

Preparo de meristemas apicais de cupuaçuzeiro
(*Theobroma grandiflorum*) para estudos de
expressão de genes por hibridização in situ



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
357**

**Preparo de meristemas apicais de
cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)
para estudos de expressão de
genes por hibridização in situ**

*Loeni Lüdke Falcão
Michelly da Silva Neves
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes
Joseilde Oliveira Silva-Werneck
Diva Maria de Alencar Dusi
Lucilia Helena Marcellino*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717 , Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Milene Castellen Sathler

Secretária-Executiva
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonietta Nassif Salomão; Bianca Damiani Marques; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Tavares da Silva; João Batista Teixeira; Rosameres Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
Diva Maria Alencar Dusi

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Lucilia Helena Marcelino

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Preparo de meristemas apicais de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) para estudos de expressão de genes por hibridização in situ. / Loeni Lüdke Falcão et al. ... – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019.

17 p. - (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 357).

ISSN: 0102-0110
Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader
Modo de Acesso: World Wide Web

1. Expressão gênica. 2. Morfologia. I. Falcão, Loeni Lüdke. II. Neves, Michelly da Silva. III. Gomes, Ana Cristina M. Mendes. IV. Silva-Werneck, Joseilde Oliveira. V. Dusi, Diva Maria de Alencar. VI. Marcellino, Lucilia Helena. VII. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. X. Série

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	11
Agradecimentos.....	15
Referência Bibliográfica.....	16

Preparo de meristemas apicais de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) para estudos de expressão de genes por hibridização in situ

Loeni Lüdke Falcão¹

Michelly da Silva Neves²

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes³

Joseilde Oliveira Silva-Werneck⁴

Diva Maria de Alencar Dusi⁵

Lucilia Helena Marcellino⁶

Resumo – O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., é uma espécie nativa da Amazônia que produz uma das frutas mais populares da região, o cupuaçu. Sua polpa tem sabor e aroma muito apreciados, sendo utilizada na fabricação de uma grande diversidade de doces e na preparação de sucos. A partir das amêndoas é possível produzir o cupulate, produto similar ao chocolate. A cultura do cupuaçuzeiro tem relevante importância econômica para a região amazônica. Um dos entraves para esta cultura, no entanto, é a doença vassoura-de-bruxa (VB), causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que compromete o desenvolvimento e a produção da planta. Este fungo acomete inicialmente as regiões meristemáticas do cupuaçuzeiro, particularmente o meristema da gema apical, causando superbrotamento, hipertrofia e hiperplasia dos tecidos, que acabam morrendo. Para maior entendimento do processo de infecção, genes relacionados à patogênese, particularmente os genes que codificam para as proteínas PR (*pathogenesis-related*), foram identificados em cupuaçuzeiro. Estudos de expressão temporal e espacial destes genes nos tecidos-alvo da infecção são necessários para acrescentar informações sobre a função de

¹ Engenheira agrônoma, mestre em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Bióloga, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga, mestre em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Engenheira agrônoma, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁵ Engenheira Agrônoma, doutora em "Plant Science", pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁶ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

cada um no desenvolvimento da doença. Para tanto, torna-se necessário o estabelecimento de um método eficiente de hibridização *in situ* que permita identificar os locais e momentos específicos da expressão dos genes de interesse. Neste trabalho foi ajustada metodologia de hibridização *in situ* em gemas apicais de cupuaçuzeiros, desde a fixação e preparo do material vegetal até as condições de hibridização e pós-hibridização. Gemas apicais de galhos de cupuaçuzeiro foram coletadas e processadas para avaliação morfo-anatômica por microscopia de luz. Fragmento de cDNA de um gene de proteína do tipo PR foi clonado em pGEM®-T Easy e sondas de mRNA senso e antisenso marcadas com digoxigenina, produzidas por transcrição, foram utilizadas para a hibridização *in situ* em meristemas de cupuaçu. A técnica utilizada mostrou ser viável para a localização da expressão de genes neste tecido.

Termos para indexação: cupuaçu, expressão gênica, meristema apical, morfologia, hibridização *in situ*

Processing apical meristems of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) for gene expression studies using *in situ* hybridization

Abstract – The cupuassu tree, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., is a native Amazonian species that produces one of the most popular fruits in the region, cupuassu. The pulp of cupuassu is much appreciated for its flavor and aroma, being used in the manufacture of a wide variety of sweets and in the preparation of juices. From their almonds it is possible to produce cupulate, a product similar to chocolate. The cupuassu tree culture has relevant economic importance for the Amazon region. One of the barriers to the culture is the witches' broom disease (WB), caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa*, which hampers plant development and production. This fungus attacks the meristematic region of the cupuassu tree, particularly the apical bud meristem, causing proliferation of buds, hypertrophy and hyperplasia of the tissues, which eventually die. For a better understanding of the process of infection, genes related to pathogenesis, specifically genes coding for PR proteins, were identified in cupuassu. Studies of temporal and spatial expression of these genes in the infection target tissues are required to add information about their role in disease development. In this work, *in situ* hybridization methodology in cupuassu tree apical buds has been adjusted, from the fixation and preparation of the plant material to the hybridization and post hybridization conditions. Apical shoots of cupuassu tree branches were collected, and processed for morphological and anatomical evaluation by light microscopy. A cDNA fragment from a PR-like protein gene was cloned

into pGEM®-T Easy, and sense and antisense mRNA probes labeled with digoxigenin, transcriptionally produced, were used for *in situ* hybridization in cupuassu meristems. This technique proved to be viable for gene expression localization in this tissue.

Index terms: cupuassu, gene expression, apical meristem, morphology, *in situ* hybridization

Introdução

O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., 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, geleias, cremes e doces (Calzavara et al., 1984; Alves et al., 2014). As amêndoas são utilizadas para extração de gordura e fabricação de manteiga de cupuaçu e delas pode ser obtido o cupulate, produto muito similar ao chocolate (Ribeiro et al., 1992). A fina gordura das amêndoas, composta principalmente por ácidos oleico e esteárico, corresponde a 60% do seu peso seco e é de fácil digestibilidade (Vasconcelos et al., 1975; Alves et al., 2014).

O cupuaçuzeiro é suscetível à doença conhecida como vassoura-de-bruxa (VB), causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* que também ataca o cacaueteiro (*T. cacao*). A doença acomete diretamente os ramos vegetativos, as almofadas florais e o próprio fruto. A planta infectada apresenta um crescimento anormal, caracterizado por um brotamento acelerado de gemas laterais que logo secam e morrem. A doença interfere no processo de fotossíntese e compromete significativamente a produtividade da planta (Benchimol et al., 2001). Em frutos jovens, a ocorrência de VB paralisa o crescimento e, nos estádios mais tardios de desenvolvimento, as cascas apresentam lesões escuras, inviabilizando o seu uso (Souza et al., 2012).

A vassoura-de-bruxa é uma doença de difícil controle, que exige no manejo da cultura, poda fitossanitária, aplicação de agrotóxicos cúpricos, além do uso de materiais vegetais mais resistentes (Gondim et al., 2001). O grande desafio do programa de melhoramento de cupuaçuzeiro é a obtenção

de plantas resistentes, que aliem alta produtividade e qualidade do fruto. Entretanto, pouco se conhece sobre as bases genéticas do cupuaçuzeiro, condição essencial para o desenvolvimento do programa de melhoramento da espécie.

Recentemente, foram iniciados estudos transcritômicos em cupuaçuzeiro, tendo sido obtidos cerca de 20.000 transcritos de gemas apicais de genótipos resistentes e suscetíveis à vassoura-de-bruxa, além de mais de 8.000 transcritos expressos no fruto. Estes transcritos, depositados no banco de dados de cupuaçu da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa..., 2019) permitiram a seleção de marcadores moleculares do tipo EST-SSR, com grande potencial de utilização em melhoramento de cupuaçuzeiro (Santos et al., 2016). Além disto, neste conjunto de dados foram encontradas sequências de grande interesse para estudos funcionais, como dos genes que codificam proteínas PR (pathogenesis-related). Estudos iniciais de expressão de genes do tipo PR em cupuaçuzeiro revelaram os níveis de expressão destes genes em meristemas de plantas resistentes e suscetíveis à VB, desafiadas com o patógeno em diferentes tempos de infecção, indicando uma participação importante no mecanismo de resistência de cupuaçuzeiro à VB (Silva, 2015). O entendimento dos mecanismos moleculares e a função de diversos genes envolvidos no processo de desenvolvimento da doença é a base para a proposição de ferramentas biotecnológicas que auxiliem na obtenção de plantas resistentes. Uma avaliação importante é conhecer o local de expressão de tais genes nos tecidos alvos de ataque do fungo, como os tecidos meristemáticos de gemas apicais. Uma técnica muito utilizada para a localização da expressão de genes é a hibridização in situ com sonda de RNA marcada com digoxigenina. Vários protocolos são utilizados para a hibridização in situ em tecidos vegetais, incluindo meristemas apicais de mudas jovens de cacau (*T. cacao*), nas quais foi investigada a localização da expressão de genes (Alemanno et al., 2008). Entretanto, para cada sonda, tecido e espécie a serem analisados, a metodologia deve ser ajustada. Isso envolve desde a fixação do material vegetal, o tempo adequado de hibridização, até o tempo de coloração para correta detecção da sonda. Neste trabalho, apresentamos a metodologia desenvolvida para o processamento de ápices caulinares de plantas adultas de *T. grandiflorum* e a análise da localização da expressão de genes por hibridização in situ.

Material e Métodos

Material Vegetal

Ápices caulinares (Fig. 1A) de plantas de *T. grandiflorum* (genótipo 1074) suscetíveis a vassoura-de-bruxa, mantidas em campo na Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC, Belém, PA).



Figura 1. Ápice caulinar de cupuaçuzeiro. A) Ápice retirado da planta; B) Ápice desbastado; a parte superior ao corte, contendo a gema apical, é a região utilizada para os estudos histo-morfológicos e para os ensaios de hibridização in situ.

Fixação e preparo das amostras

Ápices caulinares foram coletados, desbastados (Fig. 1B) e imediatamente colocados em solução fixadora de FAA [formaldeído 1,8% (v/v), etanol 60% (v/v) e ácido acético 5% (v/v)] por 24 horas. Os ápices foram transferidos para etanol 70% (v/v) e armazenados a -20 °C. Para identificação da região meristemática, as amostras foram dissecadas, cortadas ao meio longitudinalmente ou seccionadas a 100 µm com o uso de micrótomo de navalha vibratória (Vibratome® 3000) e observadas com auxílio de microscópio estereoscópico Discovery V8 (Zeiss), sendo fotodocumentadas ao microscópio Axiophot (Zeiss). O processamento das amostras para hibridização in situ foi baseado no protocolo descrito por Dusi (2015). A região meristemática das gemas foi isolada, parte dos tricomas foi retirada e os meristemas foram desidratados em série etílica crescente [etanol 80%, 90% e 96% (v/v)] por 30 minutos cada, e três vezes em etanol 100% por 1 hora

cada. Parte do material foi transferida para uma série de etanol:xilol (3:1, 1:1, 1:3) por 30 minutos cada, e três vezes em xilol puro, por 1 hora a cada troca. Parte das amostras foi tratada com HistoChoice® (Sigma Life Science) ao invés de xilol, da seguinte forma: ao frasco das amostras contendo 5 mL de etanol foram acrescentadas, lentamente, gotas de HistoChoice® até chegar, em dois dias, ao volume final de 10 mL; no dia seguinte, 5 mL da solução foram retirados e gotas de HistoChoice® foram acrescentadas, até atingir 10 mL ao final do dia. As amostras foram transferidas para HistoChoice® puro, por três vezes, a cada 12 horas. As amostras em xilol ou HistoChoice® foram então colocadas em estufa a 58 °C, e gotas de Paraplast®, uma mistura à base de parafina, previamente dissolvido, foram adicionadas lenta e periodicamente. Após aproximadamente 5 dias, a solução foi trocada para Paraplast® puro, por três vezes, durante 2 dias. As amostras foram então colocadas em formas e o Paraplast® polimerizado à temperatura ambiente.

Secções de 12 µm foram obtidas e depositadas em condições livres de RNase em lâminas de microscopia tratadas com organossilano. As lâminas foram mantidas a 42 °C por 24 horas e, então, armazenadas a 4 °C. Para remoção do Paraplast®, as lâminas foram imersas em xilol ou HistoChoice® por 15 minutos. Para verificar a preservação da morfologia e presença de RNA nos tecidos, algumas lâminas foram coradas com laranja de acridina (Dusi, 2015) e visualizadas em microscópio ótico Axiophot (Zeiss), utilizando filtro 450-490 nm de excitação - 520 nm de emissão. Com esta coloração, o RNA total no tecido fluoresce na cor laranja e o DNA, na cor verde. Outras lâminas foram utilizadas para hibridização in situ com sonda de *TgPR*.

Hibridização in situ

Um fragmento de aproximadamente 140 pb da sequência de nucleotídeo de um gene de proteína PR de cupuaçuzeiro (*TgPR*) foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) e usado como molde para a transcrição in vitro das sondas (Fig. 2).



Figura 2. Esquema representativo de um fragmento do gene PR de cupuaçuzeiro (*TgPR*) clonado no vetor pGEMT-easy. Um fragmento de aproximadamente 140 pb do

gene *TgPR* foi clonado no sítio da enzima de restrição *Eco* RI, entre os promotores das T7 e SP6 RNA polimerases para a transcrição da sonda.

O plasmídeo foi linearizado com uma das duas enzimas *Nco* I ou *Sal* I. As sondas senso e antisense de RNA marcadas com digoxigenina (DIG) foram sintetizadas utilizando o kit DIG RNA labeling (Roche) de acordo com o protocolo do fabricante. Para síntese da sonda senso foi utilizada a enzima T7 RNA polimerase, e para a sonda antisense a enzima SP6 RNA polimerase. A hibridização in situ foi feita em secções de meristema de acordo com Dusi (2015). Secções de meristema processadas com HistoChoice® foram hibridizadas com a sonda senso ou antisense a 0,6 ng.µL⁻¹ em tampão de hibridização (formamida 50%, solução de Denhardt 1X, tRNA 0,6 ng.µL⁻¹, NaCl 300 mM, sulfato de dextrano 10%, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 e EDTA 1 mM, pH 8.0). A hibridização foi feita a 42 °C, em câmara úmida, no escuro, em forno de hibridização In Slide Out, modelo 241000 (Boekel Scientific). Após 18 horas, as secções foram lavadas sequencialmente em solução SSC em 4 diferentes concentrações, iniciando pela de maior concentração (SSC 4X, SSC 2X, SSC 1X e SSC 0,5X, sendo SSC 1X = NaCl 150 mM, citrato de sódio 15 mM, pH 7,0), por 30 minutos em cada solução, a 37 °C. Em seguida, as secções foram imersas em tampão 1 (Tris-HCl, 100 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) e, então, em reagente de bloqueamento (Blocking reagente, Roche) a 1% (p/v) em tampão 1, por 30 minutos. As lâminas foram incubadas com anticorpos anti-digoxigenina (fragmentos Fab) conjugados a fosfatase alcalina (Roche) diluídos 1:1000 em tampão 1, por duas horas, e lavadas em tampão 1 por duas horas para remoção dos anticorpos. As lâminas foram transferidas para cubas de vidro contendo tampão 3 (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM), por 5 minutos. Em cada lâmina adicionaram-se 200 µL de solução de coloração (solução estoque NBT/BCIP - Roche) na diluição 1:50 em tampão 3. O desenvolvimento da coloração foi observado em microscópio estereoscópico aos 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 16 horas de incubação. Após 16 horas, as lâminas foram transferidas para cubas contendo tampão 4 (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) para parar a reação. As lâminas, foram, então, montadas em glicerol a 50% (v/v) e visualizadas utilizando o microscópio ótico Axiophot (Zeiss). A coloração azul arroxeada indica o local de hibridização da sonda.

Resultados e Discussão

Plantas adultas de *T. grandiflorum* possuem ápices caulinares com gemas apicais apresentando meristemas envoltos em grande quantidade de tricomas. A coleta do material vegetal e sua imediata fixação em condições de campo é de difícil condução. Na coleta dos ápices caulinares, parte do caule é coletado junto com a amostra. Usualmente, na hibridização *in situ* são usados fixadores à base de aldeídos em solução aquosa como por exemplo, formaldeído 4% (v/v) e glutaraldeído 2% (v/v) por promoverem boa fixação do RNA e preservarem a morfologia. Entretanto, como o tecido utilizado é de planta adulta, e de difícil fixação, neste trabalho, foi escolhido o agente fixador FAA na concentração de 60% de etanol (v/v) de etanol, que apresenta a vantagem de penetrar rapidamente na amostra, e ainda permite que a morfologia seja preservada, assim como os ácidos nucleicos.

Inicialmente, para análise morfológica do ápice caulinar de plantas adultas de *T. grandiflorum*, foi realizado um corte longitudinal na região central do ápice caulinar, revelando tecido meristemático circundado por primórdios foliares e uma quantidade abundante de tricomas (Fig. 3 A). Utilizando o Vibratome® 3000, foram produzidas secções nas quais se observou claramente os primórdios foliares, tricomas e o meristema (Fig. 3 B, C e D).

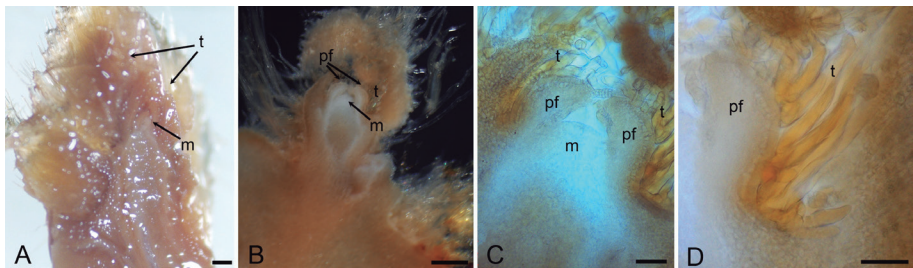


Figura 3. Gema apical de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçuzeiro). Gema observada em microscópio estereoscópico (A e B) e em microscópio de luz com contraste de interferência diferencial (C e D). A) Corte longitudinal livre mostrando o meristema apical (m) e a profusão de tricomas (t) envolvendo toda a gema apical; B e C) Secção de 100 µm feita em vibratome apresenta o meristema protegido pelos primórdios foliares (pf) com tricomas. D) Detalhe dos tricomas no primórdio foliar. Barras: A= 1.000 µm; B= 200 µm; C e D = 50 µm.

A morfologia de folha de *Theobroma* foi previamente descrita para três espécies nativas da Amazônia brasileira, incluindo *T. grandiflorum*. No referido estudo, uma variedade de tipos de tricomas foi encontrada, glandulares e não glandulares, particularmente na superfície abaxial (Garcia et al., 2014). A alta densidade de tricomas também foi observada em um estudo por microscopia eletrônica, principalmente na superfície abaxial (Ferreira et al., 2006).

No preparo do material vegetal para a hibridização in situ, foram testadas duas metodologias de infiltração em Paraplast: com xilol ou HistoChoice®. As secções obtidas de material processado em xilol e coradas com laranja de acridina apresentaram tecidos com estruturas celulares e RNA total mal preservados, como observado pela baixa emissão de fluorescência (Fig. 4A, B). O material processado em HistoChoice® foi melhor preservado. Nota-se, por exemplo, que os primórdios foliares apresentaram células da epiderme, tricomas e demais tecidos foliares com alta fluorescência alaranjada, o que indica que o RNA total está preservado nas células (Fig. 4C). Também foi possível notar nestas secções que o citoplasma das células do tecido foliar apresentava fluorescência alaranjada, enquanto os núcleos fluoesciam em verde, indicando presença de DNA nuclear, como esperado (Fig. 4D). Foi observado que, além da retenção da estrutura, o material vegetal estava mais maleável e menos frágil do que o processado com xilol. Neste estudo, o processamento com HistoChoice® resultou em uma maior preservação da morfologia de meristemas apicais de plantas maduras de *T. grandiflorum*, tendo sido, portanto, escolhido no processamento de amostras para a hibridização in situ.

A hibridização in situ com sonda antisense de *TgPR*, produziu sinal em áreas específicas do meristema de *T. grandiflorum*. Sinal de hibridização (coloração arroxeadada) foi observado principalmente no meristema, nas células que formarão a epiderme nos primórdios foliares, e nos tricomas dos primórdios foliares (Fig. 4 E). Após hibridização com a sonda senso, não foi observada a coloração azul arroxeadada no tecido, indicando que esta sonda pode ser utilizada como controle negativo da hibridização (Fig. 4 F). A ausência de sinal nas secções hibridizadas com a sonda senso valida a especificidade dos sinais obtidos da hibridização com a sonda antisense.

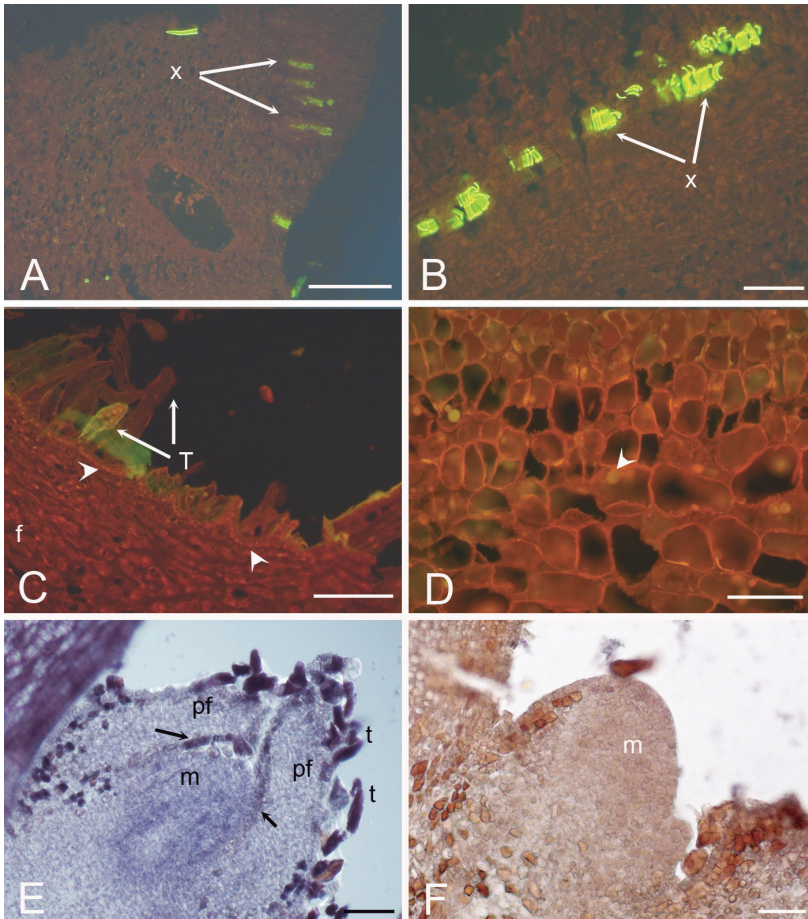


Figura 4. Detecção de RNA em gemas apicais de cupuacuzeiro. Coloração com laranja de acridina para detecção de RNA total (A-D) e hibridização in situ (E-F) em secções de gema apical de *Theobroma grandiflorum*. A-B) Amostra processada em xilol mostrando xilema (x) fluorescente. Note a má preservação do tecido com células distorcidas e tecidos desestruturados, e má preservação do RNA total, observado pela ausência de fluorescência alaranjada; C-F) Amostras processadas em HistoChoice®; C) Região abaxial da folha com células da epiderme (cabeça de seta), tricomas (t), e demais tecidos foliares (f), fluorescendo em alaranjado, indicando presença de RNA total nas células. D) Detalhe de tecido foliar com células e RNA total bem preservados. O núcleo das células (cabeça de seta) fluoresce na cor verde indicando presença de DNA; E) Após hibridização in situ com a sonda antisense do gene *TgPR*, o sinal de hibridização (coloração azul arroxeadada) pode ser observado no tecido meristemático

(m) e nos primórdios foliares (pf) em especial nas células que formarão a epiderme (setas) e nos tricomas (t); F) Após hibridização in situ com a sonda senso do gene *TgPR* como controle negativo, sem sinal de hibridização. Barras: A= 200 µm; B, E= 60 µm; C= 80 µm; D,F= 40 µm.

Assim, neste trabalho, utilizando gemas apicais de plantas adultas, foram estabelecidas as condições apropriadas para citolocalização da expressão de genes em cupuaçuzeiro. Em linhas gerais, a metodologia estabelecida pode ser assim resumida:

- Fixação do tecido com FAA 60%; armazenamento em etanol 70%
- Desidratação em série etílica (etanol 80% a 100% v/v);
- Clarificação com HistoChoice®;
- Inclusão com Paraplast®;
- Obtenção de secções de 12 µm e montagem das lâminas;
- Remoção do Paraplast® com HistoChoice®;
- Hibridização in situ a 42 °C e revelação com 16 h.

A metodologia aqui descrita viabiliza estudos mais detalhados de genes de interesse, como, por exemplo, aqueles envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos. No estudo das bases moleculares do desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa, esta metodologia será importante na detecção da expressão gênica em genótipos de cupuaçuzeiro resistente e suscetível, e em diferentes tempos de inoculação com *M. perniciosa*.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Agropolis (França) pelo cofinanciamento do projeto “Interação entre *Theobroma grandiflorum* e *Moniliophthora perniciosa*: Estudos de Associação e Genômica Funcional” (Embrapa nº 02.14.02.002.00.00). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa PIBIC à estudante Michelly da Silva Neves.

Referência Bibliográfica

ALEMANNI, L.; DEVIC, M.; NIEMENAK, N.; SANIER, C.; GUILLEMINOT, J.; RIO, M.; PASCAL, J. V. Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Planta**, v. 227, n.4, p. 853–866, 2008.

ALVES, R. M.; FILGUEIRAS, G. C.; HOMMA, A. K. O. Aspectos socioeconômicos do cupuaçuzeiro na amazônia: do extrativismo a domesticação. In: SANTANA, A. C. de (Ed.). **Mercado, cadeia produtiva e desenvolvimento rural na Amazônia**. 1. ed. Belém, PA: UFRA, 2014. p. 197–223.

BENCHIMOL, R. L.; CARNEIRO, F.; ALBUQUERQUE, D.; MUNIZ, R. Aspectos epidemiológicos da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro na microrregião de Belém, PA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 279–283, 2001.

CALZAVARA, B. B. G.; MÜLLER, C. H.; KAHWAGE, O. de N. da C. **Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1984. 101 p. il (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 32).

DUSI, D. M. A. Hibridização in situ para detecção da expressão de genes em tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2.ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 303–327.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Banco de dados: Cupuaçu RNAseq transcriptome analysis**. Disponível em: <http://lbi.cenargen.embrapa.br/cupuacu/>. Acesso em: 25 nov. 2019.

FERREIRA, M. das G. R.; NOGUEIRA, A. E.; FILHO, C. F. D. **Estudo morfológico de folhas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.)**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2006. 15 p. (Embrapa Rondônia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33).

GARCIA, T. B.; POTIGUARA, R. C. de V.; KIKUCHI, T. Y. S.; DEMARCO, D.; AGUIAR-DIAS, A. C. A. de. Caracteres anatômicos foliares de três espécies de *Theobroma* (Malvaceae s.l.) nativas da Amazônia Brasileira. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 3, p. 291-300, 2014.

GONDIM, T. M. de S.; THOMAZINI, M. J.; CAVALCANTE, M. de J. B.; SOUZA, J. M. L. de. **Aspectos da produção de cupuaçu**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2001. 43 p. (Embrapa Acre. Documentos, 67) .

RIBEIRO, N. C. de A.; SACRAMENTO, C. K. do; BARRETO, W. G.; SANTOS FILHO, L. P. dos. Características físicas e químicas de frutos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) do Sudeste da Bahia. **Agrotópica**, Ilheus, v. 4, n. 2, p. 33-37, mai./ago. 1992.

SANTOS, L. F. dos; FREGAPANI, R. M.; FALCAO, L. L.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. do C.; LOPES, U. V.; GRAMACHO, K. P.; ALVES, R. M.;

MICHELI, F.; MARCELLINO, L. H. First microsatellite markers developed from cupuassu ESTs: application in diversity analysis and cross-species transferability to cacao. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, e0151074, 2016.

SILVA, R. J. S. **Caracterização in silico e análise de expressão de genes do tipo PR de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)**. 2015. 92 p. (Dissertação - Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz, 2015.

SOUZA, M. G.; ALMEIDA, O. C.; SOUZA, A. G. C. Vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro na Amazônia. **Tropical Plant Pathology** (supl.), v. 37, p. 7–9, 2012.

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



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*



CGPE: 15850