



V Seminário de Iniciação Científica

Talentos da Ciência e Tecnologia em ação

☰ Dias 26 e 27 de setembro de 2019

📍 Auditório e Pátio - Unidade II



ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE *GLUTATIONE S-TRANSFERASE* EM PIMENTA DO REINO

Isabelle Dayane Lopes de Oliveira¹ – Unifesspa
Isabelle.oliveira@unifesspa.edu.br

Sheila Maysa da Cunha Gordo² - Unifesspa
sheilamaysa@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: FAPESPA

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Biotecnologia em plantas

1. INTRODUÇÃO

Conhecida como o “ouro negro da Amazônia”, a pimenta do reino (*Piper nigrum*), uma das especiarias mais caras e mais consumidas no mundo, é um dos principais produtos do estado do Pará, responsável por 85% da produção nacional (Embrapa, 2011). Sua fácil adaptação ao clima da região, seu sabor único e suas propriedades tornaram-na um produto importantíssimo na economia do estado. Mais de 90% da produção é exportada para os EUA e para a Europa.

O Brasil produz cerca de 40 mil toneladas de pimenta por ano, mas, no passado, chegava a produzir cerca de 80 mil toneladas por temporada. Um dos maiores motivos da diminuição da produção da pimenta do reino é a doença fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani*. Essa doença atinge o sistema condutor das plantas, xilema e floema, impedindo a passagem de água e nutrientes para toda a planta, causando assim, o amarelecimento na parte aérea da planta, queda prematura de folhas, seca dos ramos, podridão escura das raízes e do caule, o que facilita a ação de bactérias e de nematoides, e conseqüentemente, a morte prematura do vegetal. A fusariose atualmente é a doença de maior gravidade em horticultura. No entanto, no nível molecular, o entendimento sobre os mecanismos de infecção e desenvolvimento da doença e defesa são escassos. Por isso, faz-se necessário entender como funcionam as vias metabólicas da planta, para tomar medidas biotecnológicas para o melhoramento da mesma.

Através do trabalho realizado em 2012, obteve-se o primeiro sequenciamento em larga escala do transcriptoma da pimenta do reino (Gordo et al., 2012), gerando um banco de dados de genes específicos de *Piper nigrum*, abrindo assim, a possibilidade para que futuros pesquisadores, com interesse na área, tenham maior facilidade no acesso de informações sobre a pimenta, e conseqüentemente, os estudos serem feitos com maior eficiência. Entendendo o sistema de defesa da planta, e quais sequencias de RNA são expressas durante o ataque do patógeno, é possível adotar meios e estratégias de melhoramento genético da pimenta-do-reino para tornar sua resposta ao fungo *Fusarium solani* mais rápida, evitando assim, a morte prematura do vegetal.

2. MATERIAS E MÉTODOS

¹Graduanda em Ciências Naturais pela Faculdade de Química (FACQUIM), ICE, UNIFESSPA

²Doutora em Genética e Biologia Molecular (UFPA) - Professora Titular Adjunta da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FACQUIM/ICE/UNIFESSPA).

V Seminário de Iniciação Científica

Talentos da Ciência e Tecnologia em ação

☰ Dias 26 e 27 de setembro de 2019

📍 Auditório e Pátio - Unidade II



O material vegetal utilizado foi fornecido pela Embrapa Amazônia Oriental, e foram utilizadas mudas de pimenta do reino Bragantina de Panniyur-1 asiática: cultivares híbridas obtidas de Uthirankotta e Cheriya kaniyakadan. A inoculação das plantas foi realizada com o fungo *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*, isolados a partir de tecidos sintomáticos de pimenta com doença de podridão radicular. As mudas de pimenta-do-reino foram transplantadas para vasos contendo vermiculita e *Fusarium*, e mantidas em casa de vegetação até o aparecimento de sintomas de podridão radicular. Para a obtenção dos transcritos no momento da infecção, o RNA total foi extraído de 35 mg de haste tecidual e raiz de *Piper nigrum* inoculada com *Fusarium solani* f. sp. *Piperis* usando o IllustraRNAspin Mini Kit (GE Healthcare, EUA). Para remover o rRNA foi utilizado o kit RiboMinus Eukaryote para RNA-Seq e RiboMinus Plant Kit para RNA-Seq (Invitrogen, EUA). Para remover o rRNA foi utilizado o kit RiboMinus Eukaryote para RNA-Seq e RiboMinus Plant Kit para RNA-Seq (Invitrogen, EUA). Amostras de mRNA foram quantificadas usando o analisador Qubit (Invitrogen, EUA). 126,5 ng de RNA depletado foi fragmentado e usada para gerar uma biblioteca de fragmentos construídos com o kit. As sequências curtas foram pré-processadas usando o software CutAdapt (0.9.5.). para remover a redundância e cortar leituras de baixa qualidade foi utilizado o software PRINSEQ (lite 0.14.4)(Schmieder e Edwards 2011). Os dados obtidos no pré-processamento foram submetidos ao software FastQC (V. 0.9.2), (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>) para análise estatística. Foi realizada a montagem, em seguida o software CLC workbench.

Análise funcional dos genes diferencialmente expressos e a anotação funcional das transcrições foi realizada Blastx contra um banco de dados com o programa Blast2GO.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos genes expressos e identificados na extração do DNA da pimenta do reino (*Piper nigrum*) foi o *Glutathione s-transferase* (GSTs), que se manifesta em situações de toxicidade química e estresse (CATANEO et al, 2003); a glutathione metaboliza uma grande variedade de compostos xenobióticos, protegendo as células; por isso, é considerada por muitos estudiosos um dos maiores grupo de genes de desintoxicação já descritos até o momento (GUEMBAROVSKI E CÓLUS, 2001).

As sequências genéticas identificadas foram utilizadas na análise filogenética, baseada no método de distância. Foi inserida e analisada a sequência de nucleotídeos do gene *Glutathione s-transferase* em banco de dados biológico, o programa Blast-X (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) na tentativa de obter outras sequências genéticas públicas, para se fazer comparações e construir uma árvore filogenética através das características análogas encontradas.

Com o auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor, as regiões foram computadorizadas e pareadas, para tentar encontrar similaridade entre as sequências genéticas do gene *Glutathione s-transferase* com as sequências públicas encontradas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) na tentativa de encontrar paridade entre as regiões. Após a análise de vários dados, observou-se a inconformidade de algumas regiões das sequências analisadas, pois objetivávamos encontrar regiões altamente conservadas entre os diferentes grupos estabelecidos.

Assim, houve a necessidade de pesquisas mais específicas dentro do banco de dados, porém, não obtivemos sequências correspondentes com o gene estudado. Até então, não se obteve filogenia nos alinhamentos genéticos estudados.

V Seminário de Iniciação Científica

Talentos da Ciência e Tecnologia em ação

☰ Dias 26 e 27 de setembro de 2019

📍 Auditório e Pátio - Unidade II



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da análise do banco de dados de genes específicos expressos no DNA genômico da pimenta do reino (Gordo et al., 2012), obteve-se genes que se manifestam em situações de estresse da planta, como a Glutathione. Objetivando relacionar espécies com características genéticas evolutivas relacionadas, cruzamos a sequência genética do gene em questão, com o banco de dados internacional, o NCBI, para obter sequências parecidas e correlacioná-las. Porém, após pesquisas profundas e específicas no banco de dados, concluímos que dentre as sequências escolhidas, nenhuma apresentou similaridade relevante com o segmento de genes de *Glutathione S-transferase*. Apenas uma região com 20 nucleotídeos foi totalmente compatível.

Posteriormente serão amplificadas regiões do gene *Glutathione s-transferase* (GSTs) utilizando primers específicos para a região de expressão. Os trabalhos estão em andamento em fase de testes específicos para padronização das condições de amplificação do gene.

REFERÊNCIAS

CATANEO, A.C. et al. **Atividade de Glutathione s-transferase na Degradação do Herbicida Glyphosate em Plantas de Milho (zea mays) 1.** Planta Daninha, Viçosa-MG, v.21, n.2, p.307-312, 2003

Embrapa Amazônia oriental, Sistema de produção da pimenteira-do-reino. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/56858/1/DOC-375.pdf> > Acesso em 23 de agosto de 2019

GORDO, S. M. C. et. al. **Sequenciamento do transcriptoma de Pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) utilizando Plataforma de Sequenciadores de Nova Geração (NGS) – SOLiD System 3 Plus.** Congresso de Recursos Genéticos, 2012

NISHIMURA, D. S. **Caracterização molecular da glutathione S-transferase de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) em resposta a aplicação de herbicidas.** Universidade de São Paulo. Centro de Pesquisa Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2007.

ROCHA, S. et al. **Caracterização de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, produção de fitotoxina e incidência da fusariose no norte de Minas Gerais.** Summa Phytopathologica, [s. l.], v. 42, n. 22, p. 67–72, 2016.

LOSI-GUEMBAROVSKI, R. ; CÓLUS, I. M. S. **Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): distribuição étnica e relação com câncer.** Semina: Ci. Biol. Saúde, Londrina, v. 22, p. 3-9, jan./dez. 2001