



## SELEÇÃO DE *PRIMERS* SSR PARA GENOTIPAGEM DE CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO

Eduardo Filipe Torres Vieira<sup>1</sup>, Simone de Miranda Rodrigues<sup>2</sup>, Ilmarina Campos de Menezes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Eng<sup>o</sup> Agrônômica da UFRA/Bolsista Embrapa Amazônia Oriental, eduardo\_filipe16@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, simone.rodrigues@embrapa.br

<sup>3</sup>Analista da Embrapa Amazônia Oriental, ilmarina.menezes@embrapa.br

**Resumo:** A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma especiaria de grande importância econômica no mercado nacional e internacional. Para o desenvolvimento do programa de melhoramento genético da espécie, a identificação dos acessos de pimenteira-do-reino do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental e de híbridos intraespecíficos resultantes de polinização controlada é de grande importância. Objetivou-se iniciar as ações de pesquisa voltadas à obtenção um padrão de genotipagem de cultivares de *Piper nigrum* L. conservadas no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental utilizando marcador microssatélite. Foram selecionados materiais de duas cultivares de pimenteira-do-reino, laçará e Bento. Para seleção dos marcadores, foram utilizados 3 *primers* SSR pré-selecionados, UN00649, UN0913 e UN01876. Para cada *primer* foram testadas seis temperaturas de 51°C a 56°C. O *primer* UN00649 apresentou maior número de bandas polimórficas. As temperaturas ideais de anelamento para os para os *primers* UN00649, UN00913 e UN01876 foram 54°C, 54°C e 53°C, respectivamente.

**Palavras-chave:** gradiente, marcador microssatélite, *Piper nigrum* L.

### Introdução

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma especiaria de grande importância econômica na região Norte, sendo considerada bastante rentável por alcançar preços expressivos nos mercados nacional e internacional. É uma cultura que se desenvolve muito bem em clima quente e úmido, com precipitação pluviométrica anual entre 1.500 mm e 3.000 mm, umidade entre 80% e 88% e temperatura média de 23°C a 28°C, condições encontradas na região norte do Brasil (Duarte et al.,



2006). O programa de melhoramento da pimenteira-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental se concentra na produção de híbridos intraespecíficos, focados na obtenção de materiais genéticos mais produtivos, precoces e tolerantes à seca, enquanto o interespecífico foca na obtenção de materiais resistentes à fusariose (Poltronieri et al., 2000). É estreita a base genética entre as cultivares de pimenteira-do-reino, o que dificulta o progresso do programa de melhoramento da espécie, incluindo a dificuldade para identificação de materiais genéticos no campo. Portanto, a identificação dos acessos de pimenteira-do-reino do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental e de híbridos intraespecíficos resultantes de polinização controlada é importante para o desenvolvimento do programa de melhoramento genético da espécie, objetivando estabelecer padrão de genotipagem molecular com marcador microssatélite para caracterização/discriminação de cultivares e, futuramente, determinação de paternidade de híbridos intraespecíficos de pimenteira-do-reino. Assim, esse trabalho objetivou iniciar as ações de pesquisa voltadas à obtenção um padrão de genotipagem de cultivares de *P. nigrum* L. conservadas no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental utilizando marcador microssatélite.

### **Material e Métodos**

Foram selecionados materiais de duas cultivares de pimenteira-do-reino, laçará e Bento, do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém (PA). A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990). Os tecidos vegetais recém-coletados foram transportados em isopor com gelo para o Laboratório de Genética Molecular da própria instituição. As folhas frescas foram lavadas em água corrente, seguido de lavagem com hipoclorito de sódio 10%, antes de serem lavados com água destilada e secos usando papel toalha. Retiraram-se as nervuras centrais das folhas, e pedaços de tecidos foliares foram colocados em cadinho de porcelana previamente congelados, adicionando-se PVP (polivinilpirrolidona) e 20  $\mu$ l de  $\beta$ -Mercaptoetanol, após, foram macerados usando nitrogênio líquido. Cerca de 5 g do tecido macerado foi transferido para tubo Falcon de 15 ml e, em seguida, adicionaram-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 colocados em banho-maria a 60 °C por 1 hora, invertendo-se a cada 10 minutos. Após esfriar, misturou-se ao extrato, 5 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para formar uma emulsão. Em seguida, foi realizada centrifugação por 10 minutos a 4 °C e 12.000 rpm e, posteriormente, retirada a fase aquosa sobrenadante e transferida para outro tubo Falcon, logo acrescido de álcool 95%, visando a precipitação do DNA *overnight*. Foi realizada outra centrifugação por 10 minutos a 4 °C e 12.000 rpm e retirada de todo o álcool para secagem à temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas. Após a secagem do pellet, o DNA foi ressuscitado com solução de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo RNase (10 ng.mL<sup>-1</sup>). Por fim, as amostras foram armazenadas em freezer (-20 °C).

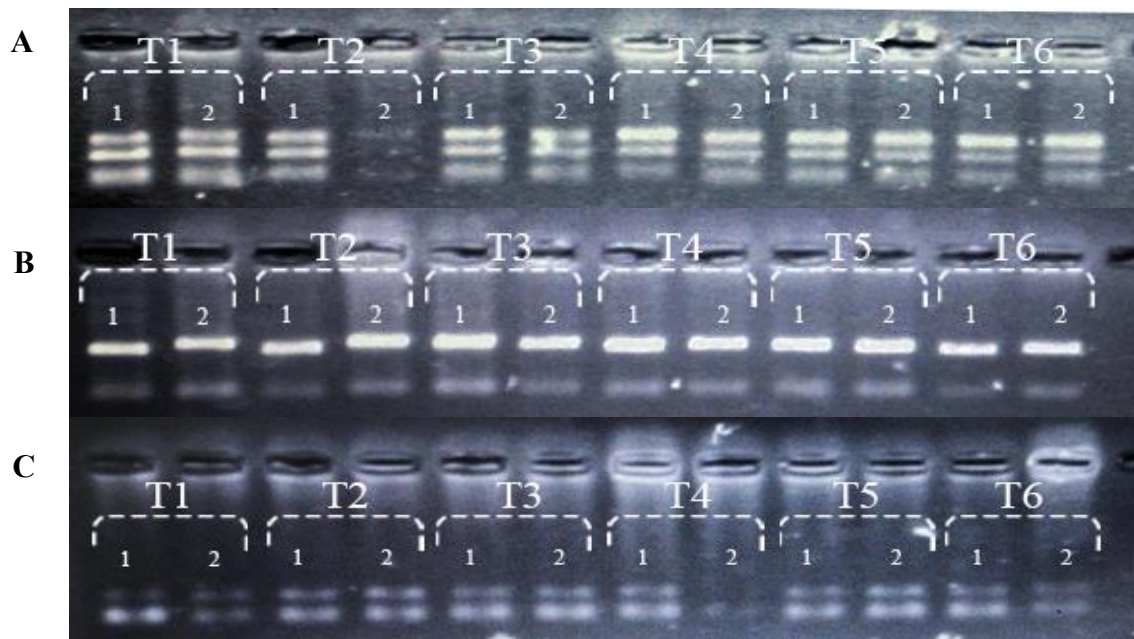
A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% imerso em cuba horizontal com TBE 1X e feita eletroforese a 120 V por 40 minutos. As bandas foram comparadas utilizando-se o programa LabImage 1D, a partir de três padrões do DNA do fago λ (50, 100 e 200 ng.µl<sup>-1</sup>). Posteriormente, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 10 ng.µl<sup>-1</sup>.

Para seleção dos marcadores, foram utilizados 3 *primers* SSR pré-selecionados, específicos para pimenteira-do-reino, UN00649, UN0913 e UN01876. 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<sup>-1</sup>), 2,5 µl de tampão 10X, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,5 µl de dNTPs (2,5 mM), 2 µl de cada *primer* F e R (UN00649, UN0913 e UN01876) (10 pmol/µl), 0,2 µl de *Taq* polimerase (Invitrogen). As amostras foram amplificadas no termociclador Applied Biosystems Veriti. As condições de PCR foram: um ciclo de 94 °C por 1 minuto; seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 51 °C a 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram corados com solução de azul de bromofenol mais GelRed, aplicados em gel de agarose 3% submerso em 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 minutos. Em seguida, foram visualizados e fotografados em fotodocumentador por transiluminação em ultravioleta.



## Resultados e Discussão

O critério utilizado para escolha da temperatura ideal de anelamento foi a partir da reação que apresentou maior intensidade, qualidade e melhor nitidez das bandas (figura 1).



**Figura 1.** DNA de duas cultivares de pimenteira-do-reino (1-laçará; 2-Bento) amplificados em seis temperaturas (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* UN00913; C - *Primer* UN01876.

**Tabela 1.** Número de bandas e temperatura ideal de anelamento para cada par de *primer* SSR. F: Forward, R: Reverse.

<b>Primers SSR</b>	<b>Sequência 5'-3'</b>	<b>Número de bandas</b>	<b>Temperatura ideal</b>
UN00649	F: TACAACAAGAGCATGGCTGC	3	54°C
UN00649	R: TTGTTAGCAGGTCTCCTCCC		
UN00913	F: ACTTCCAACCACCATCTTCG	2	54°C
UN00913	R: ACCTTTGGGTGCTGTTGTTC		
UN01876	F: TCAATGTTGTCGGTGCTGAT	2	53°C
UN01876	R: ATATCAAGCTCCCCTTCGTG		

Como mostrado na tabela 1, todos os *primers* SSR apresentaram polimorfismo. O *primer* UN00649 apresentou maior número de bandas polimórficas em relação aos *primers* UN00913 e UN01876. Para a temperatura ideal de anelamento, foram escolhidas as temperaturas de 54 °C, 54 °C e 53 °C para os *primers* UN00649, UN00913 e UN01876, respectivamente.

Menezes et al. (2009), utilizaram temperaturas acima das encontradas no atual trabalho, 58 °C como temperatura de anelamento por 1 minuto nas ampliações, durante o desenvolvimento de marcadores SSR para *P. nigrum* L. Neste mesmo trabalho, os SSR desenvolvidos também foram testados para diferentes espécies do gênero *Piper*, *P. attenuatum* Buch.-Ham., *P. hispidinervium* C. DC., *P. tuberculatum* Jacq. e *P. colubrinum* Link, utilizando como temperatura de anelamento 53 °C por 1 minuto, mostrando a necessidade de ajuste da temperatura de anelamento para a espécie utilizada.

### Conclusão

O *primer* UN00649 apresentou maior número de bandas polimórficas.

As temperaturas ideais de anelamento para os *primers* UN00649, UN00913 e UN01876 foram 54 °C, 54 °C e 53 °C, respectivamente.

### Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Oriental pelo apoio financeiro via projeto N° 22.13.06.022.00.00-00.

### Referências Bibliográficas

DUARTE, M. L. R.; POLTRONIERI, M. C.; CHU, E. Y.; OLIVEIRA, R. F.; LEMOS, O. F.; BENCHIMOL, R. L.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; SOUZA, G. F. **A cultura da pimenta-do-reino**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 73 p. (Coleção Plantar, 55).

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

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, 2009.

POLTRONIERI, M. C.; ALBUQUERQUE, F. C.; OLIVEIRA, M. R. C. de. Retrospectivas, avanços e perspectivas no melhoramento genético de pimenta-do-reino visando resistência à fusariose. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 246-248, 2000. Suplemento. Anais do Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 33., 2000, Belém, PA.