



ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DE OSMOTINA EM CUPUAÇUZEIRO

Resumo: O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., pertence à família Malvaceae e é nativo da região Amazônica. A cultura do cupuaçuzeiro é afetada pela doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, provocando uma grande redução na produção de frutos. O conhecimento molecular da interação planta-patógeno é essencial para o desenvolvimento de ferramentas para o controle da doença, como por exemplo, a identificação de genótipos resistentes. Genes expressos em resposta ao ataque de patógenos são alvos de estudos desta interação. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar um deles, o gene de osmotina, em cupuaçuzeiro. Sequências anotadas do transcriptoma de frutos de cupuaçuzeiro foram avaliadas quanto à presença deste gene. Os genes identificados foram comparados ao de osmotina de cacau pelo programa BLAST. Além disso, a organização do gene foi analisada por *Southern blot*, utilizando DNA genômico de cupuaçu. Identificaram-se duas sequências tipo osmotina: uma de 381 pb e outra de 477 pb, que correspondem a aproximadamente 63% e 79%, respectivamente, da região codificadora da proteína madura de cacau (607 pb). A comparação destas duas sequências com o gene de osmotina de cacau revelou identidade de cerca de 70%. Quanto à organização genômica em cupuaçu, foi observado que o gene está presente em múltiplas cópias. Estudos posteriores são necessários para investigar o envolvimento deste gene com os fenótipos de resistência à vassoura-de-bruxa.

Palavras-chave: osmotina, proteínas PR, *Theobroma grandiflorum*, vassoura-de-bruxa

Introdução

O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., pertence à família Malvaceae, é nativo da região Amazônica e possui características semelhantes ao cacaueiro, *T. cacao* L. (CAVALCANTE, 1974). As sementes de cupuaçu podem ser usadas para fabricar cosméticos, bem como o cupulate, produto similar ao chocolate. Além disto, a polpa de cupuaçu é utilizada na produção de sucos, sorvetes, doces, geléias, etc (CALZAVARA et al., 1984).

A cultura do cupuaçu, assim como a do cacau, é afetada pela doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, provocando uma grande redução na produção de frutos (BENCHIMOL, 2004). O conhecimento molecular da interação planta-patógeno pode contribuir para



o desenvolvimento de ferramentas para o controle da doença. Em resposta à invasão de patógenos ou a fatores abióticos estressantes, as plantas desencadeiam mecanismos de defesa, como a expressão de proteínas PR (*Pathogenesis Related*) (VAN LOON et al., 2006). As osmotinas pertencem a esta família de proteínas e apresentam atividade contra fungos (citado por FREITAS et al. 2011).

O objetivo do presente trabalho foi analisar e caracterizar o gene de osmotina do cupuaçuzeiro.

Material e Métodos

O estudo foi realizado utilizando a cultivar de cupuaçuzeiro Coari, resistente à vassoura-de-bruxa. A seleção dos genes foi realizada a partir de sequências de transcriptomas de polpa e semente de cupuaçu, obtidas por pirosequenciamento, utilizando a plataforma 454 (Roche Applied Science).

Os genes foram alinhados através do programa BLAST. A análise genômica foi realizada por *Southern blot*, utilizando como sonda um fragmento de *osm1* de cacau marcado com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. DNA genômico de cupuaçu foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e utilizado para esta análise.

Resultados e Discussão

A partir de sequências de transcriptomas de polpa e semente de cupuaçu foi possível identificar genes similares a *osm1*, gene de osmotina de cacau - GenBank AY766059 (RAMOS et al, 2012).

Identificaram-se duas sequências, de 381 e 477 pb, que correspondem a aproximadamente 63 e 79%, respectivamente, da região codante da proteína madura de cacau (607 pb).

A comparação destas sequências com *osm1* revelou identidade de cerca de 70% (Figura 1).

gb AY766059.2 Theobroma cacao osmotin-like (osm1) gene, partial cds Length=692		gb AY766059.2 Theobroma cacao osmotin-like (osm1) gene, partial cds Length=692	
Score = 215 bits (238), Expect = 2e-52		Score = 205 bits (226), Expect = 3e-50	
Identities = 323/453 (71%), Gaps = 0/453 (2%)		Identities = 277/382 (73%), Gaps = 3/382 (1%)	
Strand=Plus/Plus		Strand=Plus/Minus	
Query 30 AITCGCAACGAGTGTCTCTACACTGTCTGGGCTGCAGCCTCTCTCTGGCGGTGGGGCTGCG 89		:ry 3 ACTGTAAGCACTTGGGCACTTCTCTTGA-ATCTAGAGAAGTTTGTGGGCC-ACAGTT 60	
Sbjct 23 AITGAAACAACTGTCTGACACCGTCTGGGCTGCAGCCTGCGCAGTGTGTGTAGGGCG 82		:ct 541 ACTGTAAGCACTTGGGCACTTCTCTTGAAGAACTGGAAAAATCCGTAGGGCTACAGTT 482	
Query 90 CTAGACCCITGGCAAGT-TGGACCATCAACGTGCTGCTGGTACGGCCATGGCTCGTAT 148		:ry 61 ACCGGAATTGCAGCAGTGTCTCTCAGTCTTGAACACTGGACAAGGCCGTTACATCTCC 120	
Sbjct 83 CTGGACAGA-ggtggagcttggaaacctaaacgtgaaacctggcaccacagagcctcggtg 141		:ct 481 CCCAGAAITGCAACAATATTGATCAGTCTCTGAAAACGGTGAAGGGTTATTGCACCCGCC 422	
Query 149 CTGGGCTCGAACCAAGTCAAAATTTTGTAGGCAAGTGGTAGGGTCACTCGAATCTGGTGA 208		:ry 121 AGGAACCTTCAACTCAITCGGGCACTGCCCGCAATGTCCGCTGTACACTTGATACTCT 180	
Sbjct 142 CTGGGCTCGAACCAAGTCAAAATTTTGTAGGCAAGTGGTAGGGTCACTCGAATCTGGTGA 201		:ct 421 CGGAGCTTTCAAITGATTAGGGCACTGCCCTATGATACTGCCGCTGCATCTAATACCCCG 362	
Query 209 CTGGGAGGACTCTTAGAGTGCACAGGCTGGGGTGTCTCTCCAAACACCCCTGGCCGART 268		:ry 181 TGTGACCCCTGGAGAGTTTGTAGCTGAACCTCCATAGCAACGTTGAACCAATCAATGTAGA 240	
Sbjct 202 CTGTGGGGGCTCTCTCAAGTGCACAGGCTATGTTGCACCCCAACACCCCTGGCTGAATA 261		:ct 361 GGTGCAACCCCAAGAGTTGACTAAGTCCATAGCAACATTAATCCATCGACTAAGA 302	
Query 269 TGCCTTAACCAATTTGGCAACATGGATTTCTATGATATTTCCCTAGTGTAGTGA-TTAA 327		:ry 241 GATAACAATAAGTCTCTGTAGCGAATGGCCATTTGCATATTGATAGTGTGTGGG 300	
Sbjct 262 CGCACTAACCAAGTTCATTAACAAAGATTTCTCGATATCTCTTTAGTGTAGTGAATTA 321		:ct 301 GATATCGAAGAAATCTTGTATTGAACTGGTTTGTAGTGTAGTGTGTGGG 242	
Query 328 TATCCCAATGGTGTGGTCCAACTAGCGTGGTGTGTCAC----AATATTTGGTGCAGT 383		:ry 301 GGGTGAACCGTAGCCCTTGCATTCAGGA-CCCCGACAGTCAACGGTCTCAGACTTGCC 359	
Sbjct 322 TGTTCATAGGACTTTAGTCCAACTTCTGGGGGTTG-CACCGGGGTTATTAGATGCAAG 380		:ct 241 GGGTGCACCATAGGCTTGGCACTGGAGGAGCCCCCAAGTCAACGGTCTCAGACTTGCC 182	
Query 384 CAGACATTAACGGGCAAGTGCACCAATGAACACGGGCTCCGGTGGGTGCAATAACCCAT 443		:ry 360 TCTCCCGAAGCATCAATTTGG 381	
Sbjct 381 CAGATATCATAGGGCAAGTGCACCAATGAACATGAAAGCTCCGGGCGGGTGCATAACCC 440		:ct 181 ACGCCGGCACCATCGAATTTGG 160	
Query 444 GTACAGTGTTTAAGACTAATGAATTTTGTGCA 476			



Figura 1. Comparação das sequências identificadas em cupuaçuzeiro com o gene de osmotina de cacau, *osm1*. O alinhamento foi gerado pelo programa BLAST.

Na análise genômica realizada por *Southern blot*, confirmou-se a presença de DNA homólogo ao gene *osm1*. Foi observada a presença de pelo menos cinco bandas de DNA, de tamanhos variando de 4 a 12 Kb, que hibridizaram com o referido gene (Figura 2). O padrão de hibridização apresentado indica que o gene está em múltiplas cópias. Isto também ocorre em cacauzeiro, variedade Belizean Criollo, cujo genoma apresenta 3 cópias deste gene, as quais se encontram nos cromossomos 3, 4 e 9 (<http://cocoagendb.cirad.fr/>).

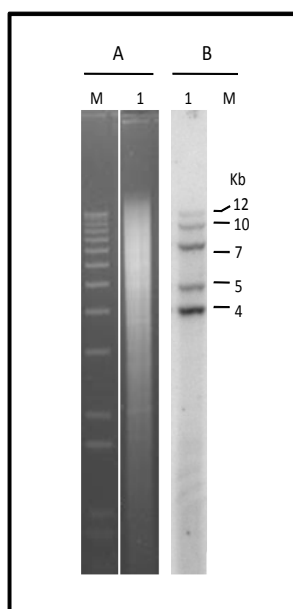


Figura 2. Análise genômica do gene de osmotina em cupuaçuzeiro. A) Eletroforese em gel de agarose de DNA genômico digerido com *EcoRI* (1). B) *Southern blot* com sonda de *osm1*. M = Marcador de peso molecular.

Conclusão

O cupuaçuzeiro possui gene homólogo ao gene de osmotina de cacau e este está presente em múltiplas cópias. A associação deste gene com fenótipos resistentes à vassoura-de-bruxa poderá ser investigada, fornecendo uma ferramenta para programas de melhoramento dessa espécie.

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

- BENCHIMOL, R.L. Principais doenças do cupuaçuzeiro e recomendações de controle. Belém; EMBRAPA Amazônia Oriental. 2004. **Comunicado Técnico**, n.132, Dezembro, 2004.
- 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.
- CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis da Amazônia. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 73p. **MPEG. Publicações avulsas**, n. 27, 1974.
- FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, F.C.S.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; DOMONT, G.B.; RAMOS, M.V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, n. 49, p. 738-743, 2011.
- RAMOS, A.R., GANDER, E.S.; MARCELLINO, L.H. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/88193284>> Acesso em julho de 2012.
- VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, n. 44, p. 135-162, 2006.