

ESTABELECIMENTO DE PADRÃO GENÉTICO MOLECULAR PARA SETE CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO *Piper nigrum* L. (Piperaceae) UTILIZANDO MICROSSATÉLITE

Resumo: O Brasil, juntamente com países Asiáticos, compõe o grupo dos maiores exportadores de pimenta-do-reino, *Piper nigrum* L., especiaria mais consumida mundialmente. No Pará, estado com maior produção do país, cultiva-se em torno de quatro cultivares nas áreas de produção. Atualmente a identificação das cultivares plantadas é feita utilizando caracteres morfo-agronômicos. Contudo, há dificuldade de identificação das cultivares utilizadas comercialmente pelos produtores que recebem nomes diversos em áreas de produção. O objetivo desse trabalho foi estabelecer o padrão genético de cultivares de *Piper nigrum* L. utilizando marcadores moleculares microssatélites. A metodologia utilizada foi extração de DNA de plantas de sete cultivares conservadas no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, amplificação de fragmentos utilizando nove loci microssatélites polimórficos e a genotipagem em gel desnaturante de poli(acrilamida) corado com prata. Os resultados mostraram diferenças entre as cultivares analisadas com nítidos agrupamentos distintos, sendo o método eficiente para estabelecer padrão genético molecular das cultivares de pimenta-do-reino.

Palavras-chave: cultivares, germoplasma, microssatélites, *Piper nigrum* L.

Introdução

O Brasil atualmente é o quarto maior exportador mundial de pimenta-do-reino com produção de 30.000t em 2011. A produtividade dessa especiaria no Estado do Pará, que detém em torno de 85% da produção nacional, tem decrescido e especialistas apontam como causa dessa diminuição, doenças causadas por fungos e mais recentemente por vírus (Brioso et al., 2000). A variabilidade da espécie no Brasil é reduzida, e o método de propagação assim como sistema de reprodução da espécie concorrem para a manutenção da falta de variação de caracteres em plantas de pimenta-do-reino. O material genético disponível no país encontra-se conservado no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental-PA que possui atualmente sete cultivares de *Piper nigrum* L. Nas áreas de cultivo da pimenta-do-reino, produtores costumam denominar grupos de plantas com nomes regionais que muitas vezes não correspondem ao nome oficial registrados no banco de germoplasma. O uso de marcador morfo-agronômicos, atualmente ainda é o método mais utilizado em trabalhos de identificação de pimenta-do-reino. Contudo, níveis taxonômicos hierárquicos mais baixos necessitam de análises mais rigorosas as quais, via de regra, utilizam marcadores moleculares. Assim, para caracterização de cultivares de pimenta-do-reino optou-se pela utilização de marcador

microsatélite para caracterização do material do banco de germoplasma de pimenteira-do-reino como também para identificação de material em área de produtores.

Material e Métodos

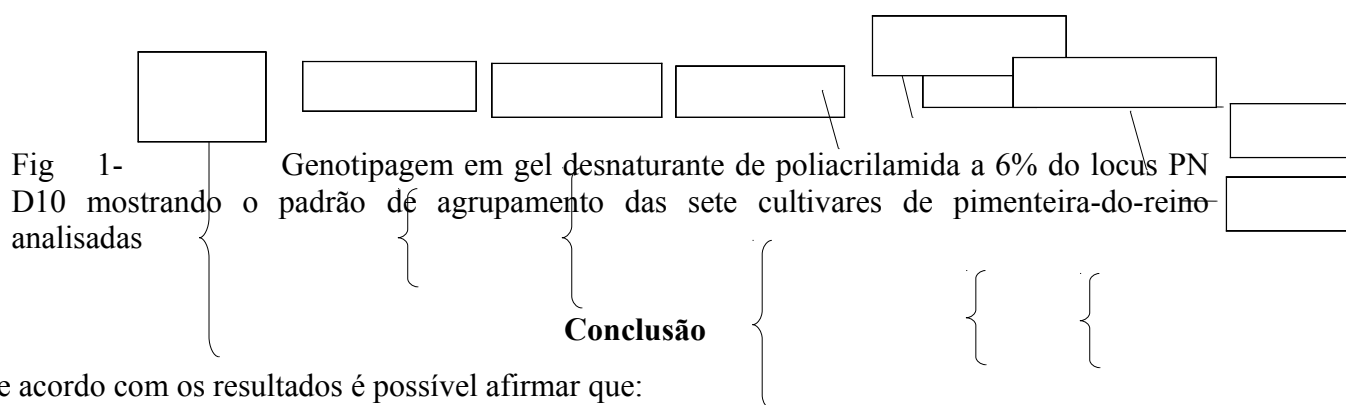
Folhas tenras de plantas de pimenteira-do-reino, *Piper nigrum* L., das cultivares Cingapura, Perunkoide, Guajarina, Kuthyravalli, Bento, Apra e Bragantina, do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, foram coletadas para extração de DNA utilizando o método CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) descrito por Doyle & Doyle (1990) e analisado em gel de agarose a 1%. Para a amplificação dos fragmentos contendo os microsstelites, as condições de PCR foram: um ciclo de 94°C por 1 min; seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 min; 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 5 min com volume final de 20 µL. Os produtos foram avaliados em gel de agarose a 2%. Nove *primers* microsatelites polimorficos, desenvolvidos por Menezes et al. (2009), foram utilizados para genotipagem em gel desnaturante de poli(acrilamida a 6% e corado com nitrato de prata (Creste, 2001). A leitura dos alelos foi feita visualmente tomando-se como padrão marcador de peso molecular de 10 pb.

Resultados e Discussão

Os resultados mostram que o número de alelos variou de 3 (PN) a 9 (PN) com os fragmentos variando de 100 a 296pb (tabela 1) e uma média de 1,3 alelos por locus. Os nove microsatélites utilizados mostraram-se eficientes para o agrupamento das cultivares. A análise mostrou uma leitura de padrão diplóide característico de aloploplóides, que são resultados de eventos de hibridações seguidos de duplicação, que tendem mostrar em genotipagem de marcadores codominantes, como é o caso de microsatélite, um padrão diplóide. Trabalhos de cariotipagem com *Piper* mostram que séries poliplóides são comuns nesse gênero (Mathew, 1958). O agrupamento da cultivar Bento, Perunkoide, Cingapura e Apra mostram um padrão homogêneo com alelos de mesmo número de pares de base (pb) dentro do mesmo grupo. Na leitura para os indivíduos da cultivar Guajarina os quatro primeiros indivíduos seguem o mesmo padrão de alelos, porém o quinto indivíduo mostra, em cinco locus analisados, alelos diversos aos do grupo, o que pode indicar erro na identificação da planta no banco de germoplasma ou mesmo troca de amostra. O mesmo ocorre com o último indivíduo da cultivar Kuthyravalli, que mostra também alelos distintos (ambos indivíduos indicados com seta). Apesar de haver uma distinção entre grupos de cultivares nota-se o compartilhamento de alelos entre elas, característica que pode ser indício de parentais comuns durante o processo de formação dessas plantas. A análise mostra também que apesar do tipo de propagação utilizada para a espécie, de forma vegetativa, o grau de heterose é alto (Fig 1).

Tabela 1 Intervalo de tamanho dos fragmentos em pares de base (pb) de cada cultivar para os nove loci microssatélites utilizados

Cultivar	Intervalo em pares de base (pb) dos fragmentos
Bento	138 -278pb
Perunkoide	138-284pb
Cingapura	100-288pb
Guajarina	132-288pb
Bragantina	138-288pb
Apra	110-296pb
Kuthyravalli	110-296pb



De acordo com os resultados é possível afirmar que:

- O método utilizado é eficiente para estabelecer padrão genético molecular das cultivares de pimenteira-do-reino.
- Os microssatélites utilizados podem ser utilizados para determinação de paternidade
- As cultivares do banco de germoplasma de pimenteira-do-reino da Embrapa, apesar da propagação vegetativa, conservam heterozigosidade considerável

Referências Bibliográficas

- BRIOSO, P.S.T; POZZER, L.; SILVA S.; KITAJIMA, E.W.; POLTRONIERI L.S; DUARTE, M.L.R. **Amplificação de fragmentos específicos do PYMV a partir de pimenta-do-reino** In: XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2000. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.438-438
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. **Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining.** **Plant Mol. Biol. Rep.** 2001, v. 19, p.299-306.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética.** Ed. Embrapa-Cenargen. Brasília.1998 220p.
- MATHEWS, P.M. **Studies on Piperaceae.** **J. Indian Bot. Soc.** 1958 v.37, p.165-171.

MENEZES, I. C. de.; CIDADE, F.W.; SOUZA, A.P.; SAMPAIO **Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper *Piper nigrum* L. (Piperaceae) Conservation Genetic Resource. 2009 v.1 1-4p**