



## OTIMIZAÇÃO E SELEÇÃO DE *PRIMERS* SSR PARA CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CULTIVARES DE PIMENTA-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 Engenharia Agrônoma da UFRA, bolsista Embrapa Amazônia Oriental, [eduardo\\_filipe16@yahoo.com.br](mailto:eduardo_filipe16@yahoo.com.br);

<sup>2</sup>Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, [simone.rodrigues@embrapa.br](mailto:simone.rodrigues@embrapa.br);

<sup>3</sup>Analista da Embrapa Amazônia Oriental, [ilmarina.menezes@embrapa.br](mailto:ilmarina.menezes@embrapa.br).

**Resumo:** A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) possui grande destaque na economia do agronegócio nacional e internacional. No entanto, a produção é afetada por várias doenças, responsáveis por perdas expressivas de produtividade. Para o desenvolvimento do programa de melhoramento genético da espécie, é necessária a identificação dos acessos de pimenteira-do-reino do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. Objetivou-se, portanto, dar continuidade às ações de pesquisa para a obtenção de um padrão de genotipagem de cultivares e híbridos de *Piper nigrum* L. conservadas no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, utilizando marcador microsatélite. Foram selecionados materiais de duas cultivares de pimenteira-do-reino, laçarã e Bento, e testados 10 *primers* SSR. Para cada *primer* foram utilizadas seis temperaturas de 51 °C a 56 °C. Todos os *primers* amplificaram em diferentes temperaturas.

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

### Introdução

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma especiaria de grande destaque na economia do agronegócio mundial, nacional e regional. O Brasil é o quarto maior produtor mundial, sendo o Pará o segundo maior produtor nacional. A pipericultura paraense é severamente afetada por várias doenças, responsáveis por perdas expressivas de produtividade, potencializada, ainda,



pela estreita base genética entre as cultivares de pimenteira-do-reino, tornando-a mais suscetível (Lemos et al., 2011; Rodrigues; Lemos, 2019). A Embrapa Amazônia Oriental vem desenvolvendo um programa de melhoramento da pimenteira-do-reino atuante na produção de híbridos para obtenção de materiais genéticos mais produtivos, precoces, tolerantes à seca e resistentes à fusariose. Esse programa é aliado a métodos e ferramentas da biologia molecular, com uso de marcadores moleculares, como os microssatélites ou *simple sequence repeat* (SSR), que podem ser usados para discriminação de cultivares, pois um dos obstáculos deve-se à dificuldade em diferenciar as cultivares, por serem morfologicamente semelhantes (Lemos et al., 2011).

Desse modo, este trabalho objetivou dar continuidade à obtenção de um padrão de genotipagem molecular para discriminação e identificação de cultivares e híbridos de *Piper nigrum* L. conservadas no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental utilizando marcador microssatélite.

### **Material e Métodos**

Foi realizada a extração do DNA de duas cultivares de pimenteira-do-reino do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA: laçará e Bento. A extração do DNA foi feita de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com modificações. 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 lavadas com água destilada e secas usando papel-toalha. Retiraram-se as nervuras centrais das folhas, e pedaços de tecidos foliares foram colocados em cadinhos de porcelana previamente congelados, adicionando-se polivinilpirrolidona (PVP) e 20 µL de β-Mercaptoetanol. Em seguida, foram macerados usando nitrogênio líquido. Cinco gramas do tecido macerado foi transferido para tubo Falcon de 15 mL e, em seguida, 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 colocados em banho-



maria a 60 °C por 1 hora, invertendo-os a cada 10 minutos. Após esfriarem, 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, que foi 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 retirado todo o álcool para secagem à temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas. Após a secagem do pélete, o DNA foi ressuspenso com solução de T.E (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 submetido à 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>. Após a quantificação, foram selecionados materiais de duas cultivares de pimenteira-do-reino, laçarã e Bento, e dez *primers* SSR específicos para pimenteira-do-reino para visualização da qualidade da amplificação dos DNAs, por meio da otimização e seleção da temperatura de anelamento dos iniciadores. 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 (Tabela 1) (10 pmol/μl), e 0,2 μL de *Taq* polimerase (Invitrogen). As amostras foram amplificadas no termociclador Applied Biosystems Veriti, utilizando gradiente de temperatura. 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

Todos os *primers* selecionados amplificaram para as cultivares de pimenteira, como observado na Figura 1. A tabela 1 apresenta as temperaturas ideais de anelamento escolhidas para os *primers*, de acordo com a intensidade e qualidade das ampliações. Essas temperaturas variaram de acordo com o *primer* utilizado, havendo necessidade de ajustes de temperaturas. Menezes et al. (2009) utilizaram 58 °C para temperatura de anelamento ao analisarem a variabilidade genética de microssatélites em 20 variedades clonais de *Piper nigrum* L., valor superior ao utilizado neste trabalho, considerando a necessidade de adequações das temperaturas de anelamento dos *primers*.



**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 dez *primers* (A – *Primer* UN05775; B – *Primer* UN02048; C – *Primer* PN02; D – *Primer* UN00044; E – *Primer* UN00904; F – *Primer* UN04358; G – *Primer* UN05311; H – *Primer* UN01526; I – *Primer* UN01096; J – *Primer* PN03).



**Tabela 1.** Temperatura ideal de anelamento selecionada para cada par de *primer* SSR. F: Forward, R: Reverse.

| <i>Primers</i> SSR     | Sequência 5'-3'  | Temperatura ideal |
|------------------------|--|-------------------|
| UN05775 F<br>UN05775 R | F: TCGAATGGGAAGATCAGTGG<br>R: CCTGCATGGTATCGTTGTTG     | 56°C              |
| UN02046 F<br>UN02046 R | F: AAGCTGGTAGCTTGTTCTCCC<br>R: GGGGGAGAAAACATTGGTGT    | 56°C              |
| PN02 F<br>PN02 R       | F: GTCGTCATGTGCGATGTCTC<br>R: AGGTGATGTAGTGGTTCTTGCG   | 54°C              |
| UN00044 F<br>UN00044 R | F: GAGTGGATCGGGTGAAAGAA<br>R: GGCCCAAACCTCCCTATCAAG    | 55°C              |
| UN00904 F<br>UN00904 R | F: TTCGGCATCTTCATCACAAG<br>R: CCAGGCTCACAATCTCCAAT     | 56°C              |
| UN04358 F<br>UN04358 R | F: TCTCAACTTCCACCATTCGG<br>R: GCAGCAGTACGAGCAGCA       | 53°C              |
| UN05311<br>UN05311     | F: GGACGTTAGAACACCGCAAT<br>R: GTTCACCCCCGTAGTCACAC     | 54°C              |
| UN01526<br>UN01526     | F: ACCCCCTGGGTGTCTCAG<br>R: CCTCTGGAGCAGGAGCTGT        | 54°C              |
| UN01096<br>UN01096     | F: ACTGGGAGAATCAGTGGCG<br>R: CCTGCATGGTATCGTTGTTG      | 54°C              |
| PN03<br>PN03           | F: CCTTGATGCAAAACCTCATAGAA<br>R: TGAAAATTAAGCGTGATAGGA | 53°C              |

### Conclusão

Todos os *primers* testados amplificaram para as cultivares laçará e Bento de pimenteira-do-reino em temperaturas distintas.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Embrapa Amazônia Oriental, pelo apoio financeiro.

### Referências

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

LEMOS, O. F. de; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. de M.; MENEZES, I. C. de; MONDIN, M. **Conservação e melhoramento genético da pimenteira-**

**do-reino (*Piper nigrum* L.) em associação com as técnicas de biotecnologia.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. 45 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 375).

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.

RODRIGUES, S. de M.; LEMOS, O. F. de. **Tecnologias para inovação na cultura da pimenteira-do-reino: desafios e oportunidades.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2019. 52 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 442).