

## Prospecção do gene PR5 em piperáceas nativas da Região Amazônica

K. L. Eufrauzino<sup>1</sup>; B. P. D. Costa<sup>2</sup>; O. F. de Lemos<sup>3</sup>; J. K. R da Silva<sup>4</sup>; A. R. Ramos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Biológicas/IESB, Unifesspa, 68507-590, Marabá-Pará, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório Multiuso de Biologia/IESB, Unifesspa, 68507-590, Marabá-Pará, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental, Embrapa, 66095-903, Belém-Pará, Brasil

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFPA, 66075-900, Belém-Pará, Brasil

**Palavras-Chave:** osmotinas, defesa de plantas, proteína antifúngica

### 1. INTRODUÇÃO

As plantas são submetidas constantemente a interações com inúmeros agentes bióticos (p. ex. patógenos e herbívoros) e abióticos (salinidade, temperatura), e empregam sistemas de sinalização e reconhecimento que permitem a detecção do agente causador do estresse e a iniciação de respostas defensivas [1]. Estas moléculas fazem parte de uma elaborada rede de defesa nas plantas, sejam elas constitutivas (ou pré-formados) e induzidas [2,3]. Os mecanismos de defesa pré-formados não são especializados para um patógeno específico, e podem ser de dois tipos: estrutural (cutina e substâncias cerosas) ou bioquímico (metabólitos secundários) [4,5]. A defesa induzida é ativada por uma cadeia de eventos sinalizadores que culmina com a expressão de genes relacionados à defesa [5,6]. Dentre estes, os genes que produzem as proteínas PR (Relacionadas a Patogênese) merecem destaque pois possuem uma ampla atividade biológica, tais como a atividade antifúngica da família das PR5, denominada osmotinas [7]. Neste sentido o isolamento e a prospecção de genes PR nas espécies de piperáceas nativas é relevante, uma vez que podem auxiliar no combate da fusariose, uma grave enfermidade radicular causada pelo fungo *Fusarium solani* sp. *piperis*, que atinge os cultivos de pimenta do reino provocando a obstrução dos vasos condutores, morte da planta e redução das colheitas. Estudos preliminares com espécies nativas de *Piper* demonstraram a resistência de algumas frente ao *F. solani* [8]. Além disso, o óleo essencial da espécie *P. divaricatum*, apresentou atividade antifúngica contra *F. solani* em bioensaios *in vitro* [9] e *in vivo* a infecção com este fungo não provocou o desenvolvimento da doença nesta espécie [10]. Como relatado o estudo de pimentas nativas é promissor, e o presente trabalho isolou o gene PR5 das espécies *Piper aduncum*, *P. maginatum*, e *P. arboreum* com objetivo de uma análise funcional *in silico* das osmotinas, visando auxiliar no futuro programas de melhoramento utilizando estas espécies como doadoras de genes.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

**Material vegetal:** Folhas das espécies *Piper aduncum*, *P. maginatum*, e *P. arboreum* foram coletadas na Coleção de Piperáceas da Embrapa Amazônia Oriental, e armazenadas a -20° C até o uso.

**Desenho dos primers e PCR:** Os primers foram desenhados a partir da sequência nucleotídica de *P. colubrinum* (EU271754.1) depositada no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Para a PCR foi extraído 100 mg de DNA, de folhas frescas utilizando o kit de purificação (Norgen Biotek Corporation). As reações de PCR (25 µL) continham 50 ng DNA, 0,4 µM PR5-F primer (5'TGGCCCTTCCTCTCCTCTAC3'), 0,4 PR5-R primer (5'CTCTGTAATTTGTGCCGCG3'), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de dNTP e 0,5 U de Taq

polimerase. As condições de PCR (Termociclador Amplitherm Mod TX 25) foram 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min, e 72 °C por 1min e 30 sec, e extensão final de 72 °C for 10 min. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1%. Os fragmentos obtidos dos tamanhos esperados foram purificados com EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit e sequenciados em ambas direções usando os primers que flaqueavam o fragmento de interesse. Os fragmentos foram sequenciados em sequenciador ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) da empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda.

Análises computacionais: As seqüências de nucleotídeos foram comparadas com sequencias do GenBank usando os programas BLASTn e BLASTx. O programa Translate tool foi utilizado para identificar possíveis matrizes de leitura assim como para fazer a tradução de nucleotídeos em seqüência de aminoácidos. Para a análise de Domínios Conservados foi utilizado o programa Prosite. Os programas BLASTn e BLASTx pertencem ao NCBI (National Center for Biotechnology Information) [11], enquanto que Translate tool e Prosite pertencem ao Expasy (<http://web.expasy.org>).

As sequencias deduzidas de aminoácidos foram alinhadas com a sequencia de PR5 de *P. colubrinum* depositadas no GenBank, utilizando o programa “Multiple sequence alignment by Florence Corpet (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisada em programa BLASTx para identificar similaridades com outras osmotinas depositadas no NCBI. A sequencia de 350 nucleotídeos de *P. aduncum* revelou uma identidade de 63% com *P. colubrinum* e 61% com *Fagus sylvatica* e *Coffea arábica*. A sequencia de 560 nucleotídeos de *P. marginatum* revelou 38% de identidade com *P. colubrinum* e 41% com *C. arábica*. A sequencia de 624 nucleotídeos de *P. arboreum* apresentou uma identidade de 90% com *P. colubrinum* e 79% com *C. canephora*. As diferenças observadas nas similaridades entre *P. marginatum*, *P. aduncum*, *P. arboreum* com *P. colubrinum* podem ser estar relacionadas as distancias genéticas destas espécies. Contudo, uma vez que as sequencias possuem tamanhos distintos, estas diferenças de similaridade devem ser reduzidas após a síntese de novos primers, mas específicos, que amplifiquem tamanhos maiores deste gene para a análise. Todas as sequencias analisadas apresentaram o domínio TLP, característico das proteínas PR5 que apresentam atividade biológica contra estresses bióticos (fungos) e abióticos (seca, frio e salinidade). O isolamento completo destes genes proporcionará estudos de funcionalidade, como os obtidos por Chowdhury et al, (2107) que demonstraram a aquisição de tolerância a estresses bióticos e abióticos após a superexpressão de osmotinas em gergelim.

### **4. CONCLUSÃO**

O trabalho apresenta a prospecção de uma sequencia parcial de osmotina em três espécies amazônicas de piperáceas. As próximas etapas visam o isolamento total deste gene nas referidas espécies. A prospecção e análise funcional in silico e posteriormente in vivo de genes de resistência das espécies do gênero *Piper* podem auxiliar no entendimento do mecanismo de defesa destas plantas e na sua interação com o fitopatógeno causador da fusariose.

## REFERÊNCIAS

- [1] Atkinson NJ, Urwin PE. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field, *J of Experimental Botany*. 2012 Jun; 63: 3523-3543.
- [2] Staskawicz BJ et al., Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*. 1995 MÊS 268(5211): 661.
- [3] Hammond-Kosack & Jones, 2001
- [4] Dangl JL, Jones JDG. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 2001 411 (6839):826-833.
- [5] Medeiros et al., 2003
- [6] Veronese P, et al. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiology*. 2003 131(4):1580-1590.
- [7] Van Loon, 1997
- [8] Albuquerque et al, 2001
- [9] Da Silva, Joyce Kelly R, et al. Antifungal activity and computational study of constituents from *Piper divaricatum* essential oil against *Fusarium* infection in black pepper. *Molecules*. 2014 19(11):17926-17942, 2014.
- [10] Meireles et al., 2016
- [11] Altschul SF, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*. 1997 25(17):3389-3402.