



Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas

Faculdade de Ciências Biológicas

Curso de Ciências Biológicas

Rafael Neves Pereira

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE LIPOXIGENASE EM
PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum* L)**

Marabá - PA

2018

Rafael Neves Pereira

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE LIPOXIGENASE EM
PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum* L)**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Edith Cibelle de Oliveira Moreira.

**Marabá - PA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Setorial Campus do Tauarizinho

Pereira, Rafael Neves

Isolamento e caracterização parcial do Gene Lipoxigenase em Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L) / Rafael Neves Pereira ; orientadora, Edith Cibelle de Oliveira Moreira. — Marabá : [s. n.], 2018.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus Universitário de Marabá, Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas, Faculdade de Biologia, Curso de Bacharel em Ciências Biológicas, 2018.

1. Pimenta-do-reino. 2. *Fusarium solani*. 3. Pimenta-do-reino - Doenças e pragas. 4. Pimenta-do-reino - Defesa I. Moreira, Edith Cibelle de Oliveira, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 583.952

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por toda saúde que tenho, por me dar sabedoria e por sempre colocar pessoas especiais em minha vida.

À Universidade do Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa) pela minha formação acadêmica.

À EMBRAPA Amazônia Oriental (Belém - PA) pelo fornecimento do material biológico e pelo financiamento de alguns reagentes.

À minha incrível e eterna orientadora Dra Cibelle, por me apresentar a esse mundo magnífico da ciência, por sempre me apoiar e confiar no meu potencial, por todos ensinamentos passados nesses quase quatro anos de orientação, por toda paciência, dedicação, conselhos e pela amizade que foi sendo construída, e claro grato por tirar do seu bolso e comprar alguns matérias e reagentes para a realização dos meus experimentos. O meu muito obrigado!

À minha família, em especial minha mãe Deide, meu pai Arnaldo, aos meus irmãos Wallison e Marcio e aos meus sobrinhos, agradeço por acreditarem em mim, pelo incentivo, suporte, por me apoiarem nas minhas escolhas e por toda compreensão. Amo vocês!

À minha segunda família que ganhei na Unifesspa, os BioAmigos: Alze, Lídyia, Matheus e Palloma por todos momentos que compartilhamos juntos, de alegria, tristeza, desespero, choros (...) durante esses quatro anos. Por sempre se fazerem presentes na minha vida tanto dentro quanto fora da universidade, por tornarem alguns momentos difíceis em momentos felizes e divertidos. Sou muito grato pela nossa amizade e farei de tudo para que ela continue por muito tempo. Esperando vocês em Lavras, hehe.

Em especial ao meu amigo Leo pela grande amizade, pelos conselhos, por sempre acreditar em mim, por sempre me motivar, por estar presente nos momentos felizes e difíceis da minha vida, por me suportar em todos os momentos, minhas chatices e desesperos, por me tirar do estresse em muitos momentos e por todas as horas que passamos juntos.

Aos amigos Suianny, Acsa, Thaís, Lucas e Saulo por todo companheirismo, pela amizade, pelos momentos que passamos juntos, pelos risos e brincadeiras.

À toda equipe de professores da biologia, pelos ensinamentos e conselhos durante os quatro anos. Em especial a professora Zan, por ser essa pessoa incrível e excelente profissional, e que tive a oportunidade de ser orientado no projeto do Bambu.

Grato a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

RESUMO

A pimenta-do-reino é uma especiaria que tem importância econômica no mundo por sua aplicação na indústria e pelas propriedades medicinais. O estado do Pará é um dos maiores produtores dessa especiaria, mas a produção dessa espécie é comprometida pela fusariose, que causa a podridão radicular na planta. Estudos para identificar genes e entender as respostas da pimenta-do-reino à nível molecular são importantes para apoiar programas de melhoramento genético da espécie. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar parcialmente o gene lipoxigenase (Lox) em pimenta-do-reino. Para isso foi realizado a extração do DNA genômico, construção dos iniciadores, amplificação do gene por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e caracterização utilizando recursos computacionais. A sequência parcial de gene *lox* de pimenta-do-reino isolada tem aproximadamente 750 nucleotídeos que codificam 258 aminoácidos e apresenta alta similaridade com proteínas lipoxigenases de *Persea americana*, *Parasponia andersonii* e *Vitis vinífera*. Verificamos que *lox* da pimenta-do-reino é do tipo *lox-9S* e que a mesma possui o domínio PLAT / LH2 de proteínas relacionadas à lipoxigenase vegetal. A estrutura secundária e terciária da proteína parcial isolada mostrou similaridade com a proteína *lox* de soja. A descrição de *Lox* em pimenta-do-reino é essencial para esclarecer os mecanismos moleculares de resposta da planta e entender seu papel na ativação da resposta de defesa em um possível ataque contra patógeno.

Palavras-chave: *Fusarium solani*, *Piper nigrum* L., Defesa, Resposta.

ABSTRACT

Black pepper is a spice that have importance economic in the world by its wide application in industry and by medicinal properties. State of Pará is one of the largest producers this spice, but the production of this species is committed by fusariosis, that causes root rot in plant. Study of molecular biology is important by support breeding improvement of black pepper. Thus, the present work aimed to isolate and partially characterize the lipoxygenase (Lox) gene in black pepper. For this purpose, the extraction of genomic DNA, construction of the primers, amplification of the gene through PCR (Polymerase Chain Reaction) and characterization using computational resources were performed. The partial lox gene sequence of isolated black pepper has 750 nucleotides that encode 258 amino acids and has high similarity with lipoxygenase proteins of *Persea americana*, *Parasponia andersonii* e *vitis vinífera*. We have verified that lox of black pepper is lox-9S type and that it has the PLAT / LH2 domain of proteins related to vegetable lipoxygenase. The secondary and tertiary structure of the isolated partial protein showed similarity with the soybean lox protein. Your description in black pepper is essential for clarify the molecular mechanisms of response of the plant to the Fungus and understand your paper in activation of the defense response in a possible attack against pathogen.

Keywords: *Fusarium solani*, *Piper nigrum* L., Defense, Response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.)...	11
Figura 2 – Frutos produzido pela pimenta-do-reino.	12
Figura 3 – Produção mundial em toneladas de pimenta-do-reino no ano de 2016.	13
Figura 4 – Mapa do Brasil destacando os estados produtores de pimenta-do-reino	14
Figura 5 – Planta de pimenta-do-reino com sintomas da fusariose	15
Figura 6 – Via das lipoxigenase.	18
Figura 7 – Folha de pimenta-do-reino cultivar Bragantina utilizada para extração de DNA .	21
Figura 8 – Resultado da extração do DNA de pimenta-do-reino. A banda destacada pela seta indica que há integridade no DNA extraído. (1) Marcador. (2) DNA genômico.	24
Figura 9 – Alinhamento de sequencias do gene lipoxigenase em diferentes espécies vegetais, em verde estão indicados os iniciadores sintetizados (F) Forward e (R) Reverse. ...	26
Figura 10 – Isolamento parcial do gene lipoxigenase. (1) Marcador. (2) Fragmentos amplificados. A seta indica um fragmento em torno de 750 pb.	27
Figura 11 – Porcentagem da identidade do gene lipoxigenase de pimenta-do-reino comparadas em diferentes espécies utilizando o programa BlastX.....	28
Figura 12 – Sequência de nucleotídeos da proteína de pimenta-do-reino sequenciada (em preto) e a sequência de aminoácidos traduzida (em vermelho)..	29
Figura 13 – Domínio lipoxigenase conservado encontrado na proteína parcial de pimenta-do-reino é destacado em vermelho na figura.	29
Figura 14 – Sequência de aminoácidos do gene lipoxigenase. Em vermelho é destacado o domínio lipoxigenase. Em azul encontra-se o domínio Plat. Em verde o domínio LH2	30
Figura 15 – Alinhamento da estrutura secundária da lipoxigenase de pimenta-do-reino e lipoxigenase de soja.....	31
Figura 16 – Proteína de lipoxigenase em soja completa (1rrl2.A).	32
Figura 17 – Estrutura terciária parcial da proteína lipoxigenase.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características de algumas cultivares de pimenta-do-reino	12
Tabela 2 – Espécies utilizadas para o alinhamento das sequências do gene lipoxigenase obtidas no banco de dados NCBI.	24
Tabela 3 – Sequência dos iniciadores sintetizados para o gene lipoxigenase. TM- Temperatura média.	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1	Pimenta-do-reino	11
2.2	Fusariose.....	15
2.3	Resposta da planta à patógenos	16
2.4	Gene lipoxigenase	17
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo geral	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1	Material biológico	21
4.2	Desenho dos iniciadores	21
4.3	Extração do DNA	22
4.4	Amplificação do gene por PCR.....	22
4.5	Caracterização do gene lipoxigenase.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
	CONCLUSÃO	32
	PERSPECTIVAS	33
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma espécie nativa das florestas de Kerala, Sul da Índia e foi introduzida no Brasil durante o século XVII pelos portugueses (BARBOSA, 2002). Ela pertence à família Piperaceae que possui mais de 2000 espécies (MENEZES et al., 2009). É uma planta trepadeira que utiliza tutores de madeira ou outras plantas como suporte para seu desenvolvimento (NELSON e EGER, 2011).

A pimenta-do-reino é uma especiaria consumida mundialmente, com grande importância na econômica, bastante utilizada na indústria alimentícia, na produção de molhos, conservas, preservação de carnes, extração de óleos, indústria de cosméticos, produção de perfumes, sabonetes, cremes, produtos para o cabelo e óleos aromáticos (LIU et al., 2010). Além disso, é usada na medicina tradicional, pois, possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (NISHIMURA et al., 2011).

No Brasil a pimenta-do-reino é cultivada em vários estados como Bahia, Maranhão, Ceará, Paraíba, Amapá, Espírito Santos e Pará, esses dois últimos os maiores produtores (EMBRAPA, 2010). O estado do Pará representa 65,9% da produção nacional (IBGE, 2017), nessa região a especiaria é um produto capaz de gerar divisas de milhões de dólares ao ano no período de safra, possibilitando uma renda extra para os agricultores devido ao seu alto preço e fácil comercialização doméstica e internacional (LEMONS et al., 2011).

Porém, devido à baixa variabilidade genética entre as cultivares, a pimenta-do-reino possui grande susceptibilidade a uma doença denominada fusariose (BARBOSA, 2002). Essa doença teve destaque a partir década de 80, causando grandes prejuízos para economia (ALBUQUERQUE et al., 2001) e é caracterizada por atingir o sistema radicular e a parte aérea da planta, causando quedas das folhas amareladas, podridão das raízes e consequentemente perdas para o produtor (CHU et al., 1997). A disseminação da fusariose é muito rápida, podendo levar à morte de um pimental de 20 ha., com cerca de 30.000 plantas em dois ou três anos (ALBUQUERQUE, 2001).

Várias medidas de controle à fusariose já foram testadas, como uso de fungicidas, uso de tutores desinfestados, erradicação e queima das plantas doentes, no entanto, até o presente momento, tem-se alcançado apenas medidas paliativas (SERRANO et al., 2006). Dentro desse contexto, existe a demanda de novas alternativas para o controle da doença.

Dentre os inúmeros esforços para combater a fusariose, há possibilidade, de entender as respostas moleculares da planta usando biologia molecular, podem ser de grande relevância

para apoiar programas de melhoramento genético. Um dos genes amplamente relatado na resposta de defesa de plantas é o gene que codifica a proteína lipoxigenase. As lipoxigenases estão associadas à importantes processos fisiológicos, como na defesa da planta contra o ataque de patógenos (SONG et al., 2016). Diante disso, o objetivo do trabalho foi isolar e caracterizar o gene lipoxigenase em pimenta-do-reino, para auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares de resposta da planta ao patógeno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pimenta-do-reino

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L) (Figura 1) é uma planta nativa do Sul da Índia e foi introduzida no Brasil durante o século XVII pelos colonos portugueses (BARBOSA, 2002). A espécie pertence ao gênero *Piper* e família Piperaceae, que é composta por cerca de 2.000 espécies (MENEZES et al., 2009). Sua maior diversidade ocorre principalmente nos trópicos da América e na região do Sul da Ásia (JARAMILLO e MANOS, 2001). É caracterizada como uma trepadeira que utiliza tutores de madeira ou outras plantas como suporte para seu desenvolvimento (NELSON e EGER, 2011).

Figura 1 – Pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L)



Fonte: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/3860001/pimenta-do-reino>

Os frutos de pimenteira-do-reino (Figura 2), podem ser comercializados, como grãos pretos maduros e secos, grãos brancos, grãos verdes imaturos e vermelhos amadurecidos (PISSINATE, 2006). Eles possuem ampla utilização em diversos setores, como: Na indústria alimentícia, para produção de molhos, conservas e preservação de carnes, na indústria de cosméticos para produção de perfumes, sabonetes, cremes, produtos para o cabelo e óleos aromáticos (LIU et al., 2010) e na medicina tradicional, pois, possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (NISHIMURA et al., 2011). Por sua ampla utilização, os frutos são extremamente valorizados pelo mercado internacional, possuindo alto

valor econômico agregado, o que permite alta rentabilidade para os pipericultores (ALBUQUERQUE ET AL., 2001).

Figura 2 – Frutos produzido pela pimenta-do-reino



Fonte: Oriel Lemos

A pimenta-do-reino possui várias cultivares, dentre elas: Apra, Bragantina, Cingapura, Guajarina, Içará, Kottanadan e Kuthiravally (LEMOS et al., 2014; LEMOS et al., 2011), cujas principais características de importância econômica estão descritas na tabela 1.

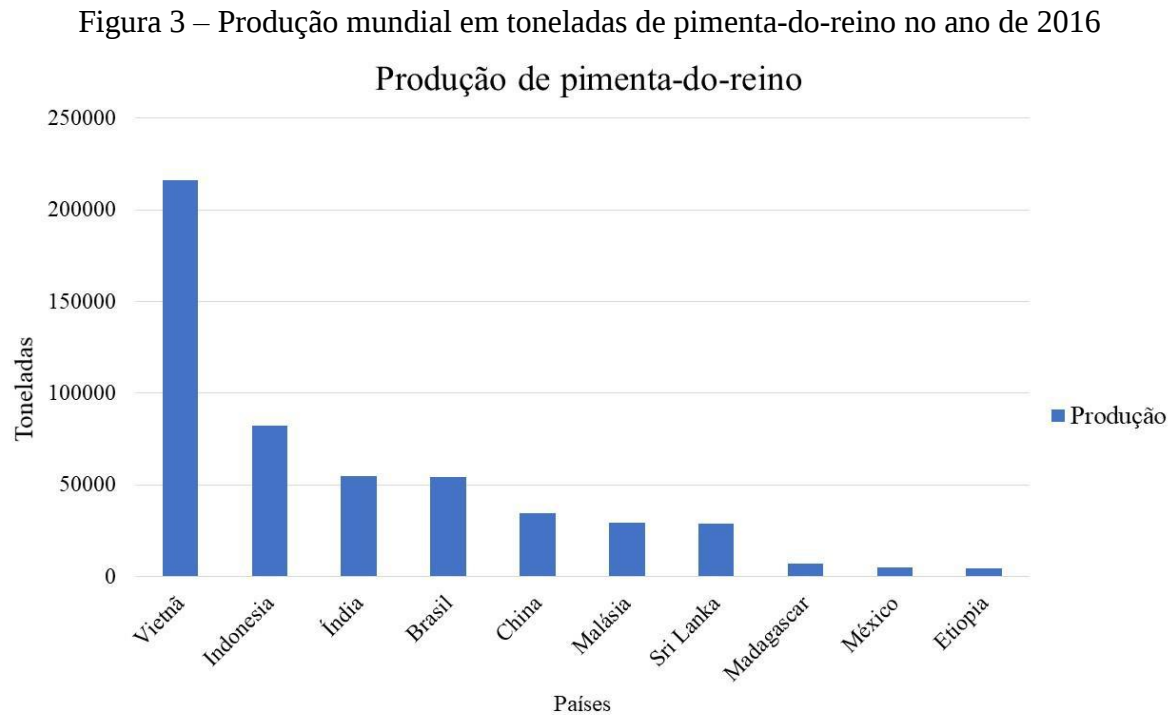
Tabela 1 – Principais características de algumas cultivares de pimenta-do-reino

CULTIVARES	ESPIGAS			RENDIMENTO MÉDIO (Kg/ha)	CICLO DE MATURAÇÃO
	Tamanho (cm)	Peso (g)	Nº de frutos		
Apra	12	14	78	3.100	Setembro/novembro
Bragantina	14	14	77	2.700	Junho/outubro
Cingapura	8	6	27	2.300	Junho/outubro
Guajarina	12	12	68	2.900	Junho/outubro
Içará	10	8	40	2.500	Setembro/novembro
Kottanadan	11	12	54	2.800	Setembro/novembro
Kuthiravally	12	13	75	2.700	Setembro/novembro

Fonte: Adaptado de Lemos et al., 2014.

Dentre as cultivares, destaca-se a cultivar Bragantina, pois, apresenta espigas longas, alta produtividade e possui maior preferência pelos produtores (LEMOS et al., 2011), devido ao seu alto valor agregado.

Os maiores produtores de pimenta-do-reino são Vietnã, Indonésia, Índia, Brasil, China, Malásia e Sri Lanka, sendo o Brasil o quarto maior produtor no mundo com cerca 54.425 toneladas (Figura 3) (FAO, 2016).



Fonte: FAO, 2016

No Brasil a pimenta-do-reino é cultivada em vários estados como Bahia, Maranhão, Ceará, Paraíba, Amapá, Espírito Santo e Pará, sendo esses dois últimos os maiores produtores (EMBRAPA, 2010) (Figura 4). Em 2016 o estado do Pará produziu 35.845 toneladas de pimenta-do-reino, representando 65,9% da produção nacional (IBGE, 2017).

Figura 4 – Mapa do Brasil destacando os estados produtores de pimenta-do-reino



Fonte: Adaptado de Mattos, 2016

No Pará a produção dessa especiaria foi amplamente fortalecida com a introdução da cultivar Cingapura, através dos imigrantes japoneses, a partir do ano de 1933, no município de Tomé-Açu (BARBOSA, 2002). Além disso, as condições ambientais do estado favoreceram o cultivo da pimenta-do-reino em larga escala, tornando-a uma cultura importante do ponto de vista sócio econômico, capaz de gerar mais de 50 milhões de dólares em divisa ao ano no período de safra, possibilitando uma renda extra para os agricultores, devido ao seu alto preço e fácil comercialização nacional e internacional, além de empregar mais de 70 mil pessoas no período de safra (LEMOS et al., 2011; DUARTE et al., 2002).

A pimenta-do-reino foi tão importante e primordial para agricultura paraense, entre as décadas de 60 e 80, que pela primeira vez na história do Pará, a renda da agricultura ultrapassou o extrativismo (BARBOSA, 1998). Porém, a partir da década de 80 o cultivo de pimenta-do-reino sofreu um acentuado declínio, devido a uma doença chamada de fusariose (ALBUQUERQUE et al., 2001).

2.2 Fusariose

A fusariose é ocasionada por *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, um fungo biotrófico de solo, pertencente a classe Ascomycetes (Ascomycetes) (ALBUQUERQUE et al., 2001). O fungo afeta a parte aérea da planta e o seu sistema radicular, levando ao apodrecimento e consequente morte do organismo (Figura 5) (CHU et al., 1997). Além disso, ao infectar a planta o fungo produz conidióforos, que originam os microconídios, macroconídios e peritécios vermelhos, que contém os ascósporos. Esses esporos são resistentes e podem se conservar por um extenso período, podendo ocasionar novas infecções (ALBUQUERQUE, 1961).

Figura 5 – Planta de pimenta-do-reino com sintomas da fusariose



Fonte: Oriel Lemos

Entre os fatores que favorecem a propagação do fungo, destacam-se o clima tropical da região Norte (elevada temperatura e umidade) e a baixa variabilidade genética entre as cultivares de pimenta-do-reino, o que leva a grande susceptibilidade (BARBOSA, 2002) e perdas para o produtor (CHU et al., 1997). O fungo pode dizimar (DUARTE e ALBUQUERQUE, 1986) e diminuir o tempo de vida dos pimentais, passando de 15 a 20 anos (ALBUQUERQUE e CONDURÚ, 1971) para 8 anos (SANTANA et al., 1995; ALBUQUERQUE e DUARTE, 1991). Além disso, a produtividade das plantações de

pimenta-do-reino tem sido comprometida pela fusariose, reduzindo assim, o cultivo dessa especiaria na Amazônia.

Várias medidas de controle à fusariose já foram testadas, como uso de fungicidas, uso de tutores desinfestados, erradicação e queima das plantas doentes, além do melhoramento genético clássico utilizando cruzamento interespecífico e intraespecífico para obtenção de variedades resistentes, no entanto, até o presente momento tem-se alcançado apenas medidas paliativas (POLTRONIERI et al., 2000; SERRANO et al., 2006). Dentro desse contexto, existe a demanda de novas alternativas para o controle da doença.

2.3 Resposta da planta à patógenos

As plantas possuem vários mecanismos de defesa contra fitopatógenos, que funcionam como barreira para evitar a entrada ou colonização de hospedeiros (GOODMAN et al., 1986). Os sistemas de defesas atuam de maneira coordenada e dinâmica (PASCHOLATI e LEITE, 1995) englobando mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos pré e/ou pós-formados (STANGARLIN et al., 2011).

Os mecanismos pré-formados são encontrados nas plantas antes mesmo do contato com o patógeno. Mecanismos estruturais pré-formados são barreiras físicas que impedem a penetração do patógeno como a produção de ceras, cutícula, modificações de estômatos, tricomas, espessamento da parede celular e adaptações de fibras/vasos condutores. Os mecanismos bioquímicos pré-formados são substâncias que possuem a capacidade de inibir o desenvolvimento e sobrevivência do patógeno, como por exemplo, produção de fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; STANGARLIN et al., 2011).

Os mecanismos pós-formados, encontram-se ausentes ou em menor evidencia antes da infecção, sendo ativado quando a planta entra em contato com o patógeno. Mecanismos estruturais pós-formados incluem a formação de papila, halo, lignificação, camada de cortiça, tiloses e deposição de goma, já os mecanismos bioquímicos pós-formados incluem produção de fitoalexinas, substâncias reativas de oxigênio e proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) (PASCHOLATI e LEITE, 1995; GARCION et al., 2007).

Ao entrar em contato com o patógeno a planta pode apresentar mecanismos de defesa. Dentre as principais defesas utilizadas pelas plantas, está a reação de hipersensibilidade (HR) e

a resistência sistêmica adquirida (SAR). A reação de hipersensibilidade (HR) é uma resposta rápida e localizada que culmina na morte programada das células infectadas e próximas da infecção, impedindo o estabelecimento da doença. Essa resposta se constitui como a primeira etapa de defesa da planta (FERNANDES et al., 2009). A resistência sistêmica adquirida (SAR) é ativada a partir de moléculas químicas ou pela tentativa de infecção por patógeno, desencadeada logo após uma infecção local ou em locais distintos, expandindo-se para locais distantes da infecção (ZHU et al., 2003; WALTERS et al., 2013).

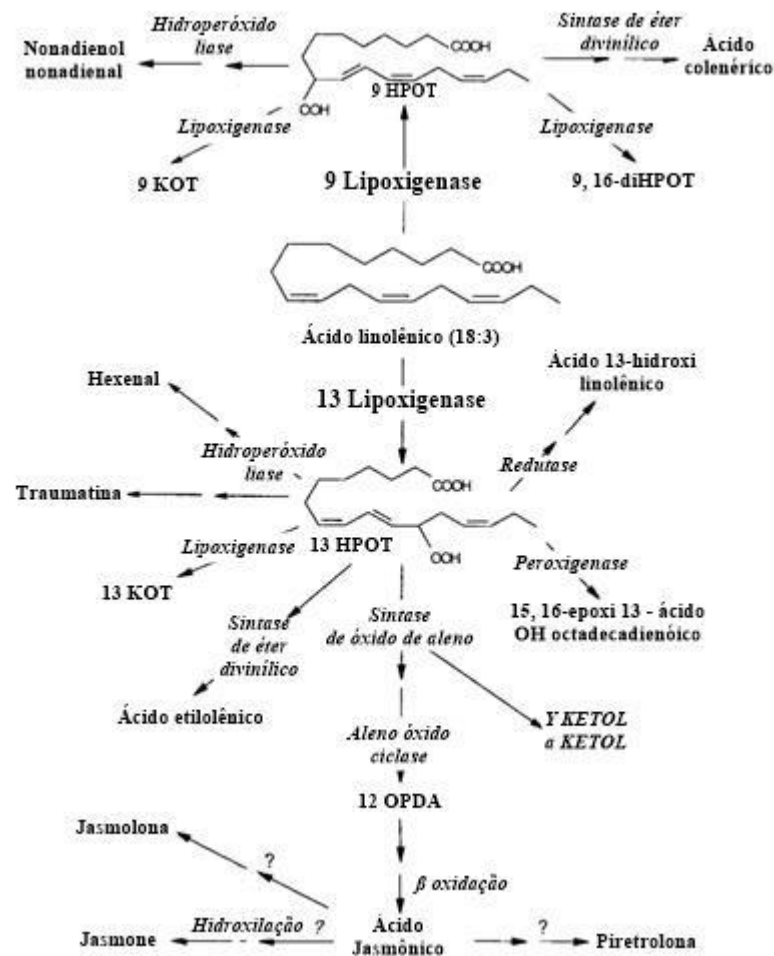
Neste caso, a ativação do mecanismo de defesa da planta inicia-se quando ocorre o reconhecimento do patógeno, por meio de receptores celulares que ativam a transdução de sinais. Com essa ativação inicia-se vários eventos bioquímicos na célula, como acidificação do citoplasma (NURNBERGER et al., 1994), ativação de algumas proteínas, produção de espécies reativas a oxigênio, que podem gerar um processo chamado de explosão oxidativa (TORRES et al., 2006; MUR et al., 2008). Além disso, a transdução de sinais também pode ativar mensageiros secundários, como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno que são hormônios que sinalizam a SAR (PORTA e ROCHA-SOSA, 2002). Dentre os genes que estão relacionados na ativação da resposta de defesa da planta, encontra-se as lipoxigenases (GUZZO, 2004), que já foram relatadas na defesa de espécies como *Arabidopsis thaliana* e *Capsicum annuum* (HWANG e HWANG, 2010; MELAN et al., 1993).

2.4 Gene lipoxigenase

As lipoxigenases são isoenzimas encontradas na maioria das plantas e animais (SONG et al., 2016) que catalisam a adição do oxigênio molecular, formando hidroperóxidos (AXELROD et al., 1981; SIEDOW, 1991).

As lipoxigenases podem ser classificadas ainda como 9 lipoxigenase (9-LOXs) ou 13 lipoxigenase (13-LOXs), de acordo com a posição na qual o oxigênio é incorporado ao substrato produzido (FEUSSNER e WASTERACK, 2002). Os principais substratos produzidos pela lipoxigenase em plantas são os ácidos linoleico e linolênico (Figura 6) (WANG et al., 1999).

Figura 6 – Via das lipoxigenase



Fonte: Adaptado de Porta e Rocha-Sousa, 2002

As lipoxigenases agem no momento em que os tecidos das plantas são afetados pelo patógeno, culminando numa degradação sequencial de lipídios, assim, tendo como produto primário os hidroperóxidos, esse podendo seguir duas principais vias enzimáticas, sendo essas: hidroperóxido-liase e hidroperóxido ciclase (FARMER e RYAN, 1992; CROFT et al., 1993). Os hidroperóxidos derivados da lipoxigenase podem ser metabolizados dando origem a moléculas de aldeídos voláteis e jasmonatos em vegetais (MOSBLECH et al., 2009). Essas moléculas possuem um papel importante no processo de sinalização na cicatrização de ferimentos das plantas (ANDREOU e FEUSSNER, 2009).

Assim, as lipoxigenases estão associadas à importantes processos fisiológicos nos seres vivos, como: biossíntese de compostos regulatórios, crescimento e desenvolvimento (SIEDOW, 1991), senescência (ROUET MAYER et al., 1992), germinação de sementes (PARK et al., 1994), resposta a ferimentos (VIEIRA et al., 2001), proteína de reserva

vegetativa (STEPHENSON et al., 1998) e na resistência à estresse biótico e abiótico (SONG et al, 2016).

Estudos de transcriptoma de pimenta-do-reino, desenvolvido previamente por Moreira et al., (2017), mostram o padrão de expressão alterado de diversos genes em resposta ao patógeno *Fusarium solani* dentre eles o gene lipoxigenase. Diante disso, o isolamento e caracterização do gene lipoxigenase é de grande importância para dar suporte à validação do mesmo e ajudar a entender seu envolvimento nos mecanismos moleculares de resposta da planta ao patógeno.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar parcialmente o gene lipoxigenase em pimenta-do-reino.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter plantas de pimenta-do-reino;
- ✓ Isolar o DNA genômico da planta;
- ✓ Selecionar e isolar o gene da lipoxigenase em pimenta-do-reino;
- ✓ Caracterizar o gene por meio de recursos computacionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Foram utilizadas folhas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* cv. Bragantina) (Figura 7), fornecidas pela EMBRAPA Amazônia Oriental (Belém - PA) com cerca de dois meses de idade. As folhas foram lavadas usando água destilada, em seguida, acondicionadas à -20 °C para sua conservação.

Figura 7 – Folha de pimenta-do-reino cultivar Bragantina utilizada para extração de DNA.



Fonte: Autor da pesquisa, 2018

4.2 Desenho dos iniciadores

Para a construção dos iniciadores foram utilizadas sequências de nucleotídeos de diferentes espécies vegetais disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após a obtenção das sequências estas foram colocadas em formato fasta e em seguida, alinhadas usando o programa Multalin (F. CORPET, 1988). A partir do alinhamento foi construído os iniciadores Forward (no sentido químico 5'– 3') e Reverse (no sentido químico 3'- 5') usando o programa Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007).

4.3 Extração do DNA

O DNA genômico vegetal foi extraído seguindo o protocolo do Kit “PureLink Plant Total DNA Purification Kit”, disponível comercialmente. Para extração foi macerado cerca de 20 mg de folha de pimenta-do-reino com o auxílio de nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado 250 µl de Resuspension Buffer (R2) e depois vortexado por alguns segundos para homogeneização. À amostra foi adicionado 15 µl de SDS 20% e 15 µl de RNase e em seguida, o material foi incubado a 55 °C até sua completa digestão. Após isso, o material passou por centrifugação por 5 minutos na maior velocidade para remoção de qualquer material insolúvel. Adicionou-se 100 µl de Precipitation Buffer (N2) e incubou-se no gelo por 5 minutos. O material foi centrifugado na velocidade máxima por 5 minutos à temperatura ambiente e transferido 250 µl do sobrenadante para outro microtubo. Por fim, foi acrescentado 375 µl de Binding Buffer (B4). Para a purificação, a amostra foi transferida para o tubo contendo a coluna de sílica. O material foi centrifugado à 13.370 RPM por 30 segundos e foi adicionado 500 µl de Wash Buffer (W4) para lavagem. Procedeu-se a centrifugação a 13.370 RPM por 30 segundos. Dando continuidade foi adicionado 500 µl de Wash Buffer (W5) e após isso, centrifugou-se a amostra à 13.370 RPM por 30 segundos. A lavagem foi repetida com o tampão W5 para total remoção de qualquer resíduo de Wash Buffer. O material passou por centrifugação a maior velocidade por 2 minutos. Foi adicionado 100 µl de Elution buffer (E1) à coluna e deixado em temperatura ambiente por 1 minuto e o material foi centrifugado a velocidade máxima por 1 minuto. O DNA extraído foi estocado a -20 °C.

4.4 Amplificação do gene por PCR

O DNA foi amplificado por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando os iniciadores sintetizados em laboratório. O volume total da reação de PCR utilizada foi 25 µl, sendo 2,5 µl de Tampão 10x, 0,5 µl de MgCl₂ (Cloreto de Magnésio), 0,75 µl de dNTP, 1 µl para cada iniciador forward e reverse do gene, 0,25 µl da enzima Taq polimerase, 2,5 µl de DNA vegetal e água ultrapura Milli-Q para completar a reação. Para amplificação do gene, foi utilizado o termociclador “Amplitherm” de acordo com as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, em seguida 35 ciclos com 1 minuto 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. O resultado da PCR foi visualizado em gel de agarose 0,8%, e fotografado com o auxílio da foto documentadora.

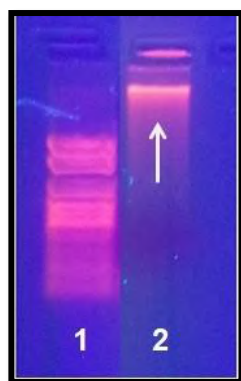
4.5 Caracterização do gene lipoxigenase

A caracterização da sequência do gene de lipoxigenase em pimenta-do-reino, obtida a partir do sequenciamento realizado por Moreira et al., (2017), foi realizada por meio dos seguintes passos: Para a busca de similaridade, as sequências de nucleotídeos de pimenta-do-reino foram analisadas por comparação em banco de dados biológico utilizando o programa Blast-X (ALTSCHUL et al., 1990). O Programa Expasy (ARTIMO et al., 2012) foi usado para identificar possíveis matrizes de leitura e fazer a identificação das sequências de aminoácidos. A avaliação de possíveis domínios na sequência isolada foi feita usando os bancos de dados o Blast-X e pfam (FINN, 2016). O servidor Phyre2 (KELLY et al., 2015) foi usado para modelagem e previsão da estrutura secundária da proteína obtida. O programa PDB (BERMAN et al., 2000) foi consultado para visualizar a estrutura tridimensional da proteína lipoxigenase com maior similaridade à de pimenta-do-reino. Em seguida, a sequência de lox foi predita por meio de modelagem comparativa usando o servidor Swiss Model (GUEx et al., 2009). A avaliação da qualidade do modelo foi observada a partir da pontuação GMQE (Global model Quality estimation) e do Qmean. O GMQE é dado pelo número entre 0 e 1 e reflete a precisão esperada do modelo construído. Números mais altos refletem maior confiabilidade. O Z-escore do Qmean em torno de zero indica boa concordância entre a estrutura do modelo e a estrutura experimental de tamanho similar.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA genômico para pimenta-do-reino mostrou-se satisfatória. Na imagem abaixo (Figura 8) é possível observar a presença de uma banda íntegra, representando a extração de DNA de qualidade.

Figura 8 – Resultado da extração do DNA de pimenta-do-reino. A banda destacada pela seta indica que há integridade no DNA extraído. (1) Marcador. (2) DNA genômico.



Fonte: Autor da pesquisa, 2018

As espécies utilizadas para construção dos iniciadores, bem como seu número de acesso no banco de dados são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Espécies utilizadas para o alinhamento das sequências do gene lipoxigenase obtidas no banco de dados NCBI.

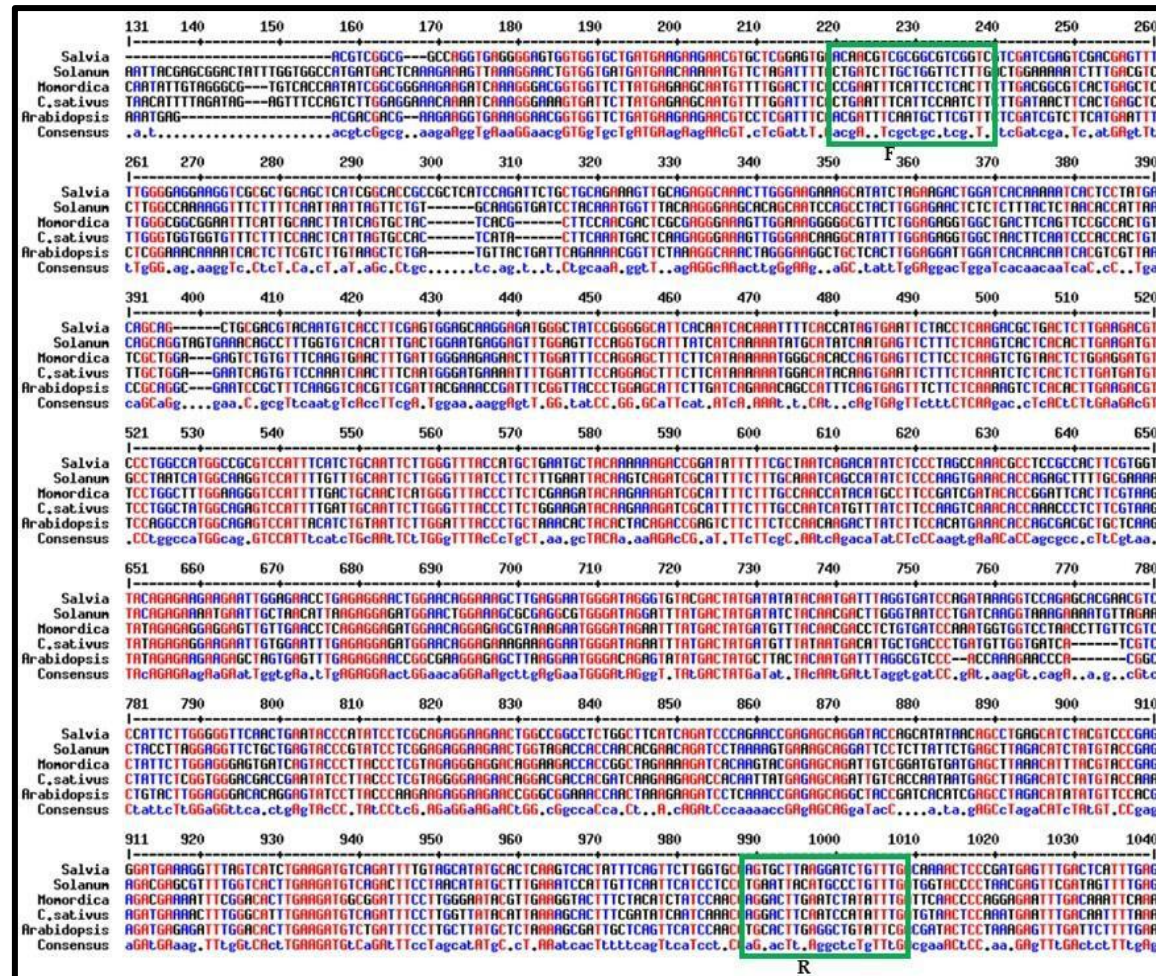
ESPÉCIE	NOME POPULAR	NÚMERO DE ACESSO
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	salvia vermelha	JX297420.1
<i>Solanum tuberosum</i>	batata	Y18548.1
<i>Momordica charantia</i>	melão São Caetano	AM930395.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	—	L04637.1
<i>Crocus sativus</i>	açafrão	X92890.1

Fonte: Adaptado NCBI, 2018

O alinhamento mostrado na figura 8 permitiu observar alto grau de conservação entre as sequências e foi usado para construção dos iniciadores para o gene lipoxigenase em pimenta-do-reino. Na figura 8 são destacadas, em verde, as regiões selecionadas para o

desenho dos iniciadores Forward e Reverse. Os iniciadores construídos foram denominados Lox3F (no sentido químico 5'– 3') e Lox3R (no sentido químico 3'- 5'). As sequências dos iniciadores sintetizados estão apresentadas na tabela 3.

Figura 9 – Alinhamento de sequências do gene lipoxigenase em diferentes espécies vegetais, em verde estão indicados os iniciadores sintetizados (F) Forward e (R) Reverse.



Fonte: Autor da pesquisa, 2018

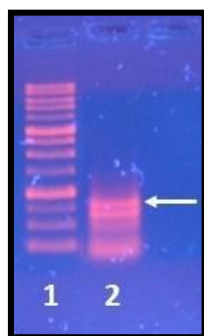
Tabela 3 – Sequência dos iniciadores sintetizados para o gene lipoxigenase de pimenta do reino. TM – Temperatura média

INICIADOR	SEQUÊNCIAS	TM
LoxPn3F	ATCATTTGGGCGTCTCTGCT	56.2 °C
LoxPn3R	GTGTGTTGCACTGCACTTCC	57.2 °C

Fonte: Autor da pesquisa, 2018

O resultado da amplificação do gene isolado é mostrado na figura 9. Ao analisar a figura 9 pode ser observado que ocorreu à amplificação de um fragmento parcial com cerca de 750 pares de base.

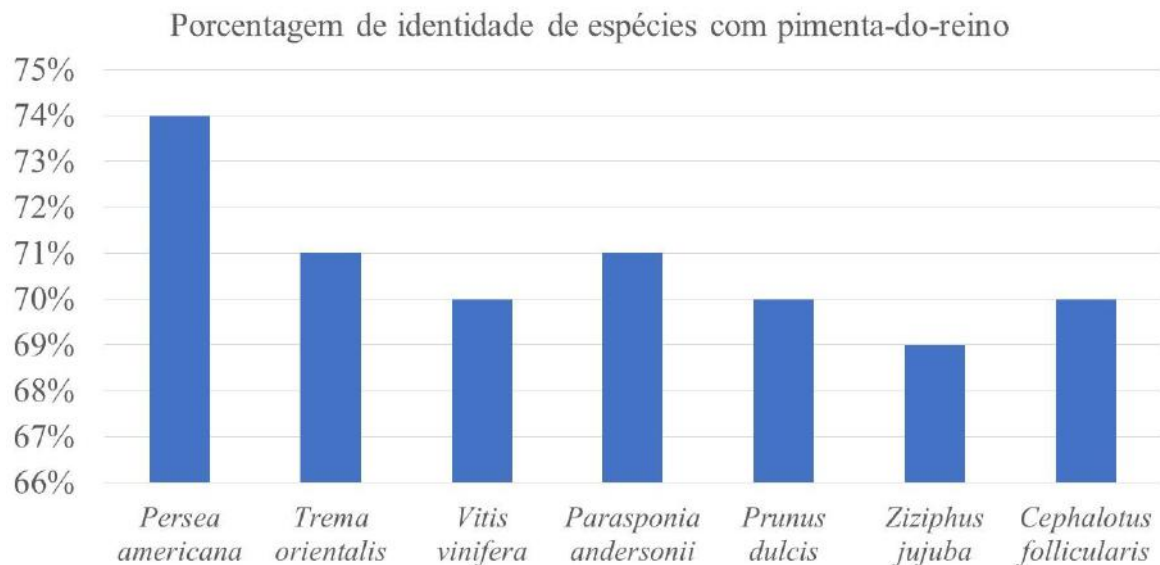
Figura 10 – Isolamento parcial do gene lipoxigenase. (1) Marcador. (2) Fragmentos amplificados. A seta indica um fragmento em torno de 750 pb.



Autor da pesquisa, 2018

A análise da sequência de nucleotídeos feita com o programa BlastX, permitiu mostrar que a sequência 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* que apresenta 74% de similaridade com o gene parcial isolado de pimenta-do-reino, *Parasponia andersonii* e *Trema orientalis* com 71%, *Vitis vinífera*, *Prunus dulcis* e, *Cephalotus follicularis* com 70% e *Ziziphus jujuba* que apresenta 69% de similaridade (Figura 11).

Figura 11 – Porcentagem da identidade do gene lipoxigenase de pimenta-do-reino comparadas em diferentes espécies utilizando o programa BlastX.



Fonte: Adaptada do BlastX

A análise feita utilizando o programa Expsy, mostrou que a proteína isolada possui cerca de 750 nucleotídeos, que codificam 258 aminoácidos como mostrado na imagem abaixo (Figura 11).

Figura 12 – Sequência de nucleotídeos da proteína de pimenta-do-reino sequenciada (em preto) e a sequência de aminoácidos traduzida (em vermelho).

```

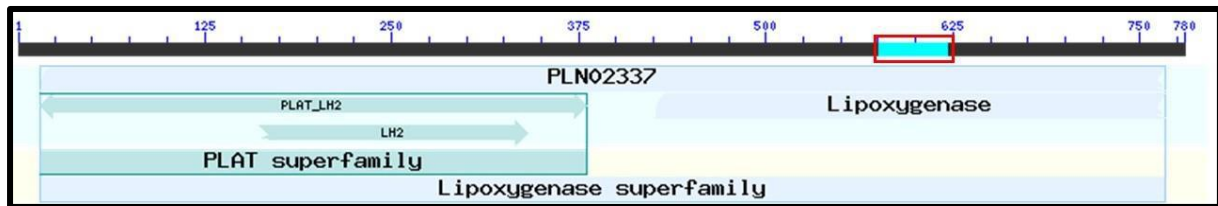
atcatttggcgctctctgctcttgacaaattacacgagcttggtggcaaaggtgtagcttttcagctcattagt
H L G V S A L D K L H E L V G K G V A F Q L I S A
ctgatcatggagaccagaaatgggcaaccgagggcgtggtgggggatgaggcatatttgcagaactggatcaca
D H G D P E M G N R G V V G D E A Y L Q N W I T T
ccataacgccggtggtggccggtgagtcgaccttcaagctgacgttcaactgggatgaggcattaggaacaccag
I T P V V A G E S T F K L T F N W D E A L G T P G
gggctttgctagtcaagaaccatcatcacagtgcgttcctgctcaagaccctcaccctacaagatgtccccggca
A L L V K N H H H S E F L L K T L T L Q D V P G I
tcggtcggatccactttgtatgcaactcttggtgtacccaacgaaatactacaaacatgaccgtatcttctttg
G R I H F V C N S W V Y P T K Y Y K H D R I F F A
ctaaccagagctatctacctagaaacacaccgttgacactggtaccttacccgggaggaagagctagcccaactta
N Q S Y L P R N T P L T L V P Y R E E E L A Q L R
gaggagatggaaatggggagctacaggagtggtggacaggggtgtactatgcttactacaacgacttggggcgacc
G D G N G E L Q E W D R V Y D Y A Y N D L G D P
cagacaaaagcccagacaatgcacggccagtgctgggaggggtccaaagagtacccttatccaaggaggggaagaa
D K S P D N A R P V L G G S K E Y P Y P R R G R T
ccggcagaaaaacccacaaaaacagacccccaaacggaaagccggttgccgctactaagcttggacatatatgttc
G R K T D P Q T E S R L P L L S L D I Y V P R D E
cgagagatgagagatttgggcacctcaagatgtcagatttcttggcgtagcactgaagtccattgtgcaatttc
R F G H L K M S D F L A Y A L K S I V Q F L V P E
tagttccggaagtgcagtgcacacac
V Q C N T

```

Fonte: Autor da pesquisa, 2018

O resultado da análise usando o programa Pfam e BlastX mostrou que a proteína isolada de pimenta-do-reino possui os domínios Plat-LH2 e lipoxigenase (Figura 12).

Figura 13 – Domínio lipoxigenase conservado encontrado na proteína parcial de pimenta-do-reino é destacado em vermelho na figura.



Fonte: BlastX

As sequencias de aminoácidos que fazem parte dos domínios lox e Plat de pimenta-do-reino são mostrados na figura abaixo. (Figura 13).

Figura 14 – Sequência de aminoácidos do gene lipoxigenase. Em vermelho é destacado o domínio lipoxigenase. Em azul encontra-se o domínio Plat. Em verde o domínio LH2

H	L	G	V	S	A	L	D	K	L	H	E	L	V	G	K	G	V	A	F	Q	L	I	S	A
D	H	G	D	P	E	M	G	N	R	G	V	V	G	D	E	A	Y	L	Q	N	W	I	T	T
I	T	P	V	V	A	G	E	S	T	F	K	L	T	F	N	W	D	E	A	L	G	T	P	G
A	L	L	V	K	N	H	H	S	E	F	L	L	K	T	L	T	L	Q	D	V	P	G	I	
G	R	I	H	F	V	C	N	S	W	V	Y	P	T	K	Y	Y	K	H	D	R	I	F	F	A
N	Q	S	Y	L	P	R	N	T	P	L	T	L	V	P	Y	R	E	E	E	L	A	Q	L	R
G	D	G	N	G	E	L	Q	E	W	D	R	V	Y	D	Y	A	Y	Y	N	D	L	G	D	P
D	K	S	P	D	N	A	R	P	V	L	G	G	S	K	E	Y	P	Y	P	R	R	G	R	T
G	R	K	T	D	P	Q	T	E	S	R	L	P	L	L	S	L	D	I	Y	V	P	R	D	E
R	F	G	H	L	K	M	S	D	F	L	A	Y	A	L	K	S	I	V	Q	F	L	V	P	E
V	Q	C	N	T																				

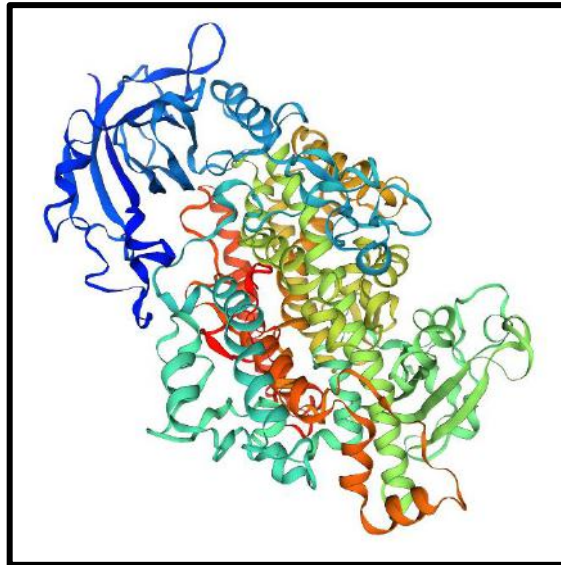
Fonte: Autor da pesquisa, 2018

Proteínas do tipo lipoxigenase possuem normalmente um domínio Plat-LH2 na região amino-terminal e um domínio lipoxigenase na região carboxi-terminal (SONG et al., 2016). O domínio Plat é encontrado em uma grande quantidade de proteínas ou lipídios associados a membranas podendo apresentar um único domínio ou estar repetido (BATEMAN e SANDFORD, 1999; HONG et al., 2000; MINOR et al., 2006; SHIN et al.,

Fonte: Phyre2

Em relação a estrutura terciária, a proteína isolada é similar a estrutura da proteína lipoxigenase de soja (1rrl2.A) (Figura 15).

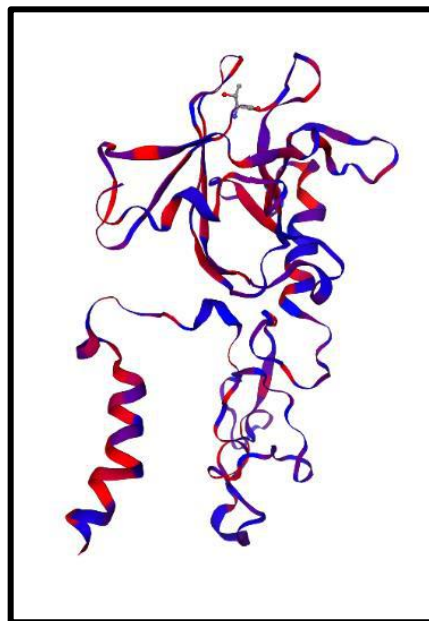
Figura 16 – Proteína de lipoxigenase em soja completa (1rrl2.A)



Fonte: Swiss model

O modelo da estrutura terciária construído para pimenta-do-reino usando o servidor Swiss model é mostrado na figura abaixo (Figura 16). As regiões mostradas em azul são as regiões polares e em vermelho são destacadas a regiões hidrofílicas. O modelo construído é um modelo confiável de acordo com a medida de QMEAN e GMQE em torno de 0,77 observada.

Figura 17 – Estrutura terciária parcial da proteína lipoxigenase de pimenta-do-reino



Fonte: Swiss model

CONCLUSÃO

O trabalho permitiu a caracterização parcial do gene de lipoxigenase em pimenta-do-reino. O gene isolado possui em torno de 750 pares de bases e similaridade com diferentes espécies vegetais, como: *Persea americana*, *Parasponia andersonii* e *vitis vinífera*. O gene codifica 258 aminoácidos e apresenta os domínios Plat-LH2 e lipoxigenase, relatados na literatura como importantes para a defesa da planta contra patógeno. A proteína isolada é do tipo 9-lipoxigenase, importante para ativação da defesa local, da resistência sistêmica e ativação de outras respostas de defesa das plantas. Além disso, a análise da estrutura secundária e terciária da proteína mostrou que a mesma possui similaridade à proteína lipoxigenase de soja. Os resultados alcançados representam 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 auxiliar programas de melhoramento genético.

PERSPECTIVAS

Diante dos resultados do trabalho, temos como perspectivas:

- ✓ O isolamento total da proteína lipoxigenase em pimenta-do-reino;
- ✓ Realização de estudos de expressão gênica para a proteína isolada, permitindo assim, a validação de trabalhos *in sílico* realizados previamente;
- ✓ Apresentação dos resultados obtidos no Congresso Internacional de Genética 2018;
- ✓ Publicação do estudo em revista científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F. C., e CONDURÚ, J. M. P. Cultura da pimenta-do-reino na região amazônica. Belém. IPEAN. **Série Fitotecnia**, v. 2, n.3, 1971.
- ALBUQUERQUE, F. C., e DUARTE, M. L. R. **Comportamento de cultivares de pimentado- reino em áreas de ocorrência de fusariose no Estado do Pará**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental CPATU, (Documentos 59), p. 40, 1991.
- 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.
- ALBUQUERQUE, F. **Podridão das raízes e do pé da pimenta-do-reino**. IPEAN. Cir, p. 45, 1961.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. "Basic local alignment search tool." **Jornal of Molecular Biology**. 215:403-410. 1990.
- ANDREOU A. E.; BRODHUN F. e FEUSSNER I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. **Progress in Lipid Research**. 48: 148–170, 2009.
- ARTIMO P, et. al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, **Nucleic Acids Research**, 40(W1):W597-W603, 2012.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.e LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods in Enzymology**, 71:441-451, 1981.
- BARBOSA, F. B. C. DA. **Pesquisa agropecuária na Amazônia Brasileira: institucionalização e padrão do financiamento dos investimentos em C&T agrícola**. Belém, 1998.
- BARBOSA, F. B. DA C. Biotecnologia molecular e novo padrão de financiamento: Possibilidades para pesquisa da fusariose da pimenta-do-reino. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 429–449, 2002.
- BATEMAN A e SANDFORD R. The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. **Current Biology**, v, 9, p. 588–590. 1999.
- BERMAN, J H.M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, 28: 235-242. 2000.
- 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.
- CORPET F., "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering", **Nucleic Acids Research**., 16 (22), 10881-10890. 1988.
- CROFT, K.P.C.; JÜNTTER, F. e SLUSARENKO, A.J. Volatiles products of the

lipoxygenase pathway involved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiology**, 101:13-24, 1993.

DUARTE M DE L.; ALBUQUERQUE F. C. e POLTRONIERI M. **Phytohossanitary conditions of black pepper cultivars crop in Brasil**. International Pepper Community, 1, 16–22, 2002.

DUARTE, M. L. R. e ALBUQUERQUE, F. C. **Secamento dos ramos da pimenta-do-reino**. In: 1o Simpósio do Trópico Úmido, 1984, Belém, PA. Anais Brasília: Embrapa- DDT, 4 (383-394.). 73. 1986.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema de produção da pimenteira-do-reino**. Disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br/sistemasdeproducao/pimenta_do_reino/paginas/apresentacao.htm>. Acessado em: 28 Jan. 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br/sistemasdeproducao/pimenta_do_reino/paginas/apresentacao.htm>. Acessado em: 28 Jan. 2018.

FARMER, E.E. e RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the syntesis of wounding inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, 4:129-134, 1992.

FERNANDES, C. DE F. et al. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Embrapa, 2009.

FEUSSNER, I. e WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 275–297, 2002.

FINN, R.D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, (2016).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Agricultural statistics database**. Rome: World Agricultural Information Center, 2016. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 9 fev. 2018.

GARCION, C.; LAMOTTE, O. e MÉTRAUX, J. P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D.; NEWTON, A. e LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, p. 109-132, 2007.

GOODMAN, R., KIRALY, Z., e WOOD, K. **The biochemistry and physiology of plant disease**. p. 433, 1986.

GUEx, N., PEITSCH, M. C., SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis** 30, S162-S173, 2009.

GUZZO, S.D. **Aspectos Bioquímicos e Moleculares da Resistência Sistêmica Adquirida em Cafeeiro contra Hemileia vastatrix**, 2004.

HONG Y., et al. An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97:8717–8722, 2000.

HWANG, I. S., e HWANG, B. K. The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. **Plant physiology**, 152(2), 948–67, 2010.

HYUN, T. K. et al. The Arabidopsis PLAT domain protein1 promotes abiotic stress tolerance and growth in tobacco. **Transgenic Research**, v. 24, n. 4, p. 651–663, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>>. Acessado em 20 de julho de 2018.

JARAMILLO, M. A., e MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, 88(4), 706–716, 2001.

KELLY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

LE MOS, O. F. et al. **Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no Estado do Pará**. Brasília – DF, Embrapa, p. 1-54, 2014.

LE MOS, O. F. et al. **Conservação e Melhoramento Genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em Associação com as Técnicas de Biotecnologia**. Belém – PA, Embrapa, v. 1, p. 1-45, 2011.

LIU, Y. et al. Inhibitory effects of black pepper (*Piper nigrum*) extracts and compounds on human tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzymes, lipid peroxidation and nuclear transcription factor-kappa-B. **Natural Product Communications**, 5(8), :1253–7, 2010.

LÓPEZ M. A., et al. Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. **Plant**, v. 67 p. 447–458. 2011.

CARLOS, C. E. A. Mapa do Brasil. Disponível em: <<http://www.dnit.gov.br/planejamento-e-pesquisa/dnit-geo/mapas-multimodais/mapaBrasil20213.jpg/view>>. Acessado em: 25 de junho de 2018.

MARCOS, R. et al. 9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins Activate Brassinosteroid Signaling to Promote Cell Wall-Based Defense and Limit Pathogen Infection 1. **Plant Physiology**, v. 169, p. 2324–2334, 2015.

MELAN, M. A. et al. An Arabidopsis thaliana lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant physiology**, 101(2), 441–50, 1993.

MENEZES I. C. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper, *Piper nigrum* L. (piperaceae). **Conservation Genetics Resources**, p. 209–212, 2009.

MINOR W., et al. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. **Biochemistry**, 2006.

MONTILLET, J. L. et al. An abscisic acid-independent oxylipin pathway controls stomatal closure and immune defense in Arabidopsis. **PLoS Biology**, p. 1-11, 2013.

MOREIRA, E. C. O. et al. Transcriptional profiling by RNA sequencing of black pepper (*Piper nigrum* L.) roots infected by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 10, p. 239, 2017.

MOSBLECH, A.; FEUSSNER, I. e HEILMANN, I. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. **Plant physiology**, 2009.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acessado em 05 de julho de 2018.

NELSON, S. e EGER, K. Black pepper (*Piper nigrum*). In **Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Black Pepper (*Piper nigrum*)**. Holualoa: Permanent Agriculture Resources (PAR), p. 1-14, 2011.

NISHIMURA Y. et al Ethanol extracts of black pepper or turmeric down-regulated SIRT1 protein expression in Daudi culture cells. **Molecular Medicine Reports**, 727–730, 2011.

NURNBERGER, T., et al. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Plant Cell**, V78, p.449–60, 1994.

PARK, T.K.; HOLLAND, M.A.; LASKEY, J.G.; POLACCO, J.C. Germination-associated lipoxygenases transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. **Plant Science**, 96:109-117, 1994.

PASCHOLATI, S., e LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismo de resistência. In: Bergamin FILHO, A.; KIMATI, H. AMORIM L. (Ed). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronomia Ceres, V.1, Cp. 22 p. 417–454.1995.

PISSINATE, KENIA. **Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos**. Seropédica, p. 1-94, 2006.

POLTRONIERI, M. C.; ALBUQUERQUE, F. C. e OLIVEIRA, M. R. C. Retrospectiva, avanços e perspectivas no melhoramento genético de pimenta-do-reino visando resistência à fusariose. **Fitopatologia Brasileira**, 25:, 246–248, 2000.

PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. **Plant Physiology**, v. 130, p. 15–21, 2002.

ROUET MAYER, M.; BUREAU, J.; LAURIERI, C. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals **Plant Physiology**, 98:971-978, 1992.

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.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.** Piracicaba: FEALQ, p.227-248. 2008.

SERRANO, L. A. L.; LIMA, I. M.; MARTINS, M. V. V. **A cultura da pimenteira-do-reino do Estado do Espírito Santo.** Vitória: INCAPER, P. 34, 2006.

SHIN R., KIM M. J., PAEK K. H. The CaTin1 (Capsicum annuum TMV-induced clone 1) and CaTin1-2 genes are linked head-to-head and share a bidirectional promoter. **Plant Cell Physiology**, p. 549–554, 2003.

SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. Ann. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, 42:145-188, 1991.

SONG, H. *et al.* Identification of lipoxygenase (LOX) genes from legumes and their responses in wild type and cultivated peanut upon *Aspergillus flavus* infection. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

STEPHENSON, L. C. et al. Specific Soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs. **Plant Physiology**, 116: p. 923–933, 1998.

UNTERGASSER, A; et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, p. 35, 2007.

VICENTE J, et al. Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. **Molecular Plant** 5: 914–928, 2012.

VIEIRA, A.A. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 13:5-12, 2001.

WALPER, E. et al. Screen identifying arabidopsis transcription factors involved in the response to 9-lipoxygenase-derived oxylipins. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–17, 2016.

WALTERS, D.R.; RATSEP, J. e HAVIS, N.D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, p. 1- 18, 2013.

WANG C, et al. Subcellular localization studies indicate that lipoxygenases 1 to 6 are not involved in lipid mobilization during soybean germination. **Plant Physiology**, p. 227–235, 1999.

ZHU, Y.J. et al. Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 63:237-248, 2003.

