



IV CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS COINTER - PDVAgro 2019

SELEÇÃO DE *PRIMERS* SSR PARA GENOTIPAGEM DE PIPERÁCEAS DA AMAZÔNIA

SELECCIÓN DE PRIMER SSR PARA EL GENOTIPO DE PIPERÁCEAS DE AMAZONIA

SSR PRIMER SELECTION FOR GENOTYPING OF AMAZON PIPERACEAE

Apresentação: Pôster

Eduardo Filipe Torres Vieira; Simone de Miranda Rodrigues²; Ilmarina Campos de Menezes³

Introdução

Algumas piperáceas nativas da Amazônia possuem resistência à fusariose, causada pelo fungo *Nectria haematococca* Berk & Br. f. sp. *piperis* Albuquerque (Fusarium solani f. sp. *piperis*), que provoca grandes perdas econômicas no cultivo da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) no Brasil, encurtando seu ciclo para, em média, 5 a 6 anos (LEMOS et al., 2011). Essa doença causa amarelecimento e secamento dos ramos e a consequente morte das plantas, sendo facilmente disseminada, favorecida pelas condições de alta temperatura e umidade da região amazônica, somado à vulnerabilidade genética das cultivares.

Espécies silvestres podem ser utilizadas como fontes de resistência, sendo de grande importância para o melhoramento genético dessa especiaria, necessitando o conhecimento de ferramentas da biologia celular e molecular, como marcadores moleculares para análise genético-moleculares (LEMOS et al., 2011).

É fundamental o conhecimento da variabilidade genética de genótipos disponíveis em bancos de germoplasma. A identificação dos acessos de piperáceas nativas da Amazônia introduzidos no Banco Ativo de Germoplasma de Piperácea da Embrapa Amazônia Oriental é importante para auxiliar o desenvolvimento do programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino.

Nesse contexto, esse trabalho objetivou detectar e selecionar marcadores moleculares microssatélites aplicáveis para piperáceas da Amazônia, visando uso no melhoramento genético da *Piper nigrum* L.

Fundamentação teórica

Para o melhoramento genético da pimenteira-do-reino, a Embrapa Amazônia Oriental desenvolveu e caracterizou alguns marcadores microssatélites para *Piper nigrum* L (LEMOS et al., 2011). Menezes et al. (2009) desenvolveram 9 *primers* microssatélites polimórficos específicos para *P. nigrum* L, sendo testada também a transferibilidade para determinadas piperáceas nativas da Amazônia.

Determinadas espécies do gênero *Piper*, como *Piper tuberculatum* e *Piper arboreum*, apresentaram alta resistência quando cultivadas em solo infestado ou inoculadas com o patógeno causador da fusariose (ALBUQUERQUE, 2001).

A obtenção de materiais genéticos mais resistentes a essa doença é uma demanda do programa de melhoramento da pimenteira-do-reino na Embrapa Amazônia Oriental, o qual se concentra na produção de híbridos interespecíficos (POLTRONIERI et al., 2000). A hibridação interespecífica além de aumentar a variabilidade genética, possibilita a introdução de características de interesse, como resistência a doenças e pragas, precocidade e tolerância ambiental (LEMOS et al., 2011).

Metodologia

Foram utilizados materiais de duas espécies nativas, *Piper tuberculatum* e *P. arboreum*, do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém (PA). A extração do DNA vegetal foi realizada de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1990). Folhas frescas foram coletas, lavadas em água corrente e NaClO 10%, lavados novamente em água destilada e secos com papel toalha. Fragmentos de tecidos foliares foram macerados usando nitrogênio líquido em cadinho de porcelana previamente congelados, e adicionou-se PVP (polivinilpirrolidona) e 20 µL de β-Mercaptoetanol ao macerado. Cerca de 5 g da mistura macerado foi transferida para tubo Falcon de 15 mL e, adicionou-se 5 mL de solução extratora (1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA pH 8,0, 100 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1% de PVP e 0,2% de CTAB). Os tubos foram imersos em banho-maria a 60°C por 1 h, invertendo-os a cada 10 min. Após esfriar, acrescentou-se 5 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para formar uma emulsão. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 4°C e 12 000 rpm e, posteriormente, o sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo Falcon, acrescentando-se álcool 95%, visando a precipitação do DNA overnight. Foi realizada

outra centrifugação por 10 min a 4°C e 12 000 rpm para a retirada de todo o álcool, seguindo-se a secagem à temperatura ambiente por aproximadamente 16 h. Após a secagem do pellet, o DNA foi ressuspendido com solução de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo RNase (10 ng.mL⁻¹). Por fim, as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C).

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% imerso em cuba horizontal com TBE 1X, e submetido à eletroforese a 120 V por 40 min. As bandas foram comparadas utilizando-se o programa LabImage 1D, a partir de três padrões do DNA do fago λ (50, 100 e 200 ng.μL⁻¹), e em seguida, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração final de 10 ng.μL⁻¹.

Foram utilizados 3 *primers* SSR pré-selecionados, específicos para pimenteira-do-reino, UN00649, UN01096 e UN01526. As reações de PCR foram preparadas em microtubos de 0,2 mL, com volume final de 25 μL, cada um contendo: 2 μL de DNA (10 ng.μL⁻¹), 2,5 μL de tampão 10X, 1,5 μL de MgCl₂ (25 mM), 1,5 μL de dNTPs (2,5 mM), 2 μL de cada *primer* F e R (10 pmol. μL⁻¹), e 0,2 μL de Taq polimerase (Invitrogen). As amostras foram amplificadas em termociclador Applied Biosystems Veriti, considerando um ciclo de 94°C por 1 min; seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 min; 51°C a 56°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos da PCR foram corados com solução de azul de bromofenol mais GelRed, submetidos a corrida em gel de agarose 3% usando TBE 1X (Tris-base 0,1 M, ácido bórico 1 M e EDTA 0,5 M), e separados por eletroforese horizontal a 90 V por 30 min, sendo em seguida, visualizados e fotografados em fotodocumentador por transiluminação em ultravioleta.

Resultados e Discussões

Os três *primers* utilizados amplificaram, revelando bandas nítidas. Indicando, portanto, a transferibilidade dos *primers* microssatélites específicos para *Piper nigrum* L. nas piperáceas nativas *P. tuberculatum* e *P. arboreum*. Dois *primers*, UN01096 e UN01526 apresentaram bandas polimórficas, sendo que o último apresentou maior número de bandas polimórficas (Tabela 1).

Menezes *et al* (2009) também obtiveram sucesso na amplificação de *primers* microssatélites desenvolvidos para *Piper nigrum* L. em diferentes espécies do gênero *Piper*,

P. attenuatum Buch.-Ham., *P. hispidinervium* C. DC., *P. tuberculatum* Jacq. e *P. colubrinum* Link. Naquele trabalho, o DNA de todas as espécies amplificou ao menos cinco dos nove *primers* testados. Dentre elas, as espécies *P. tuberculatum* e *P. attenuatum* amplificaram seis *primers*.

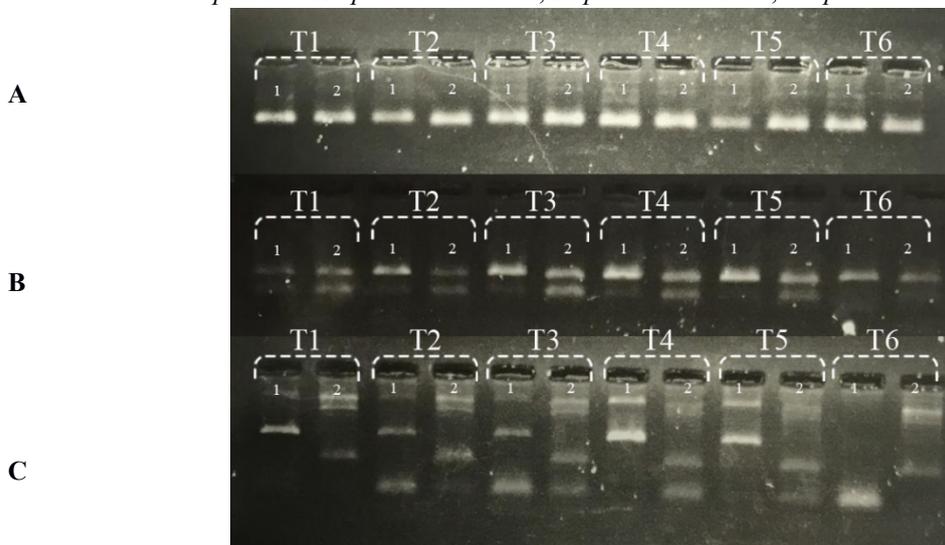
Tabela 1- Número de bandas e temperatura ideal de anelamento para cada par de *primer* microssatélite.

<i>Primers</i> SSR	Sequência 5'-3'	Número de bandas	Temperatura selecionada
UN00649 UN00649	F: TACAACAAGAGCATGGCTGC R: TTGTTAGCAGGTCTCCTCCC	1	54°C
UN01096 UN01096	F: ACTGGGAGAATCAGTGGCG R: CCTGCATGGTATCGTTGTTG	2	53°C
UN01526 UN01526	F: ACCCCCTGGGTGTCTCAG R: CCTCTGGAGCAGGAGCTGT	3	53°C

Para escolha da temperatura ideal de anelamento, foram selecionadas as corridas resultantes das reações que apresentaram maior intensidade, qualidade e melhor nitidez das bandas (figura 1). Foram escolhidas as temperaturas de 54°C, 53°C e 53°C para os *primers* UN00649, UN01096 e UN01526, respectivamente.

Estas temperaturas estão próximas da temperatura de anelamento de 53°C por 1 minuto, utilizada por Menezes *et al* (2009) nas condições de PCR para piperáceas nativas utilizando *primers* microssatélites de *P. nigrum* L., indicando a possibilidade de uso em estudos futuros.

Figura 1: DNA de duas espécies de piperáceas (1-*Piper tuberculatum*; 2-*Piper arboreum*) amplificados em seis temperaturas de anelamento (T1 = 51 °C, T2 = 52 °C, T3 = 53 °C, T4 = 54 °C, T5 = 55 °C, T6 = 56 °C), e três primers. A - primer UN00649; B - primer UN01096; C - primer UN01526.



Fonte: própria (2019)

Conclusões

Todos os primers específicos para *P. nigrum* L. amplificaram as espécies da Amazônia *P. tuberculatum* e *P. arboreum*, indicando possibilidade de uso em próximos estudos.

O primer UN01526 apresentou maior número de bandas polimórficas.

As temperaturas ideais de anelamento para os primers UN00649, UN01096 e UN01526 foram 54°C, 53°C e 53°C, respectivamente.

Referências

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 Amazônica**, v. 31, n. 3, p. 341-348, 2001.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

LEMONS, O.F.; POLTRONIERI, M.C.; RODRIGUES, S.M.; MENEZES, I.C; MONDIN, M. Conservação e melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) associado às técnicas de biotecnologia. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2011. 45 p.

MENEZES, C.; CIDADE, F. W.; SOUZA, A. P.; SAMPAIO, I. C. Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper, *Piper nigrum* L. (piperaceae). Technical note. **Conservation Genetics Resources**, v. 1, n. 1, p. 209-212, Dec. 2009

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