

Conservação e Melhoramento Genético da Pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em Associação com as Técnicas de Biotecnologia



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

Documentos 375

Conservação e Melhoramento Genético da Pimenteira-do- reino (*Piper nigrum* L.) em Associação com as Técnicas de Biotecnologia

*Oriel Filgueira de Lemos
Marli Costa Poltronieri
Simone de Miranda Rodrigues
Ilmarina Campos de Menezes
Mateus Mondin*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Oriental

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n.
Caixa Postal 48. CEP 66095-100 - Belém, PA.
Fone: (91) 3204-1000
Fax: (91) 3276-9845
www.cpatu.embrapa.br
sac@cpatu.embrapa.br

Comitê Local de Publicação

Presidente: *Michell Olivio Xavier da Costa*
Secretário-Executivo: *Moacyr B. Dias-Filho*
Membros: *Orlando dos Santos Watrin*
Márcia Mascarenhas Grise
José Edmar Urano de Carvalho
Regina Alves Rodrigues
Rosana Cavalcante de Oliveira

Revisão técnica: *Luiza Hitomi Igarashi Nakayama* – Ceplac/PA
Selma Toyoko Ohashi – Ufra

Supervisão editorial e revisão de texto: *Luciane Chedid Melo Borges*
Normalização bibliográfica: *Luiza de Marillac P. Braga Gonçalves*
Tratamento de imagens e editoração eletrônica: *Vitor Trindade Lôbo*
Foto da capa: *Oriel Filgueira de Lemos*

1ª edição

Versão eletrônica (2011)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Amazônia Oriental

Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) associado às técnicas de biotecnologia / Oriel Filgueira de Lemos... [et. al.].- Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2011.
45 p. il. color. (Documentos / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0513, 375).

1. Pimenta-do-reino - Doença. 2. *Piper nigrum* L. 3. Fusariose. 4. Melhoramento genético vegetal. 5. Cultura de tecidos. 6. Banco de germoplasma. I. Embrapa Amazônia Oriental. II. Lemos, Oriel Filgueira de.

CDD 633.84

© Embrapa 2011

Autores

Oriel Filgueira de Lemos

Engenheiroagrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.
oriel@cpatu.embrapa.br

Marli Costa Poltronieri

Engenheira-agrônoma, mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.
marli@cpatu.embrapa.br

Simone de Miranda Rodrigues

Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.
simone@cpatu.embrapa.br

Ilmarina Campos de Menezes

Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e
Biologia Molecular, analista da Embrapa Amazônia
Oriental, Belém, PA.

ilmarina@cpatu.embrapa.br

Mateus Mondin

Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética
e Melhoramento de Plantas, professor da
Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, SP.

mondin@esalq.usp.br

Apresentação

A cultura da pimenteira-do-reino tem grande expressão econômica para o Brasil e particularmente para o Estado do Pará. Ao longo da história de cultivo, a Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, tem gerado tecnologias para a melhoria do seu sistema de produção, tornando-a mais produtiva e competitiva. Entretanto, a forma cultivada geralmente em monocultivo sob tutores mortos e a estreita variabilidade genética das cultivares em uso favoreceram a ocorrência de algumas doenças, principalmente a fusariose, que tem dizimado grandes áreas de cultivo e reduzido o ciclo da cultura de 15 a 20 anos para menos de 8 anos. É uma cultura geralmente de agricultores familiares que têm grande interesse em cultivares que sejam mais produtivas, com espigas longas, frutos grandes e densos e produtividade acima de 3,0 kg de pimenta seca por planta. Isso associado à tolerância à doença e boa adaptação às condições de cultivo. A alternativa para obtenção de novas cultivares é um programa de melhoramento genético que use as modernas ferramentas da biotecnologia combinadas com o melhoramento convencional. Este documento contempla um programa de melhoramento em que para a criação da variação genética adotará o método de hibridação intra e interespecífica entre as cultivares de *Piper nigrum* e as espécies de *Piper* nativas. Por meio de polinização controlada, utilizará as técnicas de cultura de tecidos para a germinação e clonagem in vitro

das sementes híbridas geradas, os marcadores moleculares do tipo microssatélites para estudos de diversidade genética e genotipagem dos híbridos, estudos de citogenética para dar suporte à escolha de parentais para o programa de cruzamento, o desenvolvimento de método de microenxertia para o uso na conservação de germoplasma dentro do BAG de pimenteira-do-reino e abordará, ainda, a possibilidade de identificação de genes relacionados à resistência à fusariose e uso na transgenia. Enfim, é um trabalho que busca envolver as principais ferramentas biotecnológicas no desenvolvimento de um programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino para gerar novas cultivares de uma forma mais eficiente e rápida, com possibilidade de as plantas chegarem às mãos dos produtores em pouco tempo.

Claudio José Reis de Carvalho

Chefe-geral da Embrapa Amazônia Oriental

Sumário

Conservação e Melhoramento Genético da Pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.) em Associação com as Técnicas de Biotecnologia	09
Introdução	09
Conservação de gremosplasma.....	11
Principais cultivares.....	13
Cingapura.....	13
Guajarina.....	14
Bragantina.....	15
APRA	16
Kuthiravally	17
Kottanadan.....	18
Iaçará	19
Programa de melhoramento genético	21

Estudos citogenéticos.....	27
Aplicação das técnicas de cultura de tecidos.....	28
Microenxertia	33
Desenvolvimento de marcadores moleculares	
do tipo microssatélites	34
Identificação de genes	38
Perspectivas futuras	39
Referências.....	41

Conservação e Melhoramento Genético da Pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em Associação com as Técnicas de Biotecnologia

Nádia Elígia Nunes Pinto Paracampo

Introdução

Originária da Índia, a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) foi introduzida no Brasil no século XVII, sendo difundida e intensificada no Estado do Pará a partir de 1933 por imigrantes japoneses. Em nível de produção mundial, o Brasil chegou a se destacar como o maior produtor, chegando a produzir 50.000 t em 1991. Ao longo dos anos subsequentes, no entanto, a produção brasileira foi decrescendo, registrando 13.000 t em 1995 (OKAJIMA, 1997), e atualmente fixou-se como terceiro maior produtor mundial, com produção de cerca de 30.000 t anuais, dos quais quase 90% são produzidos no Estado do Pará (IPC, 2010).

Apresenta grande importância econômica e social, pois cada tonelada de pimenta colhida corresponde a uma mão de obra empregada no campo, gerando divisas de mais de 50 milhões de dólares ao ano e empregando cerca de 70 a 80 mil pessoas. São três tipos de pimenta-do-reino produzidos no País para serem comercializados no mercado internacional: preta, branca e verde. No Brasil, os

principais estados produtores, além do Pará, são o Espírito Santo, Maranhão, Paraíba, Ceará, Amapá, Bahia e Minas Gerais.

Essa especiaria, produto tipicamente de exportação, apresenta grande oscilação de preço no mercado internacional. Entretanto, o que tem ocasionado sérios prejuízos na produção e ciclo econômico no Brasil é a ocorrência da doença fusariose, causada pelo fungo *Nutria haematococca* f. sp. *piperis* (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*), que ocorre a nível epidêmico nas áreas de produção. Como consequência, o ciclo produtivo da cultura foi alterado, tornando-se mais curto, com uma média de 5 a 6 anos de sobrevivência em área de ocorrência da doença.

A vulnerabilidade genética das cultivares à doença e a rápida disseminação do patógeno têm contribuído para o agravamento do quadro produtivo da cultura. Em parte, isso se deve pela forma de propagação utilizada, que favorece a disseminação da doença (mudas provenientes de estacas obtidas de áreas de produção acima de 3 anos), e ao manejo da cultura. A ocorrência de viroses do tipo PYMoV e CMV são outras doenças que vêm limitando a expansão da cultura.

Embora haja disponibilidade de materiais de diferentes origens no Banco de Germoplasma de pimenta-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, a variabilidade genética entre esses materiais é muito estreita e todos os acessos têm apresentado susceptibilidade à doença fusariose. A dificuldade de introduzir material genético do centro de origem dessa cultura dificulta a obtenção de fontes de resistência, além de ainda não ter sido documentada a doença no centro de origem da cultura. Dessa forma, alguns métodos, convencionais ou não, devem ser utilizados visando ampliar essa estreita variabilidade genética.

Espécies silvestres do gênero *Piper*, nativas da Amazônia, têm apresentado resistência à fusariose, tais como *P. aduncum* Linn., *P. colubrinum* Link., *P. tuberculatum* Jacq., *P. hispidinervium* C. D. C. e *P. hispidum* Sw, que podem ser utilizadas como fonte de resistência a essa doença (ALBUQUERQUE et al., 1999 POLTRONIERI et. al., 1999).

Os usos dessas fontes de resistência são de grande importância no programa de melhoramento, porém necessitam do conhecimento de ferramentas de biologia celular e molecular. O conhecimento citogenético, as técnicas *in vitro*, marcadores moleculares e a identificação de genes se constituem em ferramentas valiosas para a solução deste problema, seja pela propagação rápida de plantas livres de patógenos e clonagem de material elite, resgate de embrião resultante de cruzamentos intra e interespecíficos, ou pela geração de variabilidade genética por mutações induzidas, seleção *in vitro*, produção de plantas transgênicas e análises genético-moleculares.

Os trabalhos de pesquisas têm sido direcionados para o estabelecimento de um programa de melhoramento que associe métodos convencionais com o desenvolvimento de ferramentas de biologia celular e molecular. Neste caso, polinizações controladas estão sendo adotadas para a geração de híbridos intra e interespecíficos e, paralelamente, estão sendo desenvolvidos estudos citogenéticos tanto de cultivares de *Piper nigrum* quanto de espécies nativas amazônicas, com o intuito de dar suporte às estratégias de melhoramento genético.

Ademais, há pesquisas em andamento para desenvolvimento de método de microenxertia, micropropagação e regeneração de plantas *in vitro*, desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélite e identificação de genes relacionados ao processo de infecção do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

Conservação de germoplasma

O processo dinâmico em programas de melhoramento genético vegetal depende da variabilidade existente dentro de cada espécie. Quando se trabalha com espécies nativas, cuja origem e dispersão encontram-se em nosso território, é mais fácil dispor de variações que permitam a manipulação conforme a necessidade. Porém, quando trabalhamos com espécies exóticas, há a necessidade de introduzir material genético, sendo mais difícil dispormos de variação desejável. Como a pimenteira-

do-reino é uma espécie exótica, existe a dificuldade para intercâmbio de germoplasma visando ampliar a variabilidade genética dessa espécie.

Assim, a atividade de melhoramento genético da pimenteira-do-reino é dependente da disponibilidade de variabilidade mantida em Banco Ativo de Germoplasma, que, quando caracterizado e avaliado, contribui para a geração de novas cultivares. Segundo Duarte e Albuquerque (1980), a introdução de germoplasma na Embrapa Amazônia Oriental iniciou depois de 1967, vindo de Mayaguez, Porto Rico, intermediado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, e outras introduções ocorreram por meio de consultores indianos. O Brasil, a partir da década de 1990, vem tentando controlar a entrada e saída de material genético, obedecendo às normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que implantou o programa de quarentena coordenado pela Embrapa Recursos Genéticos (Cenargen), que visa evitar a introdução de organismos exóticos no País indiscriminadamente, sem passar pelo rigor do processo de quarentena.

Até 2000, o banco de germoplasma de pimenteira-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental era composto de 33 acessos de *P. nigrum*. Entretanto, após o aparecimento do vírus PYMoV, houve perda significativa desse material, quando a maioria dos acessos foram infectados. Na época, para estabelecer o controle da infecção, foram efetuadas medidas de erradicação de plantas infectadas ocorrendo perda de acessos no banco.

Atualmente, a coleção é constituída pelos seguintes acessos de *Piper nigrum*: Guajarina, Cingapura, Bragantina, APRA, Kottanadan, Kuthiravally, laçara, Balankotta, Bento, Carneiro, e Perumkodi. Paralelamente à manutenção do BAG, está sendo estabelecida a coleção de piperáceas nativas, visando preservar algumas espécies identificadas como resistentes ao *F. solani* f sp *piperis*, composta pelas seguintes espécies: *P. aduncum*, *P. arboreum*, *P. attenuatum*, *P. colubrinum* e *P. hispidinervium*.

A conservação do germoplasma de pimenteira-do-reino está sendo realizada na forma de cultivo em campo e em telado e no cultivo em vaso. Pesquisas de limpeza clonal, para revitalização do material genético, estão em andamento no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, com a aplicação das técnicas de cultura de tecidos por meio do cultivo de meristemas.

Principais cultivares

Como resultado da introdução e avaliação de material genético de *P. nigrum* nas condições edafoclimáticas do Estado do Pará, atualmente, o sistema de produção conta com as cultivares descritas a seguir.

Cingapura

Foi introduzida em 1933 por imigrantes japoneses. Seu material original tinha o nome de Kuching e, no Brasil, recebeu o nome de Cingapura, em alusão ao local de origem. É conhecida também pelo nome de pretinha em alguns municípios do Estado do Pará.

Principais características: plantas com formato cilíndrico, folhas pequenas e estreitas, espigas curtas com comprimento médio em torno de 7,0 cm e frutos de tamanho médio (Figura 1). Não apresenta resistência às principais doenças (fusariose, podridão-do-pé e viroses), porém apresenta resistência à murcha-amarela.

Época da Colheita: A colheita das espigas ocorre o período de agosto a outubro.

Recomendação: É recomendada para pequenos, médios e grandes produtores, para condições de solos de textura média com boa drenagem.



Figura 1. Cultivar Cingapura.

Guajarina

Descende da cultivar Arkulam Munda. Foi introduzida da Índia por volta de 1970.

Principais características: a planta apresenta formato cilíndrico quando adulta, com folhas alongadas e de tamanho médio; espigas longas, com comprimento médio de 12,0 cm, e mais de 90% de flores hermafroditas; os frutos apresentam bom enchimento nas espigas, sendo esféricos e graúdos. É suscetível à fusariose, podridão-do-pé, murcha-amarela e viroses (Figura 2).

Época da Colheita: A colheita ocorre entre os meses de agosto a outubro.

Recomendação: para ambientes com período de estiagem definidos e solos bem drenados, em áreas sem ocorrência de murcha-amarela.



Figura 2. Cultivar Guajarina

Bragantina

Introduzida no Brasil na década de 1980, é um híbrido, obtido do sul da Índia, na Estação Experimental de Panniyur, no Estado de Kerala, também conhecida como Panniyur ou verdinha no Pará.

Principais características: as plantas possuem folhas largas e cordiformes; espigas longas, com comprimento médio de 14,0 cm; flores 100% hermafroditas favorecendo o bom enchimento das espigas e frutos graúdos; apresenta como característica discriminante a coloração verde claro dos brotos novos dos ramos de crescimento. Não apresenta resistência à fusariose, podridão-do-pé e viroses, porém é resistente à murcha-amarela (Figura 3).

Época da colheita: a colheita dos frutos ocorre no período de agosto a outubro.

Recomendação: ambientes com maior precipitação pluviométrica e solos ricos com maior retenção de umidade.



Figura 3. Cultivar Bragantina.

APRA

Proveniente do Estado de Kerala, sul da Índia. Foi introduzida no Brasil na década de 1980.

Principais características: apresenta folhas largas com 8,88 cm de largura e comprimento médio de 13,8 cm; espigas longas apresentando comprimento médio de 12,0 cm, contendo várias fileiras de frutos graúdos (0,53 cm de diâmetro) de maturação mais tardia. Apresenta alta resistência à murcha-amarela causada por *Fusarium oxysporum*, sendo suscetível à podridão-das-raízes e secamento dos ramos (*F. solani* f.sp. *piperis*) (Figura 4).

Época da Colheita: considerada tardia, ocorre no período de setembro a novembro.

Recomendação: para cultivo em solo de textura média, bem drenados, melhor em consórcio, principalmente com fruteiras e espécies arbóreas.



Figura 4. Cultivar APRA.

Kuthiravally

Proveniente do Estado de Kerala, sul da Índia, foi introduzida no Brasil na década de 1980.

Principais características: apresenta folhas com largura média de 10,0 cm a 12,0 cm e comprimento médio de 15,75 cm; espigas longas com comprimento médio de 12,04 cm e extremidade recurvada repleta de frutos graúdos (0,49 cm de diâmetro) de maturação mais tardia. É resistente à murcha-amarela causada por *F. oxysporum*, mas é suscetível à podridão-das-raízes e secamento dos ramos (*F. solani* f.sp. *piperis*), havendo necessidade de medidas de controle (Figura 5).

Época da Colheita: Ocorre no período de setembro a novembro, considerada também uma cultivar tardia.

Recomendação: deve ser cultivada em solos de textura média e bem drenados. Pode ser utilizada em consórcio, principalmente com espécies arbóreas e algumas essências florestais.



Figura 5. Cultivar Kuthiravally.

Kottanadan

Material proveniente da Índia (Kerala). Foi introduzido no Estado do Pará no período de 1988 a 1990, tendo sido avaliada primeiramente nos municípios de Tomé Açu e Capitão Poço.

Principais características: apresenta bom desempenho produtivo em cultivo a pleno sol. A planta adquire formato cilíndrico, ramos vigorosos, apresentando folhas largas de tamanho médio. As espigas apresentam comprimento médio de 10 cm a 13 cm, com boa formação de frutos. Não apresenta resistência a doenças de importância econômica, como a fusariose, podridão-do-pé e viroses, tornando-se adequada a adoção de medidas de controle (Figura 6).

Época da Colheita: a colheita das espigas ocorre no período de agosto a outubro.

Recomendação: deve ser cultivada em áreas de solo com textura média e boa drenagem. Pode ser usada em consórcio com culturas definitivas.



Figura 6. Cultivar Kottanadan.

laçará

Material proveniente da Índia (Kerala). Foi introduzido no Estado do Pará em 1981, tendo sido avaliado nos Municípios de Tomé-Açu e Capitão Poço entre 1988 e 1990.

Principais características: produção em pleno sol, planta com formato cilíndrico apresentando folhas do tipo estreita de tamanho médio. As espigas apresentam comprimento médio de 9 cm, repletas de frutos esféricos. Não apresenta resistência a doenças de importância econômica, como a fusariose, podridão-do-pé e viroses, tornando-se adequada a adoção de medidas de controle (Figura 7).

Época da Colheita: a colheita ocorre no período de agosto a outubro.

Recomendação: deve ser cultivada em áreas de textura média com boa drenagem. A utilização em sistemas de consórcio como cultura definitiva estabelece equilíbrio.



Figura 7. Cultivar laçará.

As cultivares descritas acima serão utilizadas no programa de melhoramento genético da Embrapa Amazônia Oriental, que busca, por meio de polinizações controladas, a obtenção de híbridos intraespecíficos que apresentem vigor híbrido e capacidade de combinação com a agregação das características mais importantes de cada uma das cultivares utilizadas, como a obtenção de espigas longas, grãos graúdos e pesados, precocidade e resistência à murcha-amarela, dentre outras características desejáveis pelos pipericultores. Na Tabela 1, é apresentada a caracterização das cultivares de pimenteira-do-reino a serem usadas na hibridação intraespecífica.

Tabela 1. Caracteres de interesse e cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) utilizadas no programa de melhoramento genético da Embrapa Amazônia Oriental.

Cultivares	Espigas média (cm)	Peso de Espigas (média g)	Nº de frutos/ espiga	Rendimento médio pimenta preta kg/ha	Ciclo Maturação	Resistência à mucha-amarela
Cingapura	8	6	27	2300	Jun/Out	Alta
Bragantina	14	14	77	2700	Jun/Out	Média
Guajarina	12	12	68	2900	Jun/Out	Nenhuma
laçara	10	8	40	2500	Set/Nov	Alta
Kottanadan	11	12	54	2800	Set/Nov	Alta
APRA	12	14	78	3100	Set/Nov	Alta
Kuthiravally	12	13	75	2700	Set/Nov	Alta

Programa de melhoramento genético

Os programas de melhoramento, tanto convencionais como não convencionais, consistem na produção de variabilidade genética na população seguida pela seleção dos genótipos desejáveis (WENZEL, 1985). A maioria da variabilidade genética disponível utilizada tem ocorrido naturalmente e bancos de germoplasma existem para preservar essa variabilidade. Porém, os genes de interesse que estão em indivíduos diferentes são adquiridos por meio de estratégias convencionais e avançadas. Os cruzamentos são estratégias simples e permitem a produção de novas e desejáveis recombinações de genes.

A variabilidade genética é essencial ao melhorista por permitir, por meio de estratégias e técnicas adequadas, o desenvolvimento de cultivares de plantas, que podem ser, por exemplo:

- a. Mais adaptadas às mudanças ambientais.
- b. Mais eficientes na utilização de nutrientes.
- c. Mais tolerantes a pragas e doenças.
- d. Mais produtivas e de melhor qualidade.

Para tanto, a seleção é a força direcional dos melhoristas de plantas para identificar, dentro de uma população variável, os melhores genótipos que respondem às demandas de produtores

agrícolas, agroindústrias e consumidores. A hibridação, a recombinação e a mutação, tanto espontânea quanto induzida, se constituem nos fatores mais importantes para a geração de variabilidade em plantas (DONINI; SONNINO, 1998). Para o caso da pimenteira-do-reino no Estado do Pará, a criação de variação é uma necessidade pela baixa variação existente nos materiais disponíveis. Portanto, um programa de melhoramento genético convencional necessita da criação de variação genética, seleção de variantes benéficos e ensaios em campo para confirmar os variantes selecionados para essa espécie (CASSELS, 1998).

As pesquisas para o melhoramento genético de pimenteira-do-reino foram iniciadas em 1952 e são concentradas principalmente na Índia, com o objetivo de obter novas cultivares. Em Porto Rico, alguns ensaios foram iniciados em 1953; na Indonésia, os estudos iniciaram em 1960, e na Malásia, em 1962. Nesses países, o programa de melhoramento visa à obtenção de cultivares com resistência a pragas e doenças, principalmente relacionadas com a resistência à podridão-das-raízes, causada pelo fungo *Phytophthora capsici*, Leonia. No Brasil, as atividades de pesquisa voltadas para o melhoramento genético de pimenteira-do-reino foram iniciadas na década de 1980, utilizando-se a estratégia de introdução e avaliação de genótipos, com o intuito de selecionar genótipos superiores para resistência à fusariose e alta produtividade, para recomendação a produtores (POLTRONIERI et al., 2000).

O programa atual de melhoramento genético da Embrapa Amazônia Oriental, em uma de suas atividades, visa à obtenção de híbridos intraespecíficos provenientes de polinizações controladas, entre genótipos da espécie *P. nigrum*, para obtenção de combinações que expressem caracteres produtivos superiores aos pais (vigor híbrido). As combinações de cultivares que estão sendo utilizadas nesse processo são: Bragantina X Cingapura, Bragantina X Guajarina, Bragantina X APRA, Bragantina X Kottanadan, Bragantina X Kuthiravally, Bragantina X Iaçará (Figura 8). Nessas combinações, o progenitor feminino será unicamente a cultivar

Bragantina — pois apresenta espigas longas, alta produtividade, preferencialmente utilizada pelos produtores. Simultaneamente a essas combinações, serão utilizados todos os recíprocos (a cultivar Bragantina passa a ser o progenitor masculino nas combinações).

A combinação dessas cultivares visam ao aumento da produtividade por meio da produção de espiga/planta, comprimento das espigas, tamanho dos frutos, tamanho das sementes secas, peso das sementes secas, percentual de flores hermafroditas. Outros caracteres de importância são: arquitetura da planta, nº de ramos ortotróficos e plagiotróficos, capacidade de aderir ao tutor (raízes adventícias), tolerância à seca, tolerância à poda, adaptação a cultivos consorciados e adaptação ao cultivo em tutor vivo. Na Figura 8, apresenta-se a estratégia de obtenção das novas cultivares com a hibridação intraespecífica.

A utilização de híbridos com bom desempenho produtivo e com resistência à fusariose é altamente desejável, porém as cultivares de *P. nigrum* disponíveis no Brasil não apresentam fonte de resistência para essa doença. Dessa maneira outras estratégias e fontes de resistência devem ser utilizadas, como a hibridação interespecífica.

Nos programas de melhoramento convencional, geralmente há preferência na utilização de pais que sejam da mesma espécie biológica, isto porque representantes da mesma espécie cruzam-se facilmente produzindo híbridos férteis e apresentam pouco ou nenhum impedimento para recombinação gênica.

Em alguns casos, entretanto, há necessidade de lançarmos mão de cruzamentos amplos envolvendo representantes de diferentes espécies e gêneros, em virtude da baixa variabilidade genética intraespecífica. Nesse caso, a hibridação interespecífica pode ser adotada como método, não só no sentido de criar ou aumentar a variabilidade genética, mas, principalmente, em decorrência da possibilidade de introduzir características desejáveis, tais como resistência a doenças e pragas, precocidade e tolerância ambiental. Para a pimenta-do-reino, também estão sendo realizados trabalhos

visando à obtenção de híbridos interespecíficos, considerando que algumas espécies de *Piper* nativas apresentam resistência ao fungo causador da fusariose (POLTRONIERI et al., 2000).

Neste sentido, o programa de melhoramento da Embrapa Amazônia Oriental está testando as combinações da cultivar Bragantina de *Piper nigrum* com espécies de *Piper* sp nativas para avaliar a compatibilidade e a viabilidade de produção de híbridos férteis conforme a seguir: Bragantina X *P. aduncum*, Bragantina X *P. hispidinervium*, Bragantina X *P. attenuatum*, Bragantina X *P. arboreum*, Bragantina X *P. colubrinum*. Após a obtenção dos híbridos, serão necessárias algumas gerações de retrocruzamento com o progenitor de *P. nigrum* (Bragantina) para a obtenção de uma cultivar com características de produção de *P. nigrum* e apresentando resistência ao fusarium (Figura 9).

Um programa de hibridação de sucesso com pimenteira-do-reino foi conduzido na Índia entre quatro parentais e deu origem ao primeiro híbrido cultivado comercialmente. A combinação entre as cultivares “Uthirankotta” x “Taliparamba-1” (“Cheriyakaniayakkadan”) produziu 69 sementes, das quais 14 plantas F1 sobreviveram e uma delas apresentou comprimento de espiga médio de 10 cm com 82 flores por espiga e 82% de frutificação. Esse híbrido foi multiplicado e apresentou performance superior em todas as características quando comparado às cultivares locais. Do início das hibridações ao lançamento do híbrido denominado Panniyur-I, decorreram 13 anos (NAMBIAR et al., 1978).

A propagação de pimenteira-do-reino é realizada tanto por sementes quanto através de estacas vegetativas. Costuma-se adotar a primeira forma quando o objetivo é basicamente os programas de melhoramento, enquanto a propagação realizada por estacas é a forma tradicional de produção de mudas para plantios comerciais. A viabilidade da semente de *P. nigrum* é perdida rapidamente após 40-50 dias de armazenamento, enquanto a germinação ocorre entre 15 a 90 dias após semeadura, dependendo da cultivar e das condições ambientais (NAMBIAR et al., 1978).

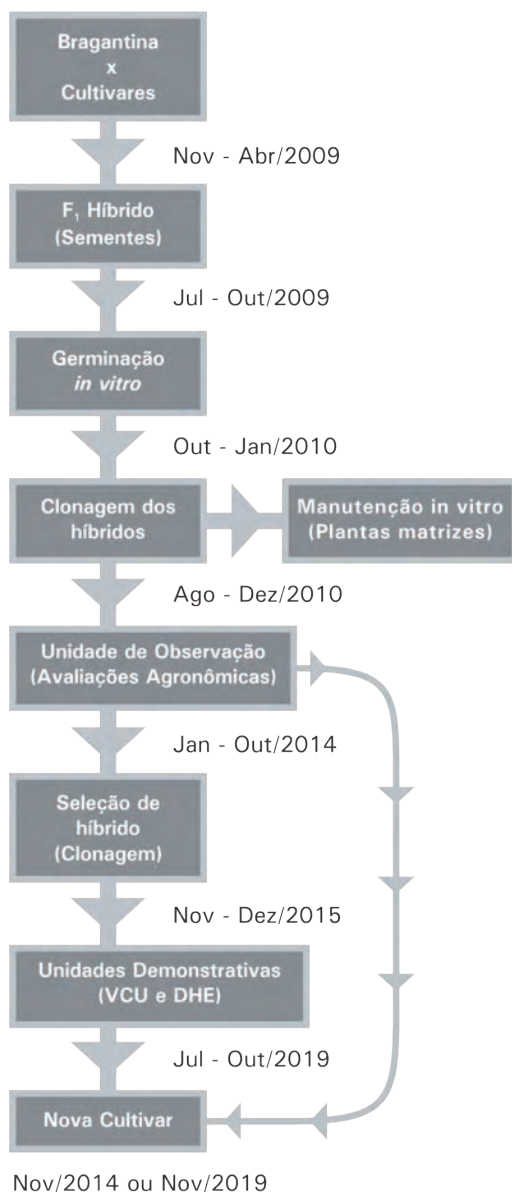


Figura 8. Estratégia usada para a geração de novas cultivares de pimenteira-do-reino com método de hibridação intraespecífica por meio de polinização controlada, germinação e clonagem in vitro dos híbridos, avaliação e seleção em campo e testes para lançamento de uma nova cultivar. VCU (valor de cultivo e uso); DHE (distinguíbilidade, homogeneidade, estabilidade).

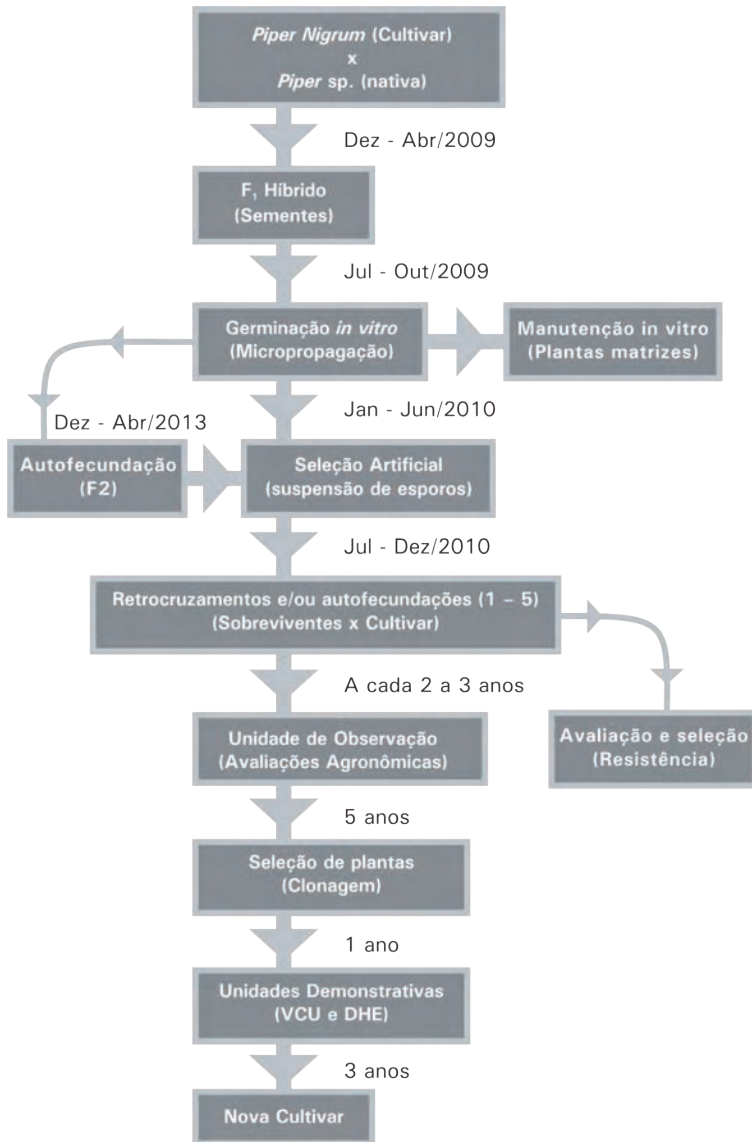


Figura 9. Estratégia usada para a introgressão de genes de resistência à doença fusariose por meio de polinização controlada entre a cultivar Bragantina e espécies nativas de *Piper*, germinação *in vitro*, autopolinização, retrocruzamento e autopolinização com seleção de variantes para resistência à fusariose e produção para a geração de novas cultivares de pimenteira-do-reino pelo método de hibridação interespecífica. VCU (valor de cultivo e uso); DHE (distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade).

Estudos citogenéticos

As pesquisas em citogenética têm como objetivo central a caracterização citogenética de acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. Entende-se como caracterização citogenética a descrição dos cromossomos de uma espécie a partir da contagem do número dos cromossomos em células somáticas e montagem de cariótipos e idiogramas a partir de análises morfométricas e da obtenção de marcadores cromossômicos mapeados por hibridação molecular *in situ* fluorescente (FISH) de sequências de DNA, principalmente os repetitivos em *tandem* e os dispersos.

Buscar-se-á atingir essa meta pela coleta de raízes e pré-tratamentos das mesmas visando à construção e organização dos cariótipos e idiogramas, de acordo com Levan et al. (1964), consistindo na determinação do número de cromossomos, análise morfométrica e determinação do conteúdo de DNA (valor-C), cujas informações servirão de base para o programa de melhoramento de introgressão de genes via cruzamentos interespecíficos. Ademais, buscar-se-á a obtenção de marcadores cromossômicos específicos e a construção de mapas cromossômicos, pois a determinação dos alinhamentos das sequências de diferentes espécies permitirá inferir sobre a possibilidade de pareamentos meióticos corretos nos híbridos e prever o comportamento dos cromossomos nesses híbridos.

Esses procedimentos permitem a obtenção de mapas cromossômicos (citogenéticos) que podem ser comparados intra ou interespecificamente, sendo possível inferir sobre a organização e evolução dos genomas, fornecendo subsídios para o direcionamento dos programas de melhoramento quanto à elaboração de planos de cruzamentos dirigidos para obtenção de linhagens, variedades ou híbridos, para introgressão genética. Diretamente, esses estudos permitem um melhor entendimento sobre a taxonomia, biodiversidade e processos evolutivos nos trópicos.

Nesse sentido, é fundamental para o avanço do programa de melhoramento da pimenta-do-reino, ter como metas os seguintes parâmetros citogenéticos estabelecidos:

1. Determinar com precisão o número de cromossomos das espécies de interesse, variedades, cultivares.
2. Obter cariótipos bastante precisos baseados em cromossomos metafásicos com morfologia bastante definida, identificando marcadores cromossômicos clássicos, tais como: regiões centroméricas e regiões organizadoras do nucléolo (RON).
3. Mapeamento de sondas de rDNA 45S e 5S que auxiliarão no estabelecimento das relações filogenéticas entre as espécies e a marcação de cromossomos específicos, bem como contribuirão para o entendimento da origem e do grau de ploidia das espécies.
4. Isolamento e caracterização de classes de DNAs repetitivos *in tandem* (satDNA) que permitirão estabelecer marcas de cromossomos específicas, relações de homeologia e poderá ainda auxiliar na identificação dos possíveis parentais das espécies tetraploides
5. Construção de mapas cromossômicos a partir das marcas obtidas pelas técnicas acima, construindo um panorama bastante claro sobre a origem, evolução e relações filogenéticas entre as espécies.

Aplicação das técnicas de cultura de tecidos

Nas últimas décadas, as técnicas de cultura de tecidos e de biologia molecular passaram a ter grande significância em todas as áreas da biologia pura e aplicada. Suas aplicações na área vegetal têm sido na micropropagação em massa, multiplicação rápida de genótipos superiores, limpeza clonal, conservação e intercâmbio de germoplasma, clonagem de genes e obtenção de plantas transgênicas de espécies de importância na agricultura e indústria (Nitzsch, 1983; Krikorian, 1990).

A conservação de germoplasma tem sido reconhecida como uma forma vital para o melhoramento de plantas, pois assegura a disponibilidade de germoplasma proveitoso em qualquer tempo e evita o processo de erosão genética (ROCA et. al., 1984). A conservação *in vitro* é, particularmente, importante para espécies de propagação vegetativa e espécies que apresentam sementes recalcitrantes. As plantas conservadas em campo, além dos elevados custos, correm riscos de perdas de genótipos valiosos em virtude da ocorrência de pragas, doenças e outros fatores de estresses ambientais (NG, S. Y. C.; NG, N. O., 1991). A conservação *in vitro*, por cultivo mínimo, oferece uma solução imediata para manutenção, em curto e médio prazo, enquanto a criopreservação é uma solução para conservação em longo prazo (STANWOOD, 1985).

A cultura de embrião, outra aplicação das técnicas de cultura de tecidos, também permite recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis, superar dormência e esterilidade de sementes, além de estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião, desenvolver métodos de micropropagação e testar viabilidade de sementes (HU; FERREIRA, 1990).

As técnicas de cultura de células e tecidos permitem a regeneração de plantas tanto por meio da formação de gemas caulinares (organogênese) quanto de embriões somáticos (embriogênese). Essas duas vias de regeneração de plantas podem ser de origem uni ou multicelular, diretamente a partir de células do tecido original ou indiretamente via formação de calos. As diferenças entre ambas são anatômicas, sendo a gema uma estrutura monopolar com ampla conexão vascular com o tecido do explante, enquanto o embrião somático é uma estrutura bipolar sem conexão com o explante por meio da vascularização (VIEIRA; APEZZATO-DA GLÓRIA, 2001).

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos em pimenteira-do-reino tem sido realizada por Mathews e Rao (1984), que verificaram a formação de calos na maioria dos explantes usados no

estudo (segmentos de hipocótilo, gemas axilares, ápice caulinar), em meio de cultura contendo uma larga combinação de auxina-citocinina, com exceção de segmentos de folha e tecidos de antera. Além disso, observaram que ápices caulinares provenientes de plântulas in vitro diferenciaram em múltiplas brotações quando cultivado em meio MS contendo IAA e BA (1 mg.L-1 de cada) e enraizaram em meio contendo a metade da concentração dos sais MS, suplementado com 0,2 mg.L-1 de NAA.

Khoon e Talib (1985) estudando o enraizamento in vitro de brotos de pimenta-do-reino verificaram que NAA (0,1 mg.L-1) induz maior número e tamanho de raízes em comparação com meio de cultura sem esse fitorregulador. Philip et al. (1992) induziram uma média de 25 novos brotos por meristema caulinar após 3-4 subcultivos, com intervalo de 30 dias por subcultivo, o que, segundo o protocolo sugerido pelos autores, permitiria uma produção estimada de 15.000 plantas a partir de um explante por ano, quando comparado com apenas 50 estacas enraizadas por planta por ano, convencionalmente obtidas por propagação vegetativa. Ressalte-se que, um ponto limitante foi o problema de contaminação por bactérias endógenas apresentado pelos explantes provenientes de plantas adultas.

A regeneração de plantas de pimenteira-do-reino, via embriogênese somática, foi obtida por Joseph et al. (1996) a partir de calos provenientes de embriões zigóticos cultivados em meio básico SH (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972), sólido ou líquido, desprovido de fitorregulador ou na presença de 2,4-D (0,5 a 5,0 mg.L-1). Os embriões somáticos originados a partir dos calos germinaram em meio líquido ou sólido com metade da concentração de sais de SH, sem reguladores de crescimento e nível de sacarose reduzido de 3% para 1,5%. A germinação dos embriões somáticos ocorreu após 8 meses de cultivo em meio de cultura estático e 8 semanas em cultura de suspensão, sendo as plantas estabelecidas em solo.

Na Embrapa Amazônia Oriental, o processo de micropropagação é iniciado com a obtenção de fontes doadoras de explantes e assepsia, até a proliferação de novas gemas, enraizamento, aclimatização e formação de mudas. A obtenção de fontes doadoras de explantes é fundamental para iniciar o processo de aplicação das técnicas *in vitro*. Tais fontes se constituem de plantas obtidas a partir de estacas ou germinação de sementes.

Para a produção de plântulas *in vitro*, as sementes apresentam melhores respostas quanto à conversão em plântulas em meio de cultura com a metade da concentração de sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 0,17 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄ (Figura 10). O processo de micropropagação é estabelecido por meio da utilização de explantes assépticos (gemas axilares e apicais) a partir de plântulas obtidas *in vitro*, em meios de multiplicação de gemas, seguindo as etapas de enraizamento, aclimatização e formação de mudas em casa-de-vegetação (LEMOS, 2003). Além disso, meristemas e gemas provenientes de plantas propagadas via estacas estão sendo submetidas a tratamentos de assepsia, visando ao estabelecimento do método de limpeza clonal e clonagem de plantas das cultivares em uso no sistema de produção.

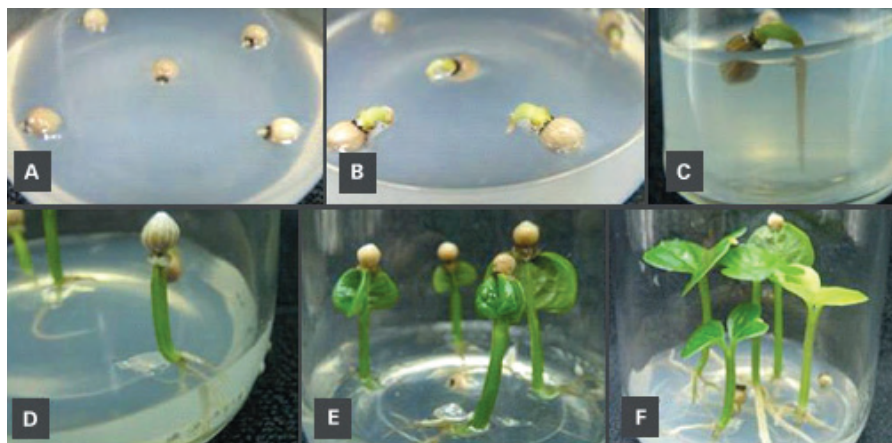


Figura 10. Etapas da germinação de pimenteira-do-reino: A) aos 30 dias; B) aos 37 dias; C) aos 50 dias; D) aos 60 dias; E) aos 67 dias; F) aos 80 dias.

As gemas fornecidas pelas plântulas *in vitro* cultivadas em meio básico de cultura MS suplementado com 0,5 mg.L-1 com BAP e 0,2 mg.L-1 de IAA, após 2 semanas de cultivo, apresentam aspecto verde, mas não diferenciadas, sendo estabelecidas em cultura. A proliferação de brotos ocorreu após 8 semanas (média de 3,4 a 5,2 gemas/tratamento), com melhor performance na concentração de 0,5 mg.L-1 de BAP, média de 5,6 novas gemas por explante (Figura 11). O melhor resultado de enraizamento dos brotos ocorreu em meio básico MS contendo 0,1 mg.L-1 de ANA, seguido de aclimatização em substrato do tipo vermiculita e formação de mudas em substrato de terra preta e esterco na proporção de 3:1 (Figura 12).



Figura 11. Indução e multiplicação de brotos de pimenteira-do-reino.

Ademais, a cultura de tecidos pode ser usada para gerar variação genética, denominada de variação somaclonal, similar àquelas originadas por mutagênicos químicos e físicos. Tais materiais podem ser incorporados em programas de melhoramento genético. Por meio da seleção *in vitro*, mutantes com tolerância a fatores abióticos e resistência a doenças podem ser isolados em curto período de tempo e inseridos nas seleções de campo.



Figura 12. Enraizamento, aclimatização e formação de mudas a partir de plantas de pimenteira-do-reino produzidas in vitro.

Microenxertia

A enxertia surgiu como uma alternativa de controle da doença fusariose em pimenteira-do-reino e foi desenvolvida utilizando três espécies nativas da Amazônia, *Piper colubrinum*; *P. aduncum* e *P. hispidinervium*, como porta-enxerto para a espécie exótica. Essas combinações de enxerto e porta-enxerto apresentaram reações de incompatibilidade tardia entre os sistemas vasculares das espécies (ALBUQUERQUE et al., 1999; DUARTE; ALBUQUERQUE, 1999).

A ideia de enxertia para essa espécie surgiu pela primeira vez após Albuquerque et. al. (2001) apresentarem um estudo de interação entre espécies do gênero *Piper* e o fungo *F. solani* f. sp *piperis*, em que relataram a resistência de nove dessas espécies a dois isolados patogênico do fungo. Assim, a técnica de enxertia foi realizada utilizando três espécies de *Piper*, *P. colubrinum*, *P. aduncum* e *P. hispidinervium*, como porta-enxerto para *P. nigrum* (ALBUQUERQUE et al., 1999; DUARTE; ALBUQUERQUE, 1999).

Nesse sentido, recentemente foi proposta a obtenção de microenxertos de pimenteira-do-reino na tentativa de se evitar incompatibilidade entre os tecidos vegetais e/ou entre as espécies, precocemente, considerados nesse estudo, visando produzir materiais genéticos superiores para a resistência à fusariose. Assim, frutos de pimenteira-do-reino e de espécies nativas foram coletados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, desinfestados e introduzidos in vitro. Atualmente, os materiais em fase de germinação serão utilizados na obtenção dos microenxertos, os quais serão avaliados primeiramente quanto à eficiência de pegamento e morfologia.

Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites

O conhecimento da variabilidade existente no banco de germoplasma é etapa básica para a correta caracterização e conservação do germoplasma e para o uso adequado em programas de melhoramento genético. Para tanto, o desenvolvimento e caracterização de marcadores moleculares é de extrema importância para a quantificação da variabilidade e organização dos genótipos presentes em bancos de germoplasma (SOUZA, 2001). O uso de marcadores moleculares tais como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites são ideais para estudos de diversidade genética e genotipagem ((JAIN, 2001).

Trabalho de caracterização de *Piper nigrum* L. tem sido feito utilizando isoenzimas e RAPD (COSTA; POLTRONIERI, 2001),, por meio de padrão eletroforético isoenzimático. Esse estudo apontou a existência de heterozigosidade no material conservado na coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental sem, no entanto, quantificar essa variabilidade. Pradeepkumar et al. 2001, utilizando 24 *primers* de RAPD obtiveram uma média de 15,3 bandas polimórficas por *primer*, e um desses foi eficiente para diferenciar três cultivares da pimenteira-do-reino cultivadas na Índia, Panniyur 4, Panniyur 5 e Panchami.

Dentre os marcadores moleculares atualmente mais difundidos, o microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) se destaca por ter características extremamente úteis no que se refere à sua utilização e aplicação. Esse marcador fornece alto nível de polimorfismo, apresenta herança codominante, com alto grau de repetibilidade e uma taxa de mutação em torno de 10⁻⁴, tornando-o mais indicado para caracterização de genótipos a partir de base genética estreita (POWELL et al., 1996; GOLDSTEIN; SCHOLTTTERER, 2001).

Estudos utilizando microssatélites têm sido amplamente utilizados para caracterização de germoplasma e auxílio em trabalhos de melhoramento de diversas espécies tais como *Musa* sp. (AMORIM et al., 2008), *Phaseolus vulgaris* (CAMPOS et al., 2005), *Stylosanthes capitata* (SANTOS et al., 2009) e *Mangifera indica* L (MARIE-FRANCE et al., 2006). Em virtude da importância da cultura da pimenteira-do-reino para o Estado do Pará, a Embrapa Amazônia Oriental desenvolveu e caracterizou marcadores microssatélite para *Piper nigrum* L. Assim, o DNA genômico foi isolado a partir de folhas de um único indivíduo da cultivar Cingapura, utilizando o método CTAB (*cetyltrimethyl ammonium bromide*) desenvolvido por Doyle, J. J. e Doyle, J. L. (1990), e uma biblioteca genômica enriquecida com microssatélites foi construída utilizando a metodologia descrita por Bilotte et al. (1999).

As regiões repetitivas foram identificadas usando o *Simple Sequence Repeat Identification Tool* (TEMNYKH et al., 2001) e 57 clones foram positivos para microssatélite. Desses clones, 36 foram utilizados para desenho de *primers* nas regiões que flanqueiam as repetições utilizando o programa Primer Select (DNAS^tar) e Primer3 Plus (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Para o teste de análise genética dos microssatélites, foram utilizados 20 acessos de *Piper nigrum* L. conservados na coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental.

Os resultados mostram que o rendimento da biblioteca foi de 30% para fragmentos contendo microssatélites e 19% para

fragmentos adequados para desenho de *primers*, o que mostra a eficiência do enriquecimento da biblioteca. Maiores porcentagens de microssatélites foram do tipo simples perfeito, e os motivos dinucleotídicos AC/TG e CA/GT foram os mais abundantes, podendo ser atribuído ao motivo do enriquecimento da biblioteca e pelo último ser mais abundante entre os vegetais.

O número de alelos variou de 3 a 10, com média de 5.8 alelos por loco. O intervalo da heterozigosidade observada foi de 0,11 a 1,00 e da heterozigosidade esperada foi de 0,477 a 0,877 com média de 0.624 e 0.721, respectivamente (Tabela 1). Os acessos avaliados conservam um nível de heterose compatível com a formação desse material, ou seja, hibridação seguida de fixação do genótipo por meio de propagação vegetativa (ANJANI, 2005).

Os dados de genotipagem mostraram um padrão de bandas nitidamente diploide em todos os microssatélites para todos os indivíduos avaliados, sem exceção, o que leva a inferir ainda que a espécie em questão é um alotetraploide, $2n = 4x = 52$ (Fig. 13).

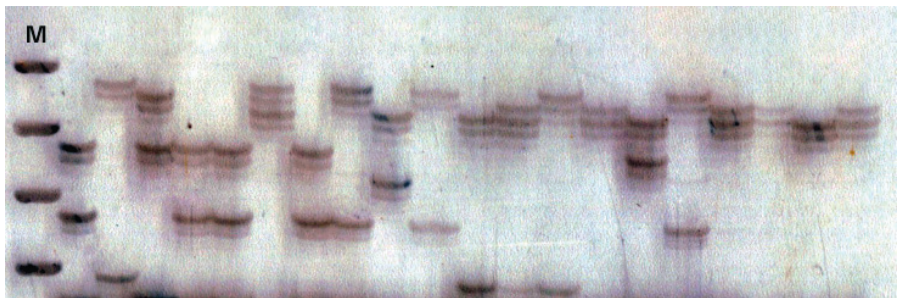


Figura 13. Genotipagem de locus microssatélite em gel desnaturante de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata, mostrando marcador de peso molecular (M) e 20 indivíduos.

Os microssatélites desenvolvidos e identificados neste trabalho darão suporte para a caracterização do germoplasma de *Piper nigrum* L. existente no Brasil e para o melhoramento genético dessa espécie.

Tabela 2. Características dos locos de SSRs em *Piper nigrum* L., incluindo nome dos locos, número de acesso no GenBank, sequência do primer, motivo repetido, número de alelos (Na), variação do tamanho em pares de base, heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) e valor de P (HWE)

Locus	Nº de acesso no GenBank	Sequência do Primer (5'-3')	Motivo repetido	Na	Varição do tamanho (bp)	Ho	He	P (HWE)
PN A5	FJ 172205	F 5' CTTCAGACCAATAATCAACTT 3' R 5' ATCCCAAAATACACAATTC 3'	(AC)19	6	164-194	0,684	0,678	0,498
PN B5	FJ 172206	F 5' GTTTTGAATGGTCGGTGAT 3' R 5' ATGTTCTGATTTCTCGTTATTG 3'	(TG)14	4	258-268	0,550	0,477	0,394
PN B9	FJ 172207	F 5' AGTATTGGTTGTTCTCTC 3' R 5' ATGTAAAATCGATAGTCTCA 3'	(AT)6(AC)9 GC (AC)11	5	258-304	0,350	0,586	0,078 **
PN E3	FJ 172208	F 5' TTTGTGCTCTCCCTCTCC 3' R 5' AAGACTAAATAGGCAAGGCAAA 3'	(CA)13	4	260-298	0,111	0,716	0,001 # **
PN F1	FJ 172209	F 5' ACTTCAGTGCTATTTTATCTTCC 3' R 5' CCAACGCCCACTCTCAT 3'	(TG)11	10	110-152	1,000	0,877	0,263
PN G11	FJ 172210	F 5' TTACTAGTGTCCACCCCACT 3' R 5' TCGATGGAAGTCAACCCTCT 3'	(AC)5	7	210-238	0,950	0,841	0,565
PN H4	FJ 172211	F 5' CTTTCCCACAATTCAGTCTCG 3' R 5' ACCATGGTGATCTCTCTCAG 3'	(AC)9	3	258-264	0,412	0,661	0,000 #
PN H8a	FJ 172212	F 5' TGTGCTTTTATATTTTTGATG 3' R 5' TATTAGTAGTTCTCCCTTTTGA 3'	(TG)16	6	266-288	0,706	0,806	0,000 #
PN D10	FJ 374758	F 5' GTGTTACCTTTGGGGCATTCA 3' R 5' TGIGTCAAGGCATCAAAACC 3'	(GT)13	8	216-296	0,850	0,852	0,201

Desequilíbrio de HW $p < 0,05$ com correção de Bonferroni

** Presença de alelos nulos (Microchecker)

Identificação de genes

Apesar de terem sido propostas muitas pesquisas para contornar o problema da fusariose, nenhuma estratégia ofereceu solução definitiva para a doença. Como poucos estudos foram desenvolvidos em nível molecular, a Embrapa Amazônia Oriental e a Universidade Federal do Pará, recentemente, aprovaram um projeto para identificar sequências gênicas putativas do fungo envolvidas no mecanismo de interação entre a pimenteira-do-reino e o patógeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

As informações serão obtidas via plataforma Solid de sequenciamento e analisadas via bioinformática. Essa proposta de pesquisa está incluída no projeto da Rede Paraense de Genômica e Proteômica liderado pela UFPA e financiado pela Fapespa, que visa oferecer informações genéticas para apoiar o programa de melhoramento da pimenteira-do-reino na Embrapa Amazônia Oriental. A identificação de sequências gênicas do fungo, envolvidas no processo de interação planta-patógeno, por meio da construção de bibliotecas de fragmentos da planta e do patógeno, nas condições de controle e obtidas durante o processo de interação, permitirá a criação de um banco de dados curado, contendo sequências genéticas de alto nível de informação e com o mínimo de redundância de sequências de proteínas, expressão gênica, função celular, famílias de proteínas e dados taxonômicos.

Essa pesquisa ainda poderá possibilitar a compreensão do processo de interação entre a planta e o fungo, assim como a identificação de potenciais sequências-alvo do fungo, envolvidas na capacidade de causar infecção, além de serem sugeridas quais proteínas da planta podem ser ativadas para conferir o fenótipo de resistência a esse patógeno. Também será possível cruzar informações genéticas com o genoma de outros fungos desse gênero já sequenciados, o que permitirá inferir a respeito da funcionalidade de sequências gênicas recém-identificadas e suas relações em diferentes estágios de infecção. Essa estratégia poderá indicar aqueles alvos com maior potencial de controle do patógeno. Secundariamente, sabendo quais

são os genes responsáveis pelo processo de infecção, poderão ser produzidos "kits" para a detecção mais precoce do fungo e eliminação das plantas doentes no início do processo de infecção.

O estudo do transcriptoma permitirá encontrar fatores genéticos responsáveis por tornar o microorganismo agressivo, facilitando assim a descoberta de novas alternativas para combatê-lo. Também abrirá caminho para, no futuro, termos ideia se o fungo é sensível ou não às drogas que estarão sendo usadas atualmente. Nesse sentido, a etapa atual desse projeto está focada no processo de obtenção de plantas que serão usadas nos ensaios de infecção. A segunda etapa consistirá na construção de bibliotecas de fragmento de cDNA para serem sequenciadas e utilizadas nas montagens dos beads. A terceira etapa consistirá nas análises de informática e anotação gênica.

Está sendo criada pela UFPA uma estrutura de bioinformática capaz de agrupar as sequências em clusters, realizar comparações automáticas e disponibilizar essas informações para os anotadores durante o processo de análise dos resultados do sequenciamento, juntamente com ferramentas que facilitam a anotação dos genes à medida que forem sendo desenvolvidas novas ferramentas de análises.

Perspectivas futuras

O desenvolvimento de ferramentas de biologia celular e molecular abre grandes possibilidades de geração de novas cultivares dentro do programa de melhoramento da pimenteira-do-reino estabelecido pela Embrapa Amazônia Oriental e parceiros. A aplicação das técnicas de cultura de tecidos e o estabelecimento das ferramentas de micropropagação e regeneração de plantas *in vitro* oferece a possibilidade de limpeza clonal das cultivares que apresentam problemas de viroses, clonagem das plantas que forem selecionadas e, conseqüentemente, aceleração do programa de melhoramento. Ademais, os estudos de citogenética fornecerão informações básicas para a escolha de parentais e métodos mais adequados de polinização

tanto intra quanto interespecífica. O uso de marcadores moleculares do tipo microssatélite, além de possibilitar a avaliação da diversidade genética entre as cultivares disponíveis, promoverá a genotipagem para auxiliar o programa de melhoramento. Ademais, a identificação de genes que expressem características importantes poderá ser usada para a incorporação dos mesmos nas cultivares em uso, a partir de métodos eficientes de transgenia e regeneração de plantas. O melhoramento genético associado às técnicas *in vitro* será um grande passo na solução dos principais problemas da cultura: a fusariose em pimenteira-do-reino, limpeza clonal e multiplicação rápida do material genético de interesse, de modo a ser adotado mais rapidamente pelos pipericultores.

A citogenética tem como papel central nesse estudo assistir o melhoramento genético dessa espécie, fornecendo informações sobre o número e a morfologia dos cromossomos, suas relações de homeologia, que são determinantes para os programas de mapeamento e para se estabelecer correlações filogenéticas entre as espécies. O desenvolvimento e a obtenção de marcas específicas para os cromossomos geram mapas que podem servir como referências em programas de cruzamento onde determinados cromossomos com características de interesse possam ser acompanhados.

Referências

ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L.; ENDO, T. Resistência de piperáceas nativas da Amazônica à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazônia**, v. 31, n. 3, p. 341-348, 2001.

ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; STEIN, R. L. B.; ENDO, T. Reação de espécies de Piper a dois isolados de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico, 7).

AMORIM, E. P.; REIS, R. V.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O.; SILVA, S. O. Variabilidade genética estimada entre diploides de banana por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1045-1052, 2008.

ANJANI, K. Identification of hybrids in black pepper (*Piper nigrum* L.) using male parent-specific RAPD markers. **Current Science**, v. 88, n. 2 p. 216-218, 2005.

BILLOTTE N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers tropical crop. **Fruits**, 54, 277-288, 1999.

CAMPOS, T.; BENCHIMOL, L. L.; CARBONELL MORAES, S.; COLOMBO, C. A.; CHIORATTO, F.; RISTERUCCI, A. M.; SOUZA, A. P. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 4, p. 589-592, 2007. Notas Científicas

CASELLS, A. C. In vitro-induced mutation for disease resistance. In: JAIN, S. M.; BRAR, D. S.; AHLOOWALIA, B. S. (Ed.). **Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement**. London: Kluwer Academic Publishers, ,1998. p.367-378, cap.18

COSTA, M. R.; POLTRONIERI, M. C. Caracterização genética da pimenta-do-reino e cupuaçu através de isoenzimas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. p. 9-17, 2001.

DONINI, P.; SONNINO, A. Induced mutation in plant breeding: current status and future outlook. In: JAIN, S. M.; BRAR, D. S.; AHLOOWALIA, B. S. (Ed.). **Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement**. London: Kluwer Academic Publishers, , 1998. cap.14, p. 255-292

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

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C. Eficiência de diferentes fungicidas no tratamento de estacas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) infectadas por *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 6, n. p. 169-175, 1980.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C. Doenças da cultura da pimenta-do-reino. In: DUARTE, M. L. R. (Ed.). **Doenças de plantas no Trópico Úmido**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. p.159-208,

GOLDSTEIN, B. D.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press, 2001. 352 p.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP; EMBRAPA-CHPH, 1990. p. 71-85,

JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v. 118, n. 2, p. 153-166, 2001.

JOSEPH, B.; JOSEPH, D.; PHILIP, V. J. Plant regeneration from somatic embryos in black pepper. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 47, n. 1, p. 87-90, 1997.

KHOON, C. B.; TALIB, S. S. Effects of naphthalene acetic acid and two phenolic substances on rooting of pepper shoots cultures *in vitro*. **MARDI Research Bulletin**, v. 13, n. 1, p. 108-110, 1985.

KRIKORIAN, A. D. Baseline and cell studies for use in banana improvement schemes. In: PLOETZ, R.C. (Ed.). **Fusarium wilt of banana**. St. Paul: APS Press, 1990. p. 127-133,

LEMOS, O. F. **Mutagênese e tecnologia in vitro no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. 2003. 191 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SOUBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Landskrona, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

MARIE-FRANCE, D.; BUNEL, J.; SITBON, C.; RISTERUCCI, M.; CALABRE, C.; LE BELLEC, F. **Genetic diversity of Caribbean mangoes (*Mangifera indica* L.) using microsatellite**. In: INTERNATIONAL MANGO SYMPOSIUM, 8th, 2006, Sun City, South Africa. **Programme - abstract book...** Siyanamukela: ISHS; South African Mango Growers Association, 2006. 126 p.

MATHEWS, M. H.; RAO, P. S. In vitro responses of black pepper (*Piper nigrum*). **Current Science**, v. 53, n. 4, p. 183-186, 1984.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAMBIAR, P. K. V.; PILLAY, V. S.; SASIKUMARAN, S.; CHANDY, K. C. Pepper research at panniur: a resume. **Journal of Plantation Crops**, v. 6, n. 1, p. 4-11, 1978.

NG, S. Y. C.; NG, N. O. Reduced-growth storage of germoplasm. In: DODS, J.H. (Ed.). **In vitro methods for conservation of plant genetic resources**. New York: Chapman and Hall, 1991. p. 11-40,

NITZSCH, W. Germoplasm preservation. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 782-805,

PHILIP, V. J.; JOSEPH, D.; TRIGGS, G. S.; DICKINSON, N. M. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 1, p. 42-44, 1992.

OKAJIMA, H. Colheita, produção, beneficiamento e mercado externo da pimenta-do-reino. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTA-DO-REINO E CUPUAÇU, 1., 1996, Belém, PA. **Anais...** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental: JICA, 1997. 440 p. p.237-243 (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).

POLTRONIERI, M. C.; LEMOS, O. F.; ALBUQUERQUE, F. C. Pimenta-do-reino. In: **PROGRAMA de melhoramento genético e adaptação de espécies vegetais para a Amazônia oriental**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 16), 1999. p. 127-137.

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.

POWELL, W.; MARCNRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 215-222, 1996.

PRADEEPKUMAR, T.; KARIHALOO, J. L.; ARCHAK, S. Molecular characterization of *Piper nigrum* L. cultivars using RAPD markers. **Current Science**, v. 81, n. 3 p. 246-248, 2001.

ROCA, W. M. Cassava. IN: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1984. v. 2, p. 269-301. cap. 10.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmer. In: MISENER, S.; KRAWETZ, S. A. (Ed.). **Bioinformatics: methods and Protocols**.. Totawa: Humana Press, 2000. p. 365-386. (Methods in Molecular Biology, 132).

SANTOS, M. O.; KARIA, C. T.; RESENDE, R. M. S.; CHIARI, L.; JUNGMANN, L.; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P. Isolation and characterization of microsatellite loci in the tropical forage legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw, Conservation Genetics Resources, v. 1, n. 1, p. 43-46, 2009.

SCHENK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian **Journal Of Botany**, v. 50, p. 199-204, 1972.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLES, M. S. (Ed.). **Recusos genéticos & melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 549-602,

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germoplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K.K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p.199-226,

TEMNYKH, S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CATINHOOR, S.; MCCOUCH, S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposons association, and genetic marker potential. **Genome**, v. 11, p. 1441-1452, 2001.

VIEIRA, M. L. C.; APEZATO-DA-GLÓRIA, B. **Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento**. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 911-938. cap. 28.

WENZEL, G. Strategies in unconventional breeding for disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 23, p. 149-172, 1985.

Embrapa

Amazônia Oriental

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

G O V E R N O F E D E R A L
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

CGPE 9809