

ESTUDOS GENÉTICOS DE PIPERÁCEAS DE INTERESSE ECONÔMICO PARA AMAZÔNIA

Beatriz Constantino Santos Viana¹ Edith
Cibelle de Oliveira Moreira²
Simone de Miranda Rodrigues

Agência Financiadora: FAPESPA

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Ciências biológicas, Genética Vegetal

1. INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma espécie da família Piperaceae e do gênero Piper, que contém cerca de 2000 espécies. Os estados do Pará, Espírito Santo e Bahia abastecem cerca de 98% de toda a produção brasileira (FILGUEIRAS et al., 2009). No Brasil, o maior produtor é o estado do Pará, sendo responsável por cerca de 65,9% de toda a produção (IBGE, 2017). Em anos anteriores, o Pará era responsável por cerca de 91,4% (em 1990) e, com a grande queda na produção, ficou responsável por 70,16%, em 2014 (JUNIOR et al., 2017). Um grande fator que limita a produção da espécie é a fusariose ou podridão-das-raízes, uma doença causada por um fungo endêmico do Brasil. As mudas de pimenta-do-reino, quando infestadas, se tornam secas e amareladas, tendo que ser eliminadas; a doença afeta raízes e ramos, podendo ser disseminadas pela chuva, vento e água (DUARTE, 2004; JUNIOR et al., 2017).

Na década de 80 o estado do Pará era o maior produtor e exportador mundial dessa especiaria, mas surgimento da fusariose, resultou em perdas significativas à pipericultura. A doença reduziu o ciclo produtivo da cultura de quinze anos para seis a oito anos e perda de 10% nas áreas cultivadas por ano, correspondendo a 5 milhões de dólares/ano (ALBUQUERQUE & DUARTE, 1991; SANTANA et al., 1995).

Mesmo com todos os métodos de prevenção, a doença ainda é uma problemática e causa grandes problemas econômicos (DUARTE, 2004; JUNIOR et al., 2017). Todas as medidas para combater a doença são tidas como paliativas, assim, alternativas para um controle mais efetivo da doença são de fundamental importância. Uma das soluções apontadas tem sido a criação de programas de melhoramento genético da pimenteira-do-reino com foco em cultivares mais produtivas e resistentes à doença.

Para isso, estudos que levem a entender o funcionamento da planta em um nível molecular são essenciais, uma vez que poucos dados estão disponíveis para essa espécie em bancos de dados biológicos. Neste sentido, a caracterização e validação dos genes potencialmente ligados à resistência na planta é de extrema importância uma vez que existem poucos trabalhos a níveis moleculares sobre *P. nigrum* (MATIELLO et al., 1997; LEMOS et al., 2011).

Diversos genes têm sido relatados no envolvimento de resistência em plantas, entre eles genes da família ABC transporter, que consiste num grande conjunto de proteínas que configuram importantes funções em todos os seres vivos. A família ABC transporter contém, em sua subclassificação, o gene Multidrug resistance (MDR), o qual está envolvido no transporte de diversas substâncias, como fitormônios (HWANG et al., 2016). Considerando o papel e a importância deste gene, o objetivo do presente estudo foi selecionar, validar e caracterizar um gene envolvido na resistência da pimenta-do-reino e entender o seu funcionamento. Além disso, contribuir com dados para o plano de ação "Análise da expressão gênica de sequências de Piper

¹ Beatriz Constantino Santos Viana, Curso de Ciências Biológicas (FACBIO/IESB/Unifesspa).

² Dra Edith Cibelle de Oliveira Moreira, Professora Adjunta da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FACBIO/IESB/Ciências Biológicas/ Unifesspa).

nigrum em piperáceas infectada com *F. solani* f. sp. *piperis*" aprovado pelo macroprograma "Melhoramento genético da pimenteira-do-reino auxiliado por técnicas de citogenética e biologia avançada – Fase II".

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e extração do DNA

O material vegetal utilizado foram folhas de uma muda de pimenta-do-reino, fornecida pela EMBRAPA Amazônia Oriental, com aproximadamente 3 meses de idade. A extração de DNA foi feita utilizando um kit fornecido comercialmente, "PureLink Plant Total DNA Purification".

2.2 Desenho dos iniciadores

Para os desenhos dos iniciadores, utilizou-se seqüências de nucleotídeos do gene MDR de diversas espécies vegetais disponíveis no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Além disso, utilizou-se dados do sequenciamento de nova geração obtidos por Moreira et al. (2017). As seqüências selecionadas foram colocadas em formato Fasta e alinhadas usando o programa "Multalin" (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Após o alinhamento e após observar as regiões mais conservadas, os iniciadores foram desenhados usando programa "Primer3plus" (www.bioinformatics.nl/primer3plus/).

2.3 Seleção e Amplificação do gene por PCR

A seleção do gene feita com base nos resultados observados por Moreira et al, 2017. O isolamento do gene foi feito por PCR (Reação em cadeia da polimerase), utilizando-se 2,5µL de Tampão 10x, 0,75µL de MgCl₂ (Cloreto de Magnésio), 1µL de dNTP, 1,25µL do primer MDRF, 1,25µL do primer MDRR, 0,25µL da enzima Taq polimerase, 2,5µL de amostra do DNA da espécie e 15,5µL de água com um volume final de 25µL. A reação foi promovida pelo termociclador "Amplitherm" com as condições de 94°C para a desnaturação inicial durante 3 minutos, depois, durante o ciclo, se utilizou 94°C por 45 segundos para a desnaturação, 55°C por 30 segundos para o anelamento e 72°C para a extensão final durante 1 minuto e 30 segundos, após o ciclo ocorreu a extensão final por 10 minutos a 72°C. Foram feitos 35 ciclos no total. O resultado da PCR, foi visualizado em eletroforese, utilizando uma cuba eletrolítica horizontal, tampão TBE (Tris-borato EDTA), gel de agarose em 8% e visualizado com auxílio de um fotodocumentador.

2.4 Sequenciamento e Análises de bioinformática

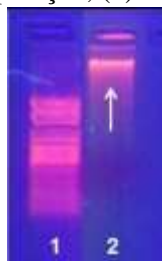
O sequenciamento foi realizado utilizando-se o sequenciador automático "Genetic analyse 3500xl (applied biosystem)". Para a identificação das possíveis matrizes de leitura e para fazer a identificação das sequencias de aminoácidos, bem como peso molecular e ponto isoelétrico da proteína foi utilizado o programa ExPASy. A seqüência de nucleotídeos do gene MDR obtida foi analisada por comparação em banco de dados biológico utilizando o programa Blast-X (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os programas BlastX e pfam (<http://pfam.xfam.org/>) foram usados para verificar domínios.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração do DNA

A extração do DNA utilizando o kit comercial teve como resultado o genoma da espécie, de forma, que a partir da visualização, pôde-se comprovar que ocorreu a extração de forma satisfatória. A integridade do DNA genômico pode ser vista na Figura 1. A seta em branco indica a banda que contém o DNA, o qual mostrase em boa qualidade, sem degradação da amostra

Figura 1 – Visualização em eletroforese para verificar a integridade do DNA. (1) Marcador de peso molecular como base de comparação, (2) DNA de *Piper nigrum* extraído.



Fonte: Autora da pesquisa, 2019

3.2 Desenho dos iniciadores

Após busca nos bancos de dados NCBI, foram selecionadas sequencias do gene multidrug resistance (MDR) de diferentes espécies vegetais para o alinhamento. O resultado do alinhamento permitiu observar regiões com alto grau de conservação. Algumas regiões do alinhamento foram então selecionadas para o

desenho dos iniciadores. Para seleção dos iniciadores considerou-se ainda os resultados obtidos pelo programa Primer3plus a partir do sequenciamento obtido por Moreira et al. (2017).

5.3 Amplificação do gene por PCR

A PCR foi feita para a ampliação de um gene que foi selecionado, o MDR. A PCR funciona a partir de uma reação química promovida por um termociclador; consiste, basicamente, na detecção de uma área específica dentro de um genoma (um gene) e sua amplificação in vitro. Dessa forma, é necessário uma série de reagentes em determinadas quantidades para estabelecer as condições (SILVA et al., 2016). As PCRs foram padronizadas testando-se diversas condições; assim as condições ideais observadas para amplificação com os iniciadores foram previamente descritas em “Materiais e métodos”. Na Figura 2 pode-se observar o resultado obtido.

Figura 2 – Visualização da PCR do gene MDR. (1) Marcador de peso molecular; (2) Gene MDR isolado por PCR.



Fonte: Autora da pesquisa, 2019.

Observa-se que cerca de 177 pares de base (pb) foram isolados por PCR, conforme esperado. Com o gene amplificado, é possível sequenciá-lo para caracterização molecular.

5.4 Sequenciamento e Análises de Bioinformática

O gene isolado foi sequenciado, sendo o resultado do sequenciamento de boa qualidade. O resultado do sequenciamento foi analisado por meio de ferramentas de bioinformática. De acordo com as análises realizadas no Expassy, a sequência isolada trata-se de uma sequência parcial que possui 177 nucleotídeos, que codifica 58 aminoácidos (Figura 3). A proteína isolada apresenta o ponto isoelétrico de 9,23 e peso molecular 5471, 33 Kda.

Figura 3 – Alinhamento dos nucleotídeos com os aminoácidos



Fonte: <https://www.expasy.org/>

A análise das sequências, realizada com o programa BLASTX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que compara a sequência de nucleotídeos contra um banco de dados de proteínas mostrou que a sequência parcial isolada apresenta identidade com outras proteínas da família “ABC transporter C family member” de diferentes espécies vegetais, na qual o gene Multidrug resistance (MDR) está inserido. A análise que identifica domínios realizada com o banco de dados Pfam (Finn et al, 2016) e Blastx, mostrou a presença de uma sequência conservada, conhecida como domínio “ABC transporter C family member” (Figura 4).

Figura 4 – Domínio da superfamília ABC transporter encontrado na proteína isolada de Piper nigrum é destacado na figura. A sequência de aminoácidos que forma o domínio é mostrada abaixo.



Fonte: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Os membros desta superfamília têm a arquitetura conservada do domínio e estão divididos em sete famílias (A – G) em fungos, plantas e animais (KOVALCHUK, 2010; WEEN, 2015; SANCHEZ, 2001).

Estudos recentes demonstraram que a família C do transportador ABC (ABC-C), como proteína da membrana celular, é importante para os patógenos fúngicos em resposta ao fungicida. Sua hiperexpressão está ligada a resistência a patógenos e toxinas dos fungos (THEODOLOU, 2000; QI et al., 2018). A família também tem importância agrônomo, envolve o sequestro de substâncias para dentro dos vacúolos, resistência a herbicidas e outros estresses. Logo, um dos principais meios de funcionamento da resistência, o transporte de metabólitos secundários e xenobióticos é realizado de forma que ocorra o armazenamento e secreção (DO et al., 2018).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o que tem sido reportado na literatura, podemos sugerir que o gene isolado possa estar envolvido na susceptibilidade de Pimenta-do-reino à fusariose. Desta forma, o presente estudo dará embasamento para isolamento do gene completo e para análise de expressão do gene MDR, contribuindo para entender o funcionamento do mesmo na resposta da planta ao estresse biótico em questão, além de dar suporte à programas de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C., & DUARTE, M. L. R. (1991). Comportamento de cultivares de pimenta-do-reino em áreas de ocorrência de fusariose no Estado do Pará. Belém, PA: **EMBRAPA**, 40p.
- DO, T. H. T., MARTINOIA, E., & LEE, Y. (2018). Functions of ABC transporters in plant growth and development. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 41, p. 32–38.
- DUARTE, M. L. (2004). **Sistemas de produção: Cultivo da Pimenteira-do-reino na Região Norte**. Embrapa Amazônia Oriental: Belém, 1ed., 185 p.
- FILGUEIRAS, G. C., HOMMA, A. K. O., SANTOS, M. A. S. (2009). **Conjuntura do mercado da pimenta-do-reino no Brasil e no mundo**. EMBRAPA. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/43563/1/Mercado.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2019.
- FINN, R. D., COGGILL, P., EBERHARDT, R. Y., EDDY, S. R., MISTRY, J., MITCHELL, A. L., POTTER, S. C., PUNTA, M., QURESHI, M., SANGRADOR-VEGAS, A., SALAZAR, G. A., TATE, J., BATEMAN, A. (2015). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, 44(D1), D279–D285. doi:10.1093/nar/gkv1344
- HWANG, J. U., SONG, W.-Y., HONG, D., KO, D., YAMAOKA, Y., JANG, S., SOJEONG, Y., LEE, E., KHARE, D., KYUNGYOON, K., PALMGREN, M., YOON, H. S., MARTINOIA, E., LEE, Y. (2016). Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle. **Molecular Plant**, vol. 9(3), p. 338–355.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>>. Acesso em: 05 jan. 2019.
- JUNIOR, J. F. C. C., LIMA, J. M., SILVA, A. L. P., NASCIMENTO, M. N. C. F. (2017). Análise de mercado da pimentado-reino no período de 1990 a 2015. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, v.11, n. 6, p. 139 – 145.
- KOVALCHUK A., DRIESSEN A. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. **BMC Genom.** 2010, vol. 11, p. 177.
- LEMONS, O. F., POLTRONIERI, M. C., RODRIGUES, S. M., MENEZES, I. C., MONDIN, M. **Consevação e Melhoramento Genético da Pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em Associação com Técnicas de Biotecnologia**. Embrapa, 2011, Belém.
- MATIELLO, R. R., BARBIERI, R. L., CARVALHO, F. I. F. (1997). Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, v. 27, n.1, p. 161 – 168.
- MOREIRA, E. C. O., PINHEIRO, D. G., GORDO, S. M. C., RODRIGUES, S. M., PESSOA, E., SCHALLER, H., LEMOS, O. F., SILVA, A., SILVA Jr, W. A., SAMPAIO, I., DARNET, S. Transcriptional profiling by RNA sequencing of black pepper (*Piper nigrum* L.) roots infected by *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*. **Acta Physiol Plant**, vol. 39, 2017.
- QI, P.-F., ZHANG, Y.-Z., LIU, C.-H., ZHU, J., CHEN, Q., GUO, Z.-R., ... ZHENG, Y.-L. (2018). Fusarium graminearum ATP-Binding Cassette Transporter Gene FgABCC9 Is Required for Its Transportation of Salicylic Acid, Fungicide Resistance, Mycelial Growth and Pathogenicity towards Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2351.
- SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ R., DAVIES T.G., COLEMAN J.O., REA P.A. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. **J. Biol. Chem.** 2001, vol. 276, p. 30231–30244.
- SANTANA, A. C. et al. **O comportamento do mercado de pimenta-do-reino no brasil e no mundo**. Estudos Setoriais 2, FCAP, p. 32, 1995.
- SILVA, A. F., PIOVESAN, A. C., ROSSALU, L. M., OLIVEIRA, A. P., FERREIRA, A., I. C., MARTIN, N., FAVARO, P. C. F., BIENO, M. S., NAKASHIMA, F. **Reação em Cadeia da Polimerase – PCR**. UNILAGO, 2016.
- WEEN M.P., ARMSTRONG M.A., OEHLER M.K., RICCIARDELLI C. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. **Crit. Rev. Oncol./Hematol.** 2015, vol. 96, p. 220–256