

“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE LIPOXIGENASE EM PIMENTA DO REINO”

“ISOLATION AND CHARACTERIZATION LIPOXYGENASE GENE IN BLACK PEPPER”

Rafael Neves Pereira¹ - Unifesspa
Edith Cibelle de Oliveira Moreira² - Unifesspa

Resumo: A pimenta-do-reino é uma especiaria consumida mundialmente que possui grande importância econômica. No Brasil, o estado Pará é um dos maiores produtores dessa cultura, geradora de milhões de dólares ao ano devido ao alto preço e fácil comercialização doméstica e internacional. A Fusariose, uma doença que atinge o sistema radicular e a parte aérea da planta, causando podridão das raízes tem levado a um declínio na produção de Pimenta-do-reino, causando grandes prejuízos para economia. Várias medidas de controle à fusariose foram testadas, no entanto não tem se observado resultados satisfatórios. Uma das alternativas viáveis pode ser o melhoramento genético, no entanto ainda há poucos estudos da planta a nível molecular. Considerando a importância de estudos moleculares para esta espécie, visando auxiliar futuros programas de melhoramento genético, o presente trabalho isolou parcialmente o gene lipoxigenase em Pimenta-do-reino. O gene foi isolado possui 187 nucleotídeos que codificam 62 aminoácidos. A partir da sequência isolada foi possível a identificação de domínios, motivos e comparação com a estrutura tridimensional utilizando bancos de dados biológicos.

Palavras-chave: *Piper nigrum*, lipoxigenase, fusariose.

Abstract: The black pepper is a spices more consumed around the world and has great importance economic importance. In Brazil, Pará state is one of the largest producers of this crop, generating millions of dollars a year due to the high price and easy domestic and international marketing. The root rot is a disease that affects the root system and aerial part of the plant and has led to a decline in the production of pepper-the-kingdom, causing great damage to the economy. Several controls measures to fusarium were tested, but has not observed satisfactory results at moment. One of the viable alternatives can be improvement breeding, however there are few studies of plant molecular level. Considering the importance of molecular studies for black pepper, aiming to help future breeding programs. In this work we isolated lipoxygenase gene in Black pepper. The partial gene isolated has 187 nucleotides encoding 62 amino acids. From the isolated sequence it was possible to identify domains, motifs, and compare with the three-dimensional structure using biological databases.

Keywords: *Piper nigrum*, lipoxygenase, fusarium

1. INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) pertence à família das Piperaceas e ao gênero *Piper*, que por sua vez possuem mais de 2000 espécies (Menezes et al., 2009). A pimenta-do-reino é uma especiaria consumida mundialmente com grande importância econômica em diversas áreas. No Brasil a pimenta é cultivada em vários estados, sendo o estado do Pará um dos maiores produtores, representando 85% da produção nacional (Embrapa, 2005).

¹Graduando do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado, FACISB, IESB, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Par. E-mail: rnverneck@gmail.com.

²Doutora Genética e Biologia Molecular com ênfase em bioinformática. Professora Adjunta da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FACISB/IESB/Unifesspa). Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado. E-mail: cibelle@unifesspa.edu.br.

No estado do Pará a pimenta-do-reino possui grande importância econômica e social, uma vez que é um produto capaz de gerar divisas de milhões de dólares ao ano no período de safra (Embrapa, 2005). A pimenta gera uma renda extra para os agricultores devido o seu alto preço e fácil comercialização doméstica e internacional (Embrapa, 2005). Além disso, é absorvedora de grande mão de obra-de-obra, uma vez que cada tonelada produzida de pimenta-do-reino corresponde a um emprego no campo (Embrapa, 2005).

Até a década de 80, a pimenta-do-reino era cultivada em grande escala, porém devido à fusariose, o cultivo sofreu um declínio, causando grandes prejuízos para economia (Embrapa, 2005). A fusariose é uma doença que atinge o sistema radicular e a parte aérea da planta, causando quedas das folhas amareladas e a podridão das raízes e conseqüentemente perdas para o produtor (Chu et al., 1997). A disseminação da fusariose é muito rápida, podendo levar à morte de um pimental de 30.000 plantas em dois ou três anos (Albuquerque, 1976). Várias medidas para o controle da fusariose como uso de fungicidas e erradicação das plantas doentes já foram testadas, no entanto até o presente momento não tem se observado resultados satisfatórios (Chu et al., 1997). Dentro desse contexto existe a demanda de novas alternativas para o controle da doença.

Uma das alternativas viáveis é a implementação do melhoramento genético utilizando estudos da planta a nível molecular. Considerando que existem poucos estudos para entender as respostas moleculares da pimenta-do-reino e a grande relevância dessa espécie para o estado do Pará, o presente projeto visa isolar e caracterizar o gene da Lipoxigenase, relatado na resposta de defesa de planta contra ataque de patógenos em pimenta-do-reino, para auxiliar futuramente no entendimento dos mecanismos moleculares de resposta da planta ao patógeno.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal utilizado foram folhas de Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L). A extração de DNA ocorreu de acordo com o protocolo do kit, “HipurA Multi – Sample DNA Purification Kit” disponível comercialmente. Após a extração o DNA foi amplificado por meio da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando o iniciador do gene lipoxigenase (LOX) sintetizado em laboratório. A reação de PCR foi realizada com o volume total de 50 µl, utilizando 5 µl de Tampão 10x, 2 µl de MgCl₂ (Cloreto de Magnésio), 1 µl de dNTP, 0,5 µl para cada iniciador forward e reverse do gene lipoxigenase, 0,5 µl da enzima Taq polimerase, 2,5 µl de DNA vegetal e água destilada autoclavada para completar a reação. Para amplificação, foi utilizado o termociclador “Amplitherm” com as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, em seguida 35 ciclos de 1 segundos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento com temperatura de 55°C e extensão de 2 minutos a 72 °C. Por fim uma extensão final de 10 minutos a 72 °C foi utilizada. O resultado da PCR foi visualizado em gel de agarose e fotografado com o auxílio da foto documentadora “L-PIX-HE LOCCUS Biotecnologia”. Após a amplificação, o gene foi purificado de acordo com o protocolo do “Kit EZ-10 Spin Column DNA Gel Extration” disponível comercialmente e enviado para o sequenciamento.

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 sequências de aminoácidos, foi utilizado o programa ExPASy (Artimo et al, 2012). A sequência de nucleotídeos de *Piper nigrum* 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. As sequência de aminoácidos das proteínas não-preditadas foram selecionadas para buscar motivos utilizando o programa Meme (Timothy et al., 1994). Após a análise dos domínios e motivos, a sequência de aminoácidos serviu de base para construção de uma árvore filogenética. Para construção da árvore foi usado o programa MEGA 5.2 (Kumar, Stecher e Tamura 2015), utilizando o método de análise de agrupamentos vizinhos NJ = Neighbor-joining. O programa PDB (Berman et al., 2000) foi consultado para visualizar a estrutura tridimensional da proteína LOX com maior similaridade à de *Piper nigrum*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A extração de DNA genômico e amplificação do gene Lipoxigenase foi realizada com sucesso.

De acordo com o resultado do sequenciamento e análises feitas, a sequência isolada possui 187 nucleotídeos, que codificam 62 aminoácidos. A análise da sequência de nucleotídeos feita com o programa BlastX, permitiu mostrar que a sequência parcial obtida apresenta identidade com outras proteínas do tipo lipoxigenase de diferentes espécies vegetais. Dentre as espécies que apresentam maior identidade com a proteína parcial isolada destacam-se *Persea americana*, *Malus domestica* e *Morus notabilis*. Para verificar o domínio lipoxigenase na proteína parcial isolada, foram considerados os resultados dos banco de dados

Pfam (Finn et al, 2016) e Blastx. A análise mostrou que apesar do isolamento da proteína de *Piper nigrum* ser parcial, foi possível identificar o domínio Lipoxigenase na sequência isolada, constatando que a proteína pertence à família das lipoxigenases. O domínio lipoxigenase, encontrado em diversas plantas, catalisa a adição de uma molécula de oxigênio a ácidos graxos insaturados formando peróxidos (Axelrod et al., 1981). Proteínas dessa família se expressam pela regulação de diferentes moléculas sinalizadoras como ácido jasmônico, respondendo à diferentes formas de estresse, falta de água e também ataque de patógenos em plantas (Silva et al., 2001).

Além de identificar o domínio lipoxigenase foi feita a análise de motivos com o programa MEME. Os motivos são regiões que apresentam grande homologia em alinhamentos de segmentos de proteínas e são utilizados para identificação da função de proteínas, bem como sua família. Sua identificação é importante, uma vez que o mesmo pode ser utilizado para buscar um ancestral comum entre espécies e para definir sítios ativos das enzimas. O resultado da análise feita com Meme foi à identificação de apenas um motivo na sequência de aminoácidos de *Piper nigrum* isolada. Este resultado se deve ao fato de que a sequência obtida é uma sequência parcial. O motivo encontrado apresentou similaridades com outras espécies, como: *Persea americana*, *Malus domestica*, *Morus notabilis*, *Brassica napus*, *Arabidopsis lyrata*, *Morus notabilis*, *Arabidopsis thaliana*, *Diospyros kaki*, *Theobroma cacao*, *Populus trichocarpa* e *Olea europaea*.

O resultado da análise de domínio e motivos mostrou ainda que a proteína parcial isolada trata-se de uma proteína do tipo 9-lipoxigenases (9-LOXS). A proteína 9-Loxs catalisam a oxigenado na posição C-9 de ácidos gordo e tem sido relatada na ativação de defesa da planta. No caso de *Piper nigrum* acredita-se que esta proteína possivelmente também está envolvida na resposta de defesa da planta contra o ataque de patógenos. Esse dado reforça a importância de estudos moleculares a respeito desta proteína e a continuação de estudos nessa linha para isolamento completo da mesma.

O domínio e o motivo identificados foram usados ainda para análise filogenética, baseada no método de distância. Essas regiões foram consideradas, visto que são regiões altamente conservadas entre os diferentes grupos estabelecidos, e que apresentam um papel importante para função da proteína. A árvore filogenética gerada, baseada no método de distância mostrou 4 grupos bem definidos, sendo que a proteína parcial de *Piper nigrum* encontra-se agrupada com a proteína de *Persea americana* devido a grande similaridade dos aminoácidos encontrados no domínio e no motivo dessas duas espécies. Sequências muito conservadas ao longo da evolução podem indicar que as proteínas possivelmente possuem a mesma função.

Para finalizar foi feita a comparação do modelo tridimensional da proteína parcial isolada através de busca no banco de dados PDB. O resultado da busca mostrou que a estrutura tridimensional da proteína de *Piper nigrum* apresenta 48% de identidade com a lipoxigenase da soja (PDB ID: 1HU9). Este resultado pode ser considerado significativo uma vez que o grau de identidade entre as estruturas primárias é superior a cerca de 25%. Baseado neste resultado pode-se construir um modelo para a proteína Lox de *Piper nigrum* por modelagem.

4. CONCLUSÃO

O trabalho permitiu a extração do DNA genômico e o isolamento parcial do gene de Lipoxigenase de Pimenta-do-reino. Baseado no sequenciamento foi possível verificar que a região isolada possui 187 nucleotídeos, que codificam 62 aminoácidos correspondentes ao domínio Lipoxigenase. Foi possível ainda verificar que a proteína parcial isolada apresenta similaridade com proteínas do tipo 9-lipoxigenases, relatada na resposta de defesa de plantas. Os resultados obtidos permitiram o desenho de novos iniciadores que possibilitarão o isolamento completo da proteína e modelagem da mesma. Os resultados obtidos representam ainda uma contribuição a respeito das respostas moleculares de Pimenta-do-reino, o que pode ser considerado importante, na medida em que informações moleculares para esta espécie ainda são escassas e podem ser considerados importantes para programas de melhoramento genético.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Unifesspa pela infraestrutura, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res*, 40(W1):W597-W603, 2012.

- Albuquerque, F. C.; Duarte, M. L. R.; Benchimol, R. L.; Endo T. “Resistência de Piperáceas Nativas Da Amazônia À Infecção Causada Por Nectria Haematococca F.sp. Piperis.” **Acta Amazonica** 3: 341–48, 2001. Acessado em <www.rcsb.org>. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne (2000) The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242.
- Axelrod, V., Cheesbrough, T. M., Laasko, S. Lipoxigenase from soybeans. **Methods In Enzymology, New York**, V. 71, P. 441 - 451, 1981.
- Chu, E. Y., Endo, T., Stein, R. L. B., Albuquerque, F. C. D. E. . **Avaliação da inoculação de fundos micorrízicos Arbusculares Sobre a Incidência Da Fusariose Da Pimenta-Do-Reino**. 22(2), 205–208, 1997.
- Embrapa Amazônia oriental, Sistema de produção da pimenteira-do-reino. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino>> Acesso em 04 de dezembro de 2015.
- 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.; The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Nucleic Acids Research (2016) Database Issue 44:D279-D285.
- Menezes, I. C.; Cidade, F. W.; P, S. A.; IC, S. . **Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper, *Piper nigrum* L. (piperaceae)**. PRism, 209–212, 2009.
- Sudhir Kumar, Glen Stecher, Koichiro Tamura. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution, 2015.
- Silva, J. a., F. F. Oliveira, E. S. Guedes, M. a L. Bittencourt, e R. a. Bittencourt. “Atividade Antioxidante de Piper Arboreum, Piper Dilatatum E Piper divaricatum.” **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 16(3):700–706, 2014.
- Timothy L. Bailey e Charles Elkan, "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers", Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994.