

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



19º Seminário de
Iniciação Científica e
3º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2015

19 a 20 de agosto

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2015



QUANTIDADE DE DNA NUCLEAR DE GENÓTIPOS DO GÊNERO *Piper*

Lana Roberta Reis dos Santos¹, Oriel Filgueira de Lemos², Simone de Miranda Rodrigues³,
Mateus Mondin⁴

¹ Doutoranda em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, Laboratório de Biotecnologia Vegetal - EMBRAPA, lana.robert@homail.com

² Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, oriel.lemos@embrapa.br

³ Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, simone.rodrigues@embrapa.br

⁴ Professor da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ, Laboratório de Citogenômica e Epigenética, mmondin@usp.br

Resumo: *Piper* é um gênero que se destaca por possuir espécies com importância econômica, como a pimenta-do-reino, que apresenta suscetibilidade a doenças, e outras nativas da Amazônia, que por sua vez, são resistentes. Neste caso, é necessária a caracterização citogenética dessas espécies deste gênero para posterior utilização em programas de melhoramento genético. Com o objetivo de mensurar o conteúdo de DNA nuclear de espécies do gênero *Piper* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental através da técnica de citometria de fluxo, foram analisados 11 genótipos do gênero *Piper*, dentre os quais quatro eram cultivares de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e sete espécies de *Piper* nativa da Amazônia. O tamanho do genoma de cada genótipo foi apresentado em megabases (Mb) e os resultados evidenciaram distinção entre o conteúdo de DNA das espécies analisadas. Portanto, a técnica de citometria de fluxo permitiu caracterizar e identificar diferenças citogenéticas entre espécies do gênero *Piper*.

Palavras-chave: citometria de fluxo, pimenta-do-reino, espécies nativas

Introdução

O gênero *Piper* inclui grande número de espécies que se caracterizam pelo uso na medicina popular, farmacêutica e na indústria de condimentos (GOULART, 2011). Muitas espécies do gênero *Piper*, nativas da Amazônia, apresentam potencial uso em programas de melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), uma vez que estas espécies silvestres exibem resistência à fusariose, sendo esta uma das principais doenças que tem ocasionado sérios prejuízos na produção e ciclo econômico no Brasil da cultura pimenta-do-reino (LE MOS et al., 2011). Os usos dessas fontes de resistência são de grande importância, porém, para utilização eficiente das espécies de *Piper* nativa em programas de melhoramento genético, faz-se necessário a caracterização destas espécies. Uma das



ferramentas capazes de elucidar a variabilidade genética existente entre espécies deste gênero é a análise citogenética, a qual tem se mostrado muito útil para a distinção de espécies e pode estar aliada a muitos outros ramos da pesquisa vegetal. Portanto, outras técnicas podem ser utilizadas para complementar os estudos citogenéticos, como é o caso da citometria de fluxo que permite que seja estimado o conteúdo de DNA nuclear dos genótipos a fim de compará-los entre as espécies estudadas. Objetivou-se com este trabalho mensurar o conteúdo de DNA nuclear de espécies do gênero *Piper* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental.

Material e Métodos

Diferentes espécies do gênero *Piper* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental foram cultivadas em casa de vegetação na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – SP. O preparo das amostras e as análises de citometria de fluxo foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC. Foram analisados 11 genótipos do gênero *Piper*, sendo quatro cultivares da espécie *Piper nigrum* (Kottanadan, Iaçará, Cingapura e Apra) e as seguintes espécies nativas: *P. alapetiolatum*, *P. colubrinum*, *P. tuberculatum*, *P. divaricatum*, *P. attenuatum*, *P. arborium* e *P. hispidum*. Para a determinação da quantidade de DNA, utilizou-se aproximadamente entre 20 e 30 mg de tecido foliar jovem de cada genótipo, acrescida com a mesma quantidade de massa foliar de *Citrus sinensis* (padrão interno de referência cuja quantidade de DNA é de 319,2 Mb). Com o auxílio de um bisturi, as folhas foram trituradas em placa de Petri contendo 1 mL do tampão de extração de núcleos MgSO_4 gelado para suspensão nuclear (DOLEZEL; BARTOS, 2005). Esta suspensão foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de náilon de 50 μm . Os núcleos foram corados com uma solução composta de iodeto de potássio de 1 mg/mL^{-1} e 5 μL de RNase. O tamanho do genoma de cada genótipo está sendo apresentado em megabases (Mb).

Resultados e Discussão

Baseado na comparação do pico relativo ao DNA nuclear do padrão interno utilizado *C. sinensis* em relação aos picos de cada genótipo estudado, os valores do tamanho dos genomas nucleares podem ser observados na Tabela 1.



Tabela 1. Tamanho do genoma de espécies do gênero *Piper* e da espécie padrão *Citrus sinensis*.

Espécie	Cultivar	Tamanho do genoma (Mb)
<i>C. sinensis</i>	-	319,2
<i>P. tuberculatum</i>	-	468,9
<i>P. attenuatum</i>	-	543,6
<i>P. nigrum</i>	Kottanadan	637,7
<i>P. nigrum</i>	Iaçará	667,9
<i>P. nigrum</i>	Apra	671,9
<i>P. nigrum</i>	Cingapura	675,3
<i>P. hispidum</i>	-	747,9
<i>P. colubrinum</i>	-	777,8
<i>P. arborium</i>	-	1148,3
<i>P. alapetiolatum</i>	-	1283,0
<i>P. divaricatum</i>	-	1687,6

Os resultados evidenciaram que os genótipos apresentam valores de conteúdo de DNA nuclear distintos. Observou-se que, com exceção das espécies *P. tuberculatum* e *P. attenuatum*, as quais apresentaram os menores valores 468,9 e 543,6 Mb, respectivamente, que as espécies nativas apresentaram maior quantidade de DNA que as espécies cultivadas. Este fato normalmente está relacionado ao nível de ploidia das espécies, pois espécies silvestres diploides apresentam maior quantidade de DNA que as espécies tetraplóides cultivadas, como é o caso destas cultivares de *P. nigrum*. Portanto, faz-se necessário a caracterização do nível de ploidia das espécies nativas mensuradas.

Samuel et al. (1986) determinaram a quantidade de DNA em nove espécies de *Piper* do Novo e do Velho Mundo, cultivadas e selvagens. A quantificação realizada por densitometria por Feulgen revelou variação de conteúdo de DNA. De acordo com os autores, as espécies silvestres tendem a ter maior quantidade de DNA que as espécies cultivadas.



Conclusão

Todos os genótipos apresentam diferenças em quantidades de DNA certificando-se que são genótipos diferentes.

Agradecimentos

Ao Macroprograma 2: Competitividade e Sustentabilidade da Embrapa Amazônia Oriental, que através do projeto Melhoramento genético da pimenteira-do-reino auxiliado por técnicas de citogenética e biologia avançada, tem dado suporte para o desenvolvimento destes estudos.

Referências Bibliográficas

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, jan. 2005.

GOULART, J. de C. **Aspectos citogenéticos, morfológicos e anatômicos de espécies de Piper L. nativas da Amazônia brasileira**. 2011. 127 f. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LEMOS, O. F. de; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. de M.; MENEZES, I. C. de M.; MONDIN, M. **Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) associado às técnicas de biotecnologia**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. 45 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 375).

SAMUEL, R.; SMITH, J. B.; BENNETT, M. D. Nuclear DNA variation in Piper (Piperaceae). **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 28, n. 6, p. 1041-1043, Dec. 1986.