e-39		
gi 84371962 gb DQ347959.1	Lycopersicon esculentum cultivar L...	139	9e-39		
gi 78675147 dbj AP007232.1	Lactuca sativa chloroplast DNA, comp	138	9e-39		
gi 32399358 emb AJ428413.1 CFE428413	Calycanthus fertilis var. f	164	2e-38		
gi 85687395 gb DQ345959.1	Gossypium hirsutum cultivar coker ...	139	2e-38		
gi 60460788 gb AY780259.1	Eucalyptus globulus subsp. globulu...	139	3e-31		
gi 5881673 dbj AP000423.1	Arabidopsis thaliana chloroplast g...	138	2e-38		
gi 91701629 gb DQ424856.1	Vitis vinifera cultivar Maxxa chlorop	139	3e-38		
gi 7636084 emb AJ400848.1 SOL400848	Spinacia oleracea complete c	140	3e-38		
gi 85816402 gb DQ231548.1	Brassica rapa subsp. pekinensis chlor	138	4e-38		
gi 50250306 emb AJ627251.1	Nymphaea alba chloroplast, complete	139	6e-38		
gi 20068310 emb AJ316582.1 ABE316582	Atropa belladonna complete	133	1e-37		
gi 13276709 emb AJ271079.2 OEL271079	Oenothera elata subsp. h...	136	4e-37		
gi 1419473 emb X98298.1 CHATNDHA	A.thaliana chloroplast ndhA gen	134	3e-36		
gi 62899131 gb AC160516.1	Medicago truncatula chromosome 7 B...	141	5e-36		
gi 74027081 gb DQ119058.1	Cucumis sativus cultivar Baekmibae...	138	7e-36		
gi 13358958 dbj AP002983.1	Lotus japonicus chloroplast DNA, com	138	2e-35		
gi 13928184 dbj AB042240.3	Triticum aestivum chloroplast DNA, c	132	4e-35		

Figura 18. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone DD-M4, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de “differential display” RT-PCR, com sequências de nucleotídeos depositadas no “GenBank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela. 6. Comparação da sequência do clone DD-M4, obtida em banana no período climatérico, com outras sequências depositadas no “GenBank”.

Acesso “GenBank”	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
AB098248.1	<i>Nicotiana tomentosiformis</i> / NADH dehidrogenase / DNA	96%	534
X62370.1	<i>Zea mays</i> / NADH dehidrogenase / DNA	90%	2235

Como a banana é um fruto climatérico, durante o amadurecimento a atividade na cadeia respiratória é maior, e esse fato talvez explique o possível aumento de expressão da NADH desidrogenase no fruto climatérico. A identidade desse gene foi maior com NADH desidrogenase de cloroplasto, porém não deve ser descartado o fato de que o gene de NADH desidrogenase de cloroplasto possui similaridade com o mitocondrial. Assim, esse gene pode ser tanto cloroplastidial como mitocondrial.

6.3.9. Clone DD-M5

O clone DD-M5, contendo um inserto correspondente a um fragmento com maior expressão na banana climatérica apresentou um tamanho de 125 bp. A comparação desse fragmento com outras seqüências do “GenBank” utilizando o programa Tblastx resultou em similaridade com proteínas bacterianas e os resultados das seqüências similares estão na Figura 19. O alinhamento da seqüência do clone DD-M5 com outras seqüências obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A17). As informações sobre a seqüência de nucleotídeos do clone DD-M5 e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A18).

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E Value	
gi	56126533	gb	CP000026.1	Salmonella enterica subsp. enteric...	68.9	2e-10
gi	16501496	emb	AL627266.1	Salmonella enterica serovar Typhi...	68.9	2e-10
gi	16418723	gb	AE008705.1	Salmonella typhimurium LT2, sectio...	68.9	2e-10
gi	56178122	gb	AE017340.1	Idiomarina loihiensis L2TR, complete	68.4	2e-10
gi	47118301	dbj	BA000007.2	Escherichia coli O157:H7 DNA, comple	68.4	2e-10
gi	15529631	gb	AF407013.1	AF407013 Escherichia coli outer mem...	68.4	2e-10
gi	4567045	gb	AF120927.1	AF120927 Shigella flexneri outer mem...	68.4	2e-10
gi	1552727	gb	U70214.1	ECU70214 Escherichia coli chromosome minu	68.4	2e-10
gi	81239530	gb	CP000034.1	Shigella dysenteriae Sd197, complete	68.4	2e-10
gi	81244029	gb	CP000036.1	Shigella boydii Sb227, complete genom	68.4	2e-10
gi	73854091	gb	CP000038.1	Shigella sonnei Ss046, complete genom	68.4	2e-10
gi	37509034	dbj	BA000037.2	Vibrio vulnificus YJ016 DNA, chromos	67.5	4e-10
gi	83629191	gb	AY552545.2	Uncultured marine gamma proteobact...	67.0	6e-10
gi	84778498	dbj	AP008232.1	Sodalis glossinidius str. 'morsitans	66.6	8e-10
gi	47118310	dbj	BA000031.2	Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210...	66.6	8e-10
gi	9656810	gb	AE004297.1	Vibrio cholerae O1 biovar eltor str...	66.6	8e-10
gi	45437263	gb	AE017137.1	Yersinia pestis biovar Medievalis ...	66.1	1e-09
gi	76881875	gb	CP000127.1	Nitrosococcus oceani ATCC 19707, comp	66.1	1e-09
gi	51587641	emb	BX936398.1	Yersinia pseudotuberculosis IP32953	66.1	1e-09

Figura 19. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone DD-M5, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de “differential display” RT-PCR, com as seqüências de nucleotídeos depositadas no “GenBank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

6.4. Biblioteca de subtração de cDNA

Como a biblioteca de subtração de cDNA é uma técnica que permite comparar duas populações de mRNA e obter clones de genes que são diferentemente expressos em uma população, mas ausentes ou com baixa expressão em outra, essa técnica foi aplicada para identificar seqüências com aumento de expressão na amostra de banana climatérica.

As seqüências obtidas por essa técnica foram clonadas e plaqueadas em meio LB-ágar e com IPTG e X-GAL. No total foram selecionadas 476 colônias e cada colônia foi retirada para crescimento em tubos contendo meio LB-ágar com ampicilina. Posteriormente, foi adicionado glicerol aos tubos para armazenamento dos clones, que foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C.

Do total de 476 colônias, inicialmente 92 clones contendo plasmídeos foram purificados para serem sequenciados. Após o sequenciamento inicial de 23 clones e comparação desses fragmentos com outras seqüências do "GenBank" através do programa tblastx, observou-se a predominância de três seqüências similares a três proteínas: expansina, omega-3-desaturase e taumatina. Apesar da similaridade de mais de um clone seqüência com determinada proteína, os fragmentos apresentaram variação no tamanho. Assim sendo, para aumentar a possibilidade do isolamento de novas seqüências, além das três seqüências já mencionadas, foi feito um "dot-blotting" com os 69 clones restantes, cujos os plasmídeos já tinham sido purificados. Nessa etapa os plasmídeos foram aplicados em triplicata em três

membranas para serem hibridizadas com sondas provenientes dos fragmentos similares à expansina, omega-3-desaturase e taumatina que já haviam sido seqüenciados. Como foram obtidos fragmentos de tamanhos diferentes, mas análogos a uma mesma proteína, a escolha das seqüências para a elaboração das sondas recaiu sobre aquelas com maior tamanho, para possibilitar uma melhor hibridização com os plasmídeos que contivessem essas seqüências. Após a hibridização, foi possível excluir seqüências similares as já obtidas. Desse modo foi selecionado outros dois clones, que após o sequenciamento, apresentaram similaridade com seqüências de metalotioneína e NADH mitocondrial. Cerca de 400 colônias ainda estão armazenadas a -80°C e, provavelmente, algumas das colônias armazenadas devem conter fragmentos diferentes dos já seqüenciados. Para se obterem novos fragmentos, o mesmo procedimento descrito anteriormente pode ser utilizado no futuro. Para confirmar o aumento de expressão dessas seqüências em banana climatérica foi feito um “northern-blotting” a partir de amostras de RNA de banana de 1, 3 e 7 DPC.

As informações obtidas na comparação dessa seqüência de banana com as outras seqüências do “GenBank” tais como tamanho e identidade com outros fragmentos depositados no “GenBank” estão descritos a seguir.

6.4.1. Clone BS-1

O clone BS-1 obtido a partir de banana climatérica utilizando a biblioteca de subtração apresentou 200 pb de tamanho. A partir das informações do sequenciamento foi feita a comparação, utilizando o programa Tblastx, com outras seqüências depositadas no “GenBank”, e foi observada a similaridade desse fragmento com uma seqüência de expansina de *M.acuminata*, cujo valor de “E-value” obtido foi de $8e^{-12}$. Além disso, houve similaridade com expansinas de vegetais tais como *Zinnia elegans*, *Prunus armeniaca* e *Pyrus communis*, cujas informações estão apresentadas na Figura 20. A Tabela 7 mostra informações quanto aos tamanhos das seqüências similares ao fragmento clonado, a maior identidade desse fragmento foi de 90% com a seqüência de *M. acuminata* já inserida no GenBank. A seqüência de nucleotídeos e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A19). O alinhamento da seqüência do clone BS-1 com outras seqüências obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A20).

Entre as diversas variações que os frutos sofrem no amadurecimento estão mudanças na textura, que conduzem à maciez característica em frutos climatéricos, como banana, tomate, maçã, pêssego, etc. O aumento da maciez é decorrência de alterações na parede celular como despolimerização e solubilização da hemicelulose e pectina.

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E Value
gi 20135553 gb AY083168.1	Musa acuminata expansin 1 (EXP1) mRNA	73.9	8e-12		
gi 23395239 gb AF539640.1	Musa acuminata expansin1 (EXP1) gene,	73.9	8e-12		
gi 7025492 gb AF230332.1	Zinnia elegans expansin 2 mRNA, comple	62.9	2e-08		
gi 3510537 gb U93167.1 PAU93167	Prunus armeniaca expansin (PA-Ex	62.5	2e-08		
gi 51507372 emb AJ811692.1	Pyrus communis mRNA for expansin (ex	60.6	8e-08		
gi 20135549 gb AY083166.1	Malus x domestica expansin 1 (EXP1) m	60.6	8e-08		
gi 7025494 gb AF230333.1	Zinnia elegans expansin 3 mRNA, comple	60.6	8e-08		
gi 38046727 gb AY435100.1	Populus tremula x Populus tremuloi...	60.2	1e-07		
gi 66992698 emb CR962133.1	Medicago truncatula chromosome 5 ...	60.2	1e-07		
gi 70779670 gb DQ100332.1	Eucalyptus globulus putative alpha...	59.7	1e-07		
gi 29466640 dbj AB047518.1	Prunus persica PpExp2 mRNA for expan	57.9	5e-07		
gi 6646884 gb AF159563.1 AF159563	Fragaria x ananassa expansin (	57.0	1e-06		
gi 2244735 dbj D88415.1	Cotton mRNA for expansin, clone CF631,	57.0	1e-06		
gi 47969970 emb AJ718202.1	Nicotiana tabacum cDNA-AFLP-fragm...	56.5	1e-06		
gi 1778098 gb U64890.1 PTU64890	Pinus taeda expansin mRNA, parti	56.5	1e-06		
gi 30231345 gb AC140030.6	Medicago truncatula clone mth2-7g24,	56.1	2e-06		
gi 32980487 dbj AK070463.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	55.6	3e-06		
gi 29421123 dbj AB104445.1	Vitis labrusca x Vitis vinifera V...	55.6	3e-06		

Figura 20. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone BS-1, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA, com as sequências de nucleotídeos depositadas no "GenBank". *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 7. Comparação da sequência do clone BS-1, obtida em banana no período climatérico, com outras sequências depositadas no "GenBank".

Acesso "GenBank"	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
AY083168.1	<i>Musa acuminata</i> / expasina / mRNA	90%	1098
AF230332.1	<i>Zinnia elegans</i> / expansina / mRNA	78%	1088
U93167.1	<i>Prunus armeniaca</i> / expansina / mRNA	77%	1109
AJ811692.1	<i>Pyrus communis</i> / expansina / mRNA	74%	1118

As expansinas rompem as ligações de ponte de hidrogênio na matriz de polissacarídeos e nas microfibrilas de celulose, o que induz a expansão celular e, desta forma, desempenham uma função importante em muitos processos do desenvolvimento da planta, como a organogênese, a germinação de sementes e o amadurecimento de frutos. (FONSECA et al., 2005, LI; JONES; MCQUEEN-MASON, 2003, TRIVEDI; NATH, 2004).

A função da expansina em frutos foi demonstrada em *Lycopersicon esculentum*, onde o gene de expansina, LeExp1, foi encontrado e parece ser expresso especificamente nos estágios finais do amadurecimento. Por ser um gene induzido pelo etileno em tomates, sugeriu-se que as expansinas desempenham uma importante função no amadurecimento (ROSE et al, 1997). A identificação desse gene no amadurecimento sugere que, além de facilitar a expansão de células em etapas anteriores do crescimento vegetal, as expansinas também contribuem para o desarranjo da parede celular em tecidos que não estejam em crescimento. Possivelmente, a ação dessa proteína facilita a ação de enzimas endógenas sobre os polímeros da parede celular (ROSE et al, 1997).

O aumento de expressão desse gene em tomates transgênicos produz uma maior maciez e a supressão resultou em frutos mais firmes, esse fato aumentou o período de vida de prateleira e também a viscosidade de extrato de tomate. Desde então as expansinas de outros frutos como morango, pêssigo e pêra foram identificados e a participação da expansina durante o amadurecimento foi confirmada (FONSECA et al., 2005, TRIVEDI; NATH, 2004). Recentemente uma

família de sete genes de expansinas foi isolada em pêras (*Pyrus communis* L.) e esses genes parecem mostrar diferença de expressão no desenvolvimento, no amadurecimento e na regulação hormonal de pêras. (FONSECA et al., 2005).

Segundo Trivedi (2004), pela combinação de PCR em tempo real e 5' e 3' RACE, um cDNA de expansina foi isolado em banana (MaEXp1), com tamanho de 1098 bp (acesso ao "GenBank" AY0831680). O alinhamento dessa seqüência com outras de MaExp1 sugere uma ORF de 768 bp, iniciando pelo códon ATG e codificando um peptídeo de 255 aminoácidos. O suposto polipeptídeo tem um peso molecular de 28kDa e o alinhamento de MaExp1 com outras expansinas específicas de frutos mostrou ser altamente conservado.

Para confirmar a expressão dessa seqüência durante o amadurecimento da banana foi feito um "northern-blotting". Com amostras 1, 3 e 7 DPC. A sonda desse fragmento não apresentou sinal em relação ao RNA 1 DPC, mas apresentou maior intensidade de sinal referente ao RNA 3 e 7 DPC. Esses fatos confirmam que a expressão dessa seqüência aumentou no decorrer do amadurecimento. Em relação ao tamanho das seqüências referentes às expansinas em diferentes plantas, os tamanhos dos fragmentos variaram entre 1000 - 1800 bases. O tamanho desse fragmento, estimado pelo "northern-blotting", foi de 1000 a 2000 bases, as informações estão apresentadas na Figura 21.

O aumento de expressão de um gene similar a expansina após o período climatérico na banana, provavelmente faz com que essa proteína atue no desarranjo da parede celular da banana proporcionando o aumento da maciez

característico de sua polpa nas etapas finais do amadurecimento, assim como já foi observado em outros frutos climatéricos como o tomate que também teve a expressão desse gene aumentada.

18.805

Identidade provável baseado na proteína com maior similaridade	Tamanho esperado (bases)	Tamanho obtido (bases)	Dias pós-colheita (DPC)
Expansina	1000 a 1800	1000 a 2000	1 3 7

Figura 21. Análise por “northern-blotting” de fragmento isolado pela biblioteca de subtração de cDNA em banana climatérica. A partir de 10 µg de RNA extraído de banana 1, 3, 7 DPC foi feita a separação por eletroforese em gel de agarose-formaldeído, para a transferência à membrana de nylon. A seguir, foi feita a hibridização com sonda do fragmento similar a expansina para a exposição da membrana ao filme. A comparação dos resultados obtidos no sequenciamento com outras seqüências disponíveis no “GenBank” utilizando o programa Tblastx, resultou na similaridade com expansina. Os resultados mostram que a expressão desses genes no fruto climatérico (3 e 7 DPC) foi maior, confirmando o aumento de expressão.

6.4.2. Clone BS-2

O clone denominado BS-2, proveniente amostra de banana climatérica e obtido pela técnica de biblioteca de subtração apresentou um tamanho de 204 pb. A partir das informações obtidas na comparação dessa seqüência com outras seqüências do “GenBank”, utilizando o programa Tblastx, foi observada a similaridade desse fragmento com uma proteína, a omega-3-desaturase, de *Malus x domestica*. O valor de “E-value” obtido ao se comparar a seqüência de banana foi de $5e^{-30}$ e as informações relativas a essa comparação estão apresentadas na Figura 22. Esse valor foi muito similar aos valores de “E-value” referentes a omega-3-desaturase de outros vegetais tais como *Arabidopsis thaliana*, *Glycine soja* e *Perilla frutescens*. As informações obtidas com o programa Tblastx estão Figura 22. A Tabela 8 mostra informações quanto aos tamanhos das seqüências similares ao fragmento clonado, e identidades com outras seqüências, a maior identidade foi de 95% com *M. domestica*. A seqüência de nucleotídeos e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A21). O alinhamento da seqüência do clone BS-2 com outras seqüências, obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A22).

Uma característica comum à membrana de plastídeos de plantas superiores é o alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados como os ácidos graxos trienóicos que são convertidos em dienóicos pela ação das omega-3 ácidos graxos desaturases. Essa enzima introduz uma terceira dupla ligação na biossíntese do ácido graxo 18:3 que é um dos constituintes da membrana de plastídeos (YADAV et al., 1993, IM et al, 2001).

Sequences producing significant alignments:					Score (Bits)	E Value
gi	45385975	gb	AY551558.1	Malus x domestica chloroplast omeg...	123	8e-27
gi	32479365	gb	AY248741.2	Lycopersicon esculentum omega-3 fa...	122	2e-26
gi	30681009	ref	NM 120640.2	Arabidopsis thaliana FAD8 (FATTY...	122	2e-26
gi	6752906	gb	AF222989.1	AF222989 Capsicum annuum omega-3 fat...	122	2e-26
gi	1754794	gb	U59477.1	PFU59477 Perilla frutescens omega-3 fa...	122	2e-26
gi	414731	gb	L25897.1	RCCFAD7A Ricinus communis linoleoyl desatu	122	2e-26
gi	408791	gb	L22965.1	SOYCPFADD Glycine soja chloroplast omeg...	122	2e-26
gi	1694624	dbj	D79979.1	Nicotiana tabacum mRNA for omega-3 f...	122	2e-26
gi	32968260	dbj	AK058242.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	122	2e-26
gi	32442201	gb	AY248742.1	Lycopersicon esculentum omega-3 fa...	122	2e-26
gi	870783	gb	U25817.1	SIU25817 Sesamum indicum omega-3 fatty ...	122	2e-26
gi	2446993	dbj	D63952.1	Zea mays FAD7 mRNA for fatty acid desat	122	2e-26
gi	1786065	gb	U75745.1	PCU75745 Petroselinum crispum omega-3 ...	122	3e-26
gi	21668464	dbj	D43688.3	Triticum aestivum TaFAD7 mRNA for p...	122	3e-26
gi	34787275	dbj	AB105887.1	Glycine max Fan mRNA for microsom...	121	4e-26
gi	32981208	dbj	AK071185.1	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	121	4e-26
gi	32306981	gb	AY254858.1	Helianthus annuus omega-3 fatty ac...	121	4e-26
gi	27902574	gb	AY204711.1	Glycine max microsomal omega-3-fat...	121	4e-26

Figura 22. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone BS-2, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA, com as sequências de nucleotídeos depositadas no “GenBank”. *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 8. Comparação da sequência do clone BS-2, obtida em banana no período climatérico, com outras sequências depositadas no “GenBank”.

Acesso “GenBank”	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
AY551558.1	<i>Malus x domestica</i> / Omega 3 desaturase / mRNA	97%	1320
NM120640.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> / Omega 3 desaturase / mRNA	95%	2037
L22965.1	<i>Glycine soja</i> / Omega 3 desaturase / mRNA	95%	1675
U59477.1	<i>Perilla frutescens</i> / Omega 3 desaturase / mRNA	93%	1797

As omega-3-desaturases foram caracterizadas através de uma série de mutantes de *Arabidopsis thaliana* com alterações na insaturação de ácidos graxos da membrana lipídica de plastídeos. Entre elas estava o mutante FAD7, que continha teor reduzido nos níveis de ácido graxo linolênico (18:3) na membrana lipídica de plastídeos. Essa mutação não apresentou efeito aparente no crescimento e desenvolvimento da planta, mas levou à redução no tamanho médio e a um correspondente aumento no número de cloroplastos em folhas (IM et al, 2001).

Outras funções dos ácidos graxos trienólicos foram relatadas, quanto à sobrevivência das plantas submetidas a “stress”, especialmente em relação ao ácido linolênico. Como, por exemplo, o fato do ácido linolênico ser convertido em ácido jasmônico. O acúmulo de ácido jasmônico ocorre em resposta à expressão de genes de defesa, que apresentam expressão aumentada quando a planta sofre injúrias por ataque de agentes patogênicos e insetos (IM et al, 2001). Também existem relatos da expressão de omega-3-desaturase em respostas à desidratação e também a outro fitohormônio relacionado ao “stress”, o ácido abscísico (IM et al, 2001). Por essas razões, a expressão do gene de omega-3-ácido graxo desaturase parece estar relacionada com várias respostas ambientais relacionadas ao “stress”. Entretanto, a regulação desse gene em resposta a fatores ambientais ainda não está clara (IM et al, 2001).

A confirmação do aumento de expressão desse gene correspondente a omega-3-desaturase foi feita através do “northern-blotting”. Como pode ser visto na Figura 23, o sinal foi maior nas amostras de RNA relativas aos 3 e 7 DPC. O que confirma o aumento de expressão dessa seqüência no amadurecimento.

Em diversas plantas os tamanhos dos insertos referentes a omega-3-desaturase variaram entre 1300 - 2000 bases. O tamanho estimado da seqüência em banana climatérica, obtido através do “Northern-blotting”, foi de 1500 bases.

Nas etapas finais do amadurecimento a banana sofre inúmeras alterações em um curto período de tempo. Nesse período, também ocorre uma maior fragilidade do fruto em relação à ação de agentes patogênicos. Esses fatores em conjunto podem contribuir para o aumento de expressão de um gene similar a omega-3-desaturase, relacionada a algumas condições de “stress” ambiental.

Identidade provável baseado na proteína com maior similaridade	Tamanho esperado (bases)	Tamanho obtido (bases)	Dias pós-colheita (DPC)		
			1	3	7
Omega-3-desaturase	1300 a 2000	1500			

Figura 23. Análise por "northern-blotting" de fragmento isolado pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA em banana no período climatérico. A partir de 10 µg de RNA extraído de banana 1, 3, 7 DPC foi feita a separação por eletroforese em gel de agarose-formaldeído, seguida de transferência para a membrana de nylon. A seguir, foi feita a hibridização com sonda do fragmento similar a omega-3-desaturase, e com maior expressão na banana climatérica, para a exposição da membrana ao filme. A comparação dos resultados obtidos no sequenciamento com outras seqüências disponíveis no GenBank utilizando o programa Tblastx, resultou na similaridade com omega-3-desaturase. Os resultados mostram que a expressão desses genes no fruto climatérico (3 e 7 DPC) foi maior, confirmando o aumento de expressão no período climatérico.

6.4.3. Clone BS-3

O clone denominado BS-3, isolado de amostra de banana climatérica apresentou, um tamanho de 310 pb. As informações obtidas a partir da comparação dessa seqüência com outras inseridas no “GenBank”, utilizando o programa Tblastx, mostraram similaridade com uma proteína antifúngica de *Musa acuminata* denominada taumatina já depositada no “GenBank” (MEDINA-SUAREZ et al., 1997). O “E-value” obtido na comparação foi de $4e^{-16}$ e esse valor foi similar ao obtido com outras proteínas como a osmotina de *Theobroma cacao*, bem como a outras proteínas de defesa em *Helianthus annuus* e a taumatina presente em *Vitis vinifera*, as informações obtidas no Tblastx estão apresentados na Figura 24. A Tabela 9 mostra informações quanto aos tamanhos das seqüências similares ao fragmento clonado e também a porcentagem de identidade com essas seqüências, cujo maior valor de identidade foi 87%. A seqüência de nucleotídeos e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A23). O alinhamento da seqüência do clone BS-3 com outras seqüências obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A24).

A polpa de banana madura contém grande quantidade de proteínas similares a taumatina – Ban-TLP (CLENDENNEN; MAY, 1997; BARRE et al., 2000). A taumatina é uma proteína de sabor doce proveniente de *Thaumatococcus daniellii*. A caracterização da proteína Ban-TLP e a clonagem molecular do gene correspondente demonstraram que a proteína nativa consiste de uma seqüência de 200 aminoácidos. Em relação ao sabor, a proteína Ban-TLP não apresentou sabor adocicado quando comparada com a taumatina proveniente de *T. daniellii* (BARRE et al., 2000).

Sequences producing significant alignments:						Score (Bits)	E Value
gi	2624221	emb	Z93125.1	MAZ93125	M.acuminata mRNA; clone pBAN UD	104	4e-21
gi	54609346	gb	AY766059.1		Theobroma cacao osmotin-like (osml) g	100	6e-20
gi	33329389	gb	AF532965.1		Vitis vinifera thaumatin-like protein	97.7	4e-19
gi	5881238	gb	AF178653.1	AF178653	Vitis riparia thaumatin mRNA,	96.8	8e-19
gi	20385168	gb	AF364864.1		Helianthus annuus pathogenesis-rel...	96.4	1e-18
gi	21630095	gb	AF516691.1		Musa acuminata clone F454 osmotin-...	93.6	8e-18
gi	38228694	emb	AJ586518.1		Fagus sylvatica partial taul mRNA fo	93.6	8e-18
gi	1839045	emb	Y10992.1	VVOSM1	V.vinifera mRNA for osmotin-like	92.3	2e-17
gi	3747059	gb	AF093743.1	AF093743	Lycopersicon esculentum pat...	90.9	5e-17
gi	170466	gb	M21346.1	TOMNP24	Tomato NP24 protein mRNA, 3' end	90.9	5e-17
gi	19314	emb	X70787.1	LEPRPA	L.esculentum pr p23 mRNA for pathog	90.9	5e-17
gi	21194	emb	X67121.1	SCOSMLP	S.commersonii mRNA for osmotin-lik	90.9	5e-17
gi	256134	gb	S44889.1		osmotin=pathogenesis-related protein h...	90.0	1e-16
gi	251138	gb	S40046.1		abscisic acid-activated [Nicotiana tab...	90.0	1e-16
gi	1167853	emb	X95308.1	NTOSPR	N.tabacum osmotin gene	90.0	1e-16
gi	19899	emb	X61679.1	NTOSMOTIN	N.tabacum mRNA for osmotin	90.0	1e-16
gi	14165166	gb	AF376058.1		Petunia x hybrida osmotin (OSM) mRNA,	90.0	1e-16
gi	71057063	emb	AJ871175.2		Actinidia deliciosa mRNA for thau...	89.5	1e-16
gi	53830835	gb	AY737312.1		Solanum tuberosum osmotin-like pro...	89.0	2e-16
gi	23955926	gb	AF548357.1		Solanum gilo thaumatin-like protein (	89.0	2e-16
gi	15419835	gb	AF297646.1		Capsicum annuum thaumatin-like protei	88.1	3e-16

Figura 24. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone BS-3, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA, com as sequências de nucleotídeos depositadas no "GenBank". *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 9. Comparação da sequência do clone BS-3, obtida em banana no período climatérico, com outras sequências depositadas no "GenBank"

Acesso "GenBank"	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
Z93125.1	<i>Musa acuminata</i> / pBAN / mRNA	87%	808
AY766059.1	<i>Theobroma cacao</i> / osmotina / DNA	87%	645 (parcial)
AF364864.1	<i>Helianthus annus</i> / -defesa- / mRNA	82%	875
AF532965.1	<i>Vitis vinifera</i> / taumatina / mRNA	80%	815

Algumas proteínas que possuem similaridade com a taumatina da banana apresentam atividades antifúngicas, como, por exemplo, a zeamatina encontrada na cevada e no milho e a osmotina do tabaco, essas proteínas também estão presentes em outros frutos como maçã, cereja, uva, etc. Porém, segundo Barre et. al (2000) em seu estudo, a taumatina analisada proveniente de banana não apresentou atividade antifúngica aparente. A taumatina é uma proteína abundantemente presente na polpa da banana madura e apesar de não desempenhar uma função antifúngica aparente, a sua função fisiológica na banana ainda não está clara (BARRE et. al, 2000).

Porém, para se ter certeza da atividade antifúngica da proteína referente ao gene isolado no presente trabalho, seria necessário isolar a proteína na amostra de banana climatérica e analisar as propriedades antifúngicas da mesma. Pois, pode haver diferenças nas atividades de proteínas, cujos frutos foram cultivados em regiões diferentes ou que foram expostos a condições ambientais distintas, por exemplo.

Como o aumento dessa proteína ocorre na fase final do amadurecimento, e essas proteínas de defesa estão presentes em espécies que dependem da disseminação de sementes por animais que consumam esses frutos, especula-se que essas proteínas seriam, de algum modo, benéficas na dispersão de sementes, na medida em que o sabor agradável proveniente dessas proteínas atraia esses organismos que assim dispersarão as sementes. Por outro lado, essas proteínas podem interagir de alguma forma com os componentes da superfície do trato digestivo,

reduzindo o dano às sementes desses frutos. Esse mecanismo pode, por exemplo, explicar a leve diarreia que ocorre em pássaros quando da ingestão de cerejas (BARRE et al., 2000).

Ao comparar o tamanho de diversas taumatinas de plantas já depositadas no “GenBank”, os tamanhos das seqüências variaram entre 800 - 1000 bases. E ao avaliar o tamanho desse fragmento obtido da biblioteca de subtração, pelo “northern-blotting” o tamanho da seqüência foi de aproximadamente 900 bases. A marcação da sonda desse fragmento foi muito maior na amostra referente a 7 DPC, dados na Figura 25. Esse fato mostra que o aumento de expressão desse gene ocorre na fase final do amadurecimento, quando a fruta está mais susceptível a ataques de agentes externos.

Identidade provável baseado na proteína com maior similaridade	Tamanho esperado (bases)	Tamanho Obtido (bases)	Dias pós-colheita (DPC)
Taumatina	800 a 1000	750 a 1250	1 3 7

Figura 25. Análise por “northern-blotting” de fragmento BS-3 isolado pela técnica de biblioteca de subtração em banana no período climatérico. A partir de 10 µg de RNA extraído de banana 1, 3, 7 DPC foi feita a separação por eletroforese em gel de agarose-formaldeído, seguida de transferência à membrana de nylon. A seguir, foi feita hibridização com sonda do fragmento similar a taumatina e com maior expressão na banana climatérica para a exposição da membrana ao filme. A comparação dos resultados obtidos no sequenciamento com outras seqüências disponíveis no “GenBank” utilizando o programa Tblastx resultou na similaridade com taumatina. Os resultados mostram que a expressão desses genes no fruto maduro (3 e 7 DPC) foi maior, confirmando o aumento de expressão em banana no período climatérico.

6.4.4. Clone BS-4

O clone, denominado BS-4, obtido a partir da amostra de banana climatérica, proveniente da biblioteca de subtração de cDNA, apresentou um tamanho de 174 pb. Através da comparação da seqüência do clone BS-4 com seqüências do "GenBank", utilizando o programa Tblastx, foi determinada a similaridade com NADH dehidrogenase de outros vegetais como *Zea Mays*, *Triticum aestivum* e *Oryza sativa*, o menor valor de "E-value" obtido na comparação foi de $1e^{-33}$, os resultados da comparação estão contidos Figura 26. A Tabela 10 mostra informações dos tamanhos de algumas seqüências similares ao fragmento clonado e a porcentagem de identidade com as seqüências, cuja maior valor de identidade foi de 93%. A seqüência de nucleotídeos e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A25). O alinhamento da seqüência do clone BS-4 com outras seqüências obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A26).

Em mitocôndrias, a cadeia de transporte de elétrons possui uma série de quatro complexos protéicos (complexo I, II, III e IV), sendo que a NADH dehidrogenase está presente no complexo I e II. No complexo I a NADH dehidrogenase oxida o NADH gerado pela matriz mitocondrial pelo ciclo do ácido cítrico, regenerando NAD^+ e reduzindo ubiquinona. Como no complexo I, o complexo II transfere elétron a ubiquinona que pode carrear um ou dois elétrons.

Sequences producing significant alignments:					Score (Bits)	E Value
gi	40794996	gb	AY506529.1	Zea mays strain NB mitochondrion, com	88.1	1e-33
gi	47118326	dbj	BA000029.3	Oryza sativa (japonica cultivar-g...	88.1	1e-33
gi	78675232	dbj	AP008982.1	Triticum aestivum mitochondrial DNA,	88.1	1e-33
gi	19560	emb	Z11889.1	MITTARRNG T.aestivum mitochondrion rrn2...	88.1	1e-33
gi	66969373	gb	DQ008785.1	Eupomatia bennettii large subunit ...	88.1	1e-33
gi	66969395	gb	DQ008807.1	Asparagus officinalis large subuni...	88.1	1e-33
gi	66969404	gb	DQ008816.1	Tofieldia calyculata large subunit...	88.1	1e-33
gi	66969397	gb	DQ008809.1	Carludovica palmata large subunit ...	87.7	2e-33
gi	66969396	gb	DQ008808.1	Croomia pauciflora large subunit r...	86.3	2e-32
gi	32364335	gb	AY279309.1	Malus x domestica NADP-dependent m...	88.1	7e-32
gi	66969393	gb	DQ008805.1	Cinnamodendron ekmanii large subun...	79.4	2e-30
gi	66969375	gb	DQ008787.1	Degeneria vitiensis large subunit ...	80.3	1e-29
gi	66969392	gb	DQ008804.1	Canella winterana large subunit ri...	79.4	7e-30
gi	66969399	gb	DQ008811.1	Triglochin maritimum large subunit...	87.2	1e-29
gi	66969400	gb	DQ008812.1	Alisma plantago-aquatica large sub...	87.2	1e-29
gi	66969394	gb	DQ008806.1	Dioscorea sp. Qiu 94044 large subu...	76.2	3e-28
gi	66969350	gb	DQ008762.1	Sargentodoxa cuneata large subunit...	80.3	2e-27
gi	54606683	dbj	BA000024.1	Beta vulgaris subsp. vulgaris mit...	80.3	2e-28

Figura 26. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone BS-4, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA, com as sequências de nucleotídeos depositadas no "GenBank". *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 10. Comparação da sequência do clone BS-4, obtida em banana no período climatérico, com outras sequências depositadas no "GenBank"

Acesso "GenBank"	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade
AP008982.1	<i>Triticum aestivum</i> / nad mitochondrial / DNA	93%
AY506529.1	<i>Zea mays</i> / NADH dehydrogenase / DNA	93%
BA000029.1	<i>Oryza sativa</i> / NADP dehydrogenase / DNA	93%

O aumento de expressão da seqüência, similar ao NADH dehidrogenase na banana climatérica, pode estar relacionada com o aumento da atividade respiratória que ocorre nesse período. A respiração libera grande quantidade de energia livre, que é armazenada sob a forma das ligações das moléculas de ATP. Essa energia de ligação química pode ser usada em reações metabólicas como crescimento, desenvolvimento e manutenção da planta.

O aumento de expressão desse gene em bananas climatéricas foi confirmado em amostras com 3 e 7 DPC por “northern-blotting”. Os tamanhos das seqüências de NADH dehidrogenase similares ao fragmento obtido variaram entre 1260 - 2150 bases. E o tamanho da seqüência obtida pela biblioteca de subtração de foi de 2000 bases, as informações referentes ao “northern-blotting” estão na apresentadas na Figura 27.

Identidade provável baseado na proteína com maior similaridade	Tamanho esperado (bases)	Tamanho obtido (bases)	Dias pós-colheita (DPC)
NADH mitocondrial	1260 a 2150	2000	1 3 7

Figura 27. Análise por "northern-blotting" de fragmento BS-4 isolado pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA em banana no período climatérico. A partir de 10 µg de RNA extraído de banana 1, 3, 7 DPC foi feita a separação por eletroforese em gel de agarose-formaldeído, seguida de transferência para a membrana de nylon. A seguir, foi feita a hibridização com sonda do fragmento similar a NADH mitocondrial com maior expressão na banana climatérica para a exposição da membrana ao filme. A comparação dos resultados obtidos no sequenciamento com outras seqüências disponíveis no "GenBank" utilizando o programa Tblastx, resultou na similaridade NADH mitocondrial. Os resultados mostram que a expressão desses genes no fruto climatérico foi maior (3 e 7 DPC), confirmando o aumento dessa expressão nesse período.

6.4.5. Clone BS-5

O clone, denominado BS-5, foi obtido a partir de banana climatérica, proveniente da biblioteca de subtração apresentou um tamanho de 115 pb. A comparação desse fragmento com outras seqüências do “GenBank” utilizando o programa “Tblastx” mostrou similaridade com outras metalotioneínas de *M.acuminata* e as informações obtidas nessa comparação estão apresentadas na Figura 28. O valor de “E-value” obtido nessa comparação foi de $3e^{-17}$ e a identidade foi de 100% com os fragmentos de *Musa acuminata*. A Tabela 11 mostra informações dos tamanhos das seqüências similares ao fragmento clonado e a porcentagem de identidade. A seqüência de nucleotídeos e os aminoácidos correspondentes a cada códon estão em anexo (vide-anexos Figura A27). O alinhamento da seqüência do clone BS-5 com outras seqüências obtidas no Tblastx está em anexo (vide-anexos Figura A28).

As metalotioneínas são pequenos polipeptídeos associados com a desintoxificação de metais e a homeostasia. Isto porque esses polipeptídeos são ricos em resíduos de cisteína (20-30 %) que se ligam a íons metálicos como cobre, zinco e cádmio. Em plantas, a função de desintoxicação das metalotioneína tem como base o estudo de transgênicos, nos quais as plantas têm a expressão de genes de metalotioneína aumentada quando submetidos à tolerância por metais. O porquê desse aumento de expressão ainda não foi elucidado. Mas, diferentes estudos de expressão gênica relacionados com o amadurecimento de frutos obtiveram como resultado genes similares a metalotioneína.

Sequences producing significant alignments:				Score (Bits)	E Value
gi 12006149 gb AF268393.1	Musa acuminata metallothionein-lik...	91.3	3e-17		
gi 1213511 gb U49044.1 MAU49044	Musa acuminata metallothionein-1	81.7	2e-14		
gi 40716475 gb AY463012.1	Musa acuminata metallothionein mRNA,	75.3	2e-12		

Figura 28. Reprodução do resultado obtido da comparação da sequência do clone BS-5, proveniente de bananas climatéricas e selecionado pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA, com as sequências de nucleotídeos depositadas no "GenBank". *E-value* significa a probabilidade do pareamento ao acaso.

Tabela 11. Comparação da sequência do clone BS-5, obtida em banana no período climatérico, com outras sequências depositadas no "GenBank"

Acesso "GenBank"	Vegetal / Proteína / Origem	Identidade	Tamanho do fragmento (bases)
AF268393.1	<i>Musa acuminata</i> / metalotioneína / mRNA	100%	469
U490444.1	<i>Musa acuminata</i> / metalotioneína / mRNA	100%	478
AY463012.1	<i>Musa acuminata</i> / metalotioneína / mRNA	100%	404

A frequência alta desse gene (10%) em um estudo de biblioteca de cDNA de banana (LIU et al., 2002), indica que a importância desse gene é significativa no amadurecimento desse fruto. A similaridade do fragmento encontrada no presente trabalho foi com a MT-3, que segundo Liu (2002) também apresentou aumento de expressão no decorrer do amadurecimento. Nesse estudo a expressão da MT-3 foi aumentada gradualmente no período entre 80 e 100 dias pós-antese, culminando com a maior expressão em 120 dias pós-antese.

7. CONCLUSÃO

Apesar das análises serem baseadas na comparação de estágios fisiológicos diferentes, o número de genes identificados como diferentemente expressos foi relativamente baixo. Assim, é bastante provável que as técnicas empregadas tenham sido sensíveis para identificar somente os genes que apresentaram uma diferença muito significativa na expressão, ou ainda, os transcritos mais abundantes na polpa da banana. Deste modo, para isolar genes com menor variação de expressão, ou expressos em níveis muito mais baixos, outras estratégias ou técnicas devem ser aplicadas.

Algumas seqüências de banana foram similares a genes que tem relação com o mecanismo de defesa em plantas. Como, por exemplo, a taumatina que tem função antifúngica; a metalotioneína, cuja expressão é associada à presença de íons metálicos; a omega-3-desaturase que participa da síntese de ácido linolênico, o qual pode ser convertido em ácido jasmônico, cujo acúmulo ocorre em resposta a injúrias causadas por patógenos e a legumina, que apesar de ser uma proteína de reserva pertence a uma família de proteínas que desencadeia reações alérgicas em consumidores e que pode, deste modo, fazer parte do sistema de defesa vegetal.

Duas seqüências de NADH dehidrogenase diferentes foram obtidas com as duas técnicas aplicadas. Essa enzima está envolvida na cadeia de transporte de elétrons da respiração. Em frutos climatéricos como a banana, existe uma elevação na taxa respiratória durante o pico climatérico e o aumento de expressão da NADH

dehidrogenase pode evidenciar a necessidade do fruto aumentar a expressão de genes relacionados com a respiração nesse período.

Outros genes obtidos estão relacionados com o desenvolvimento de plantas de uma forma geral. Como exemplos, a imunofilina, que pode atuar como chaperona modificando a conformação de proteínas e que também pode atuar na regulação hormonal em resposta a citoquinina; a expansina, uma proteína que atua no rompimento das ligações da parede celular e induz a expansão celular, mas que pode estar relacionada com o amaciamento da polpa do fruto; a desoxiribonucleotídeo quinase, necessária para a síntese de ácidos nucleicos; a proteína translocadora de nucleotídeo adenina (ANT) que catalisa a troca de ATP por ADP e a aquaporina, proteína de membrana que pode transportar além de água outras moléculas pequenas para manter o equilíbrio osmótico no fruto.

Assim, o conjunto de resultados parece refletir, principalmente, a ocorrência de alterações no padrão de expressão de genes relacionados ao “stress” ou defesa dos tecidos, e genes envolvidos com as demandas criadas pelo intenso fluxo metabólico estabelecido durante o climatério da banana.

8. REFERÊNCIAS

- Adams-Phillips, L., Barry C., Giovannoni J. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *TRENDS in Plant Science*, Kidlington v.9, n.7, p. 331-338, 2004.
- Altschul S. F., Gisha W., Millerb W., Meyersc E. W., Lipmana D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- Baldwin D., Crane V., Rice D. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Current opinion in plant biology*, London, v.2, p. 96-103, 1999.
- Barre A., Peumans W. J., Menu-Bouaouiche L., Damme E.J.M., May G.D., Herrera A. F., Leuven F. V., Rougé P. Purification and structural analysis of an abundant thaumatin-like protein from ripe banana fruit. *Planta*, Berlin, v.211, p. 791-799, 2000.
- Barry C.S., McQuinn R. P., Thompson A.J., Seymour G.B., Grierson D., Giovannoni J. J. Ethylene insensitivity conferred by the green-ripe and never-ripe 2 ripening mutants of tomato. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 138, p. 267–275, 2005.
- Benson,D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J.,Rapp, B.A., Wheeler, D.L. Genbank. *Nucleic Acids Res*, London, v. 28, n.1, p. 15-18, 2000.
- Breiteneder H., Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, St Louis v. 113, n. 5, p. 821-30, 2004.
- Campo E. M., Sabater B., Martín M. Transcripts of the *ndhH-D* operon of barley plastides: possible role of unedited site III in splicing of *ndhA* intron. *Nucleic Acids Research*, London, v. 28, n. 5, p. 1092-1098, 2000.

- Carrari F, Fernie A. R. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, p.1-15, 2006.
- Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M. J., Jung R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 125, p. 1206–1215, 2001.
- Clark M.D., Panopoulou G.D., Cahill D.J., Büsow K., Lehrach H. Construction and analysis of arrayed cDNA libraries. *Methods in Enzymology*, New York v. 303, p. 205-233, 1999.
- Clark M.D. *Plant molecular Biology: A laboratory manual*. Berlin. Springer Lab Manual. 1996.
- Clendennen S.L.K., May G. D. Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 115, p. 463-469, 1997.
- Company P., Gonzalez-Bosch C. Identification of a copper chaperone from tomato fruits infected with *Botrytis cinerea* by differential display. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, San Diego, v. 304, p. 825-830, 2003.
- Cordenunsi, B.R., Lajolo, F.M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 43, n. 2, p. 347-351, 1995.
- Cunningham B.A. Assessing differential gene expression. *The Scientist*, Philadelphia, v.15, p. 27, 2001.
- Degenhardt J., Al-Masri A. N., Kürkcüoglu S., Szankowski I., Gau A. E., Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Mol Genet Genomics*, Berlin, v. 273, p. 326–335, 2005.

- Diachenko, L. B. Ledesma, J., Chenchik, A. A., Siebert, P.D. Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, San Diego, v. 219, p. 824-828, 1996.
- Donson J., Fang Y., Espiritu-Santo G., Xing W., Salazar A., Miyamoto S., Armendarez V., Volkmut W. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Molecular Biology*, The Hague, v. 48, p. 75-97, 2002.
- Drmanac R, Drmanac S. cDNA screening by array hibridization. *Methods in Enzymology*, New York, v. 303, p. 165-178, 1999.
- Drury R., Hörtensteiner S., Donnison I., Bird C.R., Seymour G.B. Chlorophyll catabolism and gene expression in the peel of ripening banana fruits. *Physiol. Plantarum*, Lund, v. 197, p. 32-38, 1999.
- Eisen M.B., Brown P.O., DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods in Enzymology*, New York, v. 303, p. 179-204, 1999.
- Endo T., Shikanai T., Takabayashi A., Asada K, Sato F. The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 457, p. 5-8, 1999.
- FAO PRODUCTION YEARBOOK. Roma: FAO, 1991. (FAO Statistics Series).
- Fennema O.R. Food Chemistry (Third edition), Marcel Dekker, New York (1996).
- Fonseca, S., Monteiro L., Barreiro M. G., Pais M. S. Expression of genes encoding cell wall modifying enzymes is induced by cold storage and reflects changes in pear fruit texture. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 56, n. 418, p. 2029-2036, 2005.
- Fulgosi H., Vener A.V., Altschmied L., Herrmann R.G., Andersson B. A novel multi-functional chloroplast protein: identification of a 40 kDa immunophilin-like protein located in the thylakoid lumen. *Embo journal*, Eynsham, v. 17, p. 1577-1587, 1998.

- Germain H., Rudd S., Zotti C., Caron S., O'Brien M., Chantha S., Lagace' M., Major F., Matton D. P. A 6374 unigene set corresponding to low abundance transcripts expressed following fertilization in *Solanum chacoense* Bitt, and characterization of 30 receptor-like kinases. *Plant Molecular Biology*, The Hague, v. 59, p. 515–532, 2005.
- Giovannoni J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Palo Alto v. 52, p. 725-749, 2001.
- Giovannoni J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell (suppl)*, Rockville, 16: s170–s180, 2004.
- Gray, J., Picton, S., Shabbeer, J., Schuch, W., Grierson, D. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Molecular Biology*, The Hague, v. 19, p. 69-87, 1992.
- Huang J.Y., Chang T., Chang C.Y., Chen C. J. Crystal structure of nucleoside iphosphate kinase required for coleoptile elongation in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Structural Biology*, San Diego, v.150, p. 309-318, 2005
- Hulme A.C. The biochemistry of fruits and their products. Academic Press, London (1971).
- Im Y. J., Han O., Chung G.C., Cho B. H. Antisense Expression of an *Arabidopsis* Ω -3 Fatty Acid Desaturase Gene Reduces Salt/Drought Tolerance in Transgenic Tobacco. *Plants. Mol. Cells.*, v. 13, p. 264-271, 2001.
- Jiang H., Kang D, Alexandre D., Fisher P.B. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. Washington*, v. 97, p. 12684-12689, 2000.

- Joët T., Cournac L., Horvath E. M., Medgyesy P., Peltier G. Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhb* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. *Plant Physiology*, Lancaster, v. 125, p. 1919–1929, 2001.
- Kang D., LaFrance R, Su Z.Z., Fischer P. B. Reciprocal Subtraction differential RNA display: An efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. *PNAS*, Washington v. 95, p. 13788-13793, 1998.
- Kalamaki M.S., Powell A. T., Struijs K., Labavitch J. M., Reid D.S., Bennett A.B. Transgenic overexpression of expansin influences particle size distribution and improves viscosity of tomato juice and paste. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 51, p. 7465-7471, 2003.
- Kim S. H., Grierson D., Subcellular localisation and silencing of ripening-associated membrane protein (TRAMP) in tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Science*, Shannon, v. 169, p. 1022–1029, 2005.
- Kim Y. S., Park J. Y., Kim K. S., Ko M. K., Cheong S. J., Oh B. J. A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Molecular Biology*, The Hague, v. 49, p. 125–135, 2002.
- Kramer, M., Sanders, R., Bolkan, H., Waters, C., Sheehy, R.E., Hiatt, W.R. Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance. *Postharvest Biol. Technol.*, Amsterdam, v.1, p. 241–255, 1992.
- Kuhn E. From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany*, St. Louis, v. 87, p. 139-155, 2001.

- Lanahan M.B., Yen H-C., Giovannoni J.J., Klee H.J. The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell*, Rockville, v. 6, p. 521–530, 1994.
- Lang P., Zhang C.K., Ebel R. C., Dane F., Dozier W. A. Identification of cold acclimated genes in leaves of Citrus unshiu by mRNA differential display. *Gene*, Amsterdam, v. 359, p. 111-118, 2005.
- Laloi M. Plant mitochondrial carriers: an overview. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, Basel, v.56, p. 918–944, 1999.
- Lee S., Benmoussa M., Sathe S. K. , Roux K.H., Teuber S.S., Hamaker. B.R. A 50 kda maize γ -zein has marked cross-reactivity with the almond major protein. *J. Agric. Food Chem.* Washington, v. 53, p. 7965-7970, 2005.
- Lewin B. *Genes VI*. Oxford University Press, Oxford, 1997.
- Li Y., Jones L., McQueen-Mason S. Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology*, London, v.6, p.603–610, 2003.
- Liang, P., and Pardee A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, Washington, v.257, p. 967-970.1992
- Lievens S., Goormachtig S., Holsters M. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acids Res.* London, v.29, n.17, p. 3459-3468, 2001.
- Liu P., Goh C-J, Loh C-S., Pua E-C. Differential expression and characterization of three metallothioneinlike genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*). *Physiologia plantarum*, Lund, v. 114, p. 241–250, 2002.
- López-Gómez, R. and M.A. Gómez-Lim: A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hortscience*, Alexandria, v.27, n.5, p. 440-442, 1992.

- Lu Z. X., Gaudet D. A., Frick M., Puchalski B., Genswein B., Laroche A. Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Seoul, v. 38, n. 4, p. 420-431, 2005.
- Luan S, Albers MW, Schreiber SL. Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, v.91, p. 984–988, 1994.
- Maier, R. M., Hoch B., Zeltz P., Kössel H. Internal editing of the maize Chloroplast *ndhA* transcript restores codons for conserved amino acids. *The plant cell*, Rockville, v. 4, p. 609-616, 1992.
- Manning K. Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*, Berlin, v. 205, p. 622-631, 1998.
- Marjanovic Z., Uehlein N., Kaldenhoff R., Zwiazek J., Weiß M., Hampp R., Nehls U. Aquaporins in poplar: What a difference. *Planta*, Berlin, v.222, p. 258–268, 2005.
- Matz M.V., Lukyanov S. A. Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Research*, London, v. 26, n.24, p. 5537-5543, 1998.
- Medina-Escobar N., CárdenasValpuesta V., Muñoz-Blanco J., Caballero J.L. Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Analytical biochemistry*, New York, v.248, p. 288-296, 1997.
- Medina-Suarez R., Manning K., Fletcher J., Aled J., Bird C.R., Seymour G.B. Gene expression in the pulp of ripening bananas. Two dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of in vitro translation products and cDNA cloning of 25 differing ripening-related mRNAs. *Plant Physiol.* Lancaster, v.115, p. 453-461, 1997.

- Medina-Suarez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aled, J., Bird, R.C., Seymour, G.B. Gene Expression in the pulp of ripening bananas. *Plant Physiol. Lancaster*, v.115, p. 453-461, 1997.
- Moore S., Vrebalov J., Payton P., Jim Giovannoni. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *Journal of Experimental Botany, Oxford*, v. 53, n. 377, p. 2023-2030, 2002.
- Nascimento J.R.O., Cordenunsi B.R., Lajolo F.M., Alcocer M.J.C. Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. *Planta, Berlin*, v.203, p. 283-288, 1997.
- Nascimento J.R.O., Cordenunsi B.R., Lajolo F.M. "Sucrose synthase activity and gene expression during development and ripening in bananas" *J. Plant Physiol., Lancaster*, v.156, p. 605-611, 2000.
- Picaud S., Becq F. Dédaldéchamp F., Ageorges A., Delrot S. Cloning and expression of two plasma membrane aquaporins expressed during ripening of grape berry. *Functional. Plant Biology, New York*, v.30, p. 621-630, 2003.
- Pienta K.J., Schwab E.D. Modified differential display technique that eliminates radioactivity and decreases screening time. *Biotechniques, Natick*, v. 28, p. 272-277, 2000.
- Pozueta-Romero J., Viale A.M., Akazawa T. Comparative analysis of mitochondrial and amyloplast adenylate translocators. *FEBS Letters, Amsterdam*, v. 287, p. 62-66, 1991.
- Purgatto E., Nascimento J. R. O., Lajolo F. M., Cordenunsi B.R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3- acetic acid. *Plant Physiol., Lancaster*, v. 159, p. 1105-1111, 2002.

- Rast J.P., Amore G, Calestani C, Livi C.B., Ransick A., Davidson E.H. Recovery of developmentally defined gene sets from highdensity cDNA macroarrays. *Developmental biology*, Orlando, v.228, p. 270-285, 2000.
- Romano P., Gray J., Horton P., Luan S. Plant immunophilins: functional versatility beyond protein maturation. *New Phytologist.*, London, v. 166, p. 753-769, 2005.
- Sales M. P., Gerhardt I. R., Sá M.F. G., Filho J. X. Do Legume Storage Proteins Play a Role in Defending Seeds against Bruchids? *Plant Physiology*, Lancaster, v. 124. p. 515-522, 2000.
- Salzman R. A., Fujita T., Zhu-Salzman K, Hasegawa P.M., Bressan R. A. An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates. *Plant Molecular Biology Repórter*, New York, v.17, p. 11–17, 1999.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Schuch, W., Kanczler, J., Robertson, D., Hobson, G., Tucker, G., Grierson, D., Bright, S. and Bird, C. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. *HortScience*, Alexandria, v. 26., p. 1517–1520, 1991.
- Seymour G., Taylor J., Tucker G. *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman & Hall, London, 1993.
- Smith, H., Billett, E., Giles, A.B. The photocontrol of gene expression in higher plants In: Smith, H., ed. *Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants*. San Diego, Academic Press, 1977, p. 93-125.
- Speirs, J., Brady, C.J. Modification of gene expression in ripening fruit. *Aust. J. Plant Physiol.*, Melbourne, v. 18, p. 519-32, 1991.

- Stitt, M. Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Palo Alto, v. 46, p. 431-468, 1995.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F, Higgins, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids Res.*, London, v.24, p. 4876-4882, 1997.
- Thompson A.J., Tor M., Barry C.S., Vrebalov J., Orfila C., Jarvis M.C., Giovannoni J.J., Grierson D., Seymour G.B. Molecular and genetic characterisation of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiol.*, Lancaster, v. 120, p. 383–389, 1999.
- Trivedi P. K, Nath P. MaExp1, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit *Plant Science*, Shannon, v.167, p. 1351–1358, 2004.
- Tucker, G.A., Grierson, D. Fruit ripening. *The biochemistry of plants*, Chapman & Hall, London, v. 12, p. 265-318, 1987.
- Vasanthaiaha H.K.N., Ravishankarb K.V, Shivashankarac K.S., Anandb L., Narayanaswamy P., Mukundaa G., Prasadd T. G. Cloning and characterization of differentially expressed genes of internal breakdown in mango fruit (*Mangifera indica*). *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v. 163, p. 671 - 679, 2006.
- Vittorioso P., Cowling R., Faure J.D., Caboche M., Bellini C. Mutation in the *Arabidopsis* PASTICCINO1 gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development. *Molecular Cell Biology*, Washington, v. 18, p. 3034–3043, 1998.
- Weers B. D., Thornburg R. Characterization of the cDNA and Gene for an *Arabidopsis thaliana* Uracil Phosphoribosyltransferase. *Plant gene register*, PGR99-044, 1999.
- Wilkinson J.Q., Lanahan M.B., Conner T.W., Klee H.J. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Molecular Biology*, The Hague, v. 27, p. 1097-1108, 1995.

- Wu S.H., Ramonell K., Gollub J., Somerville S. Plant gene expression profiling with DNA microarrays. *Plant Physiol. Biochem.*, Paris, v.39, p. 917-926, 2001.
- Wu Z., Burns J. K. Isolation and characterization of a cDNA encoding a lipid transfer protein expressed in 'Valencia' orange during abscission. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 54, n. 385, p. 1183-1191, 2003.
- Yadav N. S., Wierzbicki, A., Aegerter M., Caster, C.S., Pérez-Grau L., Kinney, A. J., Hitz, W. D., Russell Booth Jr. J., Schweiger B., Stecca K., Allen S. M., Blackwell M., Reiter R. S., Carlson T. J., Russel S., Feldmann K. A., Pierce J., Browse J. Cloning of Higher Plant omega-3 Fatty Acid Desaturases. *Plant Physiol.*, Lancaster, v. 103, p. 467- 476. 1993.
- Yamagata T., Kato H., Kuroda S., Abe S., Davies E. Uncleaved legumin in developing maize endosperm: identification, accumulation and putative subcellular localization. *Journal of Experimental Botany*. Oxford, v. 54, n. 384, p. 913-922, 2003.
- Yoder J. *Molecular biology of tomato: fundamental advances and crop improvement*. 1 ed. Technomic Publishing. Lancaster USA.1993.
- Zakharov A., Giersberg M., Hosein F., Melzer M., Müntz K., Saalbach I. Seed-specific promoters direct gene expression in non-seed tissue. *Journal of Experimental botany*, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1463-1471, 2004.
- Zegzouti H., Jones B., Frasse P., Marty C., Maitre B., Latché A., Pech J-C., Bouzayen M. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J.*, v.18, p. 589–600, 1999.

```

Z.mays      AGGFPWAGIQPNSVLVFEIEVLSAQ-----
V.faba      AGGFPWAGIQPNSVLEFEIEVLRAQK--L-----FS-----
A.thaliana  AGGFPWAGIQPNSVLDFEIEVLSVQ-----
M.acuminata --GFPDWGIRPNSVLIFEIEVLSAQ--LL-ATRGIVEP-NNCYS-NYLSCEE-ANDMMTL
          ***  ***:*****  *****  .*

Z.mays      -----
V.faba      -----
A.thaliana  -----
M.acuminata YFPCC-LLLSWL

```

Figura A1. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone DD-V1 com seqüências similares obtidas a partir do Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estágio pré-climatérico, obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso, apresentou similaridade com três seqüências de imunofilinas ao utilizar o programa Tblastx. As seqüências similares foram *Zea mays* (AY754697.1), *Vicia faba* (AY081564.1) e *Arabidopsis thaliana* (U96925.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as sequencias, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  TGG CTT TCC AGA TTG GGG TAT CCG TCC AAA CTC GGT CTT GAT CTT TGA
    G   F   P   D   W   G   I   R   P   N   S   V   L   I   F

49  AAT CGA AGT CCT CAG CGC GCA GTA ATA ACT ACT TTA AGC CAC AAG GGG
    E   I   E   V   L   S   A   Q   -   -   L   L   -   A   T   R

97  GAT TGT AGA ACC ATG AAA TAA CTG CTA CTC CTG AAA CTA TTT GTC CTG
    G   I   V   E   P   -   N   N   C   Y   S   -   N   Y   L   S

145 TGA GGA GTA AGC CAA TGA CAT GAT GAC TTT GTA TTT TCC TTG CTG TTG
    C   E   E   -   A   N   D   M   M   T   L   Y   F   P   C   C

193 ATT ACT ACT TAG TTG GCT TTC GA
    -   L   L   L   S   W   L

```

Figura A2. Seqüência de aminoácidos do clone DD-V1. As linhas enumeradas à esquerda referem-se à seqüência de nucleotídeos obtidos no sequenciamento do fragmento DD-V1 selecionado pelo aumento de expressão em banana ainda em estágio pré-climatérico obtido pela técnica “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com seqüências de imunofilina de outros vegetais.

```

M.acuminata    LASYPIDTVRRRMMMTSGEAVKYKSSSLDAFSQILKKEGAKSLFKGAGANILRAVAGAGVL
C.sativa       LASYPIDTVRRRMMMTSGEAVKYKSSSLDAFSQILKKEGPKSLFKGAGANILR-----
T.turgidum     LASYPIDTVRRRMMMTSGEAVKYKSSSLDAFQILKKEGAKSLFKGAGANILR-----
L.albus        LASYPIDTVRRRMMMTSGEAVKYKSSSLDAFSQILKNEGAKSLFKGAGANILR-----
A.thaliana     LASYPIDTVRRRMMMTSNEAVKYKSSSLDAFKQILKNEGAKSLFKGAGANILR-----
                *****.*****.****;*.******

M.acuminata    AGV-QAAADCFWQEVFRWCLRLFLARSTVPVVFQWRIHLII-W-R-LI-DLF
C.sativa       -----
T.turgidum     -----
L.albus        -----
A.thaliana     -----

```

Figura. A3. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone DD-V2 com seqüências similares obtidas a partir do Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana no estágio pré-climatérico, obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso, apresentou similaridade com seqüências de translocador de adenina (ANT) de vegetais ao utilizar o programa TBLASTX. O fragmento obtido foi similar a quatro seqüências de ANT provenientes de *Triticum turgidum* (X95863.1), *Arabidopsis thaliana* (X65549.1), *Castanea sativa* (AF417306.1) e *Lupinus albus* (AJ003197.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O Alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  ACT TGC GTC ATA CCC TAT TGA CAC CGT TCG CAG AAG GAT GAT GAT GAC
   L  A  S  Y  P  I  D  T  V  R  R  R  M  M  M
49  ATC TGG AGA GGC TGT CAA GTA CAA GAG CTC CCT GGA CGC CTT CTC CCA
   T  S  G  E  A  V  K  Y  K  S  S  L  D  A  F  S
97  GAT CCT GAA GAA GGA GGG TGC CAA GTC TCT ATT CAA GGG TGC AGG TGC
   Q  I  L  K  K  E  G  A  K  S  L  F  K  G  A  G
145 CAA CAT TCT CCG TGC CGT TGC CGG TGC CGG TGT GCT CGC CGG GGT ATG
   A  N  I  L  R  A  V  A  G  A  G  V  L  A  G  V
193 ACA AGC TGC AGC TGA TTG TTT TTG GCA AGA AGT ACG GTT CAG GTG GTG
   -  Q  A  A  A  D  C  F  W  Q  E  V  R  F  R  W
241 CTT GAG ATT GTT TTT GGC AAG AAG TAC GGT TCC GGT GGT GTT CCA GTG
   C  L  R  L  F  L  A  R  S  T  V  P  V  V  F  Q
289 GCG CAT CCA CCT AAT AAT CTG ATG GTG ACG ATA ACT TAT CTG AGA TTT
   W  R  I  H  L  I  I  -  W  -  R  -  L  I  -  D
337 ATT TCC
   L  F

```

Figura A4. Seqüência de aminoácidos do clone DD-V2. As linhas numeradas à esquerda referem-se à seqüência de nucleotídeos obtidos no sequenciamento do fragmento selecionado com aumento de expressão em banana ainda em estágio pré-climatérico pela técnica “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com seqüências de translocadores de adenina de outros vegetais.

```

M.acuminata      -LVGLYNTINIL-YKIQLVYTYIS-NMKETEPSWNNPYS-CNQLLY-IQNKGSFLTKEV
A.calamus        -----

M.acuminata      WNSMIWKDRI-NLKG-WKLFVFESSW-
A.calamus        WDSILWKDGV-NLKG-SELLALKSSCT
                  *:.*:.*.* :  *.*  -*:-:.*

```

Figura. A5. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone DD-V3 com seqüências similares obtidas a partir do Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estágio pré-climatérico, obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso, apresentou similaridade com seqüência de cloroplasto de *Acorus calamus* (AJ879453) ao utilizar o programa Tblastx. A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

1	AGT	AAT	TGG	TTG	GTC	TGT	ATA	ATA	CAA	TAA	ATA	TAC	TGT	AAT	ACA	AAA
	-		L	V	G	L	Y	N	T	I	N	I	L	-	Y	K
49	TAC	AAC	TAG	TAT	ATA	CAT	ATA	TTA	GTT	GAA	ASV	MMC	SSA	ACA	TGA	AAG
	I	Q	L	V	Y	T	Y	I	S	-	?	?	?	N	M	K
97	AAA	CAG	AAC	CCA	GTT	GGA	ACA	ATC	CAT	ATT	CGT	GAT	GCA	ACC	AGT	TAT
	E	T	E	P	S	W	N	N	P	Y	S	-	C	N	Q	L
145	TGT	ATT	AGA	TCC	AAA	ACA	AAG	GTT	CTT	TCT	TGA	CCA	AAC	TAG	AAG	TAT
	L	Y	-	I	Q	N	K	G	S	F	L	T	K	L	E	V
193	GGA	ACT	CCA	TGA	TAT	GGA	AAG	ACA	GAA	TAT	AGA	ATC	TAA	AAG	GAT	AAT
	W	N	S	M	I	W	K	D	R	I	-	N	L	K	G	-
241	GGA	AGT	TGT	TCG	TCT	TTG	AAT	CGA	GTT	GGA						
	W	K	L	F	V	F	E	S	S	W						

Figura A6. Seqüência de aminoácidos do clone DD-V3. As linhas numeradas referem-se à seqüência de nucleotídeos obtidos no sequenciamento do fragmento selecionado com aumento de expressão em banana em estágio pré-climatérico pela técnica “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com uma seqüência de cloroplasto de *Acorus calamus*.

```

M. acuminata      ----DLETLSQSYQDRGYLKFNVLVSQVALS-QTNAIFITANIDE-
N. europaea       -LSADLETLSYYLDRGYLEFNIESTQVSITPDMKDIYITVNVTEG
S. enterica       -LAGDLETLSYYLDRGYARFNIDSTQVSLTPDKKGIYITVNITEG
V. parahaemolyticus VLAGDIEALKSFYLD RGYLKFNVDSTQVAISPDKKGVYITLGLEEG
                  *:*:*:*: * ***** .*: *:*.**: : : :*: * : *
```

Figura A7. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone DD-V4 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em bananas em estágio pré climatérico, obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso, apresentou similaridade com seqüências de proteínas bacterianas ao utilizar o programa Tblastx. O fragmento obtido foi similar a seqüências de bactérias: *Nitrosomonas europaea* (NP 841742.1), *Salmonella enterica* (NP 454831.1) e *Vibrio parahaemolyticus* (AF417306.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O Alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  CCG ACC TTG AGA CGC TGC AGT CCT ATT ACC AGG ATC GCG GCT ATC TCA
   D   L   E   T   L   Q   S   Y   Y   Q   D   R   G   Y   L

49 AGT TCA ACG TGC TGT CGG TGC AGG TGG CGT TGT CGC AGA CAA RGA ACG
   K   F   N   V   L   S   V   Q   V   A   L   S   Q   T   ?   N

97 CCA TCT TCA TCA CCG CCA ACA TTG ACG AAG
   A   I   F   I   T   A   N   I   D   E
```

Figura A8. Seqüência de aminoácidos do clone DD-V4. As linhas numeradas à esquerda referem-se à seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento com aumento de expressão em bananas em estágio pré-climatérico pela técnica “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso. A linha não numerada corresponde à seqüência de nucleotídeos traduzida em aminoácidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com seqüências proteicas bacterianas.


```

M.truncatula  FYVYWICPFTGAILAAWLFKAI FPPPEVKQKKA-----RI--
G.max        FYVYWICPFAGAILAAWLFRAVFP-----
O.sativa     FYVYWICPFVGAVLAAWVFRVFPFPAPKPK-----
Z.mays       -YVYWICPFIGAMLAGWIFRVVFLPPAPKPK-----
M.acuminata  FYVYWICPFIGAIVAGWFFRIIFPQRAEKAKKA-GVPN-V-NFYFWDARSEIT-LDRLVK
              *****  **;:*.*.*:  :*

M.truncatula  -----
G.max        -----
O.sativa     -----
Z.mays       -----
M.acuminata  LQYSSISTVRWHVYRLL-LWITIYVLSMTFVFSPSKPK-L

```

Figura A9. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone DD-M1 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estágio climatérico, obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso, apresentou similaridade com seqüências de aquaporina de vegetais ao utilizar o programa Tblastx. O fragmento obtido foi similar a quatro seqüências de aquaporinas de *Medicago truncatula* (AC123593), *Oryza sativa* (XP_550409.1), *Zea mays* (AF326497.1) e *Glycine max* (AC121763.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  AAT TTT ACG TCT ACT GGA TAT GCC CAT TCA TCG GCG CCA TTG TTG CTG
   -  F  Y  V  Y  W  I  C  P  F  I  G  A  I  V  A

49  GCT GGT TCT TCA GGA TTA TCT TCC CTC AGC GTG CAG AGA AGG CTA AAA
    G  W  F  F  R  I  I  F  P  Q  R  A  E  K  A  K

97  AAG CTT GAG GGG TAC CGA ATT AAG TGT GAA ATT TTT ATT TCT GGG ATG
    K  A  -  G  V  P  N  -  V  -  N  F  Y  F  W  D

145  CTC GCA GTG AAA TAA CCT AAT TAG ATA GAC TGG TAA AAC TGC AGT ATT
     A  R  S  E  I  T  -  L  D  R  L  V  K  L  Q  Y

193  CAT CCA TCT CTA CAG TTA GAT GGC ACG TAT ATA GGC TAC TAT AAC TAT
     S  S  I  S  T  V  R  W  H  V  Y  R  L  L  -  L

241  GGA TAA CCA TTT ATG TTC TGT CAA TGA CTT TTG TGT TTT CTC CAT CAA
     W  I  T  I  Y  V  L  S  M  T  F  V  F  S  P  S

289  AAC CTT AYA AGT AGT TGT
     K  P  ?  K  -  L

```

Figura A10. Seqüência de aminoácidos do clone DD-M1. As linhas numeradas à esquerda referem-se à seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana no período climatérico pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com seqüências de aquaporinas de outros vegetais.

```

Z.mays      ---GMEWFSIITTPNPIFSHLAGRTSVWKAI SPAVLQSSFNTPPEMEKLF RSKRLDSEIF
O.sativa    ---GLQWFSIITTPNPIFSHLAGKTSVWKAI SPEVLEASF NATPEMEKLF RSKRIDSEIF
L.esculentum ---GMDWFSIITTPNPIFTHLAGKTSTWKALSPQVLQA AFKVSPDVEKLFSSKRS AEEIF
A.thaliana   ---GMSWFSIVTTPDP IFTHLAGNTSVWKSLSPEVLQA AFKVAPEVEKSF RSTRTSSAIF
M.acuminata  GGGGMEWFSIITSRP AFEQLTGRTSELNMLPSQ ILESSLNVT PDLVKLLKTNGS AHDVF
A.europaeum  ---GLEWVSIKTSALPMRSPLVGSTSA IKGMP IQVLTNSYRISKSEA QNLKYNRERHVML
            *:.*.*.* *:.* *      *.* **  : :. :* : . : . : : . : :

```

```

Z.mays      FAP-----
O.sativa    FAPN-----
L.esculentum FPP-----
A.thaliana   FPPSNR-----
M.acuminata  APPSQTRN-SYLP PRLSIFLDPRI IIK-DSCMSYFLPCL SIFLDPRI IIK
A.europaeum  LPPPTTRS-----

```

Figura A11. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone DD-M2 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estagio climatérico, obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso e “northern-blotting”, apresentou similaridade com seqüências de legumina de vegetais ao utilizar o programa Tblastx. O fragmento obtido foi similar a seqüências de leguminas de *Lycopersicon esculentum* (BT012830.1), *Zea mays* (AY183450.1), *Oryza sativa* (AK121775.1), *Arabidopsis thaliana* (NM_100650.2) e *Asarum europaeum* (X95508.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  GCG GCG GAG GGA TGG AGT GGT TCT CCA TCA TCA CCA GTC CAA GGC CTG
   G   G   G   G   M   E   W   F   S   I   I   T   S   P   R   P
49 CAT TCG AGC AGC TAA CGG GGA GGA CGT CGG AGC TGA ACA TGT TGC CTT
   A   F   E   Q   L   T   G   R   T   S   E   L   N   M   L   P
97 CTC AGA TCC TTG AAT CTT CTC TAA ATG TCA CTC CGG ATT TGG TGA AGC
   S   Q   I   L   E   S   S   L   N   V   T   P   D   L   V   K
145 TTC TGA AGA CGA ATG GGA GTG CAC ATG ATG TCT TCG CAC CTC CAT CTC
   L   L   K   T   N   G   S   A   H   D   V   F   A   P   P   S
193 AAA CTA GAA ACT AGA GTT ACT TGC CTC CAC GTC TCT CCA TCT TCC TTG
   Q   T   R   N   -   S   Y   L   P   P   R   L   S   I   F   L
241 ATC CAA GGA TAA TAA TAA AAT AAG ACA GCT GCA TGA GTT ACT TTC TGC
   D   P   R   I   I   I   K   -   D   S   C   M   S   Y   F   L
289 CAT GTC TCT CCA TCT TCC TTG ATC CAA GGA TAA TAA TAA AAT
   P   C   L   S   I   F   L   D   P   R   I   I   I   K

```

Figura. A12. Seqüência de aminoácidos do clone DD-M2. As linhas numeradas à esquerda referem-se à seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana em período climatérico pela técnica “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso e “northern-blotting”. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou identidade com seqüências de legumina de outros vegetais.

```

V.vinifera      DVGPDHFNILDAFYAEPQRYAYTFQNYVFVTRVMQERESSGGVKPLRLMERSVFSDRMV
A.thaliana     DVGPDHFNILDAFYSEPQRYAYTFQNYVFVTRLMQEKESASGVKPLRLMERSVFSDRMV
O.sativa       DIGPDHFNILDAFYAEPHRYAYTFQNYVFVTRVMQERESSGGIKPLRLMERSVFSDRMV
L.esculentum   DIGPDHFNILDAFYAEPQRYAYTFQNYVFVTRVMQERESSGGIRPLRLMERSVFSDRMV
M.acuminata    DIGPDHFNILDAFYAEPQRYAYTFQNYVFVTRVMQERESSGGIKPLRLMERSVFS
*:***:*****:***:*****:***:***:***:*****:***
V.vinifera      VRVHEANWMNEMEISYDSWFDPVVSLPGLIPDGFIYL-----
A.thaliana     VRVHEAKWMNEMEISYDSWFDPVVSSLPGLVPDGFIYL-----
O.sativa       VRVHEANWMNEMEISYDSWFDPVVSSLPGLIPDGFIYL-----
L.esculentum   VRVHEANWMNEMEISYDSWFDPVVSTLPGLIPDGFIYL-----
M.acuminata    VRVYEAKWMNEMEISYDSWFDPVISCLPGLITGSFILELALTL
****:***:*****:***:*****:***:***:***:*****:***

```

Figura A13. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone DD-M3 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em bananas em estágio climatérico, obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso, apresentou similaridade com algumas seqüências ao utilizar o programa TBLASTX. As seqüências similares foram *Vitis vinifera* (AY194363.1), *Lycopersicon esculentum* (AF514776.1), *Oryza sativa* (AK071740.1) e *Arabidopsis thaliana* (NM_105862.3). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX

```

1  GAT ATT GGT CCT GAT CAC CTT AAT ATA CTG GAT GCC TTC TAT GCT
   D   I   G   P   D   H   L   N   I   L   D   A   F   Y   A

49  GAA CCA CAG AGG TAT GCC TAC ACC TTC CAG AAT TAT GTA TTT GTA
   E   P   Q   R   Y   A   Y   T   F   Q   N   Y   V   F   V

97  ACT AGG GTC ATG CAG GAA AGA GAG TCG TCT GGT GGA ATC AAG CCT
   T   R   V   M   Q   E   R   E   S   S   G   G   I   K   P

145  CTT AGG CTG ATG GAA AGA AGT GTT TTC AGT GAT AAA ATG GTC TTT
   L   R   L   M   E   R   S   V   F   S   D   K   M   V   F

193  GTA CGT GCT GTT TAT GAG GCC AAA TGG ATG AAT GAG ATG GAA ATT
   V   R   A   V   Y   E   A   K   W   M   N   E   M   E   I

241  AGC ATA TAT GAT TCA TGG TTT GAT CCT GTC ATA TCA TGC CTT CCA
   S   I   Y   D   S   W   F   D   P   V   I   S   C   L   P

289  GGG TTA ATT CYG ACG GGT TCA TTT ATC TTA GAG CTA GCC CTG ACA
   G   L   I   ?   T   G   S   F   I   L   E   L   A   L   T

337  CTT
     L

```

Figura A14. Seqüência de aminoácidos do clone DD-M3. As linhas numeradas à esquerda referem-se à seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana em estágio climatérico pela técnica “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso e “northern-blotting”. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com desoxiguanosina quinase de outros vegetais.

```

P.dactylifera      -VEAQSKYGFVGWNLWRQPIGFIVFLISSLAECERLPFDLPEAEEELVAGYQTEYSGIK
M.acuminata        ---PSKYGFVGWNLWRQPIGFIVFLISSLAECERLPFDLPEAEEELVAGYQTEYSGIR
N.tomentosiformis  IVEAQSKYGFVGWNLWRQPIGFIVFLISSLAECERLPFDLPEAEEELVAGYQTEYSGIK
                   *  *****;***;*****;**;*****;*****;*****;*****;*****;
                   *  *****;***;*****;**;*****;*****;*****;*****;*****;

P.dactylifera      FGLFYIASYLNLLSSLFVTVLYLGGWNFSIPYISIPELF
M.acuminata        FGLFYLASYNLLASSLFVTVLYLGGWNLS--HISIPELF
N.tomentosiformis  FGLFYIASYLNLLVSSLFVTVLYLGGWNLSIPYIFVPELF
                   :*****;.***** *****;*****;*  :*

```

Figura A15. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone DD-M4 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estágio climatérico, obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso, apresentou similaridade com seqüências de NADH desidrogenase ao utilizar o programa Tblastx. As seqüências foram similares a *Nicotiana tomentosiformis* (AB098248.1) e *Phoenix dactylifera* (AY166803.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  GCA CCG TCC AAA TAT GGC TTT TGG GGG TGG AAT CTA TGG CGT CAG CCC
   A  P  S  K  Y  G  F  W  G  W  N  L  W  R  Q  P

49 ATA GGA TTT ATA GTT TTC ATA ATT TCT TCT CTA GCT GAA TGT GAG AGA
   I  G  F  I  V  F  I  I  S  S  L  A  E  C  E  R

97  TTG CCC TTT GAT TTA CCA GAA GCA GAG GAG GAA TTA GTA GCA GGT TAT
   L  P  F  D  L  P  E  A  E  E  E  L  V  A  G  Y

145 CAA ACC GAA TAT TCT GGT ATC AGA TTT GGT TTA TTT TAT CTT GCT TCT
   Q  T  E  Y  S  G  I  R  F  G  L  F  Y  L  A  S

193 TAC CTA AAT CTA TTA GCT TCT TCG TTA TTC GTA ACG GTT CTT TAC TTA
   Y  L  N  L  L  A  S  S  L  F  V  T  V  L  Y  L

241 GGT GGG TGG AAT TTA TCT ATY YCS CAC ATA TCC ATT CCT GAG CTT TTC
   G  G  W  N  L  S  ?  ?  H  I  S  I  P  E  L  F

```

Figura A16. Seqüência de aminoácidos do clone DD-M4. As linhas numeradas à esquerda referem-se a seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana no período climatérico pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com a NADH desidrogenase de outros vegetais.

```

S.enterica      DLETLSYYLDRGYARFNIDSTQVSLTPDKKGIYITVNITE
E.coli          DLETLSYYLDRGYARFNIDSTQVSLTPDKKGIYVTVNITE
S.typhimurium   DLETLSYYLDRGYARFNIDSTQVSLTPDKKGIYITVNITE
M.acuminata     DLETLSYYQDRGYLKFNVLSVQVALSPDKNAIFITANIDE
                *****:*** *****:***:*.***:***:***:***:***:***

```

Figura A17. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone DD-M5 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estágio climatérico, obtido pela técnica de “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso, apresentou similaridade com três seqüências bacterianas ao utilizar o programa Tblastx. As seqüências foram similares a *Salmonella enterica* (CP000026.1), *Salmonella typhimurium* (AE008705.1) e *Escherichia coli* (BA000007.2). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  CGA CCT TGA GAC GCT GCA GTC CTA TTA CCA GGA TCG CGG CTA TCT CAA
   D  L  E  T  L  Q  S  Y  Y  Q  D  R  G  Y  L

49 GTT CAA CGT GCT GTC GGT GCA GGT GGC GTT GTC GCC AGA CAA GAA CGC
   K  F  N  V  L  S  V  Q  V  A  L  S  P  D  K  N

97 CAT CTT CAT CAC CGC CAA CAT TGA CGA AG
   A  I  F  I  T  A  N  I  D  E

```

Figura A18. Seqüência de aminoácidos do clone DD-M5. As linhas numeradas à esquerda referem-se à seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana no período climatérico pela técnica “differential display” RT-PCR e confirmado por “northern-blotting” reverso. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com proteínas bacterianas.

```

P.armeniaca      -----WQSNNYLNGQSLSFQVTTSDGRTVTSYNVAP-----
P.communis       -----WQSNSYLNGQALS FQVTTSDGRTVTSYNVAP-----
Z.elegans        -----WQSNSYLNGQSLSFQVTTSDGRTITSYNVAPS-----
M.acuminata(GenBank) -----WQSNSYLDGQSLSFQVTTSDGRTITSYNVAPA-----
M.acuminata      TSHGFPMAAAGIRLVAAEVAWSRPRYLDGRSLSFQVTTSDGRTITSYNVAPARGPLEITS
                  * .      ** : * : : ***** : *****

P.armeniaca      -----
P.communis       -----
Z.elegans        -----
M.acuminata(GenBank) -----
M.acuminata      EFPPA

```

Figura A19. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone BS-1 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estágio climatérico, obtido pela biblioteca de subtração de cDNA e confirmado por “northern-blotting”, apresentou similaridade com quatro seqüências de vegetais, inclusive com uma de banana, ao utilizar o programa Tblastx. As seqüências similares foram *Musa acuminata* (AY083168.1), *Zinnia elegans* (AF230332.1), *Prunus armeniaca* (U93167.1) e *Pyrus communis* (AJ811692.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos com seqüências idênticas, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX

```

1  CTG CAG GCG GCC SGA ATT CAC TAG TGA TTT CGA GCG GCC CCC GGG CAG
   L  Q  A  A  ?  I  H  -  -  F  R  A  A  P  G  Q

49 GTG CCA CGT TGT AGC TGG TGA TCG TCC TGC CGT CGC TGG TAG TCA CCT
   V  P  R  C  S  W  -  S  S  C  R  R  W  -  S  P

97  GGA ACG AGA GGC TCC GCC CGT CCA GGT ACC TCG GCC GCG ACC ACG CTA
   G  T  R  G  S  A  R  P  G  T  S  A  A  T  T  L

145 CCT CGG CCG CGA CCA ATC GAA TTC CCG CGG CCG CCA TCG GGA AGC CAT
   P  R  P  R  P  I  E  F  P  R  P  P  S  G  S  H

193 GCG ACG TC
   A  T

```

Figura A20. Seqüência de aminoácidos do clone BS-1. As linhas numeradas à esquerda referem-se a seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana no período climatérico pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA e confirmado por “northern-blotting”. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com a expansina de outros vegetais.

```

G.soja      -----ASTK--CGIG-NR--MT-VPMS-WMLLI-----
M.domestica -----ASIKL-CGIG-KRC-MT-VPIS-WMLLI-----
A.thaliana  -----ASTR--CGICGKRC-IT-VPISWWMLLI-----
M.acuminata  NSLVISVVAEVAESTRL-CGI-GKRWWMT-VPMSWWMLFIHP-SLSSVVSPPRR-LHSLP
              ** :   ***   :*   :*  **:*   *:*

G.soja      -----
M.domestica -----
A.thaliana  -----
M.acuminata  RYLPGRPLEIEFPRPGR

```

Figura A21. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone BS-2 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em bananas em estágio climatérico, obtido pela biblioteca de subtração de cDNA e confirmado por “northern-blotting”, apresentou similaridade com seqüências vegetais similares a Omega-3-desaturase ao utilizar o programa Tblastx. A foi similar a seqüências de *Malus domestica* (AY551558.1), *Arabidopsis thaliana* (NM 120640.2), *Glycine soja* (L22965.1) e *Perilla frutescens* (U59477.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  GAA TTC ACT AGT GAT TAG CGT GGT CGC GGC CGA GGT CGC TTC TAC GAG
   N   S   L   V   I   S   V   V   A   A   E   V   A   S   T   R

49 ATT GTA GTG TGG GAT CTG AGG GAA GAG GTG GTG GAT GAC ATG AGT CCC
   L   -   C   G   I   -   G   K   R   W   W   M   T   -   V   P

97  GAT GTC ATG GTG GAT GTT GTT TAT CCA CCC GTA GTC TCT GTC GAG CGT
   M   S   W   W   M   L   F   I   H   P   -   S   L   S   S   V

145 CGT CAG TCC TCC TCG CAG GTA GCT CCA TTC CTT GCC GCG GTA CCT GCC
   V   S   P   P   R   R   -   L   H   S   L   P   R   Y   L   P

193 CGG GCG GCC GCT CGA AAT CGA ATT CCC GCG GSC SCC ATG SGG GAG
   G   R   P   L   E   I   E   F   P   R   ?   P   ?   G   R

```

Figura A22. Seqüência de aminoácidos do clone BS-2. As linhas numeradas referem-se à seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana no período climatérico pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA que foi confirmado por “northern-blotting”. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com a omega-3-desaturase de outros vegetais

```

T.cacao          -----FFKTRCPDAYSYPKDDQT
V.vinifera       -----FFKTRCPDAYSYPKDDQT
H.annus          -----FFKTRCPDAYSYPKDDPT
M.acuminata      SSVVAEVAWRPR-RGRGRGL-GSVVARGTVATPAAAARPTTFFKRNCPDAYSYPKDD-T
M.acuminata GenBank -----FKRNCPDAYXYPKDDQT
                      ** .***** ***** *

T.cacao          STFTCPGG-----
V.vinifera       STFTCPAG-----
H.annus          STFTCPGG-----
M.acuminata      STFTCPGGRKIEIPAAPMAMTNVGAIIRPGGPYYQFPVVGKTVYPLP
M.acuminata GenBank STFTCPGG-----
                      *****.*

```

Figura A23. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone BS-3 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estágio climatérico, obtido pela técnica de biblioteca de subtração de cDNA e confirmado por “northern-blotting”, apresentou similaridade com seqüências vegetais ao utilizar o programa Tblastx. As seqüências foram similares a *Musa. acuminata* (Z93125.1), *Theobroma cacao* (AY766059.1), *Helianthus annuus* (AF364864.1) e *Vitis vinifera* (AF532965.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  AGT AGC GTG GTC GCC GAG GTA GCG TGG CGG CCG AGG TAG CGT GGT CGC
   S  S  V  V  A  E  V  A  W  R  P  R  -  R  G  R

49 GGC CGA GGT CTA TAG GGT AGC GTG GTC GCG CGA GGT ACT GTT GCA ACT
   G  R  G  L  -  G  S  V  V  A  R  G  T  V  A  T

97 CCG GCT GCT GCA GCC CGA CCG ACT ACT CCC TTC TTC AAG AGA AAC TGC
   P  A  A  A  A  R  P  T  T  P  F  F  K  R  N  C

145 CCC GAC GCC TAC AGC TAT CCC AAG GAC GAT ACG AGC ACC TTC ACC TGC
   P  D  A  Y  S  Y  P  K  D  D  T  S  T  F  T  C

193 CCG GGC GGC CGC AAA ATC GAA ATT CCC GCG GCC CCA ATG GCC ATG ACG
   P  G  G  R  K  I  E  I  P  A  A  P  M  A  M  T

241 AAC GTC GGG GCC ATT CGC CCC GGA GGT CCG TAT TAC CAA TTC CCT GTC
   N  V  G  A  I  R  P  G  G  P  Y  Y  Q  F  P  V

289 GTT GGG AAA ACC GTT TAC CCC
   V  G  K  T  V  Y  P

```

Figura A24. Seqüência de aminoácidos do clone BS-3. As linhas numeradas à esquerda referem-se a seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana no período climatérico pela biblioteca de subtração de cDNA que foi confirmado por “northern-blotting”. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foi obtido utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com taumatina de outros vegetais.


```

Z.mays      -----VLSYLLIRKAAHTRG-RLFIKNTGLC-VVTRCIESD
T.aestivum  -----VLSYLLIRKAAHTRG-RLFIKNTGLC-VVTRCIESD
O.sativa    -----VLSYLLIRKAAHTRG-RLFIKNTGLC-VVTRCIESD
M.acuminata ASREPCRRNSAK-PRNFGRRGALLNLTMIKVAHTRG-RLFLKNTGLC-VVTRCIESD
              :*. :***.***** ***:***** *****

```

Figura A25. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone BS-4 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estágio climatérico, obtido pela biblioteca de subtração de cDNA e confirmado por “northern-blotting”, apresentou similaridade com seqüências de vegetais ao utilizar o programa Tblastx. As seqüências similares foram a *Triticum aestivum* (AP008982.1), *Zea mays* (AY506529.1) e *Oryza sativa* (BA000029.1). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  GCG TCG AGA GAA CCA TGT CGA AGG AAC TCG GCA AAA TGA CCC CGT AAC
   A  S  R  E  P  C  R  R  N  S  A  K  -  P  R  N

49  TTC GGG AGA AGG GGT GCT CTC CTA AAT CTC ACT ATG ATT AGG AAA GTG
   F  G  R  R  G  A  L  L  N  L  T  M  I  R  K  V

97  GCA CAT ACC AGG GGG TAG CGA CTG TTT CTT AAA AAC ACA GGA CTC TGC
   A  H  T  R  G  -  R  L  F  L  K  N  T  G  L  C

145 TAA GTG GTA ACA CGA TGT ATA GAG TCT GAC
    -  V  V  T  R  C  I  E  S  D

```

Figura A26. Seqüência de aminoácidos do clone BS-4. As linhas numeradas referem-se à seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana no período climatérico pela biblioteca de subtração de cDNA que foi confirmado por “northern-blotting”. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou similaridade com NADH desidrogenase de outros vegetais.

```

U49044.1      IGCKMG-RSIICVISVLCYNSPIYPSQ-N-----
AY463012.1    IGCKMG-RSIICVISVLCYNSPIYPSQ-N-----
AF268393.2    IGCKMG-RSIICVISVLCYNSPIYPSQ-----
M.acuminata   IGCKMG-RSIICVISVLCYNSPIYPSQ-N-----
*****

```

Figura A27. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do clone BS-5 com seqüências similares obtidas a partir do programa Tblastx. O fragmento com aumento de expressão em banana em estágio climatérico, obtido pela biblioteca de subtração de cDNA e confirmado por “northern-blotting”, apresentou similaridade com três seqüências de banana ao utilizar o programa Tblastx. As seqüências similares foram a *Musa acuminata* (AF268393.1), (AY463012.1) e (U490444). A presença de asteriscos indica resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam uma substituição conservada e um ponto indica substituição semiconservadas. O alinhamento das seqüências foi feito com o programa ClustalX.

```

1  TGA TAG GTT GTA AGA TGG GAT AAC GCA GTA TCA TCT GTG TTA TCT CTG
   I  G  C  K  M  G  -  R  S  I  I  C  V  I  S

49 TCC TGT GTT ACA ACT CTC CTA TCT ATC CTA GTC AAT GAA ATA TTA TCA
   V  L  C  Y  N  S  P  I  Y  P  S  Q  -  N  I  I

97 GTA TTA AAA AAA AAA AAA A
   S  I

```

Figura. A28. Seqüência de aminoácidos do clone BS-5. As linhas numeradas referem-se a seqüência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do fragmento diferentemente expresso em banana no período climatérico pela biblioteca de subtração de cDNA. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão nas linhas não enumeradas e foram obtidos utilizando o programa Clone. Esse fragmento apresentou identidade com metalotioneína de *Musa acuminata*.