



## Sequenciamento dos transcritos de *Piper nigrum* L. infectada com *Fusarium solani* f.sp.*piperis* utilizando Plataforma de nova geração

**Resumo:** Neste trabalho nós extraímos o RNA total e isolamos o mRNA de raízes de *Piper nigrum* L. infectada com o fungo *Fusarium solani* f.sp. *piperis* na fase mais severa da infecção, para construção de uma biblioteca de fragmentos utilizando o método RNA-Seq. A biblioteca gerada foi sequenciada utilizando a plataforma de nova geração “*SOLiD™ 3 Plus System*” (*Applied Biosystems, EUA*) produzindo 67.452.415 leituras com 50 pb. As leituras obtidas foram pré-processadas com softwares de Bioinformática para obtenção de leituras de alta qualidade. Para avaliar os dados pré-processados estatisticamente, foi utilizado o software FASTQC. Os resultados obtidos foram leituras com alta qualidade que serão usadas no processo de montagem, a fim de obter uma lista de transcritos de Planta expressos em resposta a infecção pelo patógeno.

**Palavras-chave:** *Piper nigrum* L., Bioinformática, Sequenciamento de nova geração.

### Introdução

A pimenta -do -reino (*Piper nigrum* L.) é uma especiaria consumida mundialmente que possui grande importância sócio-econômica (Albuquerque *et al.*, 2001). O Brasil é um dos maiores produtores dessa cultura (F Nations, 2010), sendo o estado do Pará, o maior produtor nacional. Um dos principais gargalos para pipericultura é a doença conhecida como Fusariose, ocasionada por *Fusarium solani* f. sp *piperis*. Essa doença causa redução do tempo de vida útil dos pimentais e morte prematura da planta, ocasionando elevadas perdas em todas as áreas produtoras de Pimenta-do-reino (Albuquerque and Ferraz, 1976). Várias medidas já foram adotadas para contenção da fusariose (Duarte and Albuquerque, 1980; Benchimol *et al.*, 2000; Benchimol *et al.*, 2003), no entanto as mesmas tem se



mostrado com eficácia paliativa. Estudos que venham contribuir para um melhor entendimento de como a planta responde a infecção do patógeno podem ser considerados de suma importância, já que podem ajudar no desenvolvimento de estratégias mais efetivas de controle a doença. Desta forma o presente trabalho tem como objetivo sequenciar os transcritos de *Piper nigrum* L. produzidos em resposta a infecção de *Fusarium solani* f.sp.*piperis* utilizando a plataforma de nova geração SOLiD e processar as sequencias obtidas por meio de ferramentas de Bioinformática.

### **Material e Métodos**

Plantas de Pimenta-do-reino com 2 meses de idade infectadas com *Fusarium solani* f. sp. *Piperis* foram obtidas na EMBRAPA Amazônia Oriental. O RNA total de raízes e da região central do caule foi extraído usando “Illustra RNAspin Mini Kit” (GE Healthcare, USA). O mRNA foi extraído com os kits “RiboMinus Eukaryote kit for RNA-seq” e “RiboMinus plant kit for RNA-seq”. As sondas dos dois kits foram misturadas para obtenção de mRNA tanto de planta como de fungo. O mRNA foi purificado e utilizado na construção da Biblioteca feita com o kit “SOLiD™ Total RNA-Seq Kit (Applied Biosystems™ – Life Technologies) que utiliza PCR em emulsão. Para o sequenciamento as beads foram quantificadas e depositadas em ¼ de uma lâmina de sequenciamento no sequenciador “SOLiD™ 3 Plus System” (Applied Biosystems, EUA). Essas sequencias foram submetidas a análises preliminares de Bioinformática com os softwares CUTADAPT (V 0.9.5) (Martin, 2011), PRINSEQ (lite 0.14.4) (Schmieder and Edwards, 2011) e FASTQC para obtenção de sequencias de alta qualidade.

### **Resultados e Discussão**

Após 70 dias de cultivo em casa de vegetação, obtivemos plantas com sintomas característicos da doença fusariose, apresentando o sistema condutor de seiva enegrecido. As raízes de planta infectada,



bem como a região mais central do caule foram usadas para extração do RNA total, sendo que a integridade do mesmo pôde ser vista a partir da detecção das bandas 18S e 28S. Após o isolamento do RNA total foi feito o isolamento do mRNA, através da depleção do rRNA. O mRNA foi fragmentado e utilizado para ligação do adaptador com extremidades degeneradas. O resultado da amplificação após a transcrição reversa, purificação e seleção dos fragmentos entre 150 e 250 pb foi usado no sequenciamento. A biblioteca de fragmentos construída gerou uma concentração de aproximadamente 750.000.000 *beads* recuperadas/ $\mu$ L. 15.000.000 de *beads* foram usadas na pré-corrida WFA. O resultado da WFA mostrou que 95% das *beads* estão no eixo, indicando que a maioria das *beads* são monoclonais e que há alta qualidade das *beads* para o sequenciamento. O sequenciamento usando a plataforma SOLiD gerou 67.452.415 leituras com 50 pb (3.2 Gbp). Após o pré-processamento 13.339.422 *reads* de alta qualidade (667 Mbp) foram obtidas. A média da qualidade por base observada, utilizando o software FASTQC aumentou após o pré-processamento de 15 a 27 para 22 a 28, sendo que mais de 80% das leituras geradas tem um comprimento superior a 45 pb. As sequências de alta qualidade estão sendo usadas no processo de montagem “De novo” para obtenção dos transcritos de Planta expressos em resposta a infecção pelo patógeno.

### Conclusão

O sequenciamento de transcritos de *Piper nigrum* L. expressos em resposta à infecção de *Fusarium solani* f.sp. *Piperis* é de suma importância, já que estudos de como a planta responde a infecção do fungo a nível molecular são escassos. Plataformas de nova geração podem produzir uma grande quantidade de dados, que através do processamento por Bioinformática podem levar a uma resposta biológica e a um melhor entendimento de como a planta responde a infecção pelo patógeno. Esse entendimento pode ajudar no desenvolvimento de estratégias mais efetivas de controle a doença e pode ser utilizado em programas de melhoramento genético.



### **Agradecimentos**

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, ao CNPQ pela Bolsa concedida, ao laboratório de polimorfismo de DNA, ao Laboratório de Bioinformática do Hemocentro de Ribeirão Preto, à EMBRAPA Amazônia Oriental pelo fornecimento do material Biológico, ao laboratório de Genética e Biologia Molecular de Bragança.

### **Referências Bibliográficas**

Albuquerque F C, Duarte M L R, Benchimol R, and Endo T (2001). Resistência de piperáceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. *Acta Amazonia*, v. 31,(n.3), p.341-348.

Albuquerque F C, and Ferraz S (1976). Características morfológicas e fisiológicas de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* e sua patogenicidade à pimenta-do-reino. *Experientia*, 22, 133-151.

Benchimol R L, Chu E, Yuitimoto R, and Dias-Filho M B (2000). Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 35:, 1343-1348.

Benchimol R L, Sutton J C, and Dias-Filho M B (2003). Uso da casca de caranguejo no controle da fusariose e no desenvolvimento de mudas de pimenta-do-reino. In: XXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2003, Uberlândia, MG. *Fitopatologia Brasileira - SUPLEMENTO*. Belém: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 28:, 346-346.

Duarte M L R, and Albuquerque F C (1980). Eficiência de diferentes fungicidas no tratamento de estacas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) infectadas por *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*). *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, n. 2, p. 169-175.

F Nations (2010). *FaAOotU: FAO Statistics of Agricultural*.