



IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE GENES EXPRESSOS EM SEMENTE E POLPA DE CUPUAÇUZEIRO

Resumo: O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schumm., é a segunda espécie mais importante para a fruticultura da região amazônica, com cerca de 10% do mercado de todas as frutas amazônicas. Apesar de sua importância econômica, pouco se conhece sobre a base genética desta planta, em particular, as bases moleculares. Este trabalho teve como objetivo identificar genes expressos em frutos de cupuaçuzeiro, para disponibilizar uma nova ferramenta de apoio aos trabalhos de melhoramento genético. RNA dos frutos foram obtidos e, após processamento, as sequências foram determinadas por pirosequenciamento, utilizando-se a plataforma 454 (Roche Applied Science). Para os processos de limpeza das sequências e obtenção dos *contigs*, foram utilizados os programas est2assembly e mira assembly. A busca por similaridade foi realizada utilizando o programa BLASTX contra o banco de dados de proteínas NR (não-redundante). Cerca de 6.200 *contigs* apresentaram similaridade com proteínas previamente descritas. Em seguida, foram selecionados alguns *contigs* com potencial para utilização nos programas de melhoramento vegetal. Dentre eles, 20 foram similares a proteínas descritas para o gênero *Theobroma* e 6 para outros gêneros. As sequências selecionadas são relacionadas a genes codificadores de proteínas de reserva, de resposta a estresse, da via de síntese de ácidos graxos, etc. Análises mais aprofundadas das sequências permitirão a construção de uma importante base de dados moleculares para esta cultura.

Palavras-chave: expressão gênica, *Theobroma grandiflorum*, transcriptoma.

Introdução

O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schumm., é uma fruteira nativa da Amazônia com enorme potencial econômico devido às múltiplas utilidades de sua polpa e amêndoa. Vários produtos são fabricados com a polpa do cupuaçuzeiro, como sucos, sorvetes, licores, compotas, geléias, cremes e doces (CALZAVARA et al., 1984). Ribeiro et al. (1992) observaram na polpa do cupuaçu bom teor de vitamina C (23,6 mg/100 g), pectina (0,39%), proteína (8,1%) e traços de diversos minerais. As amêndoas, que representam 15% do peso do fruto, possuem aproximadamente 60% do seu peso seco constituído de uma fina gordura, de fácil digestibilidade, composta principalmente por ácidos oleico e esteárico (VASCONCELOS et al., 1975), da qual pode ser obtido o cupulate, produto muito similar ao chocolate (RIBEIRO et al., 1992). Assim, a cultura do cupuaçuzeiro ganha grande importância econômica e o desenvolvimento de programas de



melhoramento são essenciais. Conhecimentos sobre a genética molecular desta planta podem auxiliar neste desenvolvimento. Ao contrário do cacauzeiro, que possui o genoma sequenciado e vasta informação sobre genoma funcional (ARGOUT et al. 2008; ARGOUT et al. 2011 citados por NAGANEESWARAN et al. 2012), o cupuaçuzeiro carece destas informações. Este trabalho teve como objetivo identificar genes expressos em frutos de cupuaçuzeiro, que possibilitasse o desenvolvimento de marcadores moleculares para utilização no programa de melhoramento genético dessa fruteira.

Material e Métodos

RNA de semente e polpa foram extraídos utilizando o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Os respectivos cDNAs foram sintetizados e sequenciados por pirosequenciamento, utilizando a plataforma 454 (Roche Applied Science). A filtragem e a montagem dos contigs das sequências geradas foram feitas através dos programas est2assembly (PAPANICOLAOU et al., 2009) e mira assembly (CHEVREUX et al., 2004). A busca por similaridade foi feita pelo programa BLASTX contra o banco de dados de proteínas - NR (Não-redundante), disponível no NCBI, com um e-value de 10^{-7} . Após a anotação, foram selecionadas algumas sequências com potencial para utilização nos programas de melhoramento vegetal.

Resultados e Discussão

A análise dos dados de sequenciamento gerou 8.330 *contigs*. Destes *contigs*, 6.208 apresentaram similaridade com proteínas previamente descritas e depositadas no banco de dados de proteínas - NR. Uma busca preliminar nestes dados identificou 20 sequências similares a outras descritas para o gênero *Theobroma*, como *T. cacao*, *T. bicolor*, *T. obovatum*, além do próprio *T. grandiflorum* (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de cupuaçuzeiro com similaridade a genes descritos para o gênero *Theobroma*.

Tamanho (pb)	Anotação
363/764/489	putative 21 kDa trypsin inhibitor - <i>Theobroma bicolor</i>
656	Endochitinase 1; class I chitinase - <i>Theobroma cacao</i>
418/480	AGAMOUS-like protein - <i>Theobroma cacao</i>
364	hypothetical chloroplast RF1 - <i>Theobroma cacao</i>
307	ribosomal protein S8 - <i>Theobroma cacao</i>
909/1305	caffeine synthase - <i>Theobroma cacao</i>
1461	ribosomal protein S3 - <i>Theobroma cacao</i>
936	aspartic proteinase - <i>Theobroma cacao</i>
483/304	NBS/LRR resistance protein-like protein - <i>Theobroma cacao</i>
940	21 kDa seed protein - <i>Theobroma cacao</i>
890	16.9 kDa oleosin - <i>Theobroma cacao</i>
988/425	RNA polymerase beta' subunit - <i>Theobroma cacao</i>
283	vicilin - <i>Theobroma grandiflorum</i>



257	trypsin inhibitor - <i>Theobroma obovatum</i>
1009	ascorbate peroxidase - <i>Theobroma cacao</i>
370	non-expressor of PR1 - <i>Theobroma cacao</i>
651	aspartic proteinase - <i>Theobroma cacao</i>
456	putative 21 kDa trypsin inhibitor - <i>Theobroma cacao</i>
399	TIR-1-a - <i>Theobroma cacao</i>
749	15.8 kDa oleosin - <i>Theobroma cacao</i>

pb = pares de base

Além disto, foi feita uma busca por genes de potencial interesse para a cultura e identificaram-se genes codificadores de proteínas de resposta a estresse, da via de síntese de ácidos graxos, entre outros (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências de cupuaçuzeiro com similaridade a genes com potencial interesse agrônômico.

Tamanho (pb)	Anotação
874	chloroplast omega-6 fatty acid desaturase <i>Jatropha curcas</i>
481/558	omega-3 fatty acid desaturase <i>Betula pendula</i>
1216	stress induced protein <i>Vitis vinifera</i>
441	universal stress protein family protein <i>Brassica rapa</i>
550	stress associated endoplasmic reticulum protein, putative <i>Ricinus. communis</i>
659	universal stress protein <i>Potamogeton distinctus</i>

pb = pares de base

Conclusão

Este é um estudo preliminar e pioneiro do transcriptoma de semente e polpa de cupuaçu e gerou um grande número de sequências. Estas irão compor uma importante base de dados moleculares para esta fruteira. Elas podem ser utilizadas para a avaliação funcional de genes, estudos da expressão gênica e associação com fenótipos de resistência ou qualidade do fruto. Esta base pode contribuir para o desenvolvimento de marcadores moleculares úteis para programas de melhoramento da cultura. Entretanto, o número de sequências obtido foi menor do que a técnica de pirosequenciamento pode fornecer e um novo sequenciamento está em curso.

Agradecimentos

À Embrapa, pelo financiamento do projeto Geneaçu - bases genéticas para auxiliar o melhoramento genético do cupuaçuzeiro - Identificação e análise de genes expressos em genótipos de cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*) resistentes e susceptíveis a vassoura-de-bruxa (02.08.2.01.00.03).



Referências Bibliográficas

CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; KAHWAGE, O.N.C. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro - cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental. 1984. 101p. **Documentos**, n. 32, 1984.

CHEVREUX B.; PFISTERER T.; DRESCHER B; DRIESEL A.J.; MÜLLER W. E.G.; WETTER T.; SUHAI S. Using the miraEST Assembler for Reliable and Automated mRNA Transcript Assembly and SNP Detection in Sequenced ESTs, **Genome Research**, v. 14, p. 1147-1159, 2004.

NAGANEESWARAN S.A.; SUBBIAN E.A.; RAMASWAMY M. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from cocoa (*Theobroma cacao* L) upon infection with *Phytophthora megakarya*. **Bioinformatics**, v. 8, n. 2, p. 65-69, 2012.

PAPANICOLAOU A.; STIERLI R.; FFRENCH-CONSTANT R.H.; HECKEL D.G.; Next generation transcriptomes for next generation genomes using *est2assembly*, **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 447, 2009.

RIBEIRO, N.C.A.; SACRAMENTO, C.K.; BARRETTO, W.S.; SANTOS FILHO, L.P. Características físicas e químicas de frutos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) do sudeste da Bahia. **Agrotrópica**, v. 4, n. 2, p. 33-37, 1992.

VASCONCELOS, M.N.L.; SILVA, M.L. da; MAIA, J.G.S.; GOTTLIEB, O.R. Estudo químico das sementes do cupuaçu. **Acta Amazônica**, v.5, n.3, p.293-295, 1975.