

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**



**GENÔMICA FUNCIONAL DA INTERAÇÃO *Moniliophthora
perniciosa* x *Theobroma ssp.*: TAMANHO DO GENOMA,
CARACTERIZAÇÃO DE EST'S-SSR E EXPRESSÃO
GÊNICA**

RANGELINE AZEVEDO DA SILVA

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2014**

RANGELINE AZEVEDO DA SILVA

**GENÔMICA FUNCIONAL DA INTERAÇÃO *Moniliophthora*
perniciosa x *Theobroma ssp.*: TAMANHO DO GENOMA,
CARACTERIZAÇÃO DE EST'S-SSR E EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração:
Genômica funcional

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2014

S586

Silva, Rangeline Azevedo da.

Genômica funcional da interação *Moniliophthora perniciosa* x *Theobroma ssp.*: tamanho do genoma, caracterização de EST'S-SSR e expressão gênica / Rangeline Azevedo da Silva – Ilhéus, BA: UESC, 2015.

Xii, 77f. : il.

Orientadora: Karina Peres Gramacho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós - Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Genética vegetal. 2. Cacao – Melhoramento genético. 3. Genoma. 4. Regulação de expressão gênica. 5. Marcadores genéticos. I. Título.

CDD 581.35

RANGELINE AZEVEDO DA SILVA

GENÔMICA FUNCIONAL DA INTERAÇÃO *Moniliophthora perniciosa* x *Theobroma ssp.*: TAMANHO DO GENOMA, CARACTERIZAÇÃO DE EST'S-SSR E EXPRESSÃO GÊNICA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração:
Genômica funcional

APROVADA: 26 de fevereiro de 2014

Luis Gustavo Rodrigues Souza
(UFPE)

Fernanda Amato Gaiotto
(UESC)

Didier Pierre Louis Clement
(CEPLAC/UESC- Ilhéus)

Dr^a. Karina Peres Gramacho
(CEPLAC/UESC-Orientadora)

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

Galileu Galilei

Á Deus pela presença constante em minha vida, por esta, e por muitas graças concedidas.

Dedico!

**Aos meus pais, Rubens e Ana Maria, pelo amor, carinho e confiança.
Aos meus irmãos, Rangelson, Laiane, Laielson e Ana Laura, pelo incentivo, parceria
e apoio nas etapas da minha caminhada,**

Ofereço!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser o maior provedor de minhas esperanças, dos meus sonhos, por se fazer presente em cada momento e por não esquecer um só minuto da filha amada, jamais saberia agradecer por tanto amor.

Aos meus pais Rubens e Ana Maria, por toda a confiança, amor, preocupação, carinho e torcida. Estar longe de vocês foi sem dúvida uma experiência árdua, de amadurecimento incomensurável, foi preciso, mas também serviu para saber a força do amor que nos une e a força da saudade que não me deixou por um só instante.

Aos meus irmãos Rangelson, Laiane, Laielson e Ana Laura pelo amor, carinho e torcida, amo vocês, vocês são anjos em minha vida.

A Everton, obrigada pela companhia nessa jornada, por ser presente nos momentos difíceis e por ter tornado esses dias mais felizes.

À Nara e Sanlai, pela amizade, companheirismo, palavras de incentivo, pelos ensinamentos e broncas, por serem essas pessoas amáveis.

Aos demais familiares, pelo reconhecimento e torcida.

À Dr.^a Karina Peres Gramacho, pela orientação, ensinamentos, disposição, preocupação e paciência. Por sempre estar disposta a resolver os problemas e pela oportunidade de tornar um dos meus sonhos reais, muito obrigada.

À Dr.^a Livia Lemos, pela paciência, ajuda e conhecimentos divididos.

Ao Dr. Rogério Mercês, pelos conhecimentos compartilhados e toda a ajuda.

Ao Dr. Uilson Lopes pelas sugestões e análises estatísticas deste trabalho.

À Dr.^a Fabienne Michelli pela co-orientação e esclarecimentos nas dúvidas de expressão gênica.

Ao pessoal do grupo de pesquisa de Citogenética e Biologia Molecular vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, por me receber tão bem e contribuir com meu aprendizado, especialmente ao Luíz Gustavo Rodrigues.

À CEPLAC/CEPEC/FITOMOL, pela infraestrutura laboratorial para realização

de todos os trabalhos. À EMBRAPA-CERNAGEN, pela parceria e Co-orientação da Dr^a Lucíllia Marcelino

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), a todos os professores e funcionários.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela contribuição à minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a EMBRAPA, pela concessão da bolsa de Mestrado.

À todos do Laboratório de Fitopatologia Molecular: Didier, Analine, Louise, Tâmilis, Francisca, Lahyre, Kaleandra, Eline, Rodrigo, Mariana Carvalho, Mariana Andrade, Júlia, Taty, Marcos, Belmiro, Israel, Marlon, Michele, Yara, Maria Rafaela, Joselito, Geovane, Seu Rubem e Seu Zé. Sem a ajuda de vocês este trabalho não seria possível. De coração, meus sinceros agradecimentos!

Ao Setor de Transportes do CEPEC: Reinaldo Malta por sempre facilitar o nosso transporte entre a UESC e a CEPLAC.

ÍNDICE

EXTRATO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 O Gênero <i>Theobroma</i> L.	16
2.1.2 Descrição botânica e aspectos econômicos	16
2.2 Problemas fitopatológicos	19
2.2.1 Vassoura-de-bruxa: Histórico da doença e ciclo de vida do fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i>	19
2.2.2 Controle da vassoura-de-bruxa no cupuaçuzeiro e cacauzeiro	22
2.3 Estudos genéticos do gênero <i>Theobroma</i>	22
2.3.1 Interação planta vs Patogeno	23
2.3.2 Tamanho do genoma	23
2.3.3 Marcadores Moleculares SSR derivados de ESTs e transferabilidade entre espécies.....	24
2.3.4 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real	26
3. CAPÍTULO 1	29
4. CAPÍTULO 2	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

EXTRATO

SILVA, Rangeline Azevedo, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, Fevereiro de 2014. Genômica funcional da interação *Moniliophthora perniciosa* X *Theobroma* ssp.: tamanho do genoma, caracterização de EST's-SSR e expressão gênica. Orientadora: Dra. Karina Peres Gramacho. Co-orientadores: Dra Fabienne Micheli e Dr^a Lucillia Marcelino.

O gênero *Theobroma*, pertencente à família Malvaceae, é um gênero tropical nativo da América do Sul, compreendendo cerca de 22 espécies. O Brasil possui representantes de todas as seções com exceção de *Andropetalum*, que tem ocorrência apenas na Costa Rica, segundo o autor as espécies brasileiras ocorrem todas na Amazônia (*T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. microcarpum*, *T. bicolor* e *T. cacao*). A maioria das espécies amazônicas do gênero *Theobroma* produzem frutos comestíveis. A sua importância econômica é traduzida sob as mais diversas formas de consumo: desde o uso na indústria alimentícia, na forma de copotas, sucos e chocolates no caso do Cupuaçu e do Cacaú; e também tem seu uso reservado na indústria de cosméticos. O primeiro capítulo objetivou estimar o tamanho do genoma de sete espécies do gênero *Theobroma*, a fim de que essas informações subsidiassem o uso de marcadores moleculares no melhoramento genético do gênero, foram utilizados marcadores EST-SSR para caracterizar uma população segregante quanto à resistência à vassoura-de-bruxa e testada a transferência dos mesmos para as espécies do grupo. O conteúdo de DNA nuclear de espécies de *Theobroma* foram estimados como sendo $2C = 0,924$ para *T. bicolor*, *T. obovatum*, *T. microcarpum*, *T. speciosum*, $2C = 0,917$ para *T. grandiflorum* e $2C = 0,933$ para *T. cacao*. As análises estatísticas revelaram estabilidade do tamanho do genoma dentro do gênero, além disso, constatou-se que o genoma destas espécies são relativamente pequenos se comparado com a maioria das Angiospermas e relativamente conservados ao longo de sua evolução. Este achado possibilita o início de estudos genéticos moleculares nas demais espécies do grupo, pois o tamanho pequeno do genoma facilita o isolamento de genes de interesse. Um total de vinte marcadores microssatélites EST-SSR específicos para cacaú foram genotipados em 24 indivíduos do gênero *Theobroma*. Os vinte EST-SSR produziram alelos robustos, sendo que 11

(60%) polimórficos e 9 monomórficos (40%) para os indivíduos de *T. cacao*. Para as demais espécies os loci foram transferíveis nas seguintes taxas: 75% amplificaram em *T. grandiflorum*, 75% em *T. subicanum*, 90% em *T. obovatum*, 60% em *T. bicolor*, em 35% *T. speciosum*, 35% *T. microcarpum*. O número de alelos por locus variou de um (ESTSSR2, ESTSSR6, ESTSSR9 e ESTSSR49) a sete (mstestR16-4), excluindo-se os loci monomórficos, variou de 0,07 (mstestR20-4) a 0,78 (mstestR16-4). O novo conjunto de EST-SSRs será um ferramenta útil para o estudo da diversidade funcional de populações e para a realização de estudos de mapeamento de associação para o *T. Cacao*, além de representarem um conjunto de marcadores que podem auxiliar na construção de mapas genéticos e identificação de QTL's. O segundo capítulo objetivou quantificar a expressão gênica diferencial do EST/gene *TgORFX1-3'* de dois genótipos de *T. grandiflorum* em resposta a infecção por *M. perniciosa*. Para realização dos ensaios de RT-qPCR do EST/gene *TgORFX1-3'*, proveniente da interação Cupuaçu x *M. perniciosa* foi selecionado um gene normalizador, o gene *EF-1 α* , utilizado na cultura do cacau, foi escolhido por apresentar expressão homogênea nos diferentes tratamentos. O *Blast* da sequência de *TgORFX-1 3'* apresentou um alinhamento de 100%, com *e-value* de 0.0 com clone cDNA *TcORFX-1 3'* semelhante ao *ORFX/fw2.2-like* em *Solanum lycopersicum*. Os resultados finais da análise por RT-qPCR mostraram que houve uma expressão diferencial entre os tratamentos inoculados do genótipo C174, com superexpressão do gene em 48hai. É provável que o referido gene esteja envolvido no mecanismo de controle negativo do crescimento e divisão celular, impedindo a disseminação do fungo *M. perniciosa* nos tecidos da planta. O genótipo C1074, não apresentou níveis significativos de expressão nos tratamentos aplicados. Através desses trabalhos foi possível explorar um pouco mais da biologia do gênero *Theobroma*, principalmente de Cupuaçu, onde os estudos ligados a genética são escassos.

Palavras-chave: Gênero *Theobroma*, expressão gênica, tamanho do genoma, EST-SSR.

ABSTRACT

SILVA, Rangeline Azevedo, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, Fevereiro de 2014. Functional Genomics of interaction Theobroma ssp VS Moniliophthora perniciosa: Genome size, characterization of EST's-SSR and gene expression. Advisor: PhD Karina Peres Gramacho. Advisor Committe Members: Dra Fabienne Micheli e Dr^a Lucillia Marcelino.

The genus *Theobroma*, of the Malvaceae family, is a native of tropical South American genus comprising about 22 species. Brazil has representatives from all sections except *Andropetalum*, which has occurred only in Costa Rica, according to the author Brazilian species all occur in Amazonia (*T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. microcarpum*, *T. bicolor* and *T. cacao*). Most Amazonian species of the genus *Theobroma* produce edible fruit. Its economic importance is translated under the most diverse form of consumption: from use in the food industry, as copotas, juices and chocolates in the case Cupuacu and Cocoa, and has reserved its use in cosmetics industry. The first chapter aimed to estimate the genome size of seven species of the genus *Theobroma*, so that this information subsidize the use of molecular markers in genetic improvement of genus, EST-SSR markers were used to characterize a population segregating for resistance to witches broom and tested transferring them to the species group. The nuclear DNA content of *Theobroma* species were estimated to be $2C = 0,924$ to *T. bicolor*, *T. obovatum*, *T. microcarpum*, *T. speciosum*, $2C = 0,917$ to *T. grandiflorum* e $2C = 0,933$ to *T cacao*. Statistical analyzes revealed stability of genome size within the genus, moreover, it was found that the genomes of these species are relatively small compared with most Angiosperms and relatively conserved throughout evolution. This finding enables the top of molecular genetic studies in other species of the group, because the small size of the genome facilitates isolation of genes of interest. A total of twenty microsatellite markers specific to cocoa EST-SSR were genotyped in 24 individuals of the genus *Theobroma*. Twenty EST-SSR alleles produced robust, with 11 polymorphic (60%) and monomorphic 9 (40%) for individuals of *T. cacao*. For the other species the loci were transferable at the following rates: 75% amplified in *T.*

grandiflorum, *T. subicanum* 75%, 90% in *T. obovatum*, 60% in *T. bicolor*, *T. speciosum* in 35%, 35% *T. microcarpum*. The number of alleles per locus ranged from one (ESTSSR2, ESTSSR6, ESTSSR9 and ESTSSR49) to seven (mstestR16-4), excluding monomorphic loci ranged from 0.07 (mstestR20-4) to 0.78 (mstestR16- 4). The new set of EST-SSRs will be a useful tool for studying the functional diversity of populations and to perform association mapping studies for *T. cacao*. The new set of EST-SSRs will be useful for the study of the functional diversity of populations and to perform association mapping studies for *T. cacao*, besides representing a set of markers that can assist in the construction of genetic maps and identification of QTL. The second chapter aimed to quantify differential gene expression EST/gen *TgORFX1-3'* two genotypes of *T. grandiflorum* in response to infection by *M. perniciosa*. For testing of RT-qPCR EST/ gene *TgORFX1-3'*, coming from the interaction Cupuassu x *M. perniciosa* was selected a normalizing gene, the *EF-1 α* , used in the cultivation of cocoa, was chosen to present homogeneous expression in different treatments. Blast sequence *TgORFX-1 3'* showed 100% alignment with e-value of 0.0 to *TcORFX-1 3'* cDNA clone similar to *ORFX/fw2.2*-like in *Solanum lycopersicum*. The final results of analysis by RT-qPCR showed a clear differential expression between inoculated treatments genotype C174, with overexpression of the gene in 48hai. It is likely that the said gene is involved in the negative control of cell growth and division mechanism, preventing the spread of harmful fungi *M. perniciosa* in plant tissues. The C1074 genotype, no significant levels of expression in the applied treatments. Through these studies it was possible to explore a little more of the biology of the genus *Theobroma*, mainly Cupuacu, where studies linked to genetic are scarce.

Keywords: Genus *Theobroma*, gene expression, genome size, EST-SSR.

1. INTRODUÇÃO

O *Theobroma cacao* L tem sido alvo de diversos estudos, principalmente devido ao interesse em identificar e caracterizar genótipos resistentes a vassoura-de-bruxa, doença que também acomete o *T. grandiflorum* Schum (CRUZ, 2000).

As demais espécies do gênero, como o *T. bicolor* Humb. & Bonpl., *T. microcarpum* Mart., *T. speciosum* Willd. ex Spreng., *T. subicanum* Mart., *T. obovatum* Klotzsch ex Bernoulli., que são espécies silvestres, possuem poucos estudos no campo da genética e biologia molecular o que dificulta pesquisas relacionadas à busca de novos genes de interesse, inferências sobre a biologia e conservação. O *T. cacao*, como espécie de maior importância econômica, dispõe de estudos desde a produção (SILVA NETO, 2001), elucidação de mecanismos fisiológicos (JESUS, 1994), de filogenia (ALVERSON et al., 1999) e principalmente estudos na área de genética e biologia molecular e melhoramento (LOPES, 2011; ALLEGRE, 2012), onde foi possível o sequenciamento do genoma (ARGOUT, 2011), a descoberta da função de genes envolvidos nas mais diversas rotas metabólicas e principalmente os genes correlacionados com a resistência a fitopatógenos (GESTEIRA, 2007; GRAMACHO, 2003; LEAL, 2006; SILVA, 2010; BORRONE, 2004; BROWN, 2005; LEMOS, 2010). Desta forma, o *T. cacao* constitui-se como uma espécie modelo dentro do gênero *Theobroma*.

Para iniciar alguns estudos dentro da genética, é necessário que algumas informações sejam disponibilizadas. Um dado imprescindível é a quantificação de DNA nuclear, pois além de estar associado a diversas características fenotípicas, fisiológicas e ecológicas das espécies é uma informação útil na aplicação de marcadores moleculares, pois é revelante nestes estudos o nível de ploidia das espécies. E também na confecção de bibliotecas genômicas, uma vez que o tamanho do genoma

determina o número de cópias de um determinado gene para clonagem (LEITCH & BEITCH, 2001)

De posse de algumas informações como o conteúdo do genoma, é possível então a aplicação de estudos moleculares em espécies silvéticas. Nos últimos anos, o foco das pesquisas com marcadores moleculares e ensaios de expressão gênica tem gerado um volume de informações valiosas. A interação-planta patógeno e a maquinaria gênica envolvida é um ponto a ser muito explorado pelos geneticistas, devido a presença de genes com funções desconhecidas e a busca por novos genes de interesse (PFLIEGER et al, 2001; BARBIERI et al, 2001). O uso de EST-SSR, marcadores de alta resolução derivados de sequências expressas, vem sendo uma técnica bastante utilizada para estes fins, assim como a quantificação da expressão gênica diferencial a partir de ensaios envolvendo a técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) (SANTOS et al, 2012; GARCIA et al, 2011; LOPES et al, 2010)

Na última década o Cupuaçu vem ganhando grande destaque na indústria alimentícia, despontando como principal produto o cupulate, chocolate produzido a partir das sementes que é muito apreciado pelos consumidores em geral (ALVES, 2010; SETEC 2007). Muitos outros produtos derivados do cupuaçu como doces, geleias, tortas, sucos e polpas adentram o mercado consumidor do Brasil com amplas perspectivas de geração de lucros.

O incentivo ao cultivo do cupuaçu, que ocorre em regiões de floresta ombrófila densa, não é somente pela geração de renda, mas também por se tratar de um sistema de cultivo que permite a conservação da mata (SETEC, 2007). No entanto, assim como a lavoura cacaueteira, que sofreu grande declínio devido ao ataque do *M. pernicioso* o Cupuaçu também sofre com a infecção, que afeta diretamente a produtividade e conseqüentemente a economia regional, uma vez que a demanda de importação e exportação do Cupuaçu vem crescendo significativamente nos últimos anos (ALVES, 2010, FRAIFE, 2000).

Como os estudos de base genética no gênero *Theobroma* e principalmente na cultura do cupuaçu ainda são muito escassos, o presente estudo objetivou estimar o tamanho do genoma de sete espécies do gênero *Theobroma*, a fim de que essas informações subsidiassem o uso de marcadores moleculares no melhoramento genético, e, caracterizar através de marcadores EST-SSR uma população segregante quanto à resistência à vassoura-e-bruxa e testar a transferência dos mesmos para as demais

espécies do grupo. No contexto da interação *M. pernicioso* x *T. grandiflorum*, o presente estudo foi realizado com os objetivos de quantificar a expressão gênica diferencial do EST/gene *TgORFX1-3'* de dois genótipos de *T. grandiflorum* em resposta a infecção por *M. pernicioso*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O GÊNERO *Theobroma* L.

2.1.2 Descrição botânica e aspectos econômicos

O gênero *Theobroma*, pertencente à família Malvaceae, é um gênero tropical nativo da América do Sul, compreendendo cerca de 22 espécies (KENEDDY, 1995), classificadas em seis sessões: *Andropetalum* (*T. mammosum* Cuatr. & León); *Glossopetalum* (*T. angustifolium* Moçônio & Sessé, *T. canumanense* Pires & Fróes, *T. chocoense* Cuatr., *T. cirmolinae* Cuatr., *T. obovatum*, *T. sinuarum*, *T. sionosum*, *T. stipulatum*, *T. grandiflorum*, *T. hylaeum* Cuatr., *T. nemorale*; *Oreanthes* (*T. bernoilli*, *T. geaucum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. velutium*); *Ritidocarpus* (*T. bicolor*); *Telmatocarpus* (*T. gileri*, *T. microcarpum*.) *Theobroma* (*T. cacao*) (VENTURIERI, 1993)

O Brasil possui representantes de todas as seções que foram estabelecidas por Cuatrecasas (1964) com exceção de *Andropetalum*, que tem ocorrência apenas na Costa Rica, segundo o autor as espécies brasileiras ocorrem todas na Amazônia (*T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. microcarpum*, *T. bicolor* e *T. cacao*) (VENTURIERI, 1993).

A maioria das espécies amazônicas do gênero *Theobroma* produzem frutos comestíveis das quais podemos citar: *T. cacao*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. grandiflorum*, *T. bicolor* (VENTURIERI & AGUIAR, 1988).

As sementes de *Theobroma* são ricas em amido (15%), proteínas (15%) e óleos (50%), por esta razão são consideradas um alimento substancial. A partir de suas sementes é possível fabricar chocolate, mas apenas o *T. cacao* possui a presença de um óleo volátil que confere um sabor característico, além de possuir um teor de 1,5 a 3% de teobromina, um composto alcalóide estimulante do sistema nervoso central com propriedades semelhantes a cafeína (CUATRECASAS, 1964; VENTURIERI, 1994; COHEN, 2009).

A importância deste gênero para a região amazônica deve-se principalmente ao cupuaçu (*T. grandiflorum*) e ao cacau (*T. cacao*), traduzida pelo consumo de seus derivados sob as mais variadas formas por todo o mundo (PURDY; SCHMIDT, 1996). O cupuaçu, restringia-se à agricultura familiar até a década de 80 (EMBRAPA, 1999), dados dos últimos anos revelam que na Amazônia Brasileira o cupuaçu possui mais de 20.000 hectares plantados e com produção em torno de 55.000 toneladas de fruto, o que corresponde a aproximadamente 17.000 toneladas de polpa (IBGE/LSPA, 2010) De acordo com dados da SETEC (2007), a média de produtores de cupuaçu no Brasil chega a 170 mil pessoas, gerando, aproximadamente, 220 mil empregos diretos e indiretos.

A produção de polpa na Bahia é estimada em 300 toneladas, cujos principais municípios produtores são Ilhéus, Camamu, Ituberá, Nilo Peçanha, Taperoá, Valença e Una (FRAIFE, 2010). Por ser uma espécie de boa adaptação ao cultivo sombreado é realizado em consórcios com outras arbóreas, permitindo ótimos resultados de cunho econômico e ambiental (FRAIFE, 2000).

O consumo do cupuaçu, não se restringe às fronteiras brasileiras, segundo dados da SETEC (2005), no primeiro semestre de 2005 o Brasil exportou 50 toneladas de polpa para o Japão, Países Baixos, Reino Unido, Alemanha, Estados Unidos, Argentina, Bolívia e Paraguai. A sua ampla utilização comercial, vai desde o uso da polpa para produção de doces, geleias, sucos, compotas, licores, bombons e tortas; da utilização da casca rígida onde são montadas peças de artesanato; até o beneficiamento da semente que possui propriedades químicas semelhantes ao cacau, possibilitando assim a confecção do cupulate, um chocolate fino de ótima aceitação no mercado e de achocolatados de excelente qualidade em termos de sabor (NAZARÉ et al. 1990; COHEN & JACKIX, 2005; VASCONCELOS 2003).

O elevado preço de mercado impulsionou uma frenética expansão do seu plantio em escala comercial com um excedente expressivo de produção de amêndoas. Somente

a Cooperativa Agrícola de Tomé-Açú - CAMTA, no ano 1998, produziu naquela safra 400t de amêndoas secas. Considerando ser aquela cooperativa a maior do estado, agregando cerca de 10% da produção de cupuaçu do estado do Pará, estimou-se que cerca de 4.000 toneladas de amêndoas secas foram produzidas naquele estado (VENTURIERI, 1999).

A cultura do cacauero além de ser um dos principais componentes econômicos nas regiões onde é cultivada, também exerce um papel importante na preservação ambiental tanto pela extensão, como por seu sistema agroflorestal representar o maior índice de espécies por hectare e elevado número de plantas endêmicas, pois seu cultivo associado com árvores nativas tem auxiliado na manutenção da fauna e flora de biomas ameaçados, como a Mata Atlântica e a floresta Amazônica (LOBÃO et al., 2007; SILVA, 1997).

Os demais representantes do gênero, o *T. speciosum*, *T. subicanum*, *T. obovatum* e *T. microcarpum*, exceto *T. bicolor* que se constitui na terceira espécie mais cultivada, ainda não foram domesticados, no entanto seus frutos são apreciados na região Norte do País. Apesar do potencial apresentado pelas espécies do gênero, reassalta-se ainda a necessidade de aumentar o conhecimento sobre vários aspectos da biologia. O desmatamento acelerado da Amazônia aliado ao rápido e indiscriminado processo extrativista pode acelerar a perda do patrimônio genético, o que se torna grave pelo desconhecimento que temos da abrangência deste patrimônio e do seu valor atual ou futuro (RANKIN-DE-MERONA; ACKERLY, 1987)

A conservação dos recursos genéticos das espécies amazônicas do gênero *Theobroma* é de extrema importância uma vez que consiste no reservatório de genes para a espécie *T. cacao*. A preservação de germoplasma pode ser feita através de repositórios ativos de germoplasma, em coleções *ex situ* e/ou *in situ*, que quando apropriadamente manejados podem preservar o potencial evolutivo das espécies (DEBOUCK, 1993 *apud* VENTURIERI, 1998). As sementes de *Theobroma* assim como a maioria das sementes de espécies tropicais são recalcitrantes tornando assim a conservação *in situ* a melhor alternativa.

Atualmente os dois principais bancos ativos de germoplasma de espécies afins ao cacau são a coleção “George Basil Bartley”, pertencente a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira- CEPLAC no município de Ananindeua - PA e a coleção “George Addison O’Neill” pertencente a Embrapa Amazônia Oriental- CPATU, na

cidade de Belém – Pará. O Banco Ativo de Germoplasma do Cacau é situado nas dependências da CEPLAC- CEPEC, no município de Ilhéus, Ba e na Amazônia na CEPLAC- ERJOH, os quais complementam-se, possuindo acessos coletados no Brasil e de diversos outros Países, possuindo desta forma ampla variabilidade genética.

2.2 Problemas fitopatológicos

2.2.1 Vassoura-de-bruxa: Histórico da doença e ciclo de vida do fungo *Moniliophthora perniciosa*.

Diversos patógenos de etiologia variada são capazes de infectar o cupuaçuzeiro e outras espécies do gênero (DIAS NETO, 2001). As doenças mais comumente encontradas são a atracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, a mancha de Phomopsis, causada pelo fungo *Phomopsis* sp e ainda ocorrem outras doenças com menos incidência na cultura como a podridão negra dos frutos e morte progressiva (*Lasiodiplodia theobromae*), mancha parda (*Calonectria kyotensis*), podridão do pé (*Phytophthora palmivora*), queima-do-fio (*Ceratobasidium stevensii*), podridão branca das raízes (*Rigidoporus lignosus*), mancha de Rhizoctonia (*Rhizoctonia* sp.), requeima de mudas (*Phytophthora* sp.), podridão vermelha da raiz (*Ganoderma philipii*) e mancha de alga (*Cephaleuros mycoidea*) sp., (BENCHIMOL, 2004).

No cacauzeiro a produção é severamente reduzida por três doenças fúngicas: monilíase (causada por *Moniliophthora roreri* (Cif & Par.) (EVANS et al. 2002), podridão parda (causada por *Phytophthora* spp.) e a vassoura de bruxa (causada por *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Mora (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005). A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra.

Dentre todas as doenças, a vassoura-de-bruxa deteve mais atenção por ter se constituído em uma das principais causas do declínio de plantações de cupuaçu e cacau, chegando a perdas de 20 a 90% da produção (DIAS & REZENDE, 2001; ALVES, 2010).

A vassoura-de-bruxa é endêmica da planície Amazônica e possui ampla distribuição nos países cacauilcultores das Ilhas do Caribe, América do Sul e Panamá. A enfermidade foi constatada por Went em 1940, que descreveu a ocorrência em 1895 no Suriname. A doença foi disseminada pelo continente Americano dado a sua grande severidade (MOREIRA, 2006). Com a expansão das áreas de plantio de cacau e mais recentemente de cupuaçu, a doença se tornou comum dentro das culturas, causando perdas anuais e conseqüentemente danos à economia regional (SOUZA, 2007). O fungo também infecta o *T. bicolor*, *T. subicanum*, *T. speciosum*, *T. microcarpum*, *T. obovatum*, o gênero *Herrania* e algumas espécies da família Solanacea (HOLLIDAY, 1980; TOVAR, 1991; SUÁREZ & DELGADO, 1993).

Na Bahia, maior região produtora de cacau do Brasil, a vassoura de bruxa é considerada o maior problema fitopatológico da cacauilcultura. Quando foi introduzida em 1989 na região Sul da Bahia (PEREIRA et al 1989; TREVIZAN & SILVA, 1995), em pouco tempo a doença rapidamente alcançou proporções epidêmicas, principalmente, devido a suscetibilidade do hospedeiro e as condições climáticas altamente propícias ao desenvolvimento e persistência do patógeno (LUZ et al., 1997). A redução acentuada da produção nacional teve como consequência a interdição do quarto maior parque moageiro de sementes do Brasil, instalado no estado da Bahia. Assim, a partir de 1997, o Brasil passou a importar o produto (PERES FILHO, 1998).

Alguns autores sugerem que as infecções nos cacaueiros da Amazônia poderiam ter se originado de populações do fungo associados ao cupuaçuzeiro, sendo assim considerado o hospedeiro primário do *M. pernicioso* (VIEIRA, 1942; GONÇALVES, 1965). Apesar do cacaueiro e cupuaçuzeiro estarem convivendo em áreas vizinhas na Bahia, somente em 1997, oito anos após o aparecimento da doença na região, houve a primeira ocorrência da vassoura de bruxa no cupuaçuzeiro.

A doença ataca os ramos, almofadas florais e frutos em desenvolvimento, causando hipertrofia, estas estruturas murcham e morrem. A hipertrofia é acompanhada de brotação intensa de gemas laterais, dando a característica de uma vassoura, o sintoma característico da doença (BAKER & CROWDY, 1943). Deste modo a atividade fotossintética e produtiva da planta é severamente afetada (BASTOS, 1990; LIMA, 1998).

O agente etiológico, o fungo *M. pernicioso* (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005), afeta diretamente a fecundidade, o crescimento, a habilidade adaptativa, e no caso de

espécies arbóreas, a longevidade (PURDY & SCHMIDT, 1996). Possui ciclo de vida hemibiotrófico dividido em duas fases, sendo a primeira fase parasítica (monocariótica) constituindo-se de micélio primário com crescimento intercelular originado a partir dos basidiósporos (STAHEL, 1915; QUEIROZ et al., 2003). Na segunda fase, a saprofítica, o micélio apresenta grampos de conexão e crescimento intracelular e intercelular (EVANS, 1980).

A fase parasítica é caracterizada pela infecção dos tecidos meristemáticos, os basidiocarpos, estrutura sexual do fungo, liberam durante a noite os basidiósporos, os propágulos infectivos que são dispersados através do vento e chuva. A germinação dos basidiosporos ocorrem na superfície das cutículas e base de tricomas, ocorrendo a emissão de tubos germinativos, sem a formação de apressórios. Estas estruturas são capazes de penetrar nos tecidos meristemáticos e as principais consequências são o entumescimento dos tecidos infectados (PURDY & SCHMIDT, 1996). O micélio biotrófico do patógeno coloniza todo o tecido e cresce intercelularmente por aproximadamente três semanas. A presença do fungo induzirá contínuo crescimento, e com 30 dias é possível visualizar os sintomas (SUÁREZ, 1993; SUÁREZ & DELGADO, 1993). Após esta fase, o fungo passa para a fase saprofítica, na qual os tecidos infectados entram em processo de necrose, nesta etapa inicia-se a dicarionização, surgindo hifas com grampos de conexão. O micélio saprofítico do fungo é capaz de sobreviver por vários anos no interior dos tecidos infectados (vassouras vegetativas, frutos e folhas), que quando expostos aos efeitos alternados de chuva e sol, frutificam na forma de basidiomas (que produzem basidiosporos), e recomeçam o ciclo (BASTOS, 1990; NIELLA *et al.*, 1999).

A liberação dos basidiósporos, processo reprodutivo do *M. pernicioso*, ocorre preferencialmente à noite, estando associada à queda de temperatura e ao aumento da umidade relativa do ar, sendo disseminados pela corrente dos ventos. Os basidiósporos são liberados através de um mecanismo explosivo. Os mesmos têm vida curta, de sensibilidade à luz e em condições naturais não sobrevivem mais que uma hora. A disseminação também pode ocorrer através da água e do transporte de material biológico contaminado (GARCES, 1947).

2.2.2 Controle da vassoura-de-bruxa no cupuaçuzeiro e cacauero

A doença é controlada por meio de técnicas que visam minimizar a disseminação do fungo através controle químico, adubação, controle de níveis de sombreamento, podas profiláticas, dentre outros métodos, sendo estes aliados ao fator resistência do genótipo ao ataque do fitopatógeno (CRUZ et al., 2000; CRUZ & ALVES, 2001).

O melhoramento genético destinado à resistência sofre influências de caracteres do hospedeiro e também por fatores do patógeno. Em culturas perenes o acúmulo de genes de resistência é um fator limitante para evitar ou retardar a infecção por fitopatogênicos (DIAS, 2001; RIOS-RUIZ, 2001).

O emprego de genótipos resistentes e de alta produtividade desenvolvidas em programa de melhoramento genético do cupuaçuzeiro e do cacauero é a alternativa mais recomendada para se manejar a vassoura de bruxa (PINTO; PIRES 1998). Nesse sentido o Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) tem desenvolvido um programa focado na gestão integrada da doença, que incluem a melhoria do nível de resistência e durabilidade das novas variedades comerciais (Lopes *et al* 2012; Pires et al 2013) visando inserir fontes de resistência distintas do Scavina 6 (fonte principal da resistência utilizada), para dificultar a evolução do patógeno em respeito ao aumento de sua eficiência em provocar danos nos materiais resistentes, garantindo a diminuição da pressão de seleção do fungo e assim a durabilidade da resistência do cacau.

O programa de Melhoramento Genético do Cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental já desenvolveu variedades resistentes ao ataque do fungo, a exemplo da cultivar C174, mas dada a capacidade evolutiva do fungo em burlar os mecanismos de defesa da planta e conseguir colonizá-la, existe portanto, a necessidade de um material com ampla base genética e com diversas fontes de resistência para que haja sustentabilidade biológica e econômica (BANDEIRA, 2006).

2.3 Estudos genéticos do gênero *Theobroma*

2.3.1 Interação planta vs Patogeno

A resistência contra patógenos em plantas é muito comum, a ocorrência da doença é particularmente uma exceção à regra (BARI & JONES, 2009), fato explicado aos diversos mecanismos de defesa das plantas. No entanto, existem mecanismos de defesa que só são ativados após as plantas serem expostas a algum estresse, sendo ele biótico ou abiótico. Nesse caso, a resistência é dita induzida, as agressões sofridas vão sinalizar a ativação de genes de defesa e sua alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam, mesmo tendo muitas vezes seu desenvolvimento prejudicado (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005). Sendo assim, mecanismos que envolvem o reconhecimento do patógeno desencadeiam respostas celulares no intuito de conter a colonização pelo patógeno, E as interações entre plantas e microrganismos ou fatores abióticos são definidas a partir de um reconhecimento, com posterior transdução do sinal externo, ativação de mensageiros secundários e expressão de genes específicos (LEITE et al., 1997).

Uma das características marcantes da resposta de defesa é a liberação de compostos tóxicos, de maneira rápida e localizada, com o propósito de lesionar a parte afetada e também provocar a morte do patógeno (AGRIOS, 2004). Durante a interação planta-patógeno a atividade do patógeno consiste na colonização do hospedeiro e utilização de seus nutrientes. A planta por sua vez, detecta a presença do patógeno e lança mecanismos de defesa para tentar conter a invasão (WAN et al., 2002).

2.3.2 Tamanho do genoma

Todas as espécies do gênero apresentam $2n = 20$ com cromossomos pequenos medindo ca. 1.5 μ m predominantemente meta ou submetacêntrico, com a ocorrência de diplóides e tetraplóides (DAVIE, 1935; DANTAS & GUERRA 2009). Figueira et al em 1993 publicou o tamanho o genoma do *T. cacao*, com valor aproximado de 430Mpb. Para as demais espécies do gênero este dado é desconhecido, o que dificulta estudos de ordem genético-molecular, já que o dado de conteúdo de DNA nuclear é essencial em

estudos evolutivos e principalmente para estudos ligados a marcadores moleculares que refletem no melhoramento genético de espécies de importância econômica (LOUREIRO, 2010; KAWARA, 1999; VERMES, 2000; OCHATT, 2008)

De acordo com Gregory, 2005, a estimação do tamanho do genoma é considerado um dado imprescindível dentro dos estudos envolvendo a caracterização do material genético ou estudos de biologia molecular e de inferências a respeito de histórias evolutivas e filogenéticas. A citometria de fluxo teve início no ano de 1950 e sua principal utilização era para contagem e análise de células sanguíneas (CÔRTE-REAL et al. 2002). Nos últimos anos a técnica tem ganhado destaque no estudo de plantas, apresentando várias possibilidades de aplicações, dentre elas a quantificação do tamanho genômico (DOLEZEL; GREILHUBER; SUDA, 2007).

O aparelho utilizado na medição de partículas em suspensão, o citometro de fluxo, avalia a intensidade relativa de fluorescência de núcleos isolados a partir de células obtidas de tecidos que não estejam em desenvolvimento (DOLEZEL & BARTOS, 2005). Loureiro et al. 2007 descreve a metodologia empregada para a medição de genomas em plantas: os núcleos são isolados por maceração dos tecidos foliares jovens e saudáveis. São necessários aproximadamente 10.000 núcleos para a realização da medição, esta quantidade é obtida a partir de 50 mg de tecido vegetal fresco. Em seguida os núcleos são corados com fluorocromos DNA-específicos e a amostra é então inserida no citometro, a fluorescência emitida de cada núcleo é proporcional ao conteúdo de DNA.

O tamanho do genoma de muitas espécies já foram estimados, de acordo com Bennett e Leitch (2012) e Gregory (2012), estão disponíveis os valores 1C de 4.995 espécies de plantas e 1.653 espécies de animais. Visto que muitos esforços já foram deflagrados em função da conservação de espécies amazônicas, o conhecimento científico para respaldar essas iniciativas ainda são insuficientes (KERR & CLEMENT, 1980; SCHULTES et al, 1979). Sendo assim, o Cupuaçuzeiro consiste em uma espécie que os estudos voltados para a biologia floral, fluxo gênico e principalmente a quantificação da variabilidade genética (ALVES, 2012) e caracterização do genoma ainda são escassos.

2.3.3 Marcadores Moleculares SSR derivados de ESTs e transferabilidade entre espécies

Com a aplicação de ferramentas moleculares no âmbito do melhoramento vegetal é possível elucidar e explicar sobre as diferenças presentes no DNA, e o quanto as mesmas podem afetar o fenótipo. Os marcadores moleculares se inserem neste contexto consistirem em ferramentas informativas, capazes de detectar polimorfismos genéticos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos e a identificação de genótipos sem influência ambiental (FALEIRO, 2007).

Os marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeat*) consistem em sequências repetidas em *tandem* compostas por um a cinco nucleotídeos e seus fragmentos de repetição variam de 10 a 60 pb. Estes marcadores são comuns nos genomas eucariotos e variam de 30 a 90% de acordo com a espécie (WILEY; SONS, 2012). Estes marcadores apresentam ampla variabilidade genética, as quais são provenientes de variações no número das repetições, e isso ocorre devido tanto a erros da DNA polimerase durante a replicação do DNA, quanto da ocorrência de *crossing-over* desigual (HANCOCK, 2000). Apesar dos marcadores SSR serem espécie-específicos, apresentam vantagens como alta taxa de transferibilidade entre espécies aparentadas e até mesmo entre gêneros da mesma família, fato este devido a conservação das regiões flanqueadoras dos SSR (CHOUMANE, et al 2004; GUTIERREZ, et al 2005). Estes marcadores tem ganhado destaque dentro da gama existente de marcadores moleculares (SCHOLTTERER, 2004).

O conhecimento das sequências de nucleotídeos do DNA é uma etapa primordial para a compreensão da estrutura e funcionamento de dado organismo. Dentre as técnicas atuais que objetivam a identificação de genes, a metodologia de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs) despontam com uma estratégia promissora, capaz de identificar genes expressos em determinadas condições e fases de desenvolvimento distintas (JORGE, 2002)

Os ESTs são sequências parciais de uma das extremidades da molécula de cDNA (DNA complementar), provenientes do sequenciamento de clones de uma biblioteca de cDNA. Correspondem, portanto, a um mRNA (RNA mensageiro) os quais

contém as informações para a codificação das proteínas e estão diretamente relacionados com genes funcionais. A utilização dos EST's, vem sendo desde então o método mais rápido e eficaz na identificação de sequências codificadoras. A Comparação das frequências de ESTs em diferentes bibliotecas podem resultar na expressão gênica diferencial e identificação de genes envolvidos em caracteres de interesse (RUSSELL, 1992 ; MEYERS et al., 2004; MATSUBARA & OKUBO, 1993; EWING et al., 1999).

O desenvolvimento de SSRs derivados de ESTs (EST-SSR) pode ser um processo oneroso para espécies que não possuem bibliotecas de ESTs. Mas estes marcadores também podem ser gerados a partir da mineração de dados em bancos de sequências expressas (*Expressed Sequence Tags database- NCBI*) para espécies aparentadas (WANG, et al 2005). Ou ainda pode-se transferir estes marcadores para espécies do mesmo gênero e até mesmo entre generos da mesma família, assim como os SSR. Assim os EST-SSRs de espécies amplamente estudadas podem ser usados em espécies com poucas informações. Sendo assim os ESTs-SSR constituem em uma alternativa de marcadores que se destacam por estarem relacionados com marcas de interesse previamente selecionadas, como a resistência a algum fitopatógeno e por serem facilmente transferíveis para espécies filogeneticamente próximas (LIU *et al.*, 1999; SCOTT, 2001).

As últimas pesquisas no campo da genômica investiram esforços para construção de bibliotecas de cDNA com o objetivo de identificar EST para auxiliar na identificação e caracterização de genes em genomas complexos. Foram obtidos diversos marcadores derivados de EST's associados a resistência do cacaueteiro à vassoura-de-bruxa, a exemplo dos trabalhos de Argout, et al 2008, Leal Jr et al, 2007, Lima et al 2008, Lima et al 2010. Estes marcadores, portanto, podem oferecer benefícios incluindo a ampla abrangência em diversos estudos além da transferibilidade facilitada entre espécies solucionando análises onde recursos disponíveis são limitados (ELLIS; BURKE, 2007).

2.3.4 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) difere de um PCR convencional por ser capaz de quantificar o produto de uma reação a cada ciclo a partir da utilização de um sinal fluorescente, específico (sondas marcadas) ou não específico (intercalantes de DNA). Desta forma, é possível acompanhar a amplificação durante a fase exponencial da reação e estimar a quantidade de material presente nas amostras (GACHON *et al.*, 2004). O método de detecção chega a ser de 10.000 a 100.000 vezes mais sensível que ensaios de proteção com RNase e 1.000 vezes mais sensível que a hibridização *dot blot*. A quantidade de amostra necessária para a reação também é um fator positivo, exigindo pouco material. A desvantagem consiste apenas no alto preço de seus reagentes e equipamentos (WONG & MEDRANO, 2005).

O RT-qPCR é capaz de quantificar os níveis de transcrição de genes de interesse, caracterizando desta forma a resposta do estado e estresse fisiológico de organismos (DESROCHE *et al.*, 2005). Por sua sensibilidade, especificidade, acurácia, alta reprodutibilidade e por dispensar técnicas de biologia molecular, como a confecção de géis de agarose ou poliacrilamida, embora o método dependa de homogeneidade nos ensaios. (GACHON *et al.*, 2004; WONG & MEDRANO, 2005; BUSTIN, 2000; SHIPLEY, 2006; BUSTIN, 2009). Os métodos de análise experimental podem ser a quantificação absoluta ou relativa, a quantificação absoluta aponta um número preciso de cópias de um gene alvo geralmente por relacionar o sinal de PCR obtido com uma curva padrão. A quantificação relativa utiliza o sinal do transcrito do alvo em um determinado tratamento e relaciona a uma condição controle. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é uma forma indicada de se analisar mudanças relativas na expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A quantificação relativa tem possibilitado o desenvolvimento de grandes trabalhos no âmbito da interação planta-patógeno, a identificação de novos genes envolvidos com a defesa contra fitopágenos tem sido amplamente explorada. Em culturas pouco estudadas como o cupuaçu o interesse é maior, pois se tratando de espécies domesticadas a pouco tempo é provável que haja uma maior diversidade gênica. Vários estudos de expressão gênica com o RT-qPCR tem sido realizados na cultura do cacau. Tessuti, 2009 analisou a composição de ácidos graxos nos frutos de cacau de genes relacionados à via metabólica de ácidos graxos e triglicerídeos durante o desenvolvimento de sementes, com o intuito de selecionar genes para estudar embriões provenientes de diversos tecidos e cacau. Shi, *et al* 2010, analisou via RT-qPCR o gene

NPR1, que está ligado a respostas de defesa e regulação, na cultura do cacau, onde constatou que a ativação do referido gene resulta no aumento da expressão de mais de 2000 genes de defesa da planta contra fitopatógenos.

Pode-se concluir que a análise em larga escala a expressão gênica é considerado um pré-requisito para estudos funcionais e de seleção assistida por marcadores, resultando em estudos que fornecem informações valiosas para entender os mecanismos de interação planta x patógeno.

3. CAPITULO 1

Tamanho do genoma e caracterização de marcadores EST-SSR no gênero *Theobroma* L. (Sterculioideae, Malvaceae)

Resumo

O tamanho do genoma é uma informação que pode auxiliar muitos estudos genéticos, como no uso de marcadores EST-SSR, no entanto este dado é desconhecido para a maioria das espécies de angiospermas. Sendo assim este estudo teve como objetivo quantificar o conteúdo de DNA de espécies do gênero *Theobroma* e caracterizar por meio de EST-SSR uma população de *T. cacao* e avaliar a transferibilidade destas marcas entre genótipos das demais espécies silvestres do gênero. O conteúdo de DNA nuclear das espécies de *Theobroma* foram estimados como sendo $2C = 0,924$ para *T. bicolor*, *T. obovatum*, *T. microcarpum*, *T. speciosum*, $2C = 0,917$ para *T. grandiflorum* e $2C = 0,933$ para *T. cacao*. Constatou-se que o genoma destas espécies de *Theobroma* são relativamente pequenos se comparado com a maioria das Angiospermas e relativamente conservados ao longo de sua evolução, corroborando com os dados encontrados com os marcadores EST-SSR. Foram encontrados 11 loci (60%) polimórficos e 9 monomórficos (40%) entre os indivíduos de *T. cacao* analisados neste estudo. Para as demais espécies os loci foram transferíveis nas seguintes taxas: 75% amplificaram em *T. grandiflorum*, 75% em *T. subicanum*, 90% em *T. obovatum*, 60% em *T. bicolor*, 50% em 35% *T. speciosum*, 35% *T. microcarpum*. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada primer, excluindo-se os loci monomórficos, variou de 0,05 (mestR20-4) a 0,61 (ESTSSR 1). O conjunto de EST-SSRs validados será um ferramenta útil para o estudo da diversidade funcional de populações e para a realização de estudos de mapeamento de associação para o *T. cacao*. Os marcadores EST-SSR aqui testados representam uma ferramenta para estudos de diversidade genética e melhoramento genético, auxiliando na construção de mapas genéticos e identificação de eventuais QTL's.

Palavras-chave: tamanho do genoma, citometria de fluxo, EST-SSR, gênero *Theobroma*

1. Introdução

As vinte e duas espécies descritas para o gênero *Theobroma* são tipicamente Neotropicais e encontram-se distribuídas na Floresta Tropical úmida no hemisfério ocidental. Na Amazônia brasileira é possível encontrar nove delas, as quais produzem frutos comestíveis, e as amêndoas, de pelo menos cinco, são utilizadas na confecção de chocolate (VENTURIERI, 1993; FALCÃO, 1993).

As culturas de maior interesse dentro do gênero, *Theobroma cacao* L. e *T. grandiflorum* Schum, são acometidas por doenças fúngicas. A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) consiste um dos principais problemas enfrentados pelas culturas (DIAS, 2001; EVANS et al., 2002). Desde que a doença tomou proporções devastadoras no Sul da Bahia e demais regiões (PEREIRA et al., 1988), estudos priorizam estratégias que visam a obtenção de genótipos resistentes ao fitopatógeno (CEPLAC, 2013).

Existem muitos estudos envolvendo o *T. cacao* devido à sua importância econômica, incluindo principalmente pesquisas voltadas para a identificação de genes de resistência às principais doenças da cultura (GESTEIRA et al, 2007, MICHELI et al, 2010, GRAMACHO et al, 2003). No entanto, para as demais espécies do gênero diversas informações a respeito da biologia e aspectos genéticos são insuficientes ou desconhecidos, por serem espécies ainda não domesticadas apresentam um repertório gênico maior e possivelmente com distintos níveis de resistência à doenças, e assim podem ser úteis no melhoramento de espécies cultivadas (KERR & CLEMENT, 1980; JUNQUEIRA et al., 2005; SCHULTES et al., 1979). Dentre os diversos estudos que podem ser realizados no campo da genética e biologia molecular podemos citar as análises de tamanho do genoma e caracterização a partir de marcadores moleculares. O tamanho do genoma é um dado relevante dentro das análises que têm por objetivos estudos evolutivos, sistemáticos, taxonômicos e de biologia celular na detecção de aneuploidias e processos de apoptose, além de fornecer relevantes informações para trabalhos que envolvam sequenciamento, marcadores moleculares e construção de bibliotecas genômicas, que refletem no melhoramento genético de espécies de importância econômica (LOUREIRO, 2010; WARREN E CRAPTEN, 1991; KAWARA, 1999; VERMES, 2000; OCHATT, 2008; GREGORY, 2005). Os

marcadores moleculares do tipo microssatélites derivados de sequências expressas, os SSR-EST, tem sido convenientes para a caracterização de materiais vegetais de interesse para o melhoramento genético e são também úteis para o mapeamento de loci de características quantitativas (QTLs - *Quantitative Trait Loci*). Oriundas de regiões codificadoras, estas marcas são mais conservadas entre populações e cogêneres, possibilitando assim a transferência de conjuntos de marcadores para espécies aparentadas (HAGRAS et al., 2005; AYALA-NAVARRETE et al., 2007, LU et al., 2006; ROWLAND et al., 2003; SARGENT et al., 2007).

Diversos marcadores EST-SSR já foram identificados para as mais diversas culturas, a exemplo do cacau (LIMA et al., 2010), cereais como o Trigo (EUJAYL et al., 2002) e o centeio (HACKAUF; WEHLING 2002) e para arbóreas como o café (PONCET et al., 2006; AGGARWAL et al., 2007). Dado o seu elevado nível de transferência de uma espécie para outra (GUPTA; PRASAD 2009; LURO et al, 2008), os marcadores EST-SSRs constituem em uma ferramenta útil para estudos de diversidade, estudos funcionais e mapeamento comparativo entre espécies (VARSHNEY et al . 2005).

O presente estudo objetivou estimar o tamanho do genoma das espécies de *Theobroma* e caracterização de genótipos de *T. cacao* com diferentes níveis de resistência a vassoura-de-bruxa através de marcadores EST-SSR, bem como avaliação da taxa de transferência nas demais espécies silvestres do gênero.

2. Metodologia

2.1 Amostras biológicas

Os genótipos de cacau foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Cacau) da comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira –CEPLAC/CEPEC, Ilhéus, Bahia, Brasil. Os indivíduos de cupuaçu, o C174 e o C1074 foram cedidos pela equipe do Rafael Alves, Embrapa- Belém, PA. As espécies silvestres do gênero no

Bloco E – CEPLAC/CEPC. Os acessos e números de indivíduos analisados são listados na tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos genótipos usados na caracterização, transferabilidade de marcadores EST-SSR e medição do tamanho do genoma.

Registro	Espécies	Genótipos	Origem
1	<i>T. cacao</i>	Forasteiro*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
2	<i>T. cacao</i>	CEPEC 515*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
3	<i>T. cacao</i>	UF20*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
4	<i>T. cacao</i>	UF 667*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
5	<i>T. cacao</i>	ICS 1*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
6	<i>T. cacao</i>	ICS 100*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
7	<i>T. cacao</i>	OC 61*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
8	<i>T. cacao</i>	OC 67*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
9	<i>T. cacao</i>	Pentagona*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
10	<i>T. cacao</i>	Rim 24*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
11	<i>T. cacao</i>	Scavina 6*	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
12	<i>T. cacao</i>	R1	Peru
13	<i>T. cacao</i>	R2	Peru
14	<i>T. cacao</i>	R3	Equador
15	<i>T. cacao</i>	R4	nd*
16	<i>T. cacao</i>	R5	Equador
17	<i>T. cacao</i>	R6	Brasil
18	<i>T. cacao</i>	R7	Venezuela
19	<i>T. cacao</i>	R8	Equador
20	<i>T. cacao</i>	R9	Trinidad
20	<i>T. cacao</i>	R10*	Trinidad
22	<i>T. cacao</i>	R11	Colombia
23	<i>T. cacao</i>	R12	Brasil
24	<i>T. cacao</i>	R13	Peru
25	<i>T. cacao</i>	R14	Brasil
26	<i>T. cacao</i>	R15	nd
27	<i>T. cacao</i>	R16	nd
28	<i>T. cacao</i>	R17	Peru
29	<i>T. grandiflorum</i>	C174	Belém-Pará
30	<i>T. grandiflorum</i>	C1074	Belém-Pará
31	<i>T. bicolor</i>	<i>T. bicolor</i> *	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
32	<i>T. microcarpum</i>	<i>T. microcarpum</i> *	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
33	<i>T. obovatum</i>	<i>T. obovatum</i> *	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
34	<i>T. speciosum</i>	<i>T. speciosum</i> *	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
35	<i>T. grandiflorum</i>	<i>T. grandiflorum</i> *	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba
36	<i>T. subicanum</i>	<i>T. subicanum</i> *	CEPLAC/CEPEC-Ilhéus, Ba

2.2 Medição do genoma e análise de dados

Para a citometria de fluxo, uma suspensão de núcleos a partir de folhas jovens, foi preparado como descrito por Loureiro et al. (2007) utilizando o tampão WPB. Os tamanhos do genoma foram estimadas usando um fluxo CyFlow SL citômetro (Partec, Görlitz, Alemanha). O conteúdo de DNA final para cada adesão foi calculado com base em pelo menos três medições diferentes para cada planta. Como controle interno, folhas jovens de *Solanum lycopersicum* "Stupicke" 1,96 pg (Dolezel et al., 1992) (sementes foram fornecidos pelo Instituto de Botânica Experimental, Olomouc, República Checa) foram utilizados em todas as corridas. O software FloMax (Partec) foi utilizado para o processamento de dados. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa SISVAR. O tamanho do genoma foi ajustado via Análise de covariância.

2.3 Genotipagem

2.3.1 Loci microssatélites

Vinte marcadores do tipo microssatélite obtidos a partir de etiquetas de sequências expressas (EST's-SSR) (LIMA et al, 2008; LIMA et al, 2010; LEMOS, 2010), foram usados para genotipagem das amostras, em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata e encontram-se listados na tabela 2

Tabela 2 Relações dos pares de primers, amplitude dos fragmentos amplificados e temperatura de anelamento.

Locus	Sequência (5'-3')	Motivo de repetição	Amplitude (pb)	TA(°C)	Referência
msEstR16-4	F: TTCAATTCCAACACCAAAAAC R: CTGATCTGGGTCTTTGTTCA	[AG]4N24[AGA]5[AAG]4	203	*TD 60-48	Lemos, 2010
msEstR20-4	F: GTCAGAACATTTGCACATCA R: TACAGTTACCCCAAGGATGA	[GA]4N42[TA]4	210	TD 60-48	Lemos, 2010
ESTSSR39	F: ACCCCTCAATCTCACACATA R: GCTTGGCGCTCTTAGTATC	[CT]10	250	TD 60-48	Lima et al., 2008
ESTSSR47	F: CTATGATTTCACTCCCAAC R: ATCATAGCCTTATCGCATTC	[CT]10	228	TD 60-48	Lima et al., 2010
ESTSSR60	F: GAGGAAGGGCTTAGTTTTAGAG R: ATGGATCGGAGAGTATTAGGAT	[CT]4N30[GAG]5	170	TD 60-48	Lima et al., 2010
msEstR16-8	F: TTCTTGTCTTCCCTCTCTC R: CCAGTCAAAACACCTAACCA	[CT]4N40[TC]4	230	TD 60-48	Lemos, 2010
msEstR13-1	F: GACTGATGAGAGGGTAGCTGT R: AGTCCTCCTTTTCCTTCAAA	[CTTT]9	190	TD 55-46	Lemos, 2010
ESTSSR24	F: GATTTCTTTTCTTCGCTTCC R: AGACTGGGTTTTAGCTCCAC	[CT]4	320	TD 60-48	Lima et al., 2010
ESTSSR13	F: TGCTTAAGGAGGTGTTGAC R: GAATCACCTCCTTGATTTC	[AG]4	200	TD 60-48	Lima et al., 2010
msEstR13-4	F: AAGCACAACCAAAGACAAAA R: ACTTTGGGTGGAAAATGAAT	[CTG]6	160	TD 60-48	Lemos, 2010
msEstR13-5	F: GGGGAAAGAAGTTGGTTTTA R: CTCAAATCTCTCCCTCCCTA	[GA]4N18[AG]4	210	TD 60-48	Lemos, 2010
ESTSSR31	F: GACTGATGAGAGGGTAGCTGT R: AGTCCTCCTTTTCCTTCAAA	[CTG]4 [CTG]7	197	59,5	Lima et al., 2010
msEstR20-5	F: AGAAAATGTTCCATCCACAA R: GGAGAGGAAAGGCTACTTCA	[AG]7	245	TD 60-48	Lemos, 2010
ESTSSR1	F: CAGGCCTTTATTTGTCACAC R: TATTGTCGTCGCTGATACCT	[CT]4	160	56	Lima et al., 2010
msEstR13-3	F: AATTCAAGCCCAAATCTACC R: TGGAGACATGTTTCATAGGG	[CAG]10	155	TD 60-48	Lemos, 2010
ESTSSR2	F: AGGGGTGTTTTTATTGTCGT R: TCTTCCTTTTCCTTTCATCC	[CT]4[CT]4	210	TD 60-48	Lima et al., 2010
ESTSSR6	F: CAATCTCAAACGCTCAAAAAC R: TTGATCAGGGTTCTGTTGAC	[CT]4 [TGA] 4	194	TD 60-48	Lima et al., 2010
ESTSSR9	F: CGTTCAATCCTTCTCAGTTG R: CCATGGAAATTGCAGATAAC	[CT]4[CT]4	260	TD 60-48	Lima et al., 2010
msEstR16-2	F: TAAACCTTCCATCTCCATT R: TCCATAGCTCGCTTGAATTA	[CA]4[GA]3	210	TD 60-48	Lemos, 2010
ESTSSR49	F: AAGGACGATGAAGAGGAAAG R: ATTAGACACACACGCACA	[AT]9	210	TD 60-48	Lima et al., 2010

2.3.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada no Laboratório Fitopatologia Molecular do CEPEC/CEPLAC, a partir de folhas em estágio intermediário de maturação e sadias. O protocolo utilizado foi o Matab proposto por Risteruchi (2000), com adaptações para as demais espécies de *Theobroma*. Amostras de aproximadamente 300 mg de tecido foliar foram maceradas com o auxílio de micro esferas metálicas em tubos *ependorfs*, na presença de nitrogênio líquido. Foi adicionado ao macerado 800 μ L do tampão de extração (1.4 M NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 10 mM Na₂SO₃, 1% PEG 6000, 2% MATAB) pré-aquecido a 74°C. Após uma hora em banho-maria, a 65°C, foram acrescentados 700 μ L de clorofórmio-isoamílico (24:1) e as amostras submetidas à centrifugação por 10 minutos, a 14.000 rpm, em microcentrifuga Eppendorf a 24°C e os sobrenadantes retirados para novos tubos. Adicionou-se 700 μ L de isopropanol gelado e acondicionados a -20 °C por duas horas e centrifugado por 10 min, a 14000 rpm. Os *pellets* formados foram retirados com o auxílio de uma ponteira e transferidos para novos tubos contendo 100 μ L de TE + RNase na concentração de 40 μ g/mL e colocado em estufa a 37 °C para atuação ótima da RNase. A análise da integridade e pureza das amostras de DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1 %, corado com gel red 1 ng/ μ L. A quantificação de cada amostra foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro *Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer* (*Picodrop Limited, UK*), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras tiveram suas concentrações ajustadas para 1 ng DNA/ μ L e foram conservadas a -20 °C.

2.3.3 Amplificação via PCR e genotipagem

O volume utilizado para reação foi de 20 μ L, contendo 30 ng de DNA, 0,2 mmol.L⁻¹ de cada *primer*, 2,0 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 0,2 mmol.L⁻¹ de cada dNTP (Ludwig Biotecnologia Ltda), 1X de tampão e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia Ltda). Foi feito um gradiente a 56°C para obter a temperatura de

anelamento dos *primers* e também foram testados com o protocolo *touch down* (TD). Na reação de touch down houve 10 ciclos para denaturação a 94°C por 4 min, anelamento do primer a 60-48°C usando 1°C de decréscimo, e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 48°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final de 4 minutos a 72°C. Para a reação com as temperaturas definidas através do gradiente foi utilizado 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, TA°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os fragmentos obtidos após amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, usando como tampão de corrida TBE 1X (89 mmol.L-1 Tris, 89 mmol.L-1 de ácido bórico e 2 mmol.L-1 EDTA). O gel de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata de acordo com Creste et al (2001) e Gramacho et al (2010). Utilizou-se como marcador de peso molecular o ladder 10 pb (Invitrogen). Os fragmentos visualizados em gel de poliacrilamida 6% tiveram os seus tamanhos comparados com o marcador de peso molecular ladder 10 pb (Invitrogen). Bandas do ladder e os fragmentos tiveram as suas alturas medidas, com uma régua milimetrada, do local de aplicação até a banda.

2.3.4 Análise de dados

Para as análises genéticas foram considerados três grupos: (1) *Theobroma cacao* com dezessete indivíduos, (2) *Theobroma grandiflorum* com dois indivíduos e (3) espécies silvestres de *Theobroma* com cinco indivíduos, esse parâmetros foram definidos para comparações com base no táxon específico. A diversidade de cada locus foi caracterizada pelo número de alelos por locus (N_a), e a heterozigosidade observada (H_o) foram calculadas por meio do programa Genetix Ver. 4.05.2 (BELKHIR *et al.*, 1999). As estimativas dos parâmetros de diversidade genética também foram realizadas por grupos. Foi calculado a distância genética (D) entre os grupos estimados segundo Nei (1972) no programa Genetix Ver. 4.05.2. As informações contidas em cada locus, bem como o grau de polimorfismo deles (PIC), foram computadas por meio do software CERVUS versão 3.0 (KALINOWSKI *et al.*, 2007).

3. Resultados

3.1 Medição do tamanho do genoma

A espécie *Solanum lycopersicum* ‘Stupické’ $2C = 1,96$ pg foi escolhido como padrão primário para determinação do valor $2C$ das espécies de *Theobroma*, de acordo com a disponibilidade de padrões de referência (PRAÇA-FONTES et al., 2011) O processamento das suspensões nucleares por meio da citometria de fluxo geraram histogramas cujos picos G_1/G_0 do padrão e das amostras puderam ser identificados (Figura 1).

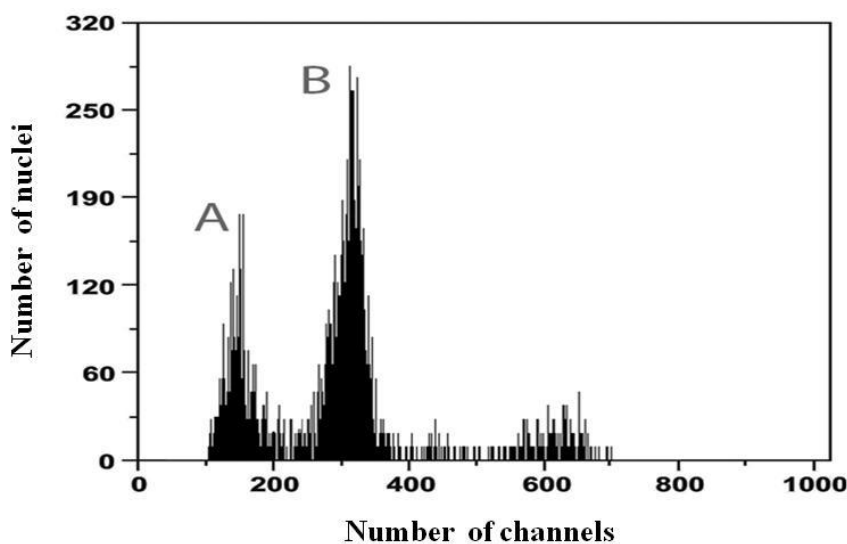


Figura 1. Determinação do conteúdo de DNA nuclear em *T. cacao* cv. ISC100 (A). Células *Solanum lycopersicum* (B) foram incluídos como um padrão interno. Núcleos isolado a partir de folhas de cacau foram coradas com iodeto de propideo e analisados por citometria de fluxo

Os cortes foliares utilizados possibilitaram a obtenção de núcleos intactos. Os valores obtidos para cada espécie apresentaram coeficiente de variação (CV) de 4.064 conforme é apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Análise de co-variância para o tamanho do genoma..

Tamanho do genoma	GL	QM	F	P value
Species <i>Theobroma</i>	6	0.00037	0.2	0.9746
Standard sample	1	0.03131	0.26	0.6148

Cv= 4,066%

A partir das análises dos histogramas, evidenciou-se que os conteúdos médios de DNA nuclear das espécies de *Theobroma* foram de $2C = 0,924$ para *T. bicolor*, *T. obovatum*, *T. microcarpum*, *T. speciosum*; de $2C = 0.917$ para *T. grandiflorum*; e de $2C = 0.933$ para *T. cacao*. A partir da mensuração do tamanho do genoma em picogramas, foi estimado o tamanho do genoma em pares de base para cada espécie e o valor 1C do genoma (Tabela 2).

Tabela 2. Tamanho do genoma das espécies de *Theobroma*

Espécies	Tamanho do genoma (valor 1C)	Número Mpb
<i>T. cacao</i>	0.4666	456
<i>T. grandiflorum</i>	0.4589	448
<i>T. microcarpum</i>	0.4624	452
<i>T. obovatum</i>	0.4624	452
<i>T. speciosum</i>	0.4624	452
<i>T. bicolor</i>	0.4624	452

3.2 Genotipagem

3.2.1 Transferabilidade dos primers

Os *primers* do presente trabalho até o momento não tinham sido testados em *T. cacao*, representando assim, um novo conjunto de 20 *primers* para a cultura. Estes marcadores microssatélites EST-SSR específicos para cacau foram genotipados em 24 indivíduos do gênero *Theobroma*. Foi preciso ajustar as temperaturas de anelamento para alguns primers com o objetivo de ter uma melhor qualidade na amplificação dos produtos de PCR. Os vinte EST-SSR produziram alelos informativos, sendo que 11 (60%) polimórficos e 9 monomórficos (40%) para os indivíduos de *T. cacao*. Para as

demais espécies os locos foram transferíveis nas seguintes taxas: 75% amplificaram em *T. grandiflorum*, 75% em *T. subicanum*, 90% em *T. obovatum*, 60% em *T. bicolor*, 35% *T. speciosum*, 35% *T. microcarpum* (Figura 2).

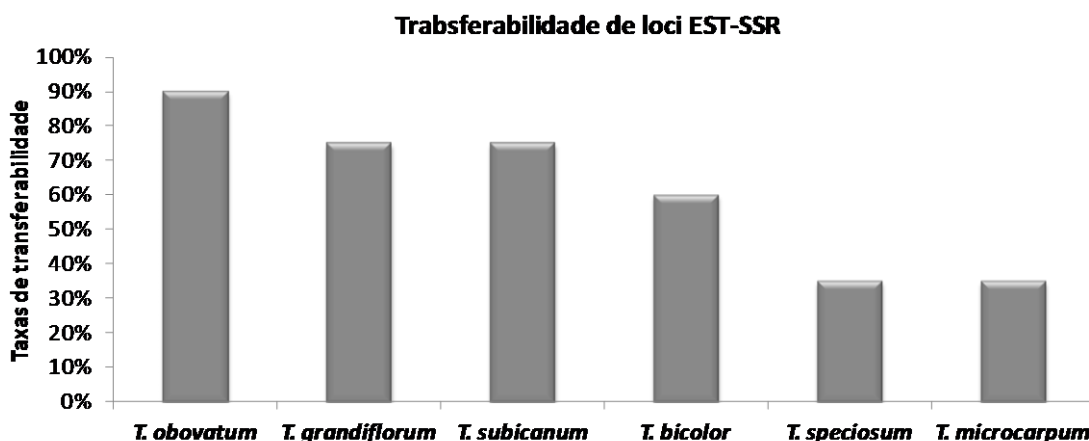


Figura 2 Taxas de amplificação dos Locos EST-SSR específicos de *T. cacao* para *T. grandiflorum* e espécies silvestres do gênero.

3.2.2 Análise descritiva dos locos microssatélites

Considerando todos os indivíduos amostrados, dos vinte locos amostrados 16 foram polimórficos e 4 foram monomórficos. Dos vinte locos amostrados foi possível amplificar um total de 60 alelos e com uma amplitude alélica variando de 155 a 260 pares de bases (tabela 3). O número de alelos por loco variou de um (ESTSSR2, ESTSSR6, ESTSSR9 e ESTSSR49) a sete (mstR16-4) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada primer, excluindo-se os loci monomórficos, variou de 0,05 (mstR20-4) a 0,61 (ESTSSR 1). Ao considerar os indivíduos como três grupos separadamente, os valores PIC podem ter sido influenciados pelo tamanho amostral, sendo o maior valor encontrada no grupo *T. cacao* (1) e a menor valor encontrado no grupo *T. grandiflorum* (2). Os marcadores foram classificados como moderadamente polimórficos, com $0,25 > \text{PIC} > 0,5$, ou considerados altamente polimórficos, com $\text{PIC} > 0,5$ (BOTSTEIN et al., 1980). Sendo assim, 60% dos marcadores utilizados neste trabalho podem ser considerados eficientes nos estudos de características quantitativas,

pois a aplicabilidade dos marcadores possui relação direta com o grau de polimorfismo deles (Tabela 3).

Tabela 3. Número de alelos e diversidade gênica por loco em cada grupo de indivíduos do gênero *Theobroma*.

Locus	Amplitude Alélica (bp)	<i>T. cacao</i> (17)		<i>T. grandiflorum</i> (2)		T. ssp (5)		Total (24)	
		Na	PIC	Na	PIC	Na	PIC	Na	PIC
msestR16-4	200-213	7	0.67	1	0	1	0	7	0.55
msestR20-4	204-210	1	0	1	0	2	0.23	2	0.05
ESTSSR39	250-260	3	0.59	0	0	3	0.55	5	0.7
ESTSSR47	220-238	4	0.53	0	0	4	0.6	5	0.58
ESTSSR60	163-175	2	0.37	0	0	3	0.59	4	0.5
msestR16-8	210-230	2	0.12	1	0	1	0	2	0.33
msestR13-1	100-190	1	0	1	0	2	0.3	2	0.11
ESTSSR24	320-322	2	0.37	1	0	1	0	2	0.37
ESTSSR13	200-204	3	0.49	2	0,3	2	0.37	3	0.52
msestR134	157-166	3	0.45	1	0	4	0.67	4	0.75
msestR13-5	208-210	1	0	1	0	1	0	2	0.22
ESTSSR31	194-200	2	0.06	1	0	2	0.16	3	0.08
msestR20-5	245-249	3	0.41	1	0	2	0.26	3	0.5
ESTSSR1	158-166	4	0.53	1	0	1	0	5	0.61
msestR13-3	155-165	5	0.561	0	0	0	0	5	0.56
ESTSSR2	210	1	0	1	0	1	0	1	0
ESTSSR6	194	1	0	0	0	1	0	1	0
ESTSSR9	260	1	0	1	0	1	0	1	0
msestR16-2	210-212	1	0	1	0	2	0.26	2	0.26
ESTSSR49	210	1	0	1	0	1	0	1	0
Average		24	0.25755	0.8	0.015	1,75	0,1995	3	0,3345

Na = total number of alleles

PIC = Polymorphic information content.

Foi avaliada também a diversidade gênica entre os grupos ocultando a contribuição de cada loci. O grupo do *T. cacao* teve uma média de número de alelos por loco de 2,4; o grupo do *T. grandiflorum* obteve uma média de alelos por locos de 1,1 enquanto que o grupo das espécies silvestres de *Theobroma* obteve obtiveram uma média de alelos por loco de 1,8 (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativas da diversidade genética para os indivíduos do gênero *Theobroma* avaliado por grupo.

Grupos	Na	Ho	P (0,95)
<i>T. cacao</i>	2,4	0,12	0,55
<i>T. grandiflorum</i>	1,1	0,00	0,06
<i>T. ssp</i>	1,8	0,06	0,52
Average	1,8	0,06	

Na = número de alelos

Ho = heterozigidade observada

4. Discussão

4.1 Tamanho do genoma das espécies de *Theobroma*

Os resultados encontrados no presente trabalho para o tamanho do genoma na espécie *T. cacao*, apesar da pequena divergência, estatisticamente entram em consonância com os achados de Figueira, 1993 e Argout et al., 2011 que foram de aproximadamente 0,43 pg. Dolezel et al. (1998) demonstraram que as diferenças na medição do conteúdo de DNA observados entre os laboratórios não pode ser interpretado como variação interespecífica, pois os instrumentos de medição podem apresentar pequenas diferenças no alinhamento ao longo do tempo. É recomendado que as medições sejam repetidas em diferentes dias e que a preparação da amostra seja um procedimento padronizado. As pequenas variações ainda podem ser geradas devido aos compostos fenólicos presentes nos diferentes genótipos de cacau utilizados nas medições (NOIROT et al., 2003; EFRAIM, 2006).

Quanto às variações encontradas para as demais espécies do gênero, estas também não diferem estatisticamente (tabela 4). As variações observadas são expressas em um coeficiente de variação ($CV = \text{desvio padrão} / \text{média}$) que geralmente varia, em células vegetais, entre 1 e 10 % (DOLEŽEL, 1991). O coeficiente de variação é extremamente importante na validação de dados de citometria, Marie e Brown (1993) definem uma gama de valores entre 1 e 2 % para análises de alta qualidade e 3 % como um valor de rotina. Todavia, para algumas espécies vegetais lenhosas com muitos compostos fenólicos e polissacarídeos, a exemplo do *T.*

grandiflorum e *T. cacao*, a obtenção destes valores recomendados é um resultado de difícil obtenção. Praça-Fontes et al. (2011), considera que uma preparação adequada das suspensões nucleares é imprescindível para fornecer núcleos estequiometricamente corados e, conseqüentemente, baixos valores de CV, como obtido no presente trabalho.

A variação de tamanho do genoma entre angiospermas é ampla, variando de $1C = 0,06$ pg em *Genlisea margaretae* a $1C = 152,23$ pg em *Japonica paris*, com uma extensa variação ocorrendo mesmo dentro dos grupos (GREILHUBER et al., 2006; PELLICER et al., 2010). A variação intra-específica de tamanho do genoma, também tem sido observada em muitas plantas. As espécies vegetais nativas das florestas tropicais tendem a ter o genoma reduzido. Esta hipótese foi sugerida por Grime & Mowforth 1982, na qual afirmam que o tamanho do genoma pode ser influenciado por um efeito diferencial da temperatura na divisão e expansão celular. O crescimento e o desenvolvimento da divisão celular, são favorecidos por temperaturas mais elevadas, como observado para cacau e demais espécies do gênero (MACHADO; HARDWICK 1988). Este processo pode selecionar um ciclo mitótico mais curto e, por consequência células menores e genomas menores do que os de plantas de regiões temperadas (FIGUEIRA, 1992).

Outra evidência para o tamanho similar do genoma das espécies de *Theobroma* é proveniente de dados citogenéticos, o *T. cacao* apresenta número cromossômico $2n=20$, assim como as demais espécies do gênero, e seus cromossomos medem de 1,25 a 2.85 μm (MUNOZ, 1948; MARTISON, 1975).

As informações do tamanho e número de pares de bases do genoma de cupuaçu e demais espécies silvestres do gênero *Theobroma* é um novo dado disponível na literatura. Esta informação poderá contribuir para o desenvolvimento de diversos estudos, como por exemplo, detecção de híbridos, controle da estabilidade e nível de ploidia, análise de possíveis correlações entre tamanho do genoma e características fisiológicas e agrônômicas e principalmente para estudos de investigação em biologia molecular e genética.

4.2 Caracterização e transferabilidade de marcadores EST-SSR

A taxa de polimorfismo em SSR genômicos de forma geral são maiores quando comparadas com os SSR obtidos de EST (CHO et al 2000; LEE et al . 2004). No entanto, os EST-SSR exibem algumas vantagens, dentre elas a maior frequência no genoma e por estarem ligados a características de interesse (MORGANTE et al. 2002). Dos 20 EST-SSR testados, 60% geraram locos polimórficos, estes achados foram superiores aos valores encontrados por Lemos 2010, onde foram testados 32 EST-SSR também relacionados à resistência ao *M. perniciosa*, onde 26,7% foram polimórficos, no entanto o grupo de indivíduos utilizado no presente trabalho era mais heterogêneo. A partir da alta taxa de locos polimórficos, pode-se observar que ocorreu uma separação entre genótipos resistentes e suscetíveis, e até mesmo a separação entre genótipos resistentes através das marcas geradas na genotipagem (Figura 1). A diferença entre marcas dentro dos genótipos resistentes provavelmente pode estar relacionada à presença de vários genes para a característica em questão, corroborando com os estudos realizados por Lemos et al (2010), Marita et al (2001) e Pires et al (2003).

O número de alelos por loci encontrado no presente trabalho foi inferior quando comparados com trabalhos utilizando a mesma cultura (SANTOS et al 2012; MOTAMAYOR et al 2002, SERENO et al 2006; LEMOS et al 2010). Este fato pode ser explicado pelo tamanho amostral e pelo tipo de marcadores, uma vez que os mesmos amplificam regiões conservadas do genoma. No entanto, esta ressalva, não inviabiliza o uso destas marcas, inclusive para identificação de genótipos resistentes à doença vassoura-de-bruxa. Em relação à diversidade genética encontrada nos indivíduos amostrados pode-se verificar que no grupo 1 (*T. cacao*) o conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi alto revelando a cobertura potencial dos marcadores testados. Vale ressaltar que não foi objetivo desse estudo caracterizar estrutura genética de populações dentro do gênero *Theobroma* e sim selecionar marcadores eficientes ligados à resistência a vassoura-de-bruxa e a transferabilidade dos mesmos para cupuaçu e outras espécies de *Theobromas* silvestres.

Uma das vantagens dos marcadores EST-SSR, é o fato de serem facilmente transferidos entre as espécies do mesmo gênero, pois as sequências são altamente conservadas (GUPTA; RUSTGI, 2004). A transferência de primers entre espécies

filogeneticamente relacionadas possibilitam a sobreposição de informações genéticas e consequentemente a diminuição de custos com a confecção de marcadores para estudos moleculares de espécies silvestres (CHISTIYAKOV *et al.*, 2006). Mantello *et al.*, 2012 testou um conjunto de 153 pares de primers SSR específicos de *Hevea brasiliensis* e encontraram taxas acima de 80% de transferibilidade entre congêneres. No presente trabalho a porcentagem de transferibilidade variou entre 35% e 90%. Baseando-se então na premissa de que os EST-SSR são altamente conservados em congêneres, a porcentagem de pares de primers funcionais para as demais espécies do gênero decresceu com o aumento da distância filogenética, *T. microcarpum* da sessão Telmatocarpus e *T. speciosum* sessão Oreanthes, foram espécies que apresentaram menor taxa de transferibilidade de primers (35%). Tang e colaboradores (2006) em seu trabalho com a cultura do trigo, afirma que é um resultado esperado devido a inserção de íntrons, apesar das taxas de amplificação serem normalmente superiores a 50% (VARSHNEY *et al.*, 2005).

As espécies *T. grandiflorum* e *T. obovatum* são parte da sessão Glossopetalum, considerada a parte mais ancestral do gênero (CUATRECASAS, 1964), enquanto o *T. cacao* (sessão Theobroma) exibe os caracteres mais derivados, sugerindo uma relação evolutiva distante entre as espécies. No entanto, foi relatada na literatura a existência de híbridos entre *T. cacao* x *T. grandiflorum* e *T. grandiflorum* x *T. obovatum*, o que indica uma relação mais estreita entre as espécies (VENTURIERI, 2004; SILVA; FIGUEIRA, 2005).

Os primeiros conjuntos de marcadores reportados na literatura para as espécies silvestres de *Theobroma* são do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), no qual objetivaram elucidar as relações filogenéticas entre as espécies. Foram utilizados 21 primers provenientes da cultura do cacau em espécies de *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor*, *T. sylvestre*, *T. obovatum*, *T. microcarpum*, *T. speciosum*, os padrões de RAPD apresentaram polimorfismo intra e interespecífico, e algumas bandas de tamanho semelhante entre espécies classificadas na mesma seção ou correspondentes (SILVA *et al.*, 1998).

Alves *et al.*, 2006, encontraram uma taxa de transferência de SSR de *T. cacao* para *T. grandiflorum* de 60.4%, evidenciando a similaridade e apontando a possibilidade do uso desses marcadores no auxílio ao melhoramento genético e construção de mapas. Neste trabalho a taxa de transferibilidade de locus EST-SSR

foram mais elevados que os achados de Alves et al, 2006, dado que as taxas de transferibilidade ficaram em torno de 75%, mas é o esperado dado a conservação das sequências de EST-SSR. Quanto ao *T. obovatum*, com 90% dos *primers* transferidos, não há estudos que relatem conjuntos de marcadores SSR ou EST-SSR para a espécie. Para a cultura do *T. grandiflorum* estão sendo identificados e caracterizados marcadores do tipo EST-SSR, ligados a qualidade do fruto e resistência a vassoura-de-bruxa (Comunicação pessoal).

A estabilidade do tamanho do genoma e a alta taxa de transferência de EST-SSR dentro do gênero *Theobroma* sugerem que as espécies mantiveram-se conservadas ao longo da evolução no que diz respeito a suas sequências gênicas, este fato também pode ser justificado pelas quantidades de DNA não codificadora repetitiva, que é composto por elementos transponíveis, DNA satélite, os íntrons e os pseudogenes, como observado no genoma do cacau (GALBRAITH, 2002, FLAVELL, 1988; BENNETT & LEITCH 2005).

Este trabalho é o primeiro relato de conjuntos de marcadores do tipo EST-SSR para as espécies silvestres do gênero *Theobroma*, sendo assim, representando um novo conjunto de primers altamente informativos e que indicam um alto potencial de utilização desses marcadores em estudos sobre o sistema de cruzamento, paternidade das progênes e fluxo gênico das espécies de valor econômico para a região Amazônica. Além de subsidiar estudos que selecionem as melhores estratégias para a conservação da biodiversidade (AVISE et al, 2010).

5. Conclusão

Constatou-se que o genoma destas espécies de *Theobroma* são relativamente pequenos se comparado com a maioria das Angiospermas e relativamente conservados ao longo de sua evolução.

O novo conjunto de EST-SSRs caracterizados neste estudo será um ferramenta útil em estudos envolvendo os programas de melhoramento genético, auxiliando na construção de mapas genéticos e identificação de QTL's. Dada a alta porcentagem atingida com a amplificação cruzada entre as espécies do gênero, estes marcadores

podem ser importantes para monitorar a variabilidade genética e também em programas de melhoramento.

Referências bibliográficas

AGGARWAL, R.K.; HENDRE, P.S.; VARSHNEY, R.K.; KRISHNAKUMAR, V.; SINGH, L. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p. 359-372, 2007.

ARAÚJO, I. S. Mapeamento genético e identificação de QTLs associados ao teor de manteiga na amêndoa do cacauero (*Theobroma cacao* L.). 2002. 52 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2002.

ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J.; GUILTINAN, M.; DROC, G.; GOUZY, J.; ALLEGRE, M.; CHAPARRO, C.; LEGAVRE, T.; MAXIMOVA, S. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics**, v. 43, p. 101-108, 2011.

AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**, v. 11, p.665–669. 2010.

AYALA-NAVARRETE, L.; BARIANA, H.S.; SINGH, R.P.; GIBSON, J.M.; MECHANICOS, A.A.; LARKIN, P.J. Trigenomic chromosomes by recombination of *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum* translocations in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v.116, p.63-75, 2007.

BELKHIR, K. Genetix: Logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UPR 9060, 1999.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Genome size evolution in plants. In: Gregory TR, editor. **The evolution of the genome**. San Diego: Elsevier; p. 89-162, 2005..

CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F.A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, p. 1–29, 2006.

CÔRREA, R. X. Marcadores microssatélites relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa do cacauero. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1137-1142, 2007.

CROUZILLAT, D.; RIGOREAU, M.; CABIGLIERA, M.; ALAREZ, M.; BUCHELI, P.; PÉTIARD, V. QTL studies carried out for agronomic, technological and quality

traits of cocoa in Ecuador. In: Proceedings International workshop on new technologies and cocoa breeding. **Proceedings**, p. 120-126, 2001.

CUATRECASAS, J. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contr. U. S. Natl. Herb**, v. 35(6), p. 379-607, 1964.

DIAS, L.A.S. Melhoramento Genético do Cacaueiro. Viçosa: **Editora Folha de Viçosa**, p. 578, 2001.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99-110, 2005.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trouts and human. **Cytometry**, v. 51A, p. 127-128, 2003.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M. A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R.; Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. **Annals Botany**, v. 82, p. 17-26, 1998.

DOLEZEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiology Plantarum**, v. 85, p. 625-631, 1992.

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GARCIA, N. H.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Teores de compostos fenólicos de semestes de cacaueiro de diferentes genótipos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, p. 229-236, 2006.

EUJAYL, I.; SORRELLS, M.E.; BAUM, M.; WOLTERS, P.; POWELL, W. Solation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. **Theor Appl Genet**, v. 104, p. 399-407, 2002.

EVANS, H.C.; HOLMES, K.A.; PHILLIPS, W.; WILKINSON, M.J; What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? **Mycologist**, v. 16, p. 1-4, 2002.

FALCÃO, M. A. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade de algumas fruteiras cultivadas na Amazônia. Manaus: **Imprensa Universitária**, p., 97, 1993

FERNANDEZ, D.; PETITOT, A.S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.119-147, 2006.

FIGUEIRA, A.V.O.; JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, p. 673-677, 1992.

FLAVELL, R. B.; ODELL, M.; THOMPSON, W. F. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleous organizer expression in wheat. **Journal Molecular Biology**, v. 204, p. 523-534, 1998.

GALBRAITH, D.; LAMBERT, G.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. **Current Protocols in cytometry**, New York, 2002.

GESTEIRA, A. S.; MICHELI, F.; CARELS, N.; DA SILVA, A. C.; GRAMACHO, K.P.; SCHUSTER, I.; MACÊDO, J.N.; PEREIRA, G.A.; CASCARDO, J.C. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of botany**, v. 100, p. 129-140, 2007.

GRAMACHO, K. P. ; MOREIRA, R. F. C. ; LEMOS, L. S. L. ; LIMA, L. S. ; CLEMENT, D. . Obtenção de marcadores microssatélites para genotipagem e análise Genética de *Moniliophthora perniciosa* em gel corado com prata.. Ilhéus: CEPLAC- Boletim Técnico, n. 196, 2009

GREGORY, T. R. The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership, **Annals of Botany**, v. 95, p. 133-146, 2005.

GREILHUBER, J.; DOLEZEL J.; LYSAK, M.; BENNETT, M. D. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘genome size’ and ‘C-value’ to describe nuclear DNA contents. **Annals of Botany**, v. 95, p. 255-260, 2005.

GRIME, J. P.; MOWFORTH, M. A. Variation in genome size an ecological interpretation. **Nature**, v. 299: p. 151-153, 1982.

GUPTA S, PRASAD M. Development and characterization of genic SSR markers in *Medicago truncatula* and their transferability in leguminous and non-leguminous species. **Genome**, v. 52, p.761-771, 2009.

GUPTA, P.K.; RUSTGI, S. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. **Functional and Integrative Genomics**, v. 4, p.139–162, 2004.

HACKAUF, B; WEHLING, P. Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. **Plant Breeding**, v. 121, p. 17-25, 2002.

HAGRAS, A.A.; KISHII, M.; SATO, K.; TANAKA, H.; TSUJIMOTO, H. Extended application of barley EST markers for the analysis of alien chromosomes added to wheat genetic background. **Breeding Science**, v.55, p.335-341, 2005

HO, Y.G.; ISHII, T.; TEMNYKH, S.; CHEN, X.; LIPOVICH, L.; MCCOUCH, S.R.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHO, S. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 713-722, 2000.

KAWARA, S.; TAKATA, M.; TAKEARA, K. High frequency of DNA aneuploidy detected by DNA flow cytometry in Brown's disease. **J. Dermatological Science**, v. 21, p. 23-26, 1999.

- LAGODA, P. J. L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, p. 2141–2152, 1999.
- LEE, J.M.; NAHM, S.H.; KIM, Y.M. and KIM, B.D. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, v. 4, p. 619-627, 2004.
- LIMA, L. S.; GRAMACHO, K. P.; PIRES, J. L. ; CLEMENT, D. ; LOPES, U. V. ; CARELS, N. ; SILVA, G. A. ; GAIOTTO, F. A. ;MATTOS, C. J. C. ; MICHELI, F. Development, characterization, validation, and mapping of SSRs derived from *Theobroma cacao* L. *Moniliophthora perniciosa* interaction ESTs. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, p. 663-676, 2010.
- LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Flow cytometric of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry, **Annals Botany**, v. 98, p. 679-689, 2006.
- LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEZEL, J.; SANTOS, C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. **Annals of Botany**, v. 100, p. 875-888, 2007.
- LOUREIRO, J.; TRAVNÍČEK, P.; RAUCHOVÁ, J.; URFUS, T.; VÍT, P.; ŠTECH, M.; CASTRO, S.; SUDA, J. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. **Preslia**, v. 82, p. 3-21, 2010.
- LU, H.J.; FELLERS, J.P.; FRIESEN, T.L.; MEINHARDT, S.W.; FARIS, J.D. Genomic analysis and marker development for the Tsn1 locus in wheat using bin-mapped ESTs and Xanking BAC contigs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.1132-1142, 2006.
- LURO, F.L.; COSTANTINO, G.; TEROL, J.; ARGOUT, X.; ALLARIO, T.; WINCKER, P.; TALON, M. OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Transferability of the EST–SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. **BMC Genomics**, v. 9, p. 287, 2008.
- MACHADO, R. C. R.; HARDWICK, K. Does carbohydrate availability control flush growth in cocoa? In: Proc. 10th International Cocoa Research Conference, p. 151-157, Proceedings, Santo Domingo: Dominican Republic, 1998.
- MANTELLO, C. C.; SUZUKI, F. I.; SOUZA, L. M.; GONÇALVES, P. S.; SOUZA, A. P. Microsatellite marker development for the rubber tree (*Hevea brasiliensis*): characterization and cross-amplification in wild Hevea species. **BMC Research Notes**, v.5, p. 329, 2012.
- MARTINSON, V. A. Cytological studies of diploid and tetraploid *Theobroma cacao*. **Genetics**, v. 45, p. 341-348, 1975.

- MICHELI, F.; GUILTINAN, M. J.; GRAMACHO, K. P.; WILKINSON, M. J.; VARGAS, O. F. A.; CASCARDO, J. C. M.; MAXIMOVA, S. N.; LANAUD, C. Functional genomics of cacao. **Advances in Botanical Research**, v. 55, p. 119-177, 2010.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, n. 2, p. 194-200, 2002.
- MUÑOZ, J.M.O. Estudios cromosomicos en el genero *Theobroma*. **IICA**, Turrialba. 1948
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **Am. Nature**, v. 106, p.283-292, 1972.
- NOIROT, M.; BARRE, P.; DUPERRAY, C.; LOUARN, J.; HAMON, S. Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: Consequences on genome size evaluation in coffee tree. **Annals of Botany**, v. 92, p. 259-264, 2003.
- OCHATT, S. J. Flow cytometry in plant breeding. **Cytometry**, v. 73, p. 581-598, 2008.
- PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHO, S. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, vol. 100, p. 713-722, 2000.
- PEREIRA, J. L. M.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica**, v.1, p.79-81. 1989.
- PONCET, V.; RONDEAU, M.; TRANCHANT, C.; CAYREL, A.; HAMON, S.; DE KOCHKO, A.; HAMON, P. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. **Molecular and Genetics Genomics**, v.276, p.436-449, 2006.
- PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; CRUZ, C. D. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 1183-1191, 2011.
- RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; N’GORAN, J.A.K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M.H.; LANAUD, C. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 6, p. 948-955, 2000.
- ROWLAND, L.J.; DHANARAJ, A.L.; POLASHOCK, J.J.; ARORA, R. Utility of Blueberry derived EST-PCR. **HortScience**, v.38, p.1428-1432, 2003a.
- SANTOS, R.M.F.; LOPES, U.V.; BAHIA, R.C.; MACHADO, R.C.R.; AHNERT, D.; D.; CÔRREA, R. X. Marcadores microssatélites relacionados com a resistência à

vassoura-de-bruxa do cacauero. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1137-1142, 2007.

SARGENT, D.J.; RYS, A.; NIER, S.; SIMPSON, D.W.; TOBUTT, K.R. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. **Theoretical and Applied Genetics**, v.114, p.373-384, 2007.

SILVA, C. R. S.; FIGUEIRA, A. V. O. Phylogenetic analysis of *Theobroma* (Sterculiaceae) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 250, p. 93-104, 2005.

SILVA, M.C.; VÁRZEA, V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; AZINHEIRA, H.G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A.S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.119-147, 2006

SWIFT, H. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. **Proc. Natl. Acad. USA**, v. 36, p. 643-654, 1950.

TANG, J.; GAO, L.; CAO, Y.; JIA, J. Homologous analysis of SSR-ESTs and transferability of wheat SSR-EST markers across barley, rice and maize. **Euphytica**, v.151, p.87-93, 2006.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnol**, v. 23, p. 48–55, 2005.
vassoura-de-bruxa do cacauero. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p.

VENTURIERI, G. A. Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Pará, 1993. 108 p.

VENTURIERI, G.; VENTURIERI, C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta amazônica**, v. 34(4), p. 507 – 511, 2004.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunological Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.

WARREN, A.; CRAMPTON, J. M. The *Aes aegypti* genome: complexity and organization. **Genetical Research**, v. 58, p. 225-232, 1991.

WINCKER, P.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R.. Transferability of the EST–SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. **BMC Genomics**, v. 9, p. 287, 2008.

WISE, R. P.; MOSCOU, M.J.; BOGDANOVA, A. J.; WHITHAM, S. A. Transcript Profiling in Host–Pathogen Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 329-369, 2007.

4. CAPITULO 2

Estudo da expressão gênica diferencial do EST/gene *TgORFX1-3'* do cupuaçuzeiro em resposta a infecção por *Moniliophthora perniciosa*

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo a análise da expressão diferencial através de RT-qPCR do EST/gene *TgORFX1-3'* proveniente da interação Cupuaçu x *M. perniciosa*. Foram utilizados meristemas inoculados com *M. perniciosa* de genótipos de *T. grandiflorum* resistente (C174) e suscetível (C1074), coletados nos tempos: 8, 24, 48 e 72 HAI. Para *T. grandiflorum* não existiam genes normalizadores para estudo de expressão gênica reportados na literatura, o gene EF-1 α , utilizado na cultura do cacau, foi escolhido por apresentar expressão homogênea nos diferentes tratamentos. O Blast da sequência de *TgORFX-1 3'* apresentou um alinhamento de 100%, com expectativa de 0.0 com clone cDNA *TcORFX-1 3'* semelhante ao *ORFX/fw2.2-like*. Os resultados finais da análise por RT-qPCR mostraram que houve uma expressão diferencial entre os tratamentos inoculados do genótipo C174, com superexpressão do gene em 48hai. É provável que o referido gene esteja envolvido no mecanismo de controle negativo do crescimento e divisão celular, impedindo a disseminação do fungo *M. perniciosa* nos tecidos da planta. O genótipo C1074, não apresentou níveis significativos de expressão nos tratamentos aplicados.

Palavras-chave: *TcORFX-1-3'*, *Theobroma grandiflorum*, expressão diferencial, RT-qPCR.

1. Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum, é uma espécie arbórea da família Malvaceae (ex Sterculiaceae) pertencente ao gênero *Theobroma*. Ocorre principalmente nos estados do Pará, Amazonas, pré-Amazônia maranhense, regiões amazônicas de países vizinhos e no Sul da Bahia, onde foi introduzido no ano de 1930 (DUCKE, 1953; SCHWAN, 2000; LOPES; 1999). Esta fruteira destaca-se não só pelo sabor e aroma agradáveis, mas também por seu excelente aproveitamento industrial que vai desde o uso da polpa para produção de doces, sucos e outros derivados; na indústria de cosméticos; até o beneficiamento da semente que possui propriedades químicas semelhantes ao cacau, possibilitando assim a confecção do cupulate, um chocolate fino de ótima aceitação no mercado (NAZARÉ et al. 1990; COHENJACKIX, 2005; SETEC, 2007; FRANCO, et al., 2005; VENTURIERI et al. 1985).

Uma das principais limitações na produção do Cupuaçuzeiro, é a doença vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), que também ataca as lavouras cacaeiras (DIAS; REZENDE, 2001). Com a expansão das áreas de plantio do cupuaçuzeiro, esta doença tornou-se mais significativa, causando perdas anuais e conseqüentemente danos à economia regional (SOUZA, 2007).

Existem diversos estudos sobre a interação *T. cacao* L. x *M. perniciosa* (LEMOS, 2010; LIMA, 2007; CARVALHO, 2007; SILVA, 2010), inseridos em diversos programas, dentre eles os que visam a identificação de genes de resistência e proteínas envolvidas nos mecanismos de patogenicidade do fungo e/ou na resistência da planta (MICHELI et al., 2010). Esses programas têm por objetivo a identificação de novas fontes de resistência na interação planta-patógeno, de modo a acumular genes diferencialmente expressos e aumentar a base genética já existente. No caso do Cupuaçuzeiro, os estudos sobre a doença vassoura-de-bruxa e sua interação com o hospedeiro são incipientes, por se tratar de uma nova alternativa de cultivo, antes explorada de forma extrativista (ALVES, 2010; ALBUQUERQUE, 2006; SETEC, 2007). O programa de Melhoramento Genético do Cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental já desenvolveu variedades resistentes ao ataque do fungo, mas como se trata de uma espécie perene, ao longo do tempo a resistência pode ser suplantada. Para tanto, há

a necessidade de um material com ampla base genética e com diversas fontes de resistência.

Torna-se premente a identificação e caracterização de genes de resistência distintos na interação Cupuaçu x *M. pernicioso*, que possam ser identificados através de estudos genéticos (ALVES, 2012). O gene/EST candidato *TgORFX1-3'* em cupuaçu, baseou-se na busca por sequências que apresentaram similaridade com genes de *T. cacao* contendo o termo “*Pathogenesis related*” na anotação em diferentes bancos de dados.

O objetivo deste trabalho foi quantificar a expressão diferencial do gene *TgORFX1-3'*, através da técnica de RT-qPCR em meristemas infectados e não infectados de genótipos contrastantes para a resistência a vassoura-de-bruxa do cupuaçu.

2. Material e métodos

2.1 Material Vegetal e inoculação

Foram selecionados para os estudos de expressão gênica em Cupuaçu, os genótipos C174 (resistente à vassoura-de-bruxa) e C1074 (suscetível a vassoura-de-bruxa).

Os meristemas apicais dos genótipos supracitados foram inoculados pelo método de gota (SURUJDEO-MAHARAJ, 2003), usando uma suspensão de basidiósporos de *M. pernicioso*, na concentração 1×10^5 , o procedimento foi realizado na CEPLAC – ERJOH. Após a inoculação, os materiais foram envoltos em sacos plásticos em ambiente saturado de água, de forma a permitir a germinação dos basidiósporos, penetração e conseqüente infecção do fungo (FRIAS et al., 1995). Plantas controle foram inoculadas com água e submetidas às mesmas condições de crescimento para estimar a eficiência da inoculação.

Meristemas apicais de C174 e C1074 foram coletados com 8, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com *M. pernicioso* em condições de RNase free em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C .

2.2 Análise de Sequências

O *TgORFX1-3'* foi identificado a partir do transcriptoma de *T. grandiflorum* dos genótipos C174 e C1074 (Projeto Geneaçú; EMBRAPA CENARGEN). Para determinar a similaridade a sequência foi comparada com o banco de dados de sequências públicas usando a ferramenta BLASTN 2.2.24 (National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)). E um blast foi realizado no Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/GO.tools.shtml>) para determinar a provável função do EST/gene. Alinhamentos apresentando similaridade >90% com uma expectativa de valor <3,10⁴ foram considerados significativos. O EST/gene foi localizado no genoma do cacau a partir da ferramenta Genome Browser do banco de dados do genoma do cacau CocoaGenDB (<http://cocoagendb.cirad.fr/>).

2.3 Desenho de primers

O par de *primer* específico flanqueando a região do EST/gene foi desenhado utilizando o programa Primer Express 3.0, seguindo especificações do programa (Applied Biosystems) (tabela 1).

2.4 Extração de RNA total e confecção do cDNA

O RNA total dos meristemas dos genótipos C1074 (suscetível) e C174 (resistente) inoculados com o fungo *M. perniciosa* foram extraídos por tempo de coleta (8, 24, 48 e 72 HAI) e por replica biológica. Para a amostra controle (material não inoculado) de cada genótipo o RNA total foi extraído utilizando um pool de todas as amostras biológicas e tempos de coleta. Os RNAs foram extraídos utilizando o Kit RNAqueous TM (Ambion®). A qualidade dos RNAs foi verificada em corrida eletroforética com coloração por fluorescência Gel Red (Biotium). Para o tratamento do

RNA total, foi utilizado o kit DNase Turbofree (Ambion®), utilizando 1,5 ul da DNase, 4 ul do tampão 10X e 1ul do Inibidor de RNase (Ribolock – Thermo Scientific) em um volume de 35 ul do RNA total e incubado por 25 minutos a 37°C. Após, foi adicionado 4,1ul da DNase Inactivation Reagente, presente no mesmo kit. A primeira fita de cDNA alvo foi sintetizada utilizando 30ul do RNA total tratado, 4ul do primer oligo dT (15) – T7 (5'AACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGCGCT -3') a 10pmol e 11 ul de água. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos e em seguida colocada no gelo. Após, na reação foi adicionado 16 ul do 5X First-Strand Buffer, 8 ul dNTP Mix a 10mM, 1 ul do Inibidor de RNase (Ribolock – Thermo Scientific), 2 ul Revert Aid™ M- MULV Reverse Transcriptase e 8 ul de água livre de RNase e novamente incubado a 42°C por uma hora e 70°C por 10 minutos.

O cDNA foi quantificado em Picodrop, diluído a 100ng/ul para utilização na amplificação com um gene endógeno de referência (Tubulina F: TACCAGCCACCCACTGTTGTT; R: CAGACAGCCCTCTGCACCTT), visando confirmar a integridade do cDNA. Foi adicionado 2ul de Tampão 10X KCl (Thermo Scientific), 2ul de DNTP (Thermo Scientific) a uma concentração de 2,5mM, 2 ul de Primer Forward e Reverse a 2 pmol/ul; 1,6 ul de Cloreto de Magnésio (Thermo Scientific) com concentração de 25mM, 4,9 ul de H₂O e 0,5 ul de Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific), totalizando uma reação de 20ul. O PCR foi realizado no termociclador Veriti (Applied Biosystems) utilizando para amplificação a temperatura inicial de 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30s, 59°C para anelamento dos primers por 30s e 72°C para extensão dos fragmentos por 45s. Após os ciclos, as reações permaneceram a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 2%, confeccionado com tampão TAE 1X corado com 1,5 ul de Gel Red (Biotium).

2. 5 Análise de expressão gênica relativa por RT- q PCR

A avaliação do perfil de expressão do EST/gene TgORFX1-3' por RT-qPCR foi realizada utilizando *SYBRgreen* em amplificador modelo 7500 Fast (*Applied*

Biosystems). Foi feito o teste de concentração de cDNA, para verificar a concentração de cDNA, que gere o menor ciclo Threshold (Ct) e o teste de concentração dos *primers* para verificar a melhor concentração dos *primers*, que gere o menor Ct, maior ΔRn e que esteja livre de dímeros. Antes de avaliar o perfil de expressão do gene, foi feito também um teste de eficiência do ensaio, realizando diluições seriadas, totalizando 5 concentrações do cDNA (100ng/ul, 50ng/ul, 25ng/ul, 12.5ng/ul, 6.25ng/ul) e 3 réplicas, e a avaliação feita pela indicação da inclinação (*slope*) da curva padrão. Através do teste de concentração de *primers*, ficou definido a utilização de ambos os *primers* forward e reverse na concentração de 300nM.

Para cada reação de amplificação do cDNA com o par de *primers* desenhado para o EST/gene *TcORFXI-3'* para o ensaio de expressão foi utilizado 1ul do cDNA na concentração definida no teste de concentração de cDNA, 0,3 uL de cada primer (F-R) e 5ul de qRGreen PCR SuperMix (Invitrogen) formando um volume total 10 ul de cada reação. As condições da reação foram de 50 °C por 20 seg, 95 °C por 10 min seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, 59°C por 1min.

Foram utilizados os genes endógenos Actina, Tubulina e Fator de Elongação 1- α (EF-1 α), para seleção de melhor *primer* endógeno para estudos de expressão com *T. Grandiflorum*. (Tabela 1).

Tabela 1. Genes endógenos selecionados para o ensaio de expressão gênica. (*) gene selecionado do trabalho de Pinheiro et al., 2011, (#) Gene selecionado de Projetos desenvolvidos pela CEPLAC

Gene	Sequência	TA (°C)	Produto
EF1- α *	F: AGGTCCACCAACCTTGACTG R: TTGGGCTCGTTAATCTGGTC	58	60
Tubulina#	F: TACCAGCCACCCACTGTTGTT R: CAGACAGCCCTCTGCACCTT	59	59
Actina#	R:CCTCGCATTCTCTCCATCAAA F:GCTTCTGCCATCTTCTACAACCTT	59	63

Para o calibrador foi utilizado o tratamento não inoculado com um pool dos 4 tempos testados, para os dois genótipos. Todas as amostras utilizadas no ensaio (alvo, gene endógeno, calibrador e NTC), foram feitas em triplicatas experimentais para cada réplica biológica. Após a reação os dados foram coletados e armazenados no Software 7500 versão 2.0.5. Os resultados foram normalizados usando software DataAssistTM ver.3.01 (Life technology).

2.6 Análise estatística dos dados

Foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) no SAMS-Agri, seguido do teste Skott-Knott, com significância dos dados a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2008).

3. Resultados

A seleção do EST/gene candidato *TgORFX1-3'* em cupuaçu, baseou-se na busca por sequências que apresentaram similaridade com genes de cacau em diferentes bancos de dados. Como a sequência com maior homologia encontrada foi o *TcORFX-1-3'*, convencionou-se no presente trabalho que a sequência de cupuaçu seria denominada por *TgORFX1-3'*.

O *primer* para o referido EST/gene foi desenhado seguindo alguns parâmetros exigidos para a eficácia do ensaio de expressão gênica: tamanho em torno de 20 pares de bases, com temperatura de anelamento em torno de 60°C, tamanho de produto pequeno e conteúdo de GC entre 45% a 50%. O par de *primer* utilizado é mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Características gerais do *primer* para o gene *TgORFX1-3'*.

Tipo	Espécie	Gene/Blast	Sequência	TA (°C)	Produto
ESTs	T. grandiflorum	TgORFX1-3'	F: CTCATGCTTTTACCGCTCCAA R: CGCATGGGCTTTTCTTCAG	58	59

As amostras de RNA dos tratamentos C174 (8h, 24h, 48h e 72h), C1074 (8h, 24h, 48h e 72h) e PoolNI (Pool não inoculado), apresentaram-se sem DNA contaminante e com integridade confirmada, usados assim para síntese dos cDNAs. Em média, esses cDNAs apresentaram concentração de 700 ng/μL, que depois foi diluído na concentração que apresentou a melhor eficácia no teste de eficiência de cDNA, feito através das diluições seriadas.

Verificou-se a temperatura de anelamento do par de *primer TgORFX-1 3'*, o qual foi testado inicialmente por meio de PCR convencional, a partir de DNA genômico dos

mesmos genótipos em estudo, correspondendo ao tamanho esperado de 60 pb e amplificando em várias temperaturas, sendo adotada a temperatura de 59°C, por ter sido a temperatura que teve uma melhor eficiência no teste de eficiência do ensaio de expressão gênica (Figura 1).

Os genes endógenos selecionados foram otimizados para estudos de expressão gênica com cupuaçu, sendo selecionado para a normalização dos dados do presente experimento de expressão com o gene ORFX (*TgORFX-1 3'*), o gene endógeno Fator Elongação 1- α (EF-1 α), por ter sido o que apresentou a melhor eficiência no ensaio com o gene alvo *TgORFX-1 3'*. mostrando-se homogêneo nos diferentes genótipos e tratamentos.

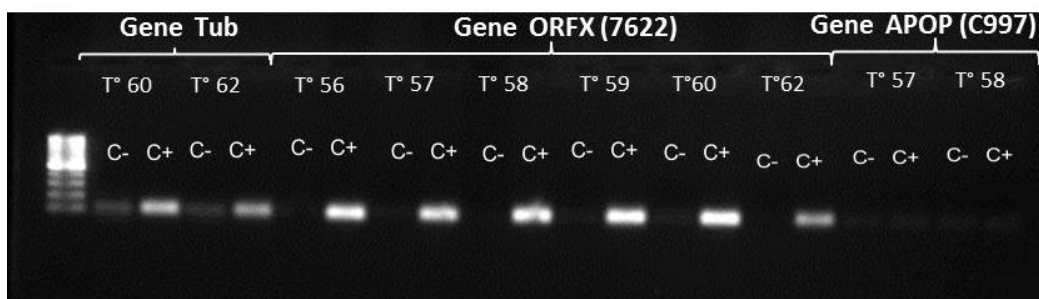


Figura 1. Teste de temperatura de anelamento EST/gene *TgORFX1-3'*. C-: corresponde a controle negativo, C+: controle positivo.

Para *T. grandiflorum* não existiam genes normalizadores para estudo de expressão gênica reportados na literatura, o gene *EF-1 α* , utilizado na cultura do cacau por Sena, 2014 foi escolhido por apresentar expressão homogênea nos diferentes tratamentos.

A eficiência dos ensaios de expressão gênica do EST/gene *TgORFX1-3'* foi determinada por meio de uma curva padrão. A curva padrão gerada para cada um dos genes é representada pelo o valor Ct correspondente versus o log da quantidade de cDNA utilizada na reação. A partir do *slope* desta curva foi possível calcular a eficiência de amplificação (*E*) do *primer*. Depois de calcular os $\Delta\Delta CT$, os níveis de expressão foram calculados ($2^{-\Delta\Delta CT}$) e os resultados são mostrados.

Ao final do experimento, foi realizada a etapa de dissociação dos *amplicons* para a geração da curva de *melting*, a qual demonstrou que o *primer* utilizado neste estudo

possui um pico único bastante definido, confirmando especificidade do produto amplificado.

Os resultados finais da análise por RT-qPCR mostraram que houve uma expressão diferencial entre os tratamentos inoculados do genótipo C174 (Figura 2). O padrão de expressão do EST/gene *TgORFX1-3'* apresenta nitidamente uma diferenciação dos valores de RQ (quantificação relativa). É possível notar um leve aumento da expressão do gene em 8hai, havendo diferenças estatísticas entre o controle. Com 24hai a expressão é suprimida em aproximadamente 2x menos em relação a 8hai. Só então em 48hai ocorre um aumento seis vezes maior que o controle, é possível concluir com o valor de Ct do tempo 48hai, o qual foi Ct=24, que apresentou fortes reações positivas indicativas de ácidos nucleicos alvos abundantes na amostra. Segundo LUU, 2010 valores de Cts compreendidos entre 38 e 40 apontam para quantidades mínimas de ácido nucleico alvo e que poderia representar uma contaminação.

No genótipo C1074, a expressão gênica em todos os tratamentos demonstrou-se homogênea, não apresentando diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

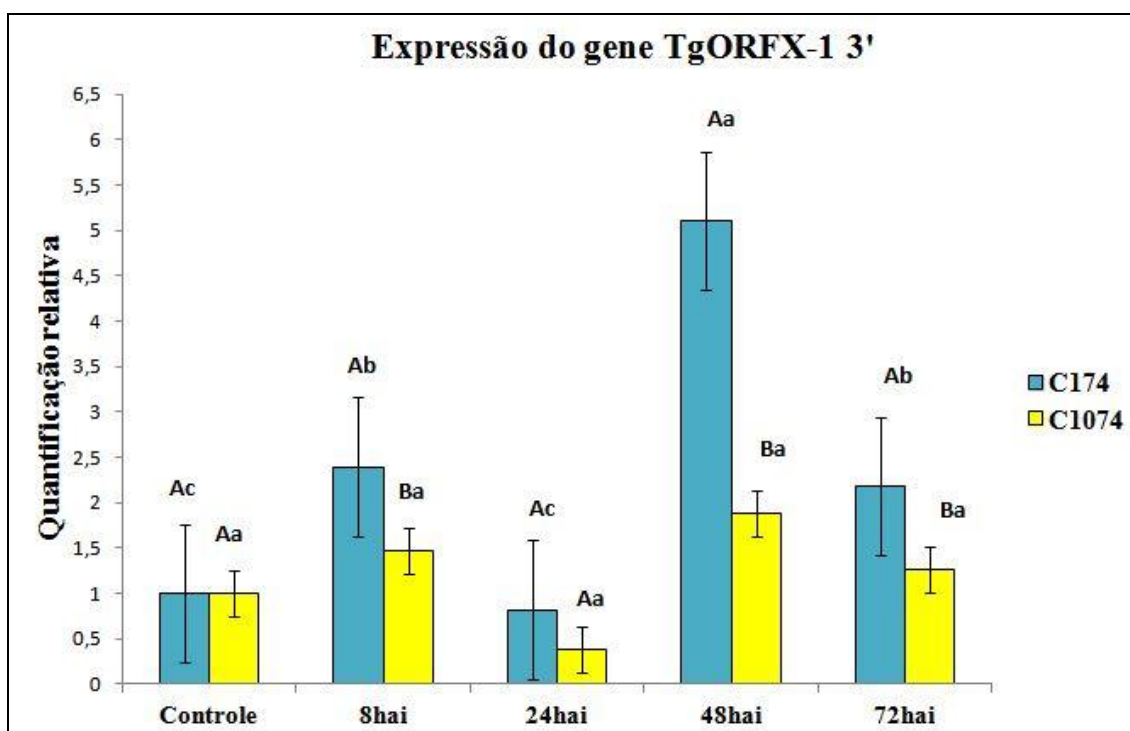


Figura 2. Análise da expressão diferencial do gene *TgORFX1-3'* em genótipo resistente (C174) e suscetíveis (C1074) de *T. grandiflorum*. A expressão relativa foi calculada pelo programa DataAssist a partir dos valores de Ct determinado por RTq-PCR, tendo como normalizador o gene Fator de enlogação *EF1 α* . Letra minúsculas indicam variação entre os genótipos. Letras maiúsculas indicam variação dentro do tempo, entre os genótipos.

A análise da sequência do *TgORFX-1 3'* no banco de dados *The Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>) a partir do software AmiGO, aponta que este gene pode estar associado com a regulação negativa do número de células, uma proteína identificada em *Zea mays*, esta associação tem uma p-value de 1.6e-45. O blast revelou que o o *TgORFX1-3'* é homólogo ao *ORFX/fw2.2 like*, sequência de mRNA de *T. cacao* com identidade de 100% e p-value de 0.0. A sequência ainda foi submetida ao *Blast* no CocoaGenDB e a sequência foi alocada no grupo de ligação dois de *T. cacao*, foi verificado se o gene estava próximo a uma região de QTL (*quantitative traci locus*), no entanto a proximidade entre marcadores para resistência no *T. cacao* e a sequência de *T. grandiflorum* não foram significantes. É possível inferir com as análises de bioinformática que o EST/gene *TgORFX-1 3'* é um gene homólogo ao EST/gene *TcORFX-1 3'* de *T. cacao*.

4. Discussão

Bustin, 2009 aponta que existem parâmetros que um ensaio de RT-qPCR deve seguir. Um ponto imprescindível que determinará a acurácia e o sucesso da técnica é a escolha de um gene endógeno (normalizador) adequado, tornando desta forma um pré-requisito para confiabilidade dos dados (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000; DHEDA et al, 2004). O gene normalizador fator de alongação *1- α* (*EF-1 α*) utilizado para expressão gênica em cupuaçu mostrou homogeneidade na expressão, este gene foi utilizado por Pinheiro et al., 2011 na cultura do cacau. A constância do mesmo pode ser explicado devido ao fato do fator de alongação *1 α* (*EF1 α*) ser responsável pela ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo, atuando, assim, na fase de alongamento da síntese proteica, sendo necessário continuamente no metabolismo celular, desta forma é esperado que o padrão de expressão não se altere nos tecidos e sob diversas condições.

O *EF1 α* e o *EF1-beta* se destacam por participarem de processos contínuos e indispensáveis dentro da célula. De acordo com alguns trabalhos, estes genes foram testados 33 vezes e constataram a estabilidade em 58% do tempo, durante intervalos das condições experimentais em situações de estresse biótico e abiótico, constatando a

eficiência como normalizador (NICOT et al , 2005; RANSBOTYNAL , 2006; . JAIN et al , 2006; . CALDANA et al , 2007; LI et al ,2009; TONG et al, 2009 ; MIGOCKA; PAPIERNIAK 2010). *EF1 α* também foi considerado adequado para a análise de expressão do transgênico *Eucommia ulmoides*, envolvido na biossíntese de isoprenóides (CHEN et al., 2010). Desta forma consideramos que ele constitui-se um endógeno ideal para ensaios de RT-qPCR em cupuaçu.

Espécies de plantas para as quais os recursos genômicos são limitados, genes homologos podem apresentar uma alternativa para inferências sobre funções e localização do gene em estudo (BOLOT et al., 2009). Portanto, a anotação de genes recém-sequenciados se baseiam principalmente na busca por homologia de sequências que já foram previamente caracterizadas em outros genomas. É amplamente aceito que em qualquer genoma, cerca de 30 a 50% dos genes apresentem homologia com transcritos conhecidos, ou a homologia é muito baixa, sugerindo que se tratam de proteínas hipotéticas ou desconhecidas.

O *Blast* da sequência de *TgORFX-1 3'* apresentou um alinhamento de 100%, com *e-value* de 0.0 com clone cDNA *TcORFX-1 3'* homologo ao *ORFX/fw2.2-like*. O *ORFX/Fw2.2-like*, foi primeiramente reportado em *Lycopersicum ssp*. Os ORFs (*Open Reading Frame*), com livre tradução para fases de leitura aberta do código genético, são identificados por um códon iniciador e um terminador, são sequências com possíveis regiões codificadoras (DIAS NETO, 2000). As Fw2.2-like foram caracterizadas por ter apresentado interação física com o regulador beta (subunidade de uma quinase CKII) perto da membrana plasmática e baseado nisto foi sugerido que Fw2.2 pode ser parte de um sistema de sinalização. Este sistema é provavelmente ativado por um sinal extracelular, coordenando assim a divisão celular (CONG; TANKSLEY, 2006).

Bailey, et al 2005, isolaram cinco clones de cDNA da cultura do cacau baseados na expressão diferencial em respostas a estresse biótico e abiótico. Dentre eles, o *TcORFX-1* (Fw2.2-like - regulador do número de células). As amostras de cacau foram tratadas com Nep1, causador de necrose e observou-se que este gene, juntamente com o *TcWRKY – 1*, responderam mais rapidamente ao tratamento Nep1. Este gene em cacau possui similaridade com a proteínas predita Fw2.2 gene (envolvidas na evolução do tamanho dos frutos). Este gene codifica um Ras-like, pequena Proteína G localizada na membrana, atuando com um regulador negativo da divisão celular e no desenvolvimento dos frutos (FRARY et al 2000; TANKSLEY, 2004; CONG E TANKSLEY 2006;

CONG et al. 2002; LIU et al . 2003). Os membros da família de genes *fw2.2* também foram identificadas em outras plantas como o abacate (*Persea americana* Mill.) (DAHAN et al. ,2010) e em nódulos radiculares de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (LIBAULT et al. De 2010).

A expressão do EST/gene *TgORFX1-3'* durante as primeiras 8 horas após inoculação com o *M. pernicioso* é duas vezes mais alterado no genótipo resistente em relação ao controle. Na interação *T. cacao* x *M. pernicioso*, a partir de 6 horas pós inoculação o fungo começa a entrar nas regiões intersticiais das células e até este momento não ocorrem respostas de defesa pois as cascatas sinalizadoras ainda não foram iniciadas (comunicação pessoal). Em cupuaçu ainda não se sabe quando ocorre a penetração do fungo, no entanto ao observar que a expressão do gene é alterada, presumimos que pode haver uma rápida resposta à infecção associada a regulação do crescimento negativo de células.

No entanto, 24hai, no genótipo C174 (resistente), a expressão do gene é levemente suprimida. Nas primeiras horas de interação, existe uma alocação de energia para processos de reconhecimento e resposta do tipo oxidativa, aumento na atividade de enzimas de compostos antimicrobianos, fitoalexinas e reforços da parede celular, por isso outros processos secundários como regulação do crescimento, podem diminuir. Isto ocorre para balancear o metabolismo total e equilibrar os gastos energéticos da planta, apresentando assim um efeito compensatório (SOMSSICH; HAHLBROCK, 1998), priorizando uma atividade em detrimento de outra que no momento não é necessário (LOGEMANN et al., 1995). Outro ponto importante diz respeito à “corrida armamentista” entre o patógeno e a planta, onde não podemos esquecer que é um sistema altamente dinâmico. Esta interação foi descrita como a “Hipótese da Rainha Vermelha”. Enquanto a planta ativa seus mecanismos de defesa, o patógeno tenta burlar tal mecanismo para conseguir sucesso na colonização do tecido do hospedeiro. Com o tempo os patógenos toram-se especializados na maioria dos genótipos dos hospedeiros, o que reduz o valor adaptativo. No entanto existem os genótipos mais raros dentro da população vão apresentar vantagem adaptativa em relação ao patógeno. Esta hipótese explica também uma série de caracteres incluindo sistemas de reprodução, virulência do patógeno, resistência do hospedeiro, e manutenção da diversidade genética da população. Este modelo de interação aponta a importância e necessidade das populações hospedeiras desenvolverem continuamente mecanismos que evitem que sua supressão

pelos patógenos (CLAY & KLOVER, 1996). Mac key (1986) se refere a Hipótese da Rainha Vermelha como “golpes” e “contra-golpes” evolutivos. É provável que o padrão de expressão do *TgORFX1-3'* seja explicado pelos fatores supracitado.

Em 48hai, o gene apresentou um padrão de expressão cinco vezes maior quando comparado ao controle. No patossistema cacao x *M perniciosa* os mecanismos de resistência observados parecem ocorrer nas primeiras 48hai após a inoculação e se caracteriza pela contenção do crescimento micelial no material resistente, com a redução da colonização e a conseqüente atenuação dos sintomas da doença (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007; SILVMATSUOKA, 1999). Tem sido observado que a expressão de genes de resistência levam a redução do crescimento da planta e fitness como conseqüência da competição metabólica direcionada a síntese de elementos de defesa (HEIL; BALDWIN 2002, LIN et al 2008. E como o gene *TcORFX1-3'* esta associado ao controle negativo da divisão celular, a sua superexpressão é provavelmente justificada desta forma.

Por fim, é provável que o EST/gene *TgORFX1-3'* possa contribuir com a inibição da divisão celular em períodos adversos da planta. Durante uma interação homóloga, ou seja interação compatível, como ocorre no presente estudo, o patógeno é capaz de colonizar o hospedeiro, no entanto em certas condições quando algumas plantas exibem resposta de resistência elas restringem o crescimento e a reprodução o patógeno. Este mecanismo pode ser explicado pelo reconhecimento específico entre gene de resistência da planta e de avirulência do patógeno, que desencadeia uma cascata de transdução de sinal. A elicitação de respostas de defesa na planta mediada pelo EST/gene desempenha um papel fundamental em termos de inibição do crescimento, proliferação, de forma a restringir a propagação do agente patogênico nos tecidos da planta (LAMB, 1989; HAMMOND-KOSACK, 1996). Concomitantemente a este gene também são ativados outros genes com o intuito de atrasar ou evitar a entrada do fitopatógeno (GUO et al, 2010).

Durante as 72hai observa-se um decréscimo da expressão do *TgORFX1-3'*, a expressão passa a equiparar-se com 8hai. A expressão pode ter sofrido um decréscimo para alocar energias para outros mecanismos de resistência que são ativados mais tardiamente. Neste tempo é observado em cacau o acúmulo de taninos, um composto que participa na diminuição do micélio do fungo dentro dos tecidos da planta, então é provável que genes antes superexpressados, como o *TgORFX1-3'* tenham suas

expressões moderadas, como já citado anteriormente, sendo a energia alocada para outros processos envolvidos na resposta de resistência.

É importante salientar que as respostas de defesa não ocorrem somente no genótipo resistente, visto que na natureza a regra é resistência. Sendo assim, muitos genes relacionados às respostas de defesa em plantas também são ativados em genótipos suscetíveis, a diferença está no tempo de ativação, sendo mais rápida nos resistentes, a resposta tardia pode trazer prejuízos á planta. No entanto, no genótipo C1074 (suscetível) não é observado uma variação significativa da expressão do *TgORFX1-3'* ao longo dos tratamentos, corroborando com Dias et al, 2011, onde observaram que os padrões de expressão do genes *apx*, *Glp* e *Dhar* em cacau obtidos as fases iniciais da infecção por *M. pernicioso* (até 72 hai), não apresentaram variação significativa em genótipos suscetíveis inoculados. Nomura et al, 2005 apontam que a supressão de defesa em plantas suscetíveis por patógenos tem sido considerada um mecanismo chave na interação planta x patógeno, envolvendo processos complexos que ainda precisam ser elucidados.

5. Conclusão

O EST/gene *TgORFX1-3'* está provavelmente envolvido nas respostas de defesa contra o *M. pernicioso* em Cupuaçu, sendo este o primeiro gene para a cultura reportado na literatura. Outros aspectos como componentes do sistema de transdução de sinais, compostos antimicrobianos e genes envolvidos com a resposta a choque térmico, dentre outros precisam ser identificados e caracterizados, a fim de constituir um banco de dados referentes aos genes envolvidos na resistência contra fitopatógenos na cultura e também outras características de interesse agrônômico.

5. Referências Bibliográficas

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 7, p. 1012-1022, 2005.

ALBUQUERQUE, P. S. B. **Mapas de ligação e controladores de características quantitativas (QTL) associadas à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacauzeiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia brasileira.** 2006. 133p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

ALVES, R. M.; FERREIRA, F.N. BRS Carimbó - a nova cultivar de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA. Embrapa Amazônia Oriental. (Comunicado Técnico 232), 8p, 2012

BAILEY, B. A.; HANHONG, B.; STREM, M. D.; MAYOLO, G. A.; GUILTINAN, M.; VERICA, J. A.; MAXIMOVA, S. N.; BOWERS, J. H. Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya*. **Plant Physiology Biochemical**, v. 43, p. 611-622, 2005.

BOLOT, S.; ABROUK, M.; QURAIISHI, U.M.; STEIN, N.; MESSING, J.; FEUILLET, C.; SALSE, J. The ‘inner circle’ of the cereal genomes. **Curr Opin Plant Biol**, v. 12, p. 119-125, 2009.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR: a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 597-601, 2005.

CALDANA, C.; SCHEIBLE, W. R.; MUELLER-ROEBER, B.; RUZICIC, S. A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. **Plant Methods**, v. 3, p. 7, 2007.

CARVALHO, H. A. S. Análise bioquímica e molecular de proteases na interação *Theobroma cacao* *Moniliophthora pernicioso*. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

CHEN, Z. B.; WANG, M. L.; BARKLEY, N. A.; PITTMAN, R. N. A simple allele-specific PCR assay for detecting FAD2 alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, p. 542-548, 2010.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 182-190, 2005.

CONG, B.; LIU, J.; TANKSLEY, S. D. Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 9, p. 13606–13611, 2002.

CONG, B.; TANKSLEY, S. D. FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene cooption in the evolution of a novel organ. **Plant Mol Biol**, v. 62, p. 867-880, 2006.

CRUZ, E. D.; ALVES, R. M. Avaliação de clones de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum, na Amazônia Oriental. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS

GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., Londrina. 2001. **Anais**. Londrina: IAPAR/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. p. 281-283.

CRUZ, E. D.; ALVES, R. M.; BENCHIMOL, R. L. **Avaliação de clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schumm) quanto a tolerância à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 4p.

DAHAN, N. M. et al. Corporate-NGO Collaboration: Co-creating New Business Models for Developing Markets. **Long Range Planning**, v. 43, p. 326-342, 2010.

DHEDA, K. et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Biotechniques**, v. 37, p. 112-119, 2004.

DIAS NETO, E. et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. Proceedings for the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, p. 491-6, 2000.

DIAS, L. A. S.; RESENDE, M. D. V. Experimentação no Melhoramento. In: (Org.). Melhoramento genético do cacauzeiro. Viçosa: FUNAPE, p. 439-492, 2001.

DIAS, M. A. N.; PINTO, T. L. F.; CICERO, S. M.; MONDO, V. H. V.; PEDRINI, L. G. Direct effects of soybean seed vigor on weed competition. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 346-351, 2011.

DUCKE, A. **As espécies brasileiras do gênero *Theobroma* L.** Belém: Instituto Agrônomo do Norte, Boletim Técnico 28, 1953. 89 p.

Ferreira, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino estatístico. **Revista Científica Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Aroma of minor tropical fruits. **Journal of Flavor and Fragrance**, v. 20, p. 358-37, 2005

FRARY, A. et al. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit. **Science**, v. 289, p. 85-87, 2000.

FRIAS, G. A., PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. An inoculation method for evaluate resistance of cocoa to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, v. 79, p. 787-791. 1995.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1445-1454, 2004.

GUO, B.; SLEPER, D. A.; BEAVIS, W. D. Nested association mapping for identification of functional markers. **Genetics**, v. 186, p. 373-383, 2010.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, D. A.; JONES, J. D. G. Ensnaring microbes: The components of plant disease resistance. **New Phytologist**, v. 133, p. 11-24, 1996

HEIL, M.; BALDWIN, I. T. Fitness costs of induced resistance: Emerging experimental support for a slippery concept. **Trends Plant Sci**, v. 7, p. 61-67, 2002.

JAIN, N.; KOOPAR, R; SAXENA, S. Effect of accelerated ageing on seeds of radish (*Raphanus sativus* L.). **Asian J. Plant Sci.**, v. 5, p. 461-464, 2006.

KENAGA, C. B. **Principles of phytopathology**. Lafayette: Balt Publishers, 1974. 654p.

LAMB, C. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack. **Cell**, v. 56, p. 215-224, 1989

LEAL JÚNIOR, G. A. Genes diferencialmente expressos em theobroma cacau e *Crinipellis pernicioso* associados a resistência e patogenicidade no período assintomático da Doença Vassoura-de-Bruxa. Tese de Doutorado.- Piracicaba, 2006. 124p.

LEAL JUNIOR, G. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA, A. Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis pernicioso*. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 279-292, 2007.

LEMOS, L. S. Desenvolvimento de Marcadores EST-SSR e SNPs para mapeamento genético de novas fontes de resistência do cacau à vassoura-de-bruxa. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 114p, 2010.

LI, G. Z.; VISSERS, J. P. C.; SILVA, J. C.; GOLICK, D.; GORENSTEIN, M. V.; GEROMANOS, S. J. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, p. 1696-171, 2009.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIBAUT, M. et al. An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants. **Plant J**, v. 63, p. 86-99, 2010.

LIMA, E. L. Diagnóstico da Cacaucultura na SUPOR: Município de Medicilândia. Belém; CEPLAC/SUPOR, v. 7, 55 p, 1998.

LIMA, L. S. Identificação de Polimorfismo em ESTs da interação cacau-*Moniliophthora pernicioso*. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz. 2007.

LIN, C.H.; LERCH, R.N.; GARRETT, H.E; GEORGE, M.F. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by forage grasses: Transformation, uptake, and detoxification. **J. Environ. Qual**, v. 37, p.196–206, 2008.

LIU, K.; GOODMAN, M.; MUSE, S.; SMITH, J. S.; BUCLER, E.; DOEBLEY, J. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. **Genetics**, v. 165, p. 2117-2128, 2003

- LOGEMANN, E.; PARNISKE, M.; HAHLBROCK, K. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 92, p. 5905-5909, 1995.
- LOPES, J. R. M.; LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L. Situação atual do cupuaçuzeiro no Sul da Bahia. **Agrotrópica**, v. 11, p. 183-188, 1999.
- MAXIMOVA, S. N. et al. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, v. 224, p. 740-749, 2006.
- MICHELI, F. et al. Functional genomics of cacao. **Adv Bot Res**, v. 55, p. 119-177, 2010.
- MIGOCKA, M.; PAPIERNIAK, A. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. **Mol Breeding**, v. 28, p. 343-357, 2010.
- NAZARÉ, R. F. R.; BARBOSA, W. C.; VIÉGAS, R. M. F. **Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate**. Belém: Embrapa-CPATU, 1990. 38p.
- NICOT, N.; HAUSMAN, J.; HOFFMAN, L.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2907-2914, 2005.
- NOMURA, K.; MELOTTO, M.; He, S.Y. Suppression of host defense in compatible plant-Pseudomonas syringae interactions. **Curr Opin Plant Biol**, v. 8, p. 361-368, 2005.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.
- SCHMITTGEN T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **J Biochem Biophys Methods**, p. 46, p. 69-81, 2000.
- SCHWAN, R. F. et al. Cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd Ex Spreng.)]. In: ALVES, R. E., FILGUEIRAS, H.A.C., MOURA, C.F.H. (coords.). **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal: FUNEP, 2000.
- SETEC - Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica/MEC. Cartilhas temáticas: Cupuaçu. Brasília - DF, nov. 2007.
- SILVA, C. H. D. Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas. 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

SILVA, S. D. V. M.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 54-59, 1999.

SOMSSICH, I.; HAHLBROCK, K. Pathogen defense in plants - a paradigm of biological complexity. **Trends Plant Sci.**, v. 3, p. 86-90, 1998.

SOUZA, A. G. C.; BERNI, R. F.; SOUZA, M. G.; SOUSA, N. R.; SILVA, S. E. L.; TAVARES, A. M.; ANDRADE, J. S.; BRITO, M. A. M.; SOARES, M. S. C. Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro, Manaus: Embrapa Ocidental, 2007.

TANKSLEY, S. D. The genetic, developmental, and molecular basis of fruit size and shape variation in tomato. **The plant cell**, v. 16, p. S181-S189, 2004.

TONG, Z.; GAO, Z.; WANG, F.; ZHOU, J.; ZHANG, Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v.10, p. 71, 2009.

VENTURIERI, G. A.; ALVES, M. L. B.; NOGUEIRA, M. Q. O Cultivo do cupuaçuzeiro. **Informativo SBF**, Campinas, v. 4, p. 15-17, 1985.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, p. 75-85, 2005

6. CONCLUSÕES GERAIS

1. As informações do tamanho do genoma poderão ser aplicadas nas mais diversas áreas de conhecimento: estudos de fisiologia, biologia molecular, genética e filogenia. Subsidiando principalmente estudos à cerca da conservação das espécies silvestres de *Theobroma*.
2. O conjunto de marcadores EST- SSRs caracterizados neste trabalho podem ser utilizados como uma ferramenta de alto valor informativo em estudos envolvendo os programas de melhoramento genético, auxiliando na construção de mapas genéticos e identificação de QTL's na cultura do cacauero. Além da possibilidade do uso destes marcadores para as demais espécies silvestres do gênero para estudos no âmbito de melhoramento genético e conservação.
3. O EST/gene *TgORFX1-3'* encontrado na cultura do cupuaçu foi apontado como provavelmente envolvido nas respostas de defesa da planta durante a infecção por *M. pernicioso* atuando nas fases iniciais de invasão do patógeno. Sua ação é provavelmente inibir a proliferação celular no intuito de conter a invasão do patógeno nos tecidos da planta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 5 ed. San Diego: **Academic Press**, 922p., 2004.
- AIME, M.C. e PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, n. 5, p. 1012-1022, 2005.
- ALBUQUERQUE, P. S. B. **Mapas de ligação e controladores de características quantitativas (QTL) associadas à resistência a *Crinipellis perniciosus* em acessos de cacauero (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia brasileira**. 2006. 133p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.
- BAKER, R.E.D. & CROWDY, S.H. Studies in the witches' broom disease of cocoa caused by *Marasmius perniciosus* Stahel.: Introduction, symptoms and etiology. Port-of-Spain. ICTA. 1943.
- BARI R.; JONES, J.D.G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Mol Biol**, v. 69, p. 473–488, 2009.
- BASTOS, C.N. Epifitologia, hospedeiros e controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosus*) (Stahel) Singer. **Boletim Técnico. Ministério da Agricultura**. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Ilhéus, n. 168, p. 21, 1990.
- BENCHIMOL, R.L. Principais doenças do cupuaçuzeiro e recomendações de controle. Belém; EMBRAPA Amazônia Oriental. **Comunicado Técnico**, n.132, Dezembro, 2004.
- BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J.. Genome size evolution in plants. San Diego: **Elsevier**; p. 89–162. 2005
- BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas, In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; **Botany**, v.33, p.258-266, 1979.
- CARVALHO, H. A. S. **Análise bioquímica e molecular de proteases na interação *Theobroma cacao* *Moniliophthora perniciosus***. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

- CHOUMANE, W.; WINTER, P.; WEIGAND, F.; KAHL, G. Conservation of microsatellite flanking sequences in different taxa of Leguminosae. **Euphytica**, v. 138, p. 239-245, 2004.
- COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.
- CORNER, E. J. H. The Seeds of dicotyledons. Cambridge: Cambridge. University Press. v. 1, p. 552. 1976.
- CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M. E LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, v.71, p. 19-33, 2002.
- CRUZ, E.D.; ALVES, R.M. Avaliação de clones de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum, na Amazônia Oriental. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., Londrina. 2001. **Anais...** Londrina: IAPAR/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.
- CRUZ, E.D.; ALVES, R.M.; BENCHIMOL, R.L. Avaliação de clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schumm) quanto a tolerância à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer). Belém: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2000.
- CUATRECASAS, J.. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contr. U. S. Natl. Herb**, v 35(6), p 379-607, 1964
- DAVIE, J. H. Chromosome studies in the malvaceae and certain related families. II. **Genetics Nederlandsch**, v. 17, p.487- 498, 1935.
- DIAS, L. A. dos S.; RESENDE, M. D. V. Experimentação no Melhoramento. In: (Org.). Melhoramento genético do cacauzeiro. Viçosa, **MG: FUNAPE**. v.1, p. 439-492, 2001
- DIAS, L.A.S. Origem e dispersão de *Theobroma cacao* L.: um novo cenário. In: DIAS, L.A.S. (Ed.).**Melhoramento genético do cacauzeiro**. Viçosa: Funape, p.81-1272001.
- DOLEZEL J.; GREILHUBER J.; SUDA J.. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols** **9**: p. 2233-2244, 2007
- DOLEZEL, J.; BARTOS, 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Ann. Bot.**, v.95, p. 99-110.
- EMBRAPA. Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental. Belém, (**Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 16**), p.. 137 1999.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, p. 515-523, 1980.

- FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. **Planaltina: Embrapa Cerrados**, p. 102, 2007. p.
- FIGUEIRA, A.V.O.; JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, v.117, n.4, p.673-677, 1992.
- FRAIFE FILHO, G. A. Histórico da introdução do cupuaçu sem sementes no estado da Bahia. **A Tarde Rural**, v. 10, p. 8-10, 2000.
- FRAIFE, G. de A.F. Cultivo do cupuaçuzeiro para o estado da Bahia. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cupuaçuzeiro.htm>>. Acesso em: jan.2014.
- GARCES, D. C. La escoba de bruja del cacao. **Revista Facultad de Agronomía**, v.24, p.329-369, 1947.
- GONÇALVES, J.R.C. *Theobroma grandiflorum* (Spreng.) Schum. as source of inoculum of witches' broom disease of *Theobroma cacao* L. **Tropical Agriculture**, v.42, p. 261-263, 1965.
- GREGORY, T. R. The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership, **Ann. Bot**, v. 95, p. 133–146, 2005.
- GUTIERREZ, A.P.; PITCAIRN, M. J.; ELLIS, C.K.; CARRUTHERS, N.; GHEZELBASH, R. Evaluating biological control of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis* L.) in California: A supply-demand model. **Biol. Control**, v 34, p. 115-131, 2005
- HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. (Ed). Microsatellites. Evolution and Applications. New York: Oxford University press, p. 1-9, 2000.
- HOLLIDAY, P. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge. **Cambridge University Press**. 1980.
- IBGE. Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em dez. 2013.
- KAWARA S., TAKATA M., TAKEARA K. High frequency of DNA aneuploidy detected by DNA flow cytometry in Brown's disease. **J. Dermatological Science** **21**, p. 23-26, 1999.
- KENNEDY, A.J. Cacao, *Theobroma cacao* (Sterculiaceae). In: Smartt J, Simmonds NW (eds) **Evolution of crop plants**, p 472–475, 1995.

KERR, W.E.; CLEMENT, C.R. Práticas agrícolas de conseqüências genéticas que possibilitaram aos índios da Amazônia uma melhor adaptação às condições ecológicas da região. **Acta Amazônica**, v. 9, p.392-400, 1980.

LEITE, B. RONCATO, L.D.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações plantas- fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 235-280. Passo Fundo-RS. 1997.

LEMOS, L. S. **Desenvolvimento de Marcadores EST-SSR e SNPs para mapeamento genético de novas fontes de resistência do cacauero à vassoura-de-bruxa**. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 114p, 2010.

LIMA, E. L. Diagnóstico da Cacaicultura na SUPOR:Município de Medicilândia. Belém; **CEPLAC/SUPOR**, v. 7, p. 55, 1998.

LIMA, L. S. **Identificação de Polimorfismo em ESTs da interação cacau-Moniliophthora perniciosa**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz. 2007.

LOBÃO, D. E.; SETENTA, W. C.; LOBÃO, E. S. P.; CURVELO, K.; VALLE, R. R. Cacau Cabruca – sistema agrossilvicultural tropical. In: VALLE, R. R. (Ed.). Ciência, tecnologia e manejo do cacauero. Itabuna: **Gráfica e Editora Vital**, p. 290-323, 2007..

LOUREIRO J., TRAVNÍČEK P., RAUCHOVÁ J., URFUS T., VÍT P., ŠTECH M., CASTRO S., SUDA J. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. **Preslia**, v. 82, p. 3-21, 2010.

LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M.; LOPES, U.V.; GRAMACHO, K.P.; PINTO, L.R.M. Seleção de material genético de cacauero resistente à vassoura-de-bruxa na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.279- 279, 1997.

MICHELI, F.; GUILTINAN, M.; GRAMACHO, K.P.; WILKINSON, M.J.; FIGUEIRA, A.V.D.; CASCARDO, J.C.D.; MAXIMOVA, S.; LANAUD, C. Functional genomics of cacao. **Adv Bot Res**, v.55, p;119–177, 2010.

MOREIRA, M. A. Identification of major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, v. 122, p. 258-272, 2003.

MOREIRA, R. F. C. M. **Estrutura genética de populações de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR**. (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

NAZARÉ, R.F.R. de; BARBOSA, W.C.; VIÉGAS, R.M.F. Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate. **Belém: Embrapa-CPATU**, 38p, 1990.

NIELLA, G.R.; RESENDE, M.L.; CASTRO, H.A.; SILVA, L.H.C.P.; CARVALHO, J.Á. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicios*a. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p. 523-7, 1999.

OCHATT, S.J. Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry Part A*. 73^a: 581-598, 2008.

PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba/ SP, **FEALQ**, p.11-28, 2005.

PEREIRA, M.; OLIVEIRA, A.L.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Efeitos de substratos, valores de pH, concentrações de AIB no enraizamento de estacas apicais de jabuticabeira [*Myrciaria jabuticaba*(Vell) O. Berg.]. **Scientia Forestalis**, v.69, p 84-92, 2005.

PERES FILHO, A. S. A. Agronegócio Brasileiro: ciência, tecnologia e competitividade. In: ARAÚJO, C. (Ed.) Cadeia produtiva do cacau. Brasília: CNPQ, p.275, 1998..

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-debruxa. Ilhéus: **Ceplac, Cepec**, 35p, 1998.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 573-594, 1996.

QUEIROZ, V.T.; GUIMARÃES, C.T.; ANHERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R.T.; PEREIRA, M.G.; MIRANDA, V.R.M.; LOGUERCIO, L.L.; BARROS, E.G.; RANKIN-DE-MERONA, J. M.; ACKERLY, D. D. Estudos populacionais de árvores em florestas fragmentadas e as implicações para conservação in situ das mesmas na floresta tropical da Amazônia Central. **Revista IPEF**, n. 35, p. 47-59, 1987.

RIOS-RUIZ, R.A. Manejo de enfermedades em cacau y café en Tingo Maria. (Relatório de Consultoria). **OSP/PNUD**, 89p, 1989.

SCHULTES, R.E. The Amazonia as a source of new economic plants. **Economic Botany**, v.33, p.258-266, 1979.

SETEC - Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica/MEC. **Cartilhas temáticas: Cupuaçu**. Brasília - DF, nov. 2007.

SILVA, C. H. D. **Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 69p, 2010.

SILVA, J. A. C. *Sterculiaceae* Vent. Reserva Florestal Ducke. MANAUS AM. Dissertação de Mestrado, INPA-MANAUS, 1998.

SILVA, O.R.F. Agroindustrialização do algodão. In: ENCONTRO SOBRE AGROINDÚSTRIA DE PEQUENO PORTE NO NORDESTE, 1, 1997, Petrolina. Anais. Petrolina : **EMBRAPA-CIRAD**, p.122-123, 1997.

SOUZA, A. das G. C. Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro. Manaus: **Embrapa Amazônia Oriental**, 56 p, 2007.

STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* nov. spec. **Suriname**: [s.n]., 49p., 1915.

SUÁREZ, C. C.; DELGADO, A. J. C. La escoba de bruja del cacao. **FUNDAGRO – INIAP**(Boletín técnico, n. 11), 21p., 1993.

TOVAR, G. LA escoba de bruja del cacao *Crinipellis perniciososa* (Stahel) Singer: descripción de síntomas de la enfermedad. **Agronomia Colombiana**, v.8, n.1, p.227-239, 1991.

TREVISAN, S.D.P.; SILVA JUNIOR, M.F. Mudanças sócio-econômicas e ambientais associadas à vassoura-de-bruxa nos cacauais da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 273, 1995.

VASCONCELOS, M. A. M. **Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. Campinas, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 114p.,1999.

VENTURIERI, G.A.; AGUIAR, J.P.L.. Composição do chocolate de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Acta Amazonica**, v.18, p. 3-8. 1988.

VENTURIERI, G.A. Cupuaçu: A espécie, sua cultura, usos e processamentos. **Clube do Cupu, Belém**, 108p, 1993..

VENTURIERI, G.A. Biologia aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do Gênero *Theobroma*: Primeiro Relatório. Universidade Federal do Pará/CNPq/Programa de Trópico Úmido – PTU. Belém, PA. 105p., 1998.

VENTURIERI, G.A. Floral biology of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann). Reading, 1994. 206p. Thesis (Ph.D.) - University of Reading.

VERMES I.; HAANEN C.; REUTELINGSPERGER C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunological Methods** v.243: p. 167-190, 2000

VIEIRA, J.T. "Lagartão" ou "vassoura-de-bruxa". **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, v. 5, p.393-400, 1942.

WAN, Z., ZHANG, Y., LI, Z.-L., WANG, R., SALOMONSON, V. V., YVES, A., & BOSSENO, R. Preliminary estimate of calibration of the Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) thermal infrared data using Lake Titicaca. **Remote Sensing of Environment**, v. 80(3), p. 497 – 515, 2002.