

# NGUỒN TƯ LIỆU DI TRUYỀN HỒ TIÊU

## NGÂN HÀNG KIẾN THỨC

(BÙI CHÍ BỬU bổ sung ngày 5-8-2020)

### I. ĐA DẠNG DI TRUYỀN HỒ TIÊU

*P. nigrum* hiện nay thích nghi tương đối rộng, trồng được trên vùng đất có những cao trình khác nhau. Đặc điểm sinh thái canh tác hồ tiêu đa dạng đã dẫn đến tính đa dạng di truyền của nó (Howard, 1973). Hồ tiêu đã được sử dụng như thuốc thảo mộc, chống ô xi hóa (antioxidant), chống viêm nhiễm (anti-inflammatory), và chống ung bướu (anticancer) (Liu et al., 2010; Nishimura et al., 2011). Hàng năm, nông dân phải trồng dặm những cây đã mất do bệnh **foot rot**. Bệnh này rất quan trọng cho canh tác hồ tiêu tại nhiều quốc gia (Anandaraj, 2000). Một vài loài tiêu hoang dại như *Piper colubrinum* và *Piper hainanense* được xem như nguồn cho gen kháng sự xâm nhiễm của nấm *Phytophthora capsici* (Fan et al., 2015). Ngân hàng gen hồ tiêu đã được hình thành, bao gồm mẫu giống hồ tiêu trồng và loài hoang dại có nguồn gốc ở châu Á và châu Mỹ. Người ta gặp phải một vài khó khăn khi nghiên cứu đa dạng di truyền hồ tiêu, nếu chỉ dựa trên cơ sở hình thái học. Trên cơ sở chỉ thị phân tử ISSR, 56 mẫu giống hồ tiêu của châu Á và châu Mỹ được chia thành 3 nhóm di truyền tương ứng với phân bố địa lý của chúng (Fan et al., 2014). Bảy cặp mồi của chỉ thi SSR mới đã được tạo ra để tham gia nghiên cứu đa dạng di truyền hồ tiêu của 40 giống trồng chủ lực của Ấn Độ và bốn loài hoang dại miền Nam Ấn Độ (Joy et al., 2011).

Đối với chi *Piper*, chỉ thị phân tử EST-SSR tỏ ra rất hiệu quả và rõ hơn chỉ thi SSR. Theo hệ transcriptome của hồ tiêu (NCBI accession No. SRX119532), chỉ thi EST-SSR đã được phát triển thành công và được áp dụng cho hệ gen hồ tiêu (Wu et al., 2015).

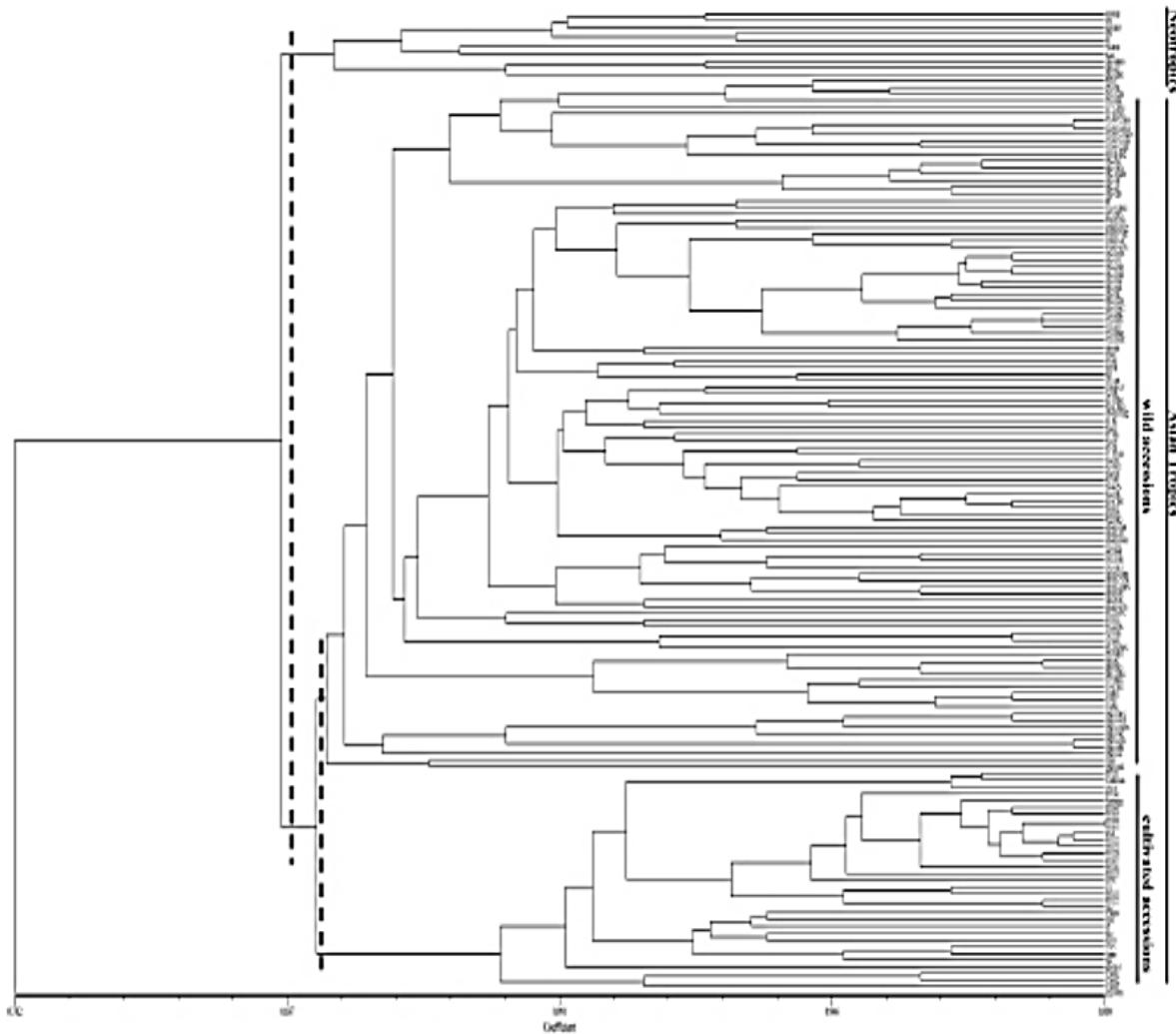
Trong nghiên cứu này, người ta thực hiện phân tích đa dạng di truyền hồ tiêu với 148 mẫu giống, bao gồm loài hoang dại và giống trồng trọt tại châu Á và châu Mỹ, thông qua chỉ thi phân tử **transcriptome EST-SSR**. Hiểu biết về quỹ gen cây hồ tiêu là điều rất quan trọng trong chương trình cải tiến giống tiêu và ghép cành giống, cũng như hoạt động bảo tồn quỹ gen cây tiêu. người ta khai thác 13 chỉ thi phân tử được chọn, có khả năng khuếch đại thành công những loci đích trong tập đoàn quỹ gen cây trồng hồ tiêu. Tất cả chỉ thi phân tử EST-SSR biểu thị tính đa hình cao với giá trị trung bình PIC (polymorphism information content) là 0,93. Chỉ số tương đồng di truyền biến thiên 0,724 đến 1,000, trung bình là 0,867. Kết quả chỉ ra rằng quỹ gen cây hồ tiêu biểu hiện nần tăng di truyền rất phức tạp và rất đa dạng. Theo kết quả phân tích nhóm di truyền, 148 mẫu giống này được chia thành hai clades chủ yếu: đó là Neotropics và Asian tropics. *Peperomia pellucida* được xếp vào nhóm riêng biệt, có khoảng cách di truyền xa với những mẫu giống khác. Kết quả cho thấy có sự thống nhất khoảng cách di truyền và khoảng cách địa lý. Tuy nhiên, nhóm di truyền Asian tropics không tạo nên **cluster** theo nguồn gốc địa lý của chúng. Hơn nữa, so với mẫu giống hồ tiêu châu Mỹ, mẫu loài hoang dại Á châu và mẫu giống trồng trọt Á châu tập hợp trong cùng một nhóm di truyền, cho thấy tương quan rất gần về huyết thống (Wu et al. 2016).

**Table 1.** Primer sequences and characterization for 13 EST-SSR loci from black pepper germplasms.

Locus	Primer sequence	Repeat motifs	Target size (bp)	T <sub>a</sub> (°C)	Origin of isolated libraries	Homologues of gene name	E-value
PE15	F: GTGTTACCTTGGGCATTCA R: TGTCAGGGCATCAAACC	(GT) <sub>13</sub>	130	55	PN	-	-
PE02	F: AGGGATCTTGCAATTGAGTATAG R: TGAATGGTAACTCTCGTATGTG	AG(2*10)	147	55	PN, PF	Uncharacterized protein [ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ]	0.007
PN01	F: CATACTACGGGGTAAAACACCAA R: CCCGCATCTCTATTGACTAGATT	GT(2*9)	154	55	PN	Ribonuclease E/G-like protein, chloroplastic isoform X1 [ <i>Nelumbo nucifera</i> ]	7E-31
PE12	F: CCGGCATCTCTATTGACTAGATT R: TCTCCATTCTCGCTTCTTGAG	TG(2*10)	155	55	PN	Arginine decarboxylase [ <i>Malus domestica</i> ]	0
PE07	F: GTTGAGATTCTTCTGCTTC R: TATCGAATTGTTTGTGACTC	TA(27)	140	55	PF	-	-
PE06	F: ATAGAGTGAACCGAAAAGACTCGG R: CATTCCATTGAAGGTAGAGGA	CTT(3*5)	160	55	PN, PF	Thioredoxin z, P <sub>t</sub> TRX z isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	0
PN02	F: GTCGTATGCGATGTC R: AGGTATGAGTGGTCTTGCG	CCG(3*5)	160	53	PN	Signal peptide peptidase-like 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	0
PN03	F: CCTTGATGCAAACCTCATAGAA R: TGAAAATTAAAAGCGTGATAGGA	CAT(3*7)	152	53	PN	-	-
PN04	F: GAATATGGTATCGGAGATCAA R: AAGTGGAAAGAAATCTGAGCA	CTC(3*7)	149	53	PN	-	-
PE13	F: GAAACTCTCACCAACACTCAAC R: ATCATCAAAGGACGAGGAATTG	GCT(3*6)	147	53	PN, PF	Membrane protein-like protein [ <i>Glycine max</i> ]	1E-80
PL01	F: TTGTTGATCTGGATTGTAGTG R: TACAAGAAAACCCAGGAAGATGA	GGT(3*7)	145	53	PF	Putative clathrin assembly protein [ <i>Glycine soja</i> ]	0
PL02	F: AAAGATCAAACCACTGAAAGGTGAA R: TTAATGCATGCTCTTGCCTAAT	ATC(3*6)	135	53	PF	-	-
PE14	F: GATCAAGAGAAATCGTAGCAGCAG R: GTCGGAATCATGTCCTCTAACG	ATG(3*7)	157	53	PN, PF	Cyclin-L1, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	7.00E-92

PN = *Piper nigrum*; PF = *Piper flavidorum*.**Table 2.** Characterization of polymorphic EST-SSR loci in black pepper germplasms.

Locus	PIC	Central American accessions	Asian wild accessions	Cultivated accessions	Number of alleles detected
PE15	0.93	3	11	4	11
PE02	0.93	6	9	6	11
PN01	0.94	7	12	4	14
PE12	0.93	5	10	6	12
PE07	0.93	2	11	8	11
PE06	0.91	3	8	2	10
PN02	0.93	4	12	6	12
PN03	0.91	4	9	3	10
PN04	0.95	8	17	6	19
PE13	0.92	4	11	4	11
PL01	0.92	4	14	6	14
PL02	0.94	12	12	4	15
PE14	0.94	2	10	4	10
Total		64	146	63	160
Mean	0.93	4.92	11.23	4.85	12.31



**Figure 2.** Dendrogram of 148 black pepper germplasms resulting from an UPGMA analysis based on Nei's genetic distance.

## II. GIẢI TRÌNH TỰ HỆ GEN CÂY HỒ TIÊU

Hồ tiêu (*Piper nigrum L.*) là loài cây gia vị nổi tiếng của thế giới. Năng suất hồ tiêu bị thất thoát nhiều do bệnh: **root rot** (bệnh chết chậm) do sự xâm nhiễm của nấm *Fusarium solani* và **foot rot** (bệnh chết nhanh) do sự xâm nhiễm của nấm *Phytophthora capsici*. Người ta cần phải hiểu biết tương tác hết sức rõ ràng giữa ký sinh và ký chủ tại vùng rễ của cây hồ tiêu, từng giống cụ thể thông qua sự hỗ trợ của công nghệ sinh học về tính kháng bệnh. Số liệu di truyền và phân tử của loài hồ tiêu trồng vẫn còn rất hạn chế. Người ta sử dụng kỹ thuật **RNA-Seq** lần đầu tiên để mô tả hệ transcriptome rễ cây hồ tiêu (Gordo et al. 2012). Kết quả được ghi nhận là hệ transcriptome rễ cây hồ tiêu được giải trình tự theo nền tảng **NGS SOLiD** (phương pháp giải trình tự thế hệ mới) rồi được tổng hợp theo phương pháp **Multiple-k**. Người ta giải thích chi tiết chuỗi trình tự này bằng bằng phương pháp **Blast2Go** và **orthoMCL** với tất cả **10.338 unigenes**. Có tất cả 4472 proteins được dự đoán, biểu thị khoảng 52% bản chất đồng dạng (homology) so với hệ proteome của cây *Arabidopsis thaliana*. Hai proteomes của rễ được xác định với 615 proteins, chúng

dường như phản ánh được bản chất của rễ cây hồ tiêu. Chỉ thị phân tử SSRs tỏ ra vô cùng hữu hiệu trong nghiên cứu đa dạng di truyền cây hồ tiêu, được áp dụng trong công nghệ sinh học và sinh môi học. Cơ sở dữ liệu của 10338 unigenes này vô cùng quan trọng cho chương trình cải tiến giống tiêu bằng công nghệ sinh học cũng như cho nghiên cứu **ecogenomics** (Gordo et al. 2012).

Di truyền tính kháng với bệnh do nấm *Phytophthora capsici* và *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, chưa thành công trong chương trình cải tiến giống tiêu, đây là thách thức rất lớn cần được sự hỗ trợ của công nghệ sinh học (Nair 2011). Despite the agricultural and economic importance of black pepper, knowledge of its genetics is presently very limited (Dias và Ortiz 2011). Hồ tiêu không phải là cây mô hình, do vậy cơ sở dữ liệu về chỉ thị phân tử, giải trình tự thế hệ mới (NGS) là cơ hội rất lớn để các nhà khoa học tiếp cận nhanh hơn các thông tin di truyền hiện đại (Hawkin et al. 2010; Lister et al. 2009, Morozova et al. 2009; Wang et al. 2009). Trong sinh học thực vật, do kích cỡ của genomes lớn và mức độ đa bội thể cao, việc định tính hệ transcriptomes cần phải được xem là một công cụ rất quyền lực để phân lập những proteins mong muốn. **RNA-seq** có thể chạy trình tự, có tính chất hiệu quả kỹ thuật rất tốt (extremely high-throughput) và phản ánh được số lượng của hệ transcriptome một sinh vật nào đó hay một mô nào đó (Wang et al. 2009). Công nghệ NGS phát sinh ra số lượng vô cùng lớn số lần đọc trình tự (reads) với mức độ lấy mẫu rất cao của thư viện cDNA, do đó, kết quả làm cho chúng ta có cách nhìn sâu hơn và toàn diện hơn hệ transcriptomes (Morozova et al. 2009). Chạy trình tự theo phương pháp **transcriptome-wide description** xác định được trình tự mang mật mã di truyền, chỉ thị SNPs, những đa hình khác, biến thể của nội dung **splicing** (nội exon và cắt rời intron), mức độ biểu hiện tương đối do kỹ thuật đếm số lần đọc (**counting reads**) - phương pháp mang tính chất biểu hiện gen được số hóa (digital gene expression: DGE) (Wang et al. 2009; Nagalakhsni et al. 2010). Phân tích **RNA-seq** hệ transcriptome của hồ tiêu có thể tác động lớn trong hiểu biết của chúng ta về loài cây trồng này. Hồ tiêu thuộc họ Piperaceae, lớp phụ Magnoliid, là thực vật **basal angiosperms** (hạt kín điển hình), nhưng cơ sở dữ liệu genomic ít được công bố. Cơ sở dữ liệu transcriptomic từ khai thác sự tiến hóa của họ Piperaceae, người ta có thể phát triển chỉ thị phân tử microsatellites vô cùng hữu ích cho các chương trình cải tiến giống hồ tiêu.

Gordo et al. (2012) đã sử dụng kỹ thuật **RNA-seq** để phân tích hệ transcriptome của cây hồ tiêu. Có khoảng 71 triệu reads phát sinh và 22363 phân tử transcript *de novo* được tổng hợp từ mô của rễ tiêu và thân tiêu. Những phân tử transcripts này có chức năng được xác định bằng phần mềm annotation; đây là lần chạy trình tự đầu tiên từ hệ transcriptome của *P. nigrum*. Người ta mô tả được khoảng 257 chỉ thị SSRs mới. Đây là cơ sở dữ liệu đầu tiên về trình tự của lớp phụ Magnoliid. Kết quả mở ra những triển vọng mới để nghiên cứu đa dạng di truyền và sinh môi học. Nó sẽ rất có ích cho chương trình cải tiến giống và nghiên cứu hệ gen cây hồ tiêu để hiểu rõ hơn tương tác giữa ký sinh và ký chủ tại rễ hồ tiêu, nơi bị tấn công bởi nấm *F. solani* và *P. capsici* (Gordo et al. 2012).

**Table 1 Overview of sequencing and assembly**

Raw data	
Total number of reads	71878419
Number of unique high-quality reads	13300000
Number of contigs obtained with Velvet/Oases/STM <sup>T</sup>	22363
Unigenes dataset	
Unigenes number	10338
Total size (bp)	1787600
Largest transcript length (bp)	1314
N50 length (bp)	168
No ATGC characters	18
Average coverage per base	62
Predicted proteins	
Predicted CDS (partial/complete)	4472
Gene expression	
Reads mapped in transcripts	71148200
Most expressed transcript (rpkm)	68250

bp: base pair; rpkm: read coverage normalized per million mapped nucleotides and the length of unigene.

**Table 2 Percent of predicted proteins with homology to protein sequences from databases of other species**

Protein databases	% with homology
<i>Arabidopsis thaliana</i>	51.57
<i>Glycine max</i>	53.23
<i>Vitis vinifera</i>	53.93
<i>Oryza sativa</i>	50.87
<i>Populus trichocarpa</i>	54.38
<i>Sorghum bicolor</i>	51.43
<i>Aristolochia fimbrata</i>	54.02

Predicted protein sequences were obtained used FrameD tool and BLASTP was performed with e-value of  $1e^{-05}$ .

Phần trăm protein của hồ tiêu tương đồng với protein của genome cây trồng khác

**Table 4 SSR statistics**

Dinucleotide repeat	number	%
AC	21	29
AG	44	60
AT	5	7
CG	3	4
Total	73	100
Trinucleotide repeat	number	%
AAC	7	7
AAG	7	7
AAT	8	9
ACC	1	1
ACG	15	16
ACT	15	16
AGC	18	19
AGG	6	6
AGT	10	10
CCG	7	7
Total	94	100
Tetranucleotide repeat	number	
AAAT/ATTT	1	

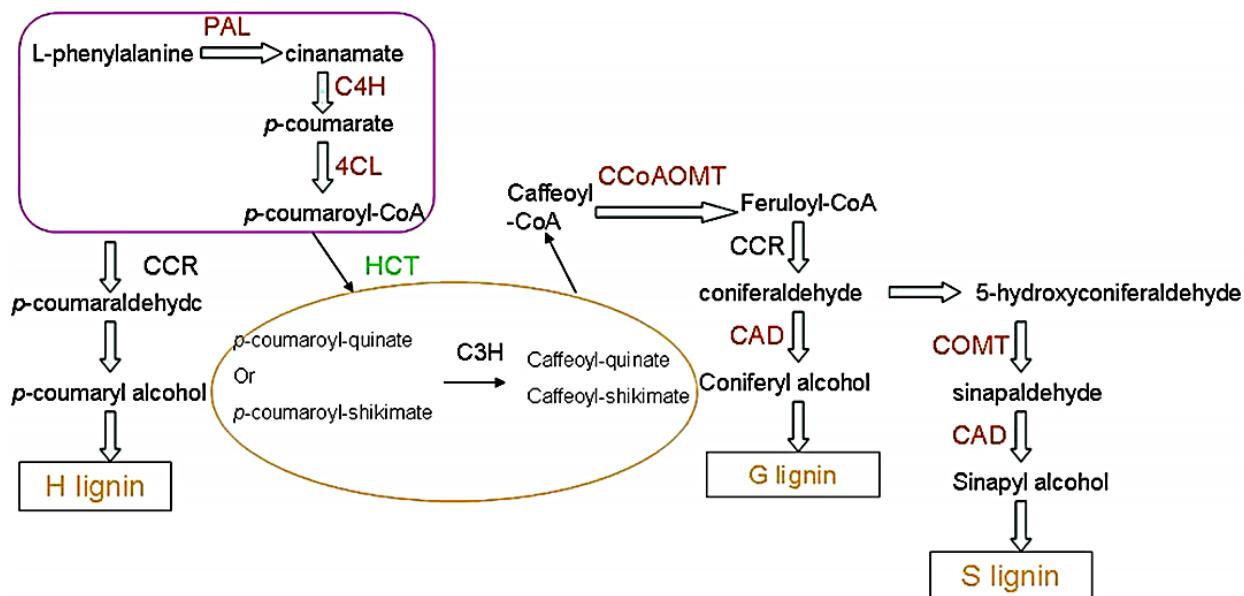
### III. DI TRUYỀN TÍNH KHÁNG BỆNH CHẾT NHANH DO NẤM *Phytophthora capsici*

*Piper nigrum* L. bị đe dọa nghiêm trọng bởi nấm *Phytophthora capsici*. Cải tiến di truyền tính kháng bệnh **foot rot** này là mục tiêu quan trọng cho chương trình chọn giống hồ tiêu. Tuy nhiên, người ta biết quá ít về cơ chế kháng của nấm *P. capsici* đối với cây chủ *Piper nigrum*. Cơ chế phân tử phản ứng nhiễm bệnh foot rot đã được nghiên cứu thông qua phân tích hệ transcriptome giữa loài tiêu kháng (*Piper flavidorum*) và giống tiêu nhiễm (*Piper nigrum* cv. Reyin-1) (Hao et al. 2016). Có tất cả 116.432 unigenes được tìm thấy từ sáu thư viện cDNA (ba replicates mang

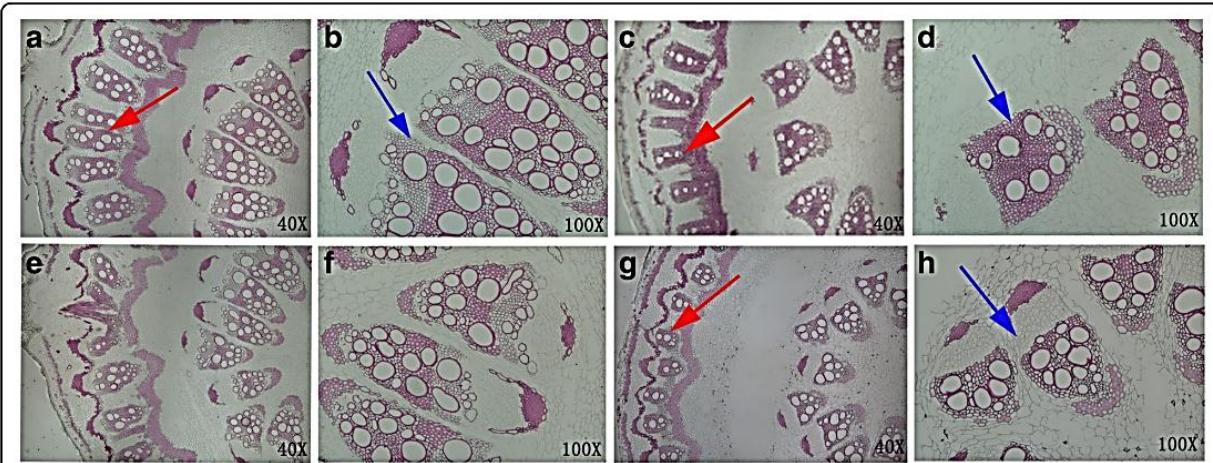
tính kháng và tính nhiễm), chúng được hợp nhất vào với nhau nhờ áp dụng **BLAST similarity** và tra cứu bộ dữ liệu **Kyoto Encyclopaedia of Genes and Gene Ontology (GO) genome orthology**. Hệ transcriptome tham chiếu được lập thành bản đồ với hai cơ sở dữ liệu về biểu hiện gen được số hóa (digital gene expression data). Thông qua phân tích mức độ phong phú GO đối với những gen biểu hiện ra bên ngoài rất khác nhau, đa phần gen này kết hợp với chu trình sinh tổng hợp phenyl propanoid được tìm thấy trong loài tiêu hoang dại *P. flaviflorum*. Hơn nữa, sự biểu hiện của những gen ấy được quan sát sau khi chủng nấm *P. capsici* trên cây nhiễm và cây kháng. Đa số gen tham dự vào chu trình biến dưỡng phenyl propanoid. Chúng điều tiết theo kiểu up trong cả hai loài tiêu đang nghiên cứu. So sánh những nghiệm thức xử lý và cơ quan được xử lý, tất cả gen điều tiết theo kiểu up với tỷ lệ biểu hiện cao ở loài tiêu kháng. Hoạt tính men phenylalanine ammonia lyase và peroxidase tăng trong loài kháng và nhiễm bệnh sau khi chủng nấm *P. capsici*, nhưng loài tiêu kháng tăng nhanh hơn rất nhiều. Cây tiêu kháng duy trì được cấu trúc mạch dẫn truyền trong bó lignin, theo kết quả phân tích mô học. Đây là thông tin quan trọng liên quan đến những gen đích và cơ sở kỹ thuật cho nghiên cứu của tương lai về cải tiến di truyền tính kháng bệnh chét nhanh của hồ tiêu, kể cả chọn giống bằng con đường chuyển nạp gen (Hao et al. 2016).

Bệnh chét nhanh (tên tiếng Anh là foot rot) do nấm *Phytophthora capsici* Leonian gây ra, xâm nhiễm tại rễ tiêu rồi vào thân và lá tiêu, can thiệp tiêu cực đến quá trình tăng trưởng của hồ tiêu. Hiện tượng này được tìm thấy ở hầu hết các vườn tiêu trên toàn thế giới (Suseela et al. 2007, Tiong- Kheng 1990). Dịch bệnh phát triển với triệu chứng foot rot, thường do kỹ thuật canh tác không tương thích, ẩm độ đất, độ phì đất, điều kiện ngoại cảnh và sự thoát thủy (Suseela et al. 2007). Mọi nỗ lực cải tiến tính kháng bệnh chét nhanh do *P. capsici* thông qua phương pháp chọn giống truyền thống đều chưa thành công cho đến nay (Zeng et al. 2005). Sheila et al. (2012) lần đầu tiên xây dựng nên cơ sở dữ liệu của chuỗi trình tự hệ gen cây *P. nigrum*. Tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu cơ chế phân tử của bệnh chét nhanh trên cây tiêu do nấm *P. capsici* gây ra. Phát triển mới đây về tin sinh học và sinh học phân tử đã và đang làm thuận tiện hơn sự hiểu biết về cơ chế phân tử của bệnh foot rot, cải tiến tính kháng bệnh chét nhanh bằng kỹ thuật di truyền hiện đại. Thông qua sự di truyền tính trạng vô cùng phức tạp, nhận biết và thay đổi tín hiệu, người ta tìm thấy nhiều cơ chế tự vệ của cây chủ đã tránh được sự tấn công của ký sinh (Yang et al. 1997; Paszkiewicz và Studholme 2010). Sử dụng phương pháp giải trình tự thế hệ mới (NGS), người ta chạy trình tự hệ transcriptome thu được nhiều dữ liệu phủ trên vùng hết sức rộng, nhiều trình tự có chiều sâu. Kỹ thuật **RNA-Seq** giúp người ta hiểu tốt hơn những biến thể di truyền trong tiến trình biến dưỡng, đây là kết quả tốt cho sự tìm ra gen đích (gene discovery), cho nội dung so sánh transcriptomics và nội dung hệ gen có tính chất tiến hóa (Wang et al. 2010; Mizrachi et al. 2010). Hiện nay, tìm và phân lập gen đích bằng kỹ thuật **RNA-Seq** trở nên phổ cập bao gồm sinh tổng hợp các sản phẩm biến dưỡng thứ cấp (secondary metabolites), bao gồm cellulose và lignin trong bông vải (Shi et al. 2011); carotenoid trong cây *Momordica cochinchinensis* (Huang et al. 2012); flavonoid, theanine và caffeine (Li et al. 2012); flavonoid in safflower (Hua et al. 2011); chất tăng hoạt trong *Salvia miltiorrhiza* (liu et al. 2013); và capsaicinoid trong cây ớt (*Capsicum annuum*) (Ferrer et al. 2008). Nhiều phương pháp tiếp cận sự truyền tín hiệu để bảo vệ cây trồng đối với xâm nhiễm của pathogen, thông qua sự thay đổi tín hiệu của chúng (Verhage et al. 2010). Những chất biến dưỡng thực vật có từ chu trình

**phenylpropanoid** có vai trò cực kỳ quan trọng trong sinh tổng hợp **lignin**, hoạt động tạo nguồn cho sản phẩm khác như **lignans**, **coumarins** và **flavonoids**. Phenylpropanoids xuất phát từ cầu nối phenylalanine carbon thuộc nhóm biến đổi đa dạng. Chúng góp phần vào việc duy trì kiến trúc, tùy theo mức độ sống sót bao nhiêu ngày (Vogt 2010). Trước đây, người ta đã đề nghị rằng: Trong trường hợp kháng của rễ cà chua, việc sản sinh ra hydrogen peroxide đã được tăng thêm, hoạt tính của men phenylalanine ammonia lyase (PAL) và men peroxidase (POD) cũng tham gia tích cực vào tổng hợp lignin (Gayoso et al. 2010). Nghiên cứu hoạt tính của enzyme POD đối với nhiều giống kháng của cây ót, dưa leo và thuốc lá đã chứng minh rằng: gia tăng hoạt tính của POD xảy ra cao hơn trong giống kháng sau khi bị nhiễm bệnh so với giống không (Alcazar et al. 1995; Piyada et al. 1995). Phổ biến hiện gen của cây trong giai đoạn tự vệ được nghiên cứu bằng kỹ thuật **deep sequencing**. Đặc điểm của hệ transcriptome rễ hò tiêu của cây kháng (*P. flavidiflorum*) và cây nhiễm (*P. nigrum* cv. Reynin-1) được tiến hành phân tích theo công nghệ Illumina HiSeq™ 2000, nhằm xác định các gen đích và chu trình truyền tín hiệu có trong cây kháng bệnh (Hao et al. 2016).



Hình 8: Chu trình **phenylpropanoid** của cây *Piper* giả định và phổ thể hiện gen có trong chu trình này (Bey et al. 2004). Hộp đỏ chứa các enzymes cần thiết cho chu trình. Con đường màu vàng biểu thị nội dung sản sinh ra **monolignols**. Enzymes biểu thị màu đỏ và xanh green là nội dung kích hoạt gen biểu hiện hoặc úc chế gen, theo thứ tự. Enzymes biểu thị màu đen làm tăng hoặc giảm số phân tử transcripts.



**Fig. 10** Histochemical analysis of lignin in stem cross-sections of control and *P. capsici*-inoculated black pepper plants. Stem were stained with Wiesner reagents for detecting lignin. Pink staining with the Wiesner reagent indicates the presence of p-hydroxycinnamyl aldehyde end groups in lignin. **a, b, e, f** Sections from control and *P. capsici*-inoculated *P. flaviflorum* (resistant) stems. **c, d, g, h** Sections from control and *P. capsici*-inoculated *P. nigrum* (susceptible) stems. **a, b, c, d** Sections from control plants 10 d after treatment. **e, f, g, h** Sections from inoculated plants 10 d after treatment. Adjustments to magnification and illumination were made to allow optimal viewing of individual sections. **a, c, e, g**: 40X; **b, d, f, h**: 100X; Blue arrow showed xylem and numbers of lignified xylem bundles, vessels, and interfascicular fibres. Red arrow showed the screens and vessels in phloem

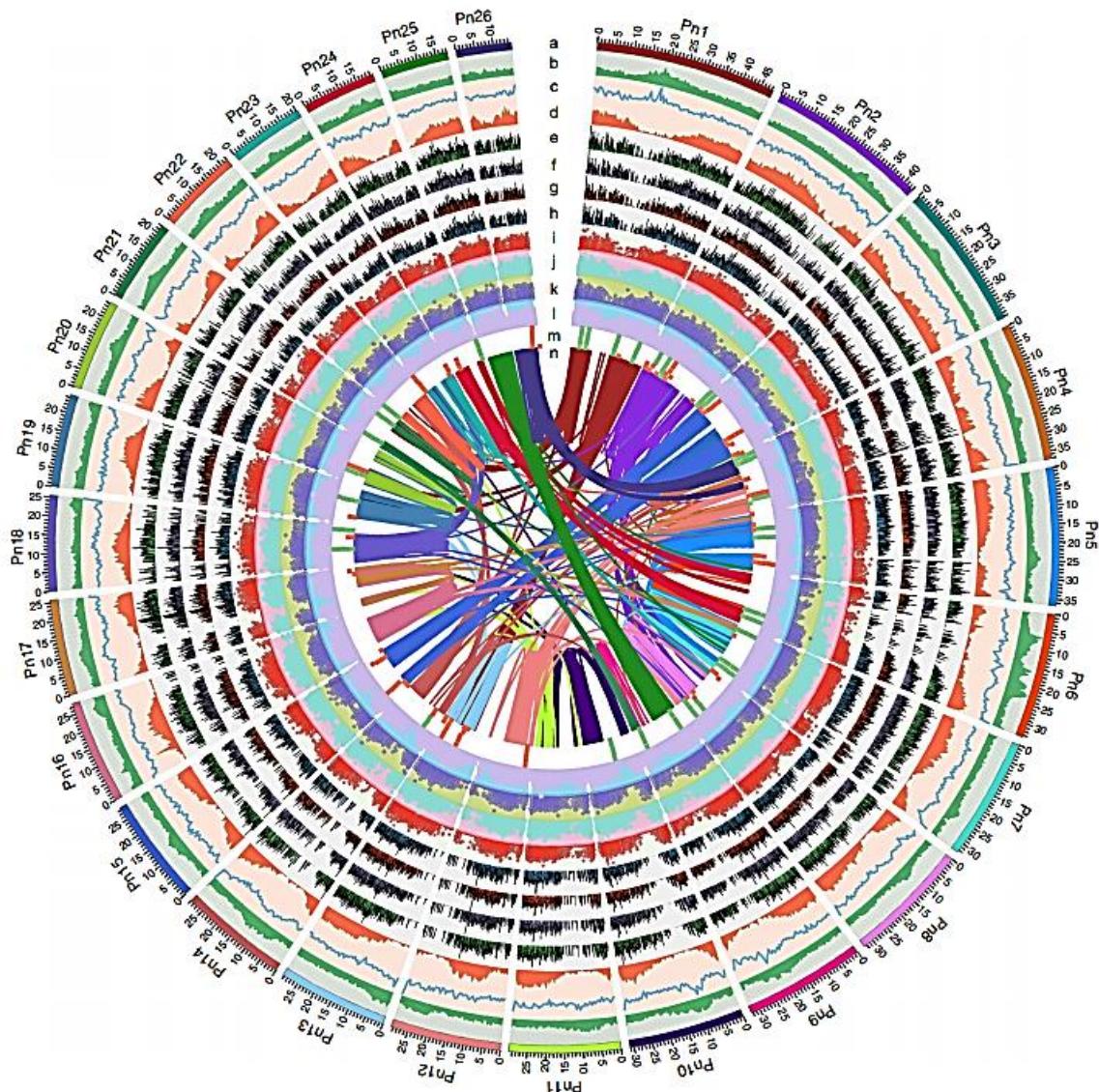
Hình: Phân tích mô học hàm lượng lignin (Hao et al. 2016)

#### IV. HỆ GEN THAM CHIẾU ĐỐI VỚI SINH TỔNG HỢP PIPERINE

Hò tiêu (*Piper nigrum*) được nghiên cứu với hệ gen tham chiếu trong trường hợp mã hóa piperine, bởi tích hợp được công nghệ **PacBio, 10x Chromium, BioNano DLS optical mapping**, và **Hi-C mapping** (Hu et al. 2019). Trình tự hệ gen chạy được 761,2 Mb (bao gồm 45 scaffolds với độ lớn N50 là 29,8 Mb); người ta tổng hợp các trình tự đọc được thành 26 pseudochromosomes (nhiễm sắc thể giả). Phân tích di truyền huyết thống của những genomes đặc trưng thuộc lớp phụ Magnoliids như dòng sister đối với clade có tính chất **monocots-eudicots** cho thấy rằng: hò tiêu có nguồn gốc tiến hóa từ **Laurales-Magnoliales lineage** khoảng 180 triệu năm trước đây. Phân tích genome có tính chất so sánh cho thấy sự lan rộng ảnh hưởng của những họ gen đặc biệt mã hóa các men glycosyltransferase, cytochrome P450, shikimate hydroxycinnamoyl transferase, lysine decarboxylase, và acyltransferase. Phân tích transcriptome có tính chất so sánh chỉ ra rõ ràng hơn cách biểu hiện đặc sắc của điều tiết kiểu *up* trong những gen như vậy thuộc các họ gen có liên quan. Cơ sở dữ liệu này cung cấp một nội dung có tính chất tiến hóa và làm sáng tỏ các tiến trình biến đổi ở mức độ phân tử về sinh tổng hợp chất piperine rất chuyên biệt theo loài (species-specific) (Hu et al. 2019).

*Piper nigrum*, 2n = 52: cây gia vị được mệnh danh là vàng đen của thế giới (Black Gold). Hò tiêu thuộc họ Piperaceae, một họ lớn trong bộ Piperales. Bộ Piperales nổi tiếng nhờ sản phẩm **piperidine alkaloids** độc đáo của nó. Piperine là alkaloid chủ yếu tương ứng với mức độ cay nồng (pungency) và mùi thơm của hò tiêu. Hò tiêu là gia vị nấu nướng rất phổ biến trên toàn thế giới, nó còn được sử dụng rộng rãi như thuốc thảo mộc, ví dụ như hệ thống y học Ấn Độ (Indian Ayurvedic), thuốc cổ truyền Trung Hoa, thuốc dân dã của người chau Mỹ La Tinh và người Đông Nam Á (Meghwal và Goswami 2013). Piperine hàm chứa trong ấy là hoạt tính được học rất năng động, làm tiết giảm tế bào mỡ thông qua hiện tượng điều tiết theo kiểu down, trong mã

hóa PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) biểu hiện trạng thái gamma, dẫn đến việc chế tạo ra thuốc trị bệnh đái tháo đường, như chế phẩm **PPAR agonist** (Kharbanda et al. 2016). Hò tiêu còn được làm chất antioxidant, antitumour, antimicrobial, antidepressive và anti-inflammatory (Manayi et al. 2018). Bản chất hóa thảo mộc và hóa dược học như vậy của hò tiêu đã thu hút sự chú ý của nhiều lĩnh vực khoa học khác nhau. Tuy nhiên, người ta chưa biết rõ cơ chế di truyền của gen điều khiển chu trình sinh tổng hợp chất piperine, chúng tích tụ như thế nào, nguồn tài nguyên di truyền nào sẽ được khai thác trong ngân hàng gen cây tiêu. Người ta tiến hành nghiên cứu hệ gen tham chiếu (reference genome) của cây hò tiêu thông qua bốn công nghệ nền tảng. **Phân tích sự tiến hóa** (evolutionary analysis) của 3 genomes **magnoliid** từ những bộ thực vật (order) khác nhau, chỉ ra được những chứng cứ của các điểm mang tính chất di truyền huyết thống (phylogenetics) của clade “magnoliids”. Thực hiện **phân tích genome có tính chất so sánh**, thực hiện **phân tích transcriptome** để xác định những thay đổi có trong biểu hiện gen như thế nào? Biết được sự tiến hóa và độ lớn của dòng họ trong gia đình gắn liền với kết quả sinh tổng hợp piperine. **Tài nguyên di truyền** hệ gen cây hò tiêu sẽ là tài nguyên vô giá phục vụ nghiên cứu sinh học và nông học đối với loài hò tiêu trồng trọt (Hu et al 2019).



**Fig. 1** Black pepper genomic landscape of diversity and expression data. **a** Circular representation of the pseudomolecules. **b-d** The distribution of the GC density, repeat density and gene density, respectively, with densities calculated in 500 Kb windows. **e-l** Expression of berry-specific genes (from outside to inside tracks: 2 MAP, 4 MAP, 6 MAP, 8 MAP, root, stem, leaf and flower). **m** Locations of genes mapped to secondary metabolism (green square) and alkaloid metabolism (red square) pathways. **n** Syntenic blocks. The band width is proportional to syntenic block size. Source data are provided as a Source Data file

Hình: **Đa dạng di truyền hệ gen cây hồ tiêu** (Hu et al. 2019). (a) Biểu thị các pseudomolecules. (b-d) Phân bố mật độ nỗi GC, mật độ lặp lại, mật độ gen, mỗi window là 500 kb; (e-l) Biểu hiện gen đặc biệt của hạt tiêu (dáu vết trong và ngoài: 2 MAP, 4 MAP, 6 MAP, 8 MAP, rễ, thân, lá và hoa). (m) Các gen định vị được gắn trên bản đồ di truyền mã hóa sản phẩm biến dường thứ cấp [hình vuông xanh green], alkaloid [hình vuông đỏ]; (n) Blocks mang tính chất đồng dạng syntenic. Chiều rộng của band tương ứng với kích cỡ syntenic block. Nguồn dữ liệu là hồ sơ nguồn. (Hu et al. 2019)

## V. XÁC ĐỊNH HỆ GEN HỒ TIÊU & CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR

Khả năng sẵn sàng về chỉ thị phân tử phân bố trên toàn bộ hệ gen cây hồ tiêu sẽ là điều kiện tiên quyết để nghiên cứu di truyền cây hồ tiêu. Xác định những QTL đích, tăng cường kết quả nghiên cứu di truyền và cải tiến giống tiêu trong sản xuất là mục tiêu của dự án này (Kumari et al. 2019). Thông tin về trình tự hệ gen cây hồ tiêu từ kết quả gần đây nhất đối với *Piper nigrum* genome đã và đang được sử dụng, phục vụ việc xác định và định tính những chỉ thị phân tử SSRs (Simple Sequence Repeats). Người ta có tất cả 69.126 chỉ thị SSRs đã được phân lập từ kết quả **assembling** hệ gen cây tiêu *P. nigrum*. **Tần suất SSR đạt 158 trên mỗi Mb có nghĩa là một SSR trên 6,3 kb trong genome cây tiêu.** Trong số các loại hình khác nhau của motif SSR tại những vị vẹt tinh, motif có hai chữ lặp lại (dinucleotides) chiếm nhiều nhất 48,6%, theo sau là motif ba chữ (trinucleotide) chiếm 23,7% và motif còn lại (compound repeats) chiếm 20,62%. Sử dụng một bộ chỉ thị bao gồm 85 SSRs để minh chứng, người ta thấy có 74 cho ra sản phẩm PCR khuếch đại với kích thước mong muốn. Độ dạng di truyền của 30 mẫu giống hồ tiêu thông qua chạy điện di 50 chỉ thị SSRs cho kết quả có 4 nhóm di truyền khác biệt nhau. Bên cạnh đó, các loài giao thoa nhau trong tự nhiên có thể chuyển đổi chỉ thị SSRs, điều này được kiểm tra lại trong 9 loài hồ tiêu hoang dại. Trong số 50 chỉ thị SSRs này, có 19 chỉ thị được khuếch đại trong 9 loài *Piper* và 31 chỉ thị SSRs được khuếch đại trong 7 loài *Piper*. Như vậy, chỉ thị SSRs có thể được áp dụng cho loài khác thuộc chi *Piper*, mà nơi ấy trình tự của hệ gen chưa sẵn sàng. Đây là nghiên cứu đầu tiên ứng dụng chỉ thị SSR trên cơ sở NGS trong genome cây tiêu (Kumari et al. 2019).

Hồ tiêu ( $2n = 4x = 52$ ) là cây thân gỗ, có tập tính dây leo, đa niên thuộc họ Piperaceae. Hạt tiêu có giá trị kinh tế lớn của nông nghiệp toàn cầu, nhờ vị cay và mùi thơm đặc biệt của gia vị tiêu, do hợp chất **alkaloid piperine** và dầu bay hơi (Nair 2011; Ravindran và Kallupurackal 2012).

Khả năng của nguồn genome dưới dạng chỉ thị phân tử trên cơ sở chuỗi trình tự DNA, được kỳ vọng sẽ thúc đẩy nghiên cứu cơ bản nhanh hơn, ví dụ như bản đồ di truyền, QTL/gene mapping, genomics có tính chất so sánh và chọn giống bằng kỹ thuật phân tử. Về **DNA based markers**, chỉ thị SSRs được đa số nhà chọn giống ưa thích sử dụng vì khả năng tái tạo (reproducibility), khả năng multi-allelic, bản chất co-dominant và phủ trọn genome cây trồng (Varshney et al. 2005). Microsatellites hay SSRs là những tandem repeats của 1 đến 6 nucleotide có rải rác trong genome (tại vùng mật mã di truyền hoặc không có mật mã di truyền) (Tautz và Renz 1984).

Trong hệ gen cây hồ tiêu, có vài báo cáo nói về thiết kế chỉ thị SSRs (Menezes et al. 2009; Wu et al. 2016). Gần đây, người ta tiếp cận phương pháp nghiên cứu transcriptome để ứng dụng tạo ra bộ chỉ thị phân tử SSRs cho hồ tiêu (Gordo et al. 2012; Hu et al. 2015).

Tính ưu việt của công nghệ NGS (next generation sequencing) đã và đang thúc đẩy việc thiết kế ra những chỉ thị phân tử mới, mang hiệu quả rất tốt (Mardis 2008, Yang et al. 2012).

Kumari et al. (2019) vừa chạy trình tự bản thảo hệ gen cây hồ tiêu (*P. nigrum*) thông qua Illumina, PacBio (NCBI GenBank: PRJNA412127) và Irys sequencing để có được một bản phác thảo genome bao gồm 916 scaffolds, phủ trên genome là 80X, rồi sử dụng thông tin của sequence ấy thực hiện **genome wide mining** (tìm kiếm mở rộng trên hệ gen), định tính chỉ thị SSR trong cây hồ tiêu. Đây là báo cáo đầu tiên về sáng tạo ra số lượng lớn chỉ thị SSR trên cơ sở trình tự genomic cây hồ tiêu. Chỉ thị SSR phát triển từ *Piper nigrum* đã được xét nghiệm đối với **cross amplification** trong chín loài tiêu hoang dại. Những chỉ thị SSR đa hình cao được xác định trong báo cáo này có thể được sử dụng trực tiếp cho các loài thuộc chi Peper để phân tích đa dạng di truyền và di truyền tiến hóa (Kumari et al. 2019).

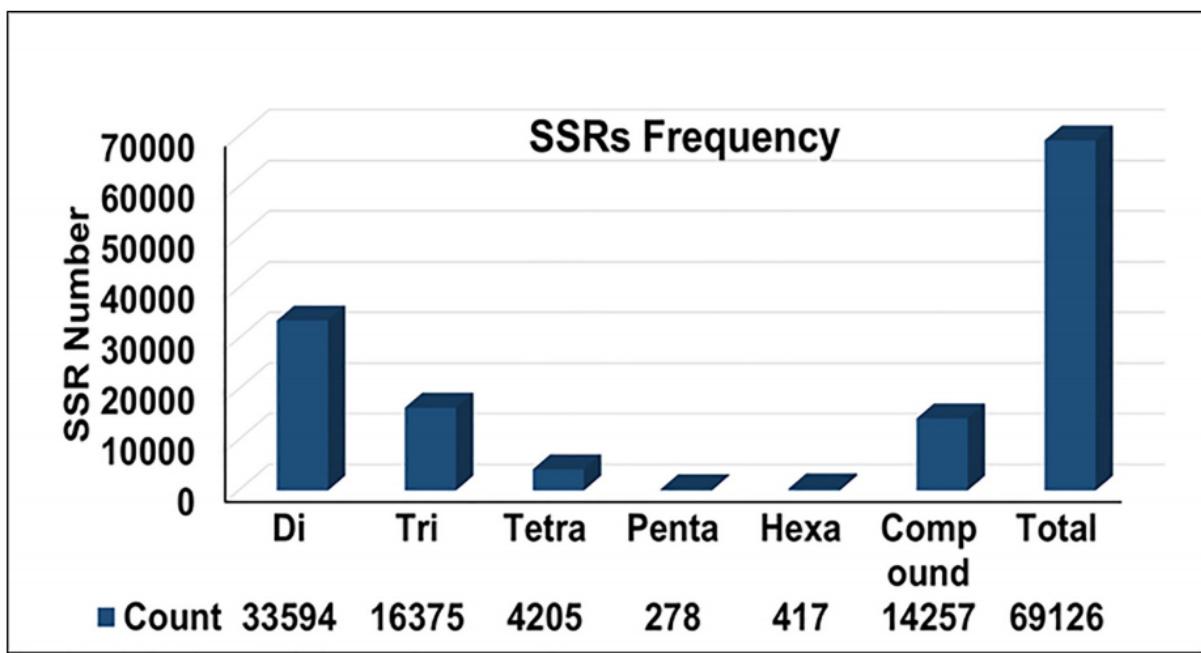


Fig 1. Distribution of simple sequence repeats in the draft genome sequence of black pepper (*Piper nigrum*).

Hình: Phân bố chi thị SSRs trong hệ gen cây tiêu

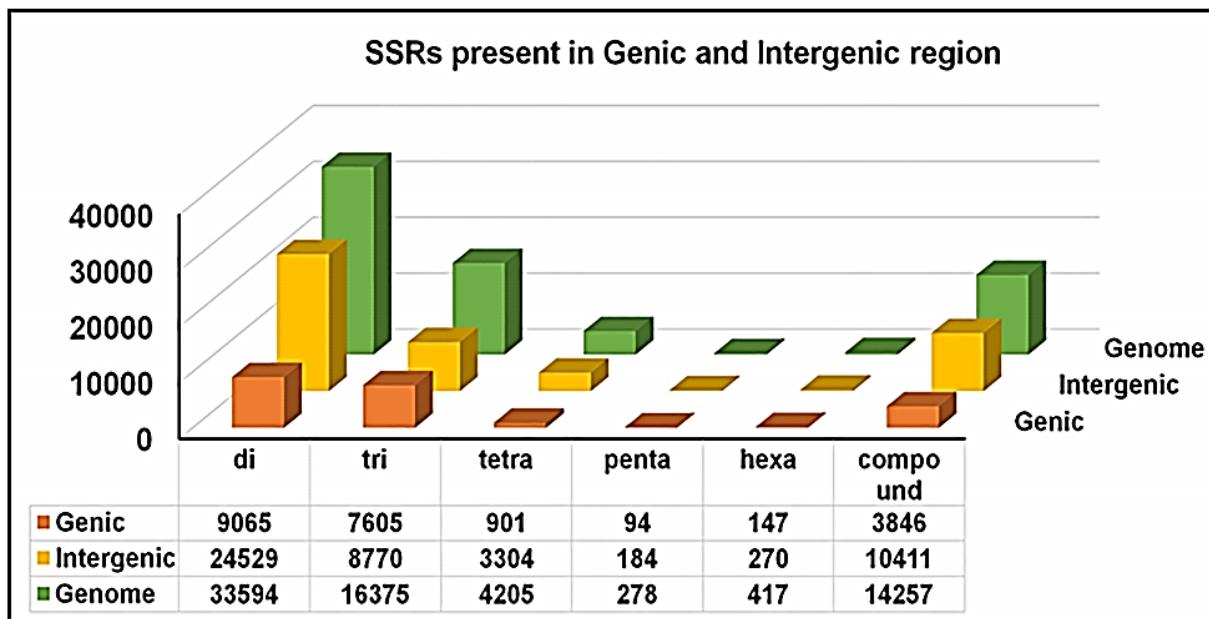
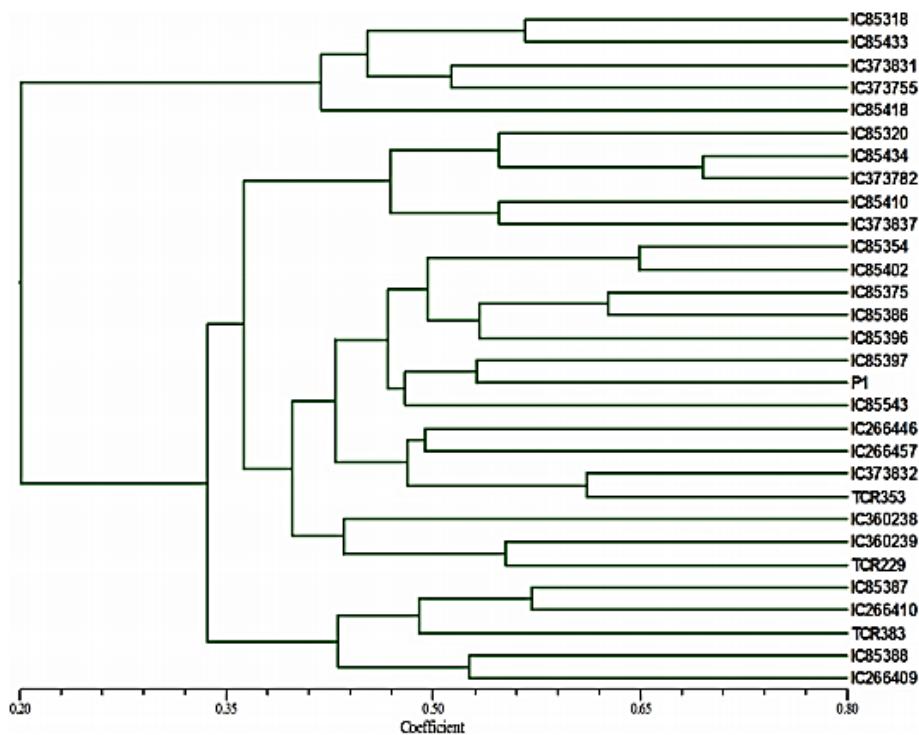


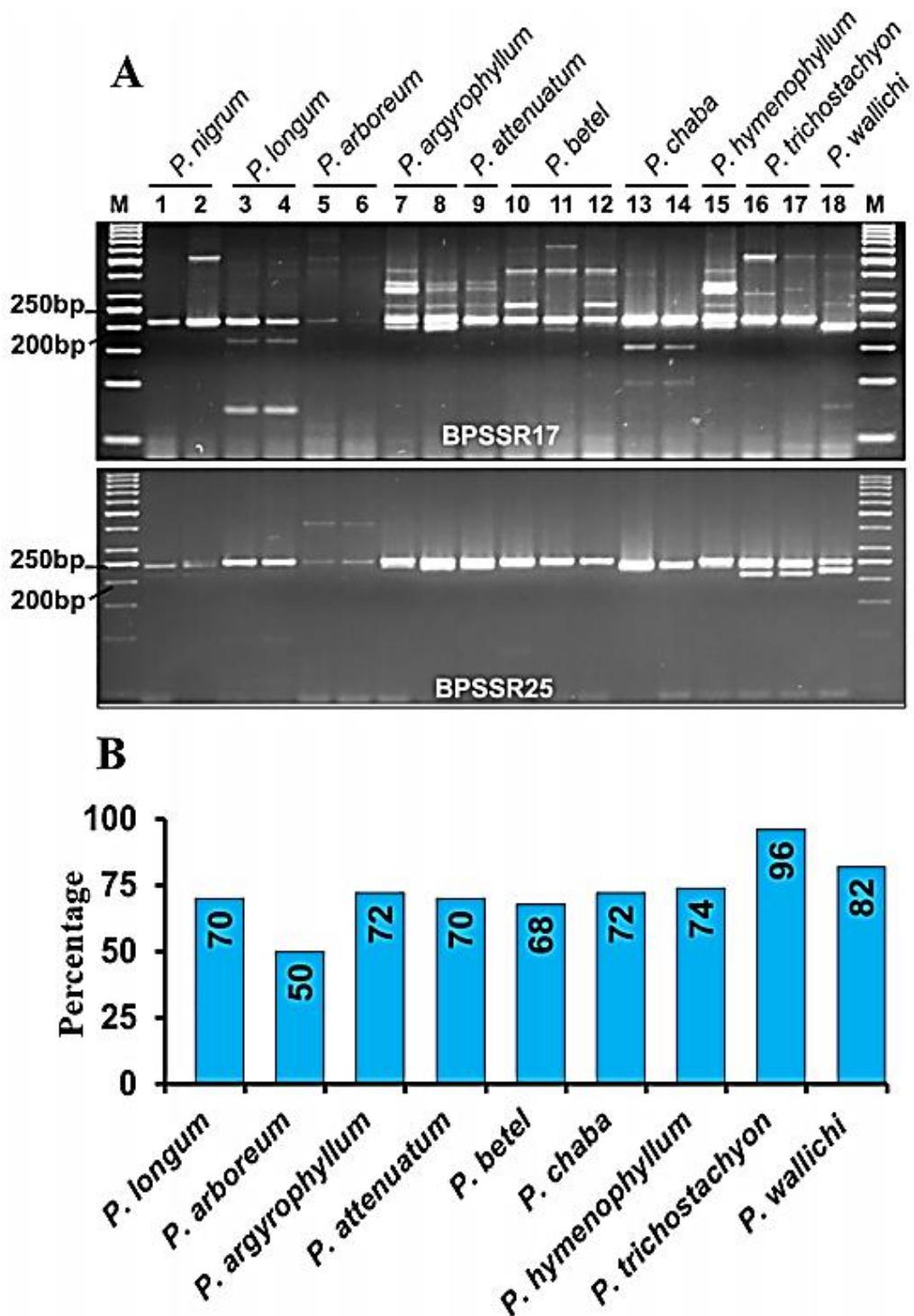
Fig 3. Distribution of SSRs identified in genic and intergenic regions of *Piper nigrum*.

(Nguồn: Kumari et al. 2019).



**Fig 6. Genetic relationship of germplasm accessions as revealed by SSR markers in black pepper.** Dendrogram was constructed using SSR profiles for 30 black pepper (*Piper nigrum*) accessions. The pairwise Jaccard's similarity coefficients was used for construction of phylogenetic tree.

Hình: Mối quan hệ di truyền huyết thống của các mẫu giống tiêu qua phân tích bằng chỉ thị SSR (Nguồn: Kumari et al. 2019).



Hình: Khả năng giao thoa giữa loài của chỉ thị SSR từ tiêu trồng *P. nigrum* đến loài tiêu hoang dại

## HỆ TRANSCRIPTOME TRONG HẠT TIÊU

Đây là nghiên cứu đầu tiên về hệ transcriptome của hạt tiêu (fruit transcriptome) thông qua chạy trình tự **Illumina HiSeq 2000** (Hu et al. 2015). Kết quả tổng cộng 56.281.710 reads chưa sàng lọc (raw reads) được thu thập và thao tác tổng hợp (assembled). Từ những kết quả **raw reads** như vậy, người ta ghi nhận 44.061 unigenes, trung bình mỗi gen có độ lớn phân tử là 1.345 nt. Thực hiện kỹ thuật chú thích chi tiết di truyền (functional annotation), có 40.537 unigenes được chú thích theo **Gene Ontology categories**, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways, Swiss-Prot database, và cơ sở dữ liệu Nucleotide Collection (NR/NT). Bên cạnh đó, số chỉ thị phân tử SSRs được tìm thấy là 8.196 markers. Phân tích chi tiết hệ transcriptome ngày, người ta xác nhận được những gen mang tính chất housekeeping (gen không có chức năng) phục vụ chạy PCR để kiểm tra, những chỉ thị SSRs đa hình cao, và những gen liên quan đến biến đổi lysine/ornithine. Kết quả này minh chứng khả năng khai thác cơ sở dữ liệu của Hu và ctv. (2015) rất tốt. Đặc biệt là nghiên cứu quá trình tổng hợp nên chất **piperine** của hò tiêu (Hu et al. 2015).

Giá trị có ý nghĩa bậc nhất của hò tiêu là sản phẩm **piperidine alkaloids**. Piperine có công thức hóa học là 1-piperoylpiperidine; quyết định độ cay (pungent), chứa nitrogen, và là alkaloid chủ lực của hạt tiêu (Srinivasan 2007). Piperine, được sử dụng như một phân tử **enhancer** có tính chất vị giác (gustatory), là chất kích thích hiệu quả (agonist) tại kẽm vận chuyển cation có tính chất **transient receptor** đầy tiềm năng, thuộc receptor, **subfamily V member 1**, tạo nên cảm giác sưng nóng của động vật (McNamara et al. 2005; Okumura et al. 2009). Trái lại, gia vị hò tiêu với hàm lượng piperine sẽ kích thích hoạt động của những enzymes tiêu hóa từ tuyến tụy và ruột non. Theo đó, khả năng tiêu hóa được tăng cường và thời gian chuyển hóa thức ăn thành chất bở dường xâm nhập vào cơ thể sẽ nhanh hơn (Mehmood và Gilani 2010; Platel và Srinivasan 2000). Với phẩm chất và mùi vị độc đáo, khả năng tiêu hóa tốt của piperine, hò tiêu đã trở thành thực phẩm phổ biến bậc nhất của dân cư toàn thế giới. Về y học, piperine được minh chứng trong những thí nghiệm *in vitro* rằng: nó có khả năng ngăn ngừa hoặc chống lại tổn thương do ô xi hóa, thông qua khả năng dập tắt được ROS (reactive oxygen species: gốc ô xi tự do) và ức chế sự peroxyl hóa chất béo (Zarai et al. 2013; Prasad et al. 2004). Tầm quan trọng về thực phẩm và y học của piperine cao như vậy, nhưng người ta chưa hiểu biết nhiều về cơ chế phân tử của biến đổi piperine. Nghiên cứu trước đây cho thấy piperine là dẫn xuất của những sản phẩm biến đổi bậc một (primary metabolism) thuộc về lysine/ornithine. Sản phẩm này được nghiên cứu khá nhiều trong loài thực vật mô hình (Geisler và Gross 1990; Szöke et al. 2013). Tuy nhiên, nghiên cứu sâu về sinh tổng hợp piperine trong cây hò tiêu, không phải cây mô hình, vẫn còn rất hạn chế, vì người ta rất thiếu thông tin về cơ sở dữ liệu phân tử. Là một cây không phải mô hình (non-model plant), hò tiêu không được nghiên cứu nhiều về thông tin hệ gen của nó (genomic information). Khi thiếu thông tin về trình tự genome, người ta phải tiếp cận với phương pháp rất tốn kém là **de novo assembly of RNA-Seq** để nghiên cứu có hệ thống transcriptomes, đối với hầu hết sinh vật có hoàn cảnh tương tự (Grabherr et al. 2011; Jain 2010). Hàng triệu phân tử **short tags** đã được tạo ra từ kỹ thuật nền **RAN-Seq**, ví dụ như kỹ thuật **Roche 454**, **Illumina Genome Analyzer**, và **Applied Biosystems SOLiD**. Sau khi có được phân tử **short tags**, người ta tổng hợp chúng lại (assembled) bằng những công cụ đặc biệt và bằng thuật toán tương thích; trình tự của genome và trình tự của transcriptome sẽ được giải mã. Nền tảng trình tự ấy, cộng thêm công cụ **assembly**, và phân tích tin sinh học tương thích, người ta có thể được vận dụng để hình thành nên một hệ thống công nghệ phức tạp để chạy **RNA-Seq**; kết quả sẽ xác định được tính chất đa hình của trình tự phân tử transcript, xác định

được sự kiện **trans-splicing** mới, và sự kiện **splice isoforms** (Robinson và Oshlack 2010; Robertson et al. 2010; Wang et al. 2009). So với phương pháp truyền thống, công nghệ RNA-Seq này cho ra kết quả đo lường có tính chất đặc biệt rất cao và tính chất số lượng chính xác. Theo nghiên cứu của Hu et al. (2015), transcriptome của hạt tiêu được phân tích thông qua Illumina HiSeq 2000. Ước khoảng 56 triệu **clean reads** được thu thập và số unigenes là 44.061 gen được tổng hợp lại *de novo*. Gen mang tính chất housekeeping, gen có liên quan đến lysine/ornithine, cặp mồi của chỉ thị phân tử SSRs đa hình đã được xác định. Công trình nghiên cứu ấy là cơ sở dữ liệu đầu tiên được thực hiện trên hạt tiêu. Công trình này cung cấp một thư viện gen (gene library) vô cùng hữu ích phục vụ nghiên cứu di truyền phân tử cây hò tiêu (Hu et al. 2015).

**Table 1. Summary of transcriptome data for black pepper fruits.**

	Number	Percentage
Raw reads	56,281,710	
Clean reads	52,098,738	
Contigs	179,075	
Total unigenes	44,061	
Total sizes (nt)	59,262,045	
Unigenes (300–500 nt)	10,678	24.23%
Unigenes (500–1000 nt)	10,298	23.38%
Unigenes (1000–2000 nt)	13,316	30.22%
Unigenes (2000–5000 nt)	9,409	21.35%
Unigenes (>5000 nt)	360	0.82%
Mean length (nt)	1,345	
GC content N50 length	1,757	46.60%
Unigenes in NR database	32,697	74.20%
Unigenes in NT database	25,366	57.57
Unigenes in SwissProt database	23,080	52.38%
Unigenes in GO database	28,827	65.43%
Unigenes in COG database	16,195	36.76%
Unigenes in KEGG database	24,836	56.37%

doi:10.1371/journal.pone.0129822.t001

**Table 2. The list of lysine mechanism-related genes in transcriptome.**

Gene ID	Length	KO_id	ko_definition
CL3230.Contig3_F0463-PN	1711	K01581	ornithine decarboxylase [EC:4.1.1.17]
CL1221.Contig2_F0463-PN	1806	K01586	diaminopimelate decarboxylase [EC:4.1.1.20]
CL16778.Contig2_F0463-PN	1610	K01581	ornithine decarboxylase [EC:4.1.1.17]
CL44.Contig2_F0463-PN	2878	K00276	primary-amine oxidase [EC:1.4.3.21]
CL9334.Contig1_F0463-PN	2082	K13367	non-specific polyamine oxidase [EC:1.5.3.17]
Unigene14041_F0463-PN	2504	K00276	primary-amine oxidase [EC:1.4.3.21]
CL13005.Contig1_F0463-PN	1978	K00818	acetylornithine aminotransferase [EC:2.6.1.11]
Unigene14591_F0463-PN	2315	K00276	primary-amine oxidase [EC:1.4.3.21]
Unigene7223_F0463-PN	2206	K00276	primary-amine oxidase [EC:1.4.3.21]
CL9890.Contig2_F0463-PN	1293	K01778	diaminopimelate epimerase [EC:5.1.1.7]
CL3253.Contig4_F0463-PN	1552	K13065	shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase [EC:2.3.1.133]
CL3823.Contig1_F0463-PN	1696	K01438	acetylornithine deacetylase [EC:3.5.1.16]
CL3485.Contig1_F0463-PN	2233	K00928	aspartate kinase [EC:2.7.2.4]
CL13479.Contig1_F0463-PN	6480	K11446	histone lysine-demethylase JARID1 [EC:1.14.11.-]
CL5146.Contig2_F0463-PN	3370	K15601	lysine-specific demethylase 3 [EC:1.14.11.-]
CL14382.Contig2_F0463-PN	1349	K00215	dihydrodipicolinate reductase [EC:1.3.1.26]
CL1221.Contig2_F0463-PN	1806	K01586	diaminopimelate decarboxylase [EC:4.1.1.20]

doi:10.1371/journal.pone.0129822.t002

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alcazar MD, Egea C, Espin A, et al. 1995. Peroxidase isoenzymes in the defense response of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol Plant.* 94:736–42. 25.
- Anandaraj M. 2000. Diseases of black pepper. In: Black pepper (Ranvindran PN, ed.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 239–267.
- Bey M, Stu K, Fellenberg K, Schwarz-sommer Z, Sommer H. 2004. Characterization of antirrhinum petal development and identification of target genes of the class B MADS. *J Clim.* 16(12):3197–215
- Dias JS, Ortiz R. 2011. Transgenic Vegetable Crops: Progress, Potentials, and Prospects. In Plant Breeding Reviews, Plant Breeding Reviews, Volume 35. Edited by Janick J. New York: Wiley Blackwell; 151–224. Janick J. (Series Editor).
- Fan R, Ling P, Hao CY, Li FP. 2015. Construction of a cDNA library and preliminary analysis of expressed sequence tags in *Piper hainanense*. *Genet. Mol. Res.* 14: 12733-12745.
- Fan R, Wu HS, Hao CY, Tan LH. 2014. Genetic diversity of pepper germplasm resources by ISSR markers. *Chin. J. Trop. Crops* 35: 1-7
- Ferrer JL, Austin MB, Stewart CJ, Noel JP. 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol Biochem.* 46(3):356–70.
- Gayoso C, Pomar F, Novo-Uzal E, Merino F, Martinez de Ilarduya O. 2010. The Vemediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H2O2, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *BMC Plant Biol.* 10(1):232–51.
- Geisler JG, Gross GG. 1990. The biosynthesis of piperine in *Piper nigrum*. *Phytochemistry* 29: 489– 492. 13.
- Gordo SM, Pinheiro DG, Moreira EC, Rodrigues SM, Poltronieri MC, et al. 2012. High-throughput sequencing of black pepper root transcriptome. *BMC Plant Biol.* 12:168.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotech* 29: 644–652. 15.
- Hao CY, ZQ Xia, R Fan, L Tan, L Hu, B Wu and H Wu. 2016. *De novo* transcriptome sequencing of black pepper (*Piper nigrum* L.) and an analysis of genes involved in phenylpropanoid metabolism in response to *Phytophthora capsici*. *Genomics* 17:822
- Hawkins RD, Hon GC, Ren B. 2010. Next-generation genomics: an integrative approach. *Nat Rev Genet* 11(7):476–486. 7.
- Howard RA. 1973. Notes on the Piperaceae of the Lesser Antilles. *J. Arnold Arbor.* 54: 377-411.
- Hu L, C Hao, R Fan, B Wu, L Tan, H Wu. 2015. De Novo Assembly and Characterization of Fruit Transcriptome in Black Pepper (*Piper nigrum*). *PlosOne* 10(6): e0129822.

- Hu L, Hao C, Fan R, Wu B, Tan L, Wu H. 2015. De Novo Assembly and Characterization of Fruit Transcriptome in Black Pepper (*Piper nigrum*). PLoS One. 10:e0129822.
- Hu L, Z Xu, M Wang, R Fan, D Yuan, B Wu, H Wu, X Qin, L Yan, L Tan, S Sim, W Li, CA Saski, H Daniell, JF Wendel, K Lindsey, X Zhang, C Hao, S Jin. 2019. The chromosome-scale reference genome of black pepper provides insight into piperine biosynthesis. Nature Communication 10: 4702
- Hua WP, Zhang Y, Song J, Zhao LJ, Wang ZZ. 2011. De novo transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients. Genomics. 98(4):272–9
- Huang HH, Xu LL, Tong ZK, Lin EP, Liu QP, Cheng LJ, Zhu MY. 2012. De novo characterization of the Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) transcriptome and analysis of candidate genes involved in cellulose and lignin biosynthesis. BMC Genomics. 13(1):648
- Jain M. 2011. Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. Briefings in Functional Genomics 11: 63–70.
- Joy N, Prasanth VP and Soniya EV. 2011. Microsatellite based analysis of genetic diversity of popular black pepper genotypes in South India. Genetica 139: 1033-1043.
- Kharbanda C. et al. 2016. Novel piperine derivatives with antidiabetic effect as PPAR- $\gamma$  agonists. Chem. Biol. Drug Des. 88, 354–362.
- Kumari R, DP Wankhede, A Bajpai, A Maurya, K Prasad, D Gautam, P Rangan, M Latha, JK John, A Suma, KV Bhat, AB Gaikwad. 2019. Genome wide identification and characterization of microsatellite markers in black pepper (*Piper nigrum*): A valuable resource for boosting genomics applications. PlosOne 1-17
- Li H, Dong Y, Yang J, Liu X, Wang Y, Yao N, Guan L, Wang N, Wu J, Li X. 2012. De novo transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids. PLoS One. 7(2):e30987.
- Lister R, Gregory BD, Ecker JR. 2009. Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. Curr Opin Plant Biol 12(2):107–118. 8.
- Liu S, Li W, Wu Y, Chen C, Lei J. 2013. De novo transcriptome assembly in chili pepper (*Capsicum frutescens*) to identify genes involved in the biosynthesis of capsaicinoids. PLoS One. 8(1):e48156.
- Liu Y, Yadav VR, Aggarwal BB and Nair MG. 2010. 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. Nat. Prod. Commun. 5: 1253-1257.
- Manayi A, Nabavi SM, Setzer WN, Jafari S. 2018. Piperine as a potential anti-cancer agent: a review on preclinical studies. Curr. medicinal Chem. 25, 4918–4928.
- Mardis ER. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends Genet 24: 133–141.
- McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. 2005. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). British journal of pharmacology 144: 781–790.
- Meghwal M, Goswami TK. 2013. Piper nigrum and Piperine: an update. Phytother. Res. 27, 1121–1130.
- Mehmood MH, Gilani AH. 2010. Pharmacological basis for the medicinal use of black pepper and piperine in gastrointestinal disorders. Journal of medicinal food 13: 1086–1096.
- Menezes IC, Cidade FW, Souza EAP, Sampaio EIC. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper, *Piper nigrum* L. (Piperaceae) Conservation Genet Resour 1:209–212.
- Mizrachi E, Hefer CA, Ranik M, Joubert F, Myburg AA. 2010. De novo assembled expressed gene catalog of a fast-growing eucalyptus tree produced by illumina mRNA-Seq. BMC Genomics. 2010;11(1):681.
- Morozova O, Hirst M, Marra MA. 2009. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. Annu Rev Genomics Hum Genet 10:135–151. 9.
- Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. 2010. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. Curr Protoc Mol Biol 2010, SUPPL. 89:4.11.1–4.11.13.
- Nair KP. 2011. Agronomy and Economy of Black Pepper and Cardamom: The " king" and" queen" of Spices. Elsevier; eBook ISBN: 9780123918772. 2.
- Nishimura Y, Kitagishi Y, Yoshida H, Okumura N, et al. 2011. Ethanol extracts of black pepper or turmeric down-regulated SIRT1 protein expression in Daudi culture cells. Mol. Med. Rep. 4: 727-730.
- Okumura Y, Narukawa M, Iwasaki Y, Ishikawa A, Matsuda H, Yoshikawa M, et al. 2009. Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 74: 1068–1072.
- Paszkiewicz K, Studholme DJ. 2010. De novo assembly of short sequence reads. Brief Bioinform. 11(5):457–72
- Piyada T, Michelle DH, John CS. 1995. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenoloxidase. Phytochemistry. 40(3):673–6.
- Platel K, Srinivasan K. 2000. Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. Food/Nahrung 44: 42–46.

- Prasad NS, Raghavendra R, Lokesh BR, Naidu KA. 2004. Spice phenolics inhibit human PMNL 5- lipoxygenase. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 70: 521–528.
- Ravindran PN, Kallupurackal JA. 2012. Handbook of Herbs and Spices ( Second Edition) Wood head Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Robertson G, Schein J, Chiu R, Corbett R, Field M, Jackman SD, et al. 2010. De novo assembly and analysis of RNA-seq data. Nature methods 7: 909–912.
- Robinson MD, Oshlack A. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. Genome Biol 11: R25.
- Sheila MC G, Pinheiro DG, Edith CO M, Rodrigues SM, Poltronieri MC, de Lemos OF, da Silva IT, Rommel TJ R, Artur S, Horacio S, Silva Jr WA, Iracilda S, Sylvain D. 2012. High-throughput sequencing of black pepper root transcriptome. BMC Plant Biol. 12(2):168.
- Shi CY, Yang H, Wei CL, Yu O, Zhang ZZ, Jiang CJ, Sun J, Li YY, Chen Q, Xia T. 2011. Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea-specific compounds. BMC Genomics. 12(1):131.
- Srinivasan K. 2007. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. Critical reviews in food science and nutrition 47: 735–748.
- Suseela SR, Anandaraj M, Sarma YR, Veena SS, Saji KV. 2007. Screening of black pepper (*Piper nigrum* L.) germplasm for resistance to foot rot disease caused by *Phytophthora capsici* Leonian. J Spices Aromatic Crops. 16(2):115–7.
- Szöke É, Lemberkovics É, Kursinszki L. 2013. Alkaloids Derived from Lysine: Piperidine Alkaloids. Natural Products: Springer press. pp. 303–341.
- Tautz D, Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. 12: 4127–4138.
- Tiong- Kheng K. 1990. Major diseases of black pepper and their management. The Planter. 66:59–69.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends Biotechnol 23: 48–55.
- Verhage A, van Wees SCM, Pieterse CMJ. 2010. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? Plant Physiol. 154(2):536–40.
- Vogt T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. Mol Plant. 3(1):2–20.
- Wang Z, Fang B, Chen J, Zhang X, Luo Z, Huang L, Chen X, Li Y. 2010. De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina pairedend sequencing and development of cSSR markers in sweetpotato (*Ipomoea batatas*). BMC Genomics. 2010;11(53):726. 14.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics 10: 57–63.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M: RNA-Seq. 2009. a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet 10(1):57–63
- Wu BD, Fan R, Hu LS, Wu HS, Hao CY. 2016. Genetic diversity in the germplasm of black pepper determined by EST-SSR markers. Genet Mol Res 15:1.
- Wu BD, Hao CY, Fan R, Yang JF, et al. 2015. Development and application of EST-SSR markers in pepper. Chin. J. Trop. Crops 36: 237–243
- Wu BD, R Fan, LS Hu, HS Wu and CY Hao. 2016. Genetic diversity in the germplasm of black pepper determined by EST-SSR markers. Genetics and Molecular Res. 15 (1): gmr.15018099
- Yang T, Bao SY, Ford R, Jia TJ, Guan JP, et al. 2012. High-throughput novel microsatellite marker of faba bean via next generation sequencing. BMC Genomics 13:602.
- Yang Y, Shah J, Klessig DF. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. Genes Dev. 11(13):1621–39. 12.
- Zarai Z, Boujelbene E, Ben Salem N, Gargouri Y, Sayari A. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. LWT-Food Science and Technology 50: 634–641. 11.
- Zeng HC, Ho HH, Zheng FC. 2005. Pythium vexans causing patch canker of rubber trees on Hainan Island, China. Mycopathologia. 159(4):601–6