

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ
UNIDADE DE APOIO À PESQUISA E À PÓS-GRADUAÇÃO
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

XII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA DA FCAP

VI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA DA EMBRAPA
AMAZÔNIA ORIENTAL

10 a 12 de Dezembro 2002
CAMPUS DA FCAP - BELÉM - PARÁ



**A CONTRIBUIÇÃO DO PROFISSIONAL DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS NO USO E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**

ANAIIS

SIMILARIDADE GENÉTICA EM PIPERÁCEAS ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD

LUZ, Sylmara de Melo¹; COSTA, Maria Rosa²; POLTRONIERI, Marli Costa³;

INTRODUÇÃO

Dentre as piperáceas nativas a espécie *P. spidinervium* C.DC. é a mais importante devido ao óleo essencial safrol que é um composto aromático empregado na indústria química. A espécie *P. aduncum* L. vem sendo estudada para fins medicinais. As demais piperáceas que estão em conservação no Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental têm um objetivo específico ligado a melhoria do sistema de produção da pimenta-do-reino sendo utilizadas como fonte de resistência ao fungo *Fusarium solani* f.sp.piperis, através da enxertia ou em trabalhos de melhoramento genético. A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) se constitui em um importante produto agrícola de consumo interno e de exportação. Apesar de oscilações de preço no mercado internacional, observa-se uma contínua tendência de aumento do seu consumo. Além disso, a cultura da pimenta tem papel relevante no contexto sócio econômico regional, gerando divisas ao estado e empregos diretos e indiretos no meio rural.

Nos Bancos de Germoplasma Vegetal, mantidos pela Embrapa Amazônia Oriental, existem pesquisas em andamento que visam quantificar a variabilidade genética dos acessos e verificar a similaridade entre eles a fim de sanar dúvidas quanto à origem e uso nos cruzamentos, além de auxiliar na escolha de acessos potenciais para o enriquecimento da variabilidade genética nos próprios bancos. Tendo em vista a necessidade de conservação das Piperáceas, bem como o melhor aproveitamento destas em benefício do homem, utilizamos a biologia molecular, especificamente a técnica RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), como importante ferramenta na distinção e preservação desta família.

O RAPD constitui-se o segundo tipo de marcador molecular mais utilizado em plantas. Ele foi desenvolvido a partir do estabelecimento da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Esta técnica possibilita a amplificação de fragmentos de DNA, através da ação de uma enzima (DNA polimerase) em presença de nucleotídeos e cofatores para a atividade da mesma. Em função da grande quantidade de DNA produzida a partir do fragmento amplificado, esta amostra pode ser visualizada diretamente em gel de agarose na forma de bandas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Devido a essas vantagens foi escolhida a técnica de RAPD para a realização deste trabalho, como ferramenta de suma importância para a caracterização das Piperáceas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material analisado foi composto de 12 acessos de *Piper nigrum* (Bragantina, Guajarina, Cingapura-2 Brt.rx, Kottanadan, Iaçara, Perunkoide, KARK, 239, M-170, M-132, M-123 e Cingapura Baião) e um acesso das espécies *P.tuberculatum*, *P.attenuatum*, *P.spidinervium* e *P. aduncum* provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA. O DNA genômico foi obtido através do protocolo de Nelson (1993) modificado. A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose 1,0 %, pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA lambda. As amostras utilizadas no RAPD, após a quantificação total, partiram de diluições da amostra total em água estéril, de modo a conter 5 ng/μl de DNA. As alíquotas foram armazenadas a -20 °C.

As reações de amplificação foram desenvolvidas de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990) com pequenas modificações, num volume final de 13 μl contendo água destilada autoclavada, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 2,0 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, BSA purificada (2,5 mg/ml), 1,3 uM *primer* arbitrário, 1U.I Taq DNA polimerase e 15 ng de DNA genômico, cobertas com duas gotas de óleo mineral.

As amplificações foram realizadas em termociclador de DNA Thermolyne Amplitron II modelo DB.80225, sendo realizados 40 ciclos de 1' a 94 °C, 1' a 37 °C e 2' a 72 °C, seguidos de mais 7 minutos a 72 °C para a completa extensão dos produtos amplificados. O método utilizado para a separação dos produtos amplificados foi a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio 1mg/ml. Utilizou-se 13 μl de cada reação, acrescido de 2 μl de uma solução de azul de bromofenol (40 %) mais sacarose. Foi utilizado TBE (Trizma base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5M) como tampão do gel e de corrida. Após a eletroforese, os géis foram visualizados e fotografados em equipamento de foto documentação por transiluminação em ultravioleta.

Foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados com presença (1) e ausência de banda (0). Somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Bandas muito fracas, de difícil resolução, não foram incluídas. Para análise dos dados, utilizou-se o NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.02. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, que gerou a matriz de similaridade. A partir dessa matriz foi gerado o cluster pelo método UPGMA ("Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average"), que foi expresso na forma de um dendograma (Figura 1).

¹ Estagiária/Embrapa Amazônia Oriental/ acadêmica do curso de Engenharia Agrônoma-FCAP.

² Eng. Agrônoma, M.Sc., Pesquisadora da EMBRAPA Amazônia Oriental.

³ Eng. Agrônoma, M.Sc., Pesquisadora da EMBRAPA Amazônia Oriental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *primers* utilizados (OPT 6, 7, 8 e 12) amplificaram um total de 92 marcadores RAPD com tamanhos variando de 200 a 2200 pb. Destes, 80 foram polimórficos, gerando 86,95% de polimorfismo. Segundo Dudley (1994), 75 marcadores polimórficos são suficientes para a análise de divergência genética, uma vez que o autor considera que resultados de 50 a 100 marcadores tendem a coincidir com informações baseadas no *pedigree* das amostras. Em média 20 fragmentos polimórficos foram gerados por *primer* e o número de marcadores amplificados por *primer* variou de 20 (OPT 08) a 26 (OPT 07). Foram estimados os índices de similaridade para todos os indivíduos analisados (Tabela 1).

Tabela 01- Matriz de distância genética estimada pelo coeficiente de Jaccard para os acessos de piperáceas do Banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. Belém, 2002.

	brag	guaj	p.tub	p.spd	p.adu	p.att	cing	kott	iaca	peru	kark	239	m170	m132	m 123	cinb
brag	1.00															
guaj	0.53	1.00														
p.tub	0.07	0.03	1.00													
p.spd	0.08	0.04	0.04	1.00												
p.adu	0.18	0.14	0.12	0.24	1.00											
p.att	0.22	0.16	0.11	0.03	0.14	1.00										
cing	0.26	0.29	0.03	0.04	0.16	0.11	1.00									
kott	0.34	0.35	0.04	0.11	0.06	0.09	0.33	1.00								
iaca	0.25	0.18	0.12	0.07	0.19	0.15	0.25	0.14	1.00							
peru	0.32	0.24	0.08	0.03	0.17	0.25	0.46	0.21	0.32	1.00						
kark	0.35	0.23	0.10	0.12	0.21	0.33	0.17	0.14	0.28	0.39	1.00					
239	0.38	0.24	0.12	0.11	0.22	0.30	0.26	0.19	0.36	0.46	0.62	1.00				
m170	0.24	0.31	0.04	0.10	0.03	0.12	0.18	0.29	0.06	0.20	0.15	0.18	1.00			
m132	0.44	0.35	0.06	0.09	0.20	0.19	0.25	0.24	0.32	0.33	0.45	0.47	0.23	1.00		
m123	0.46	0.35	0.10	0.08	0.19	0.22	0.22	0.21	0.35	0.33	0.40	0.54	0.20	0.52	1.00	
cinb	0.39	0.32	0.08	0.06	0.15	0.32	0.26	0.21	0.21	0.37	0.31	0.43	0.38	0.27	0.48	1.00

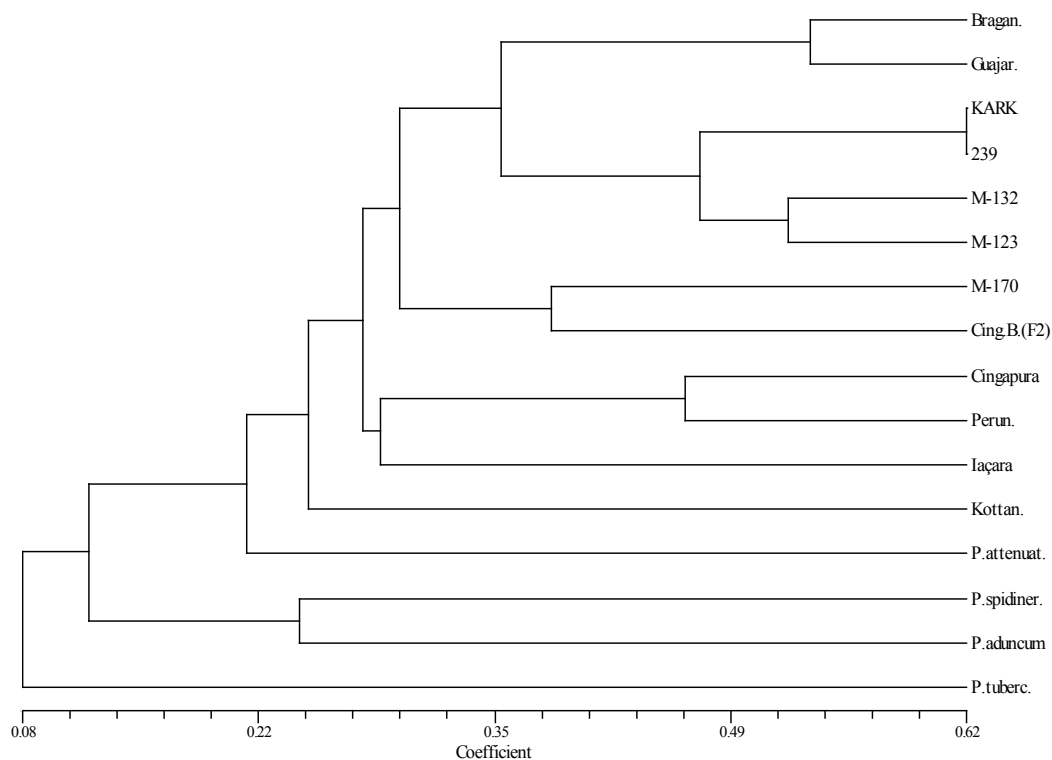


FIGURA 1- Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA para o coeficiente de Jaccard, a partir das 80 bandas polimórficas geradas pelo RAPD.

As maiores distâncias genéticas foram obtidas comparando-se *P. tuberculatum* Jacq. com Guajarina e Cingapura; *P. spidinerivium* C.D.C. com *P. attenuatum* L.; M-170 com *P. aduncum* Linn., todos com distanciamento de 3 %. Isto indica que estes acessos são candidatos potenciais como fonte de variabilidade no programa de hibridização, visando o melhoramento genético. Na Fig.1, encontra-se o dendrograma gerado pelo método UPGMA, através do programa NTSYS-pc, 2.02. Observa-se a separação dos acessos, em dois grupos principais. No primeiro grupo, que se subdividiu em dois

subgrupos, com coeficiente de similaridade, variando de 3% a 62%, incluem-se 15 materiais. Os acessos Iaçara, Kottanadan e *P. attenuatum* constituíram subgrupos isolados dentro de seu grupo. No segundo grupo ficou isolado o acesso de *P. tuberculatum* que foi o mais divergente em relação ao restante dos acessos. Por outro lado a maior similaridade foi encontrada entre os acessos KARK e 239. Estes dados podem monitorar os cruzamentos com grande potencial de aumento de variabilidade no germoplasma de piperáceas.

CONCLUSÃO

O RAPD-PCR é uma ferramenta eficiente para detectar de maneira rápida a variabilidade genética em acessos da coleção de germoplasma de piperáceas e possibilitou uma distinção mais precisa dentro desses grupos. O arranjo da distribuição dos acessos em função da divergência genética possibilitará monitorar os cruzamentos e incrementar o programa de melhoramento genético visando a ampliação da base genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUDLEY, J.W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: **Analysis of Molecular Marker Data**. Corvallis: Oregon, 1994, p. 3-7.

FERREIRA, M.E. ; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa Cenargen, Brasília, DF. 1996.

NELSON, J. C. ITMI **Wheat mapping workshop -laboratory manual**. Cornell University, 1993.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.