



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
DOUTORADO EM AGRONOMIA



LANA ROBERTA REIS DOS SANTOS

**ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Piper* DE
INTERESSE AO MELHORAMENTO GENÉTICO**

BELÉM

2017

LANA ROBERTA REIS DOS SANTOS

**ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Piper* DE
INTERESSE AO MELHORAMENTO GENÉTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da
Amazônia e a Embrapa Amazônia Oriental, como
parte das exigências do curso de doutorado em
Agronomia, para a obtenção do título de Doutor
em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

Co-orientador: Pesq. Dr. Oriel Filgueira de Lemos

BELÉM

2017

Santos, Lana Roberta Reis dos

Aspectos citogenéticos de espécies do gênero *piper* de interesse ao melhoramento genético / Lana Roberta Reis dos Santos. - Belém, 2017.

71 f.

Tese (Doutorado em Agronomia / Área de Concentração Produção Vegetal) – Universidade Federal Rural da Amazônia/Embrapa Amazônia Oriental, 2017.

Orientador: Hugo Alves Pinheiro.

1. Pimenteira-do-reino - melhoramento genético 2. Citometria de fluxo 2. Citogenética 3. FISH 4. Piperaceae I. Pinheiro, Hugo Alves, (orient.) II. Título

CDD – 581.350724

LANA ROBERTA REIS DOS SANTOS

**ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Piper* DE
INTERESSE AO MELHORAMENTO GENÉTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

Aprovado em 31 de janeiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Dr. Oriel Filgueira de Lemos – Co-orientador
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

Dra. Hérica Santos de Oliveira - 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Dr. Osmar Alves Lameira - 2º Examinador
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

Dra. Ilmarina Campos de Menezes - 3º Examinador
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

Dra. Marly Pedroso da Costa - 4º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

*Ao meu Deus e Pai pelo seu amor incondicional e
pela Sua misericórdia que me fazem permanecer.*

----- Ofereço-----

*Ao meu amado esposo pelo amor demonstrado
através de seu companheirismo, amizade,
compreensão, incentivo e apoio em todos os
momentos.*

-----Dedico-----

AGRADECIMENTOS

Ao meu grandioso Deus, pelo Seu amor, força e certeza que Ele é comigo em qualquer lugar e em qualquer situação. Meu Pai receba minha adoração, minha gratidão e que através do trabalho de minhas mãos eu possa glorificar o Teu Nome.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado que tornou possível o desenvolvimento e a realização dessa pesquisa.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pela formação profissional e pelo curso de doutorado que me possibilitaram avançar profissionalmente e assim oferecer melhores oportunidades a todos quanto meu trabalho possa auxiliar.

À Embrapa Amazônia Oriental, ao Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos, que, além de apoio técnico-científico, pude conviver com pessoas excelentes.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), ao Departamento de Genética, Laboratório de Citogenômica e Epigenética, por ter me recebido para realização destes estudos.

À minha Mãe pela sua luta para que eu tivesse oportunidades as quais não foram possíveis a ela. Pela sua educação familiar, princípios, dignidade, honestidade e pela sua força para o trabalho, sempre com intuito de dar o melhor para suas filhas.

Ao meu amado esposo Rildo pelo seu amor, apoio, auxílio, companheirismo e compreensão. Por estar sempre ao meu lado, por me acalmar em momentos de aflição, por me esperar enquanto eu desenvolvia meus estudos.

A minha irmã Mara Reis por seus ensinamentos, sua força, sua paciência e demonstração de fé.

Aos meus familiares Maria Rosenil e Bartolomeu Melo, Silas, Nídia e Patric que contribuíram para muitos dos meus dias serem mais felizes.

Ao Dr. Pesq. da Embrapa Amazônia Oriental Oriel Filgueira de Lemos, por sua confiança, compreensão e ensinamentos.

Aos assistentes do laboratório da Embrapa Amazônia Oriental, Gilberto e José Carlos, pelo apoio e manutenção para manter a ordem e organização no laboratório.

À Dra. Ilmarina Menezes pela amizade, orientações, momentos de descontração e força para superar minhas limitações, palavras não são suficientes para expressar minha gratidão.

Aos amigos Kelly Ramos (fofinha), Gledson Castro, Marly Pedroso, Orlando Maciel e Marcos Paulo Albuquerque pela força, apoio profissional, incentivo e vínculo que criamos.

Ao prof. Hugo Alves Pinheiro por se disponibilizando na viabilização do que estivesse em seu alcance para a conclusão deste curso.

A coordenadora e vice-coordenadora do curso de pós-graduação, Herdjania Lima e Gisele Barata, pela disposição em fazerem o melhor para elevar o nível do curso.

Ao professor Mateus Mondim pelos ensinamentos, treinamento em citogenética, pelo auxílio durante minha estada em seu laboratório e sobretudo por sua amizade.

À técnica Silvia Molina do laboratório de citogenômica e Epigenética da ESALQ, pela sua paciência, ensinamentos e amizade.

Às doutorandas da ESALQ, Marina Nogueira e Natália Teixeira, pelo auxílio em meu trabalho, pelos momentos de descontração e alegria.

Ao casal Guanair e Amanda Souza, meus amigos externos deste vínculo profissional, mas que sua fé, amizade verdadeira me ajudaram a me reerguer nos momentos mais difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais esta etapa da minha vida profissional, todo o meu carinho e gratidão.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

"Teus, ó SENHOR, são a grandeza, o poder, a glória, a majestade e o esplendor, pois tudo o que há nos céus e na terra é Teu. Teu, ó SENHOR, é o reino; Tu estás acima de tudo. As riquezas e a glória pertencem a Ti; Tu dominas sobre todas as coisas. Nas Tuas mãos estão a força e o poder para exaltar e dar força a todos."

(1Cr 29:11-12)

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	11
ABSTRACT	12
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos gerais de espécies do gênero <i>Piper</i> com potencial para o melhoramento genético da pimenteira-do-reino	16
2.1.1 O gênero <i>Piper</i>	16
2.1.2 A cultura da pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.)	18
2.1.3 Espécies de <i>Piper</i> como fonte de resistência a Fusariose	21
2.1.4 Melhoramento do gênero <i>Piper</i> (Piperaceae)	23
2.2 Citogenética e conteúdo de DNA do gênero <i>Piper</i>	25
REFERÊNCIAS	29
CONTEÚDO DE DNA E NÚMERO CROMOSSÔMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Piper</i> (PIPERACEAE)	34
RESUMO	35
ABSTRACT	36
Introdução	37
Material e Métodos	39
Resultados e Discussão	43
Conclusões	48
REFERÊNCIAS	49
ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO PARA HIBRIDAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH) DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Piper</i>	56
RESUMO	56
ABSTRACT	57
Introdução	58
Material e Métodos	60
Resultados e Discussão	64
Conclusão	69
REFERÊNCIAS	70
CONCLUSÕES GERAIS	72

RESUMO GERAL

O gênero *Piper* se configura em um dos maiores em número de espécies, sendo *Piper nigrum* L. a representante com maior importância econômica. Porém, há fatores que preocupando os pipericultores e que limitam a produtividade da cultura, dentre os quais se destaca a doença fungica fusariose. Com o programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino em andamento, as espécies do gênero *Piper*, nativas da Amazônia, apresentam-se como importantes fontes de resistência/tolerância à fusariose, havendo necessidade de caracterização destas espécies. Estudos citogenéticos são essenciais na determinação dos indivíduos que devem ser envolvidos em cruzamentos controlados para obtenção de características desejáveis. O objetivo deste estudo foi caracterizar citogeneticamente espécies do gênero *Piper* para dar suporte ao programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino. As espécies estudadas foram *P. tuberculatum*, *P. attenuatum*, *P. hispidum*, *P. colubrinum*, *P. arboreum*, *P. alatipetiolatum*, *P. divaricatum* e cultivares de *P. nigrum*. Cromossomos metafásicos foram obtidos após o pré-tratamento das pontas de raízes dos genótipos com 8-hidroxiquinolina a 300 ppm por 4h e fixados em solução de Carnoy e conservadas a -4 °C. Para contagem do número cromossômico as pontas de raízes foram coradas através da técnica Feulge e a quantificação do conteúdo de DNA foi determinada por citometria de fluxo. Para a análise da variabilidade no número, tamanho e posição dos sítios de rDNA 45S e 5S por meio da FISH, adaptou-se o protocolo utilizado no Laboratório de Citogenômica e Epigenética da Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, para FISH o qual se baseia em Schwarzacher; Heslop-Harrison (2000). Houve variação no número de cromossomos das espécies nativas, distinção no número básico e no nível de ploidia de *P. colubrinum* $2n = 2x = 26$, *P. arboreum* $2n = 4x = 48$, *P. alatipetiolatum* $2n = 38$ e *P. divaricatum* $2n = 6x = 54$. Para *P. tuberculatum*, *P. attenuatum*, *P. hispidum* estas variáveis precisam ser elucidados. As cultivares estudadas de *P. nigrum* apresentam o mesmo número de cromossomos ($2n = 4X = 52$). O conteúdo de DNA entre as espécies variou de 0,91 a 3,29 pg. A partir de ajustes no protocolo para FISH é possível localizar sítios de rDNA 45S e 5S em espécies do gênero *Piper*.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. Citogenética. FISH. Melhoramento genético. Piperaceae.

ABSTRACT

The *Piper* genus is one of the largest in number of species, being *Piper nigrum* L. the most economically important representative. However, there are factors worrying black pepper growers and limiting the culture productivity, among which the fungal disease fusariosis deserves a highlight. Due to the ongoing black pepper plant breeding program, native Amazonian species of the *Piper* genus, are presented as important sources of fusariosis resistance/tolerance and there is a need to characterize them. Cytogenetic studies as essential in the determination of individuals that should be involved in controlled crossings for obtaining desirable traits. The aim of this work was to cytogenetically characterize species of the *Piper* genus in order to provide support for the black pepper plant breeding program. The studied species were *P. tuberculatum*, *P. attenuatum*, *P. hispidum*, *P. colubrinum*, *P. arboreum*, *P. alatipetiolatum*, *P. divaricatum* and cultivars of *P. nigrum*. Metaphasic chromosomes were obtained after the pretreatment of root tips from the genotypes with 8-hydroxyquinoline at 300 ppm for 4h, fixation in Carnoy solution and conservation at -4 °C. For counting the chromosome number, the root tips were stained by the Feulge technique and the quantification of DNA content was determined by flow cytometry. For the variability analysis in the number, size and position of the 45S and 5S rDNA sites by FISH, the protocol used in the Cytogenomics and Epigenetics Laboratory of Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, was adapted for the FISH, which is based in Schwarzacher; Heslop-Harrison (2000). There was variation in the chromosome number of native species, distinction in the basic number and in the ploidy level of *P. colubrinum* $2n = 2x = 26$, *P. arboreum* $2n = 4x = 48$, *P. alatipetiolatum* $2n = 38$ and *P. divaricatum* $2n = 6x = 54$. For *P. tuberculatum*, *P. attenuatum* and *P. hispidum*, these variables still need further elucidation. The investigated *P. nigrum* cultivars presented the same chromosome number ($2n = 4X = 52$). The DNA content between species varied from 0.91 to 3.29 pg. From adjustments in the FISH protocol it is possible to localize 45S and 5S rDNA sites in species of the *Piper* genus.

Keywords: Flow cytometry. Cytogenetics. FISH. Plant breeding. Piperaceae.

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A biodiversidade brasileira é a maior do mundo, estima-se que 9,5% do total mundial de espécies sejam brasileiras, correspondendo a 1,8 milhões de espécies, com uma biota de cerca de 210 mil espécies conhecidas (LEWINSOHN; PRADO, 2005). A flora do Brasil é uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas (OLIVEIRA et al., 2006) que apresentam um importante potencial para o desenvolvimento socioeconômico do país. Neste sentido, os recursos naturais existentes na Região Amazônica tornam-se conhecidos gradativamente à medida que as pesquisas científicas se intensificam e os resultados são disponibilizados para a sociedade.

Em meio às espécies produtoras e biologicamente ativas, com importância socioeconômica, destacam-se as do gênero *Piper*, mais especificamente as espécies nativas da Amazônia. Este gênero apresenta bom potencial comercial, devido à produção de óleos essenciais utilizados pela indústria farmacêutica, na produção de perfumes e cosméticos, pelo potencial para a indústria de química fina, na fabricação de inseticidas e na utilização como fungicida no controle de doenças em plantas (LUZ et al., 2003). Outra espécie deste gênero que se destaca no cenário econômico é a espécie de origem indiana, *P. nigrum* L., mais conhecida como pimenteira-do-reino, cujo fruto é utilizado como condimento alimentar, sendo esta especiaria a mais difundida no mundo.

Devido à expansão da pipericultura no Estado do Pará, alguns fatores podem ter contribuído para o aparecimento de problemas fitossanitários nas áreas de cultivo, tanto em plantios homogêneos em larga escala como em monocultivos os quais cooperam para o aparecimento de doenças. Dentre as doenças que comprometem a produtividade da pimenteira-do-reino e os volumes das exportações do seu produto, pode-se citar a fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* presente no solo.

Por estas razões, de acordo com Silva et al., (2011), nos últimos anos a vida útil da lavoura tem sido reduzida de 15 para 6 anos. Para Lemos et al., (2011), a vulnerabilidade genética das cultivares de pimenteira-do-reino à doença e a rápida disseminação do patógeno têm contribuído para o agravamento do quadro produtivo da cultura tornando-se importante buscar novas fontes de variabilidade genética a fim de serem utilizadas no programa de melhoramento genético desta cultura. Embora haja materiais de diferentes origens no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de pimenteira-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, o único do Brasil, a variabilidade genética entre esses

materiais é muito estreita e todos os acessos têm apresentado suscetibilidade à doença fusariose.

Neste contexto, o enriquecimento do BAG de pimenteira-do-reino faz-se necessário para disponibilizar maior fonte de variabilidade genética dentro do gênero *Piper*, tanto para a conservação como para a implantação de programas de melhoramento genético. No entanto, há entraves que dificultam a introdução de material genético do centro de origem da pimenteira-do-reino. Por este motivo, métodos convencionais como a polinização controlada para geração de híbridos, a microenxertia para o uso na conservação de germoplasma, ou métodos não convencionais como os estudos de citogenética básica e molecular para dar suporte à escolha de parentais para o programa de cruzamento, os marcadores moleculares do tipo microssatélites para estudos de diversidade genética podem ser utilizados como base para ampliar essa estreita variabilidade genética.

Visando conhecer a informação genética de um BAG, é necessário um esforço intensivo de coleta e caracterização detalhada dos acessos. Desse modo, caracterizar espécies do gênero *Piper* usando atributos morfológicos, bioquímicos, citológicos, genéticos e moleculares é indispensável para utilização das espécies de interesse em programas de melhoramento genético.

A análise cromossômica tem sido um campo estimulante da citologia e da genética, apresentando relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma (BRAMMER et al., 2007). Portanto, a citogenética tem o intuito de analisar a estrutura dos cromossomos, fornecendo informações sobre as peculiaridades das espécies, proporcionando conhecimento em relação à organização genômica. Segundo Shi et al., (1996), a citogenética é indispensável para a contagem do número de cromossômico, observação da morfologia de cromossomos mitóticos e meióticos, estabelecimento de padrões cariótipos e análise do comportamento meiótico de híbridos intraespecíficos e interespecíficos.

Para Guerra (2008), a contagem do número de cromossomos é uma tarefa relativamente fácil e que produz dados confiáveis em relação a esta característica das espécies. Este conhecimento é útil na sistemática e evolução das plantas, complementando dados morfológicos e moleculares, por detectar variações de ploidia e outras alterações importantes no genoma que nem sempre são visíveis por outras abordagens.

A família Piperaceae pertence a um grupo taxonômico que apresenta problemas com relação à elucidação da taxonomia e filogenia de suas espécies. Neste sentido, os

estudos citogenéticos têm sido reconhecidos como importantes colaboradores no esclarecimento destas questões (MATHEW et al., 1999). Contudo, os poucos estudos direcionados para espécies do gênero *Piper* revelam uma ampla variação de número cromossômico entre espécies e até mesmo dentro da mesma espécie (GOULART, 2011).

Além da importância da citogenética clássica para caracterização de espécies, a citogenética molecular através da hibridização *in situ* (HIS), ou com a utilização dos fluorocromos, hibridação *in situ* fluorescente (FISH), passou a ganhar espaço e atualmente, os protocolos usam sondas que apresentam vantagens como alta resolução, menor tempo de processamento, estabilidade e riscos menores na manipulação. Os protocolos baseados na hibridação *in situ* auxiliam na detecção de diferentes alvos na mesma célula por meio do uso de duas ou mais sondas marcadas diferencialmente (BRAMMER et al., 2007).

Desse modo, a análise citogenética pode subsidiar o programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino, auxiliando na caracterização genômica tanto de espécies de *Piper* nativas da Amazônia quanto de cultivares de *P. nigrum* L. Portanto, as hipóteses desta tese são: a) Há diferença citogenética no gênero *Piper*, em espécies nativas da Amazônia e cultivares de *Piper nigrum*; b) Há possibilidade de adaptação do protocolo de hibridação *in situ* fluorescente para distribuição de sítios de rDNA 45S e 5S em espécies gênero *Piper*.

Por conseguinte, o objetivo geral foi caracterizar citogeneticamente espécies do gênero *Piper* para dar suporte ao programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino. Sendo os objetivos específicos os seguintes: a) estabelecer o conteúdo genômico e número de cromossomos de espécies do gênero *Piper*, nativas da Amazônia e de cultivares de *Piper nigrum* L.; b) Adaptar o protocolo de hibridação *in situ* para análise das distribuições de sítios de rDNA 45S e 5S em espécies do gênero *Piper*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais de espécies do gênero *Piper* com potencial para o melhoramento genético da pimenteira-do-reino

2.1.1 O gênero *Piper*

O gênero *Piper*, o maior da família Piperaceae, abrange em torno de 2000 espécies as quais se encontram distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do velho e novo mundo. Esse gênero tornou-se especialmente conhecido por duas espécies asiáticas: *Piper nigrum* L. conhecida vulgarmente como pimenta-do-reino e *Piper bettle* L., ambas consideradas de importância econômica (JARAMILLO; MANOS, 2001). No território brasileiro é possível encontrar cerca de 450 destas espécies, dentre as quais 300 estão na região Amazônica e 150 na região sudeste do Brasil (JARAMILLO; MANOS, 2001; QUIJANO-ABRIL et al., 2006). Descritas, no Brasil, existem cerca de 80 espécies de *Piper* e a região norte apresenta o maior número (EHRINGHAUS, 1997). Contudo, o número de espécies brasileiras do gênero é contraditório para muitos pesquisadores, devido a grande dificuldade na delimitação de alguns táxons que são muito semelhantes (GOULART, 2011).

As espécies apresentam folhas alternadas de coloração verde escuro, pecioladas, com formas e tamanhos variados. As flores são de coloração esbranquiçada, aperiantadas, densamente congestas ou laxas, frutos do tipo drupas de forma variável, com pericarpo pouco espesso e sementes de tamanho diminuto (GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006). As espiguetas são predominantemente hermafroditas e, de modo geral, apresentam o fenômeno da protoginia que é o amadurecimento dos órgãos femininos ou o estado de receptividade do estigma anterior ao amadurecimento dos órgãos masculinos ou a viabilidade do pólen (NASCIMENTO; VILHENA, 1999). A combinação de caracteres vegetativos e reprodutivos facilita sua identificação, porém as suas flores aparentemente detém diferenças que podem dificultar a classificação infragenérica das espécies (JARAMILLO; MANOS, 2001).

Há um grande número de espécies de *Piper* nativas da Amazônia (Figura 1) que apresentam como características um bom rendimento em óleo essencial. Os metabólitos secundários podem ser utilizados como matéria-prima na indústria de química fina

podendo ser aplicados como perfumes, fragrâncias e cosméticos, na indústria de medicamentos, na medicina popular, além do uso mais recente em estudos contra fungos fitopatogênicos (MAIA; ANDRADE, 2009).

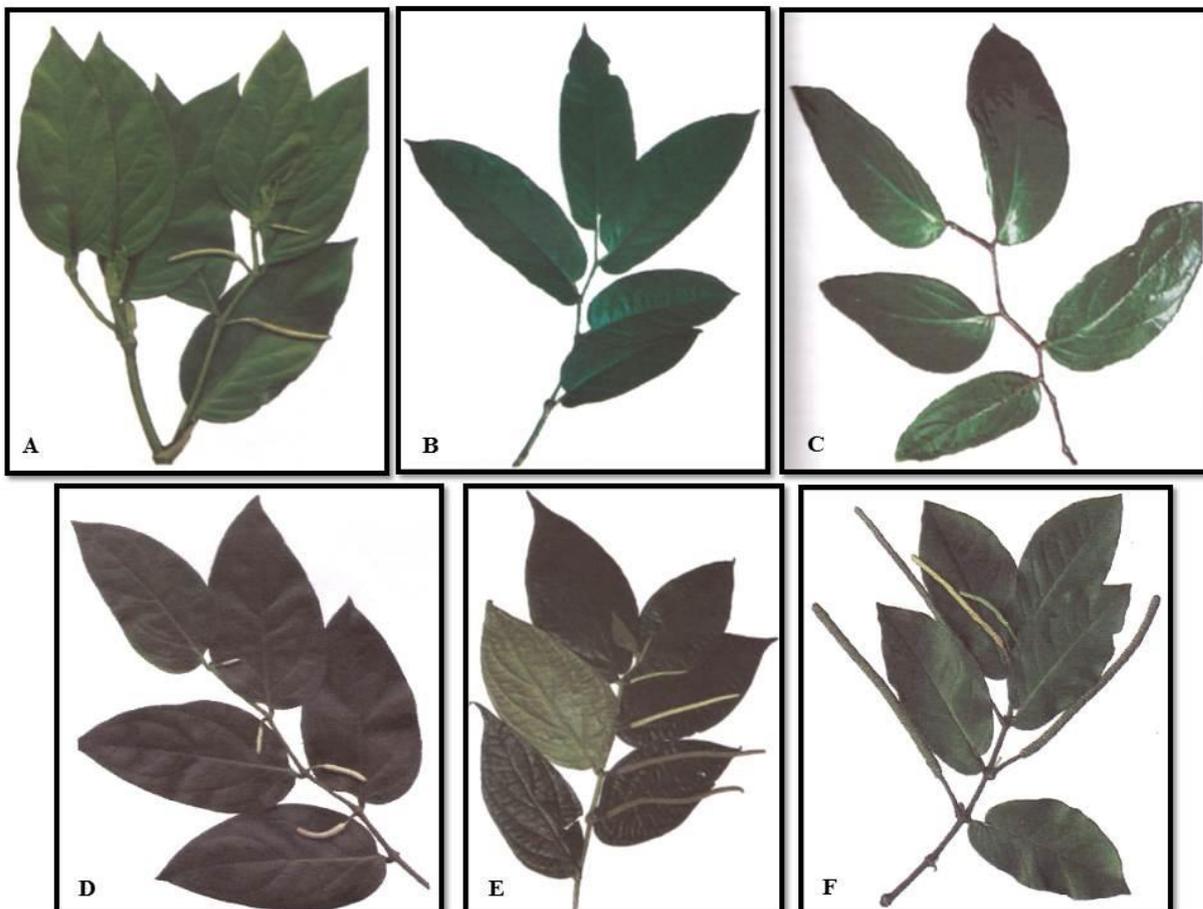


Figura 1. Espécies de *Piper* nativa da Amazônia Oriental. **A** - *Piper alatipetiolatum* Yuncker. **B** - *Piper arboreum* Aubl. var. *arboreum*. **C** - *Piper colubrinum* (Link ex Kunth) Link ex C. DC. **D** - *Piper divaricatum* G. Mey. **E** - *Piper hispidum* Sw. **F** - *Piper tuberculatum* Jacq. var. *tuberculatum*. Fotos: ANDRADE et al., (2009).

Para especialistas em taxonomia de plantas, o gênero *Piper* é considerado como modelo para estudos de evolução, plantas desse gênero são consideradas basais dentro da escala evolutiva das angiospermas. A APG - *Angiosperm Phylogeny Group* compila trabalhos em botânica com diversas categorias de plantas e os resultados mais recentes de sistemática das angiospermas para propor classificações robustas. Para o gênero *Piper* a morfologia de peças vegetativas e a biologia reprodutiva têm sido as principais características para descrição de espécies e para estabelecimento da taxonomia do gênero e mais recentemente marcas moleculares têm sido utilizadas para dar suporte para classificação desse gênero entre estes, marcadores ITS (espaçadores transcritos internos)

do DNA ribossomal nuclear, regiões nucleares (*g3pd*) e regiões cloroplastidiais; espaço intergênico *trnL trnF*, introns *psbJ-petA*, *trnL*, tem estabelecidos diferentes relações para o grupo (CALLEJAS, 1986; JARAMILLO; MANOS, 2001; JARAMILLO et al., 2008; SMITH et al., 2008).

Estudos de filogenia utilizando o espaço interno transcrito do DNA ribossômico (ITS) e íntron *trnL*, desenvolvidos por Menezes (2011), evidenciaram, pela análise de Distância, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana, árvores filogenéticas com topologias congruentes. Nas árvores geradas com dados ITS, dois grandes clados distintos podem ser claramente observados em todos os métodos utilizados, com forte sustentação de bootstrap e as espécies da região amazônica aparecem dentro do grande grupo Neotrópico em oposição ao grupo Paleotrópico representado pelas espécies asiáticas.

Espécies de *Piper* são objeto de trabalhos de Andrade et al., (2009), que tem concentrado esforços em estudos fitoquímicos de *P. divaricatum* e *P. colubrinum*, que são consideradas também no presente trabalho. Esta última utilizada nos primeiros trabalhos dos programas de melhoramento genético envolvendo a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). As espécies *P. divaricatum* e *P. colubrinum*, são extremamente semelhantes morfológicamente possuindo uma diferença quase imperceptível levando a erros de identificação botânica, mesmo quando feita por especialistas que estudam a família Piperaceae. Devido à importância econômica potencial de *P. divaricatum* e *P. columbrinum* pela produção do óleo essencial, as espécies em questão têm gerado trabalhos que tentam esclarecer sobre diversas características das espécies e consequentemente sobre o posicionamento taxonômico.

2.1.2 A cultura da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.)

A história das especiarias é muito bem entrelaçada com a história da humanidade, sendo que dentre todas as espécies utilizadas como condimentos, a pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é predominante. Ela também é chamada de “rei” das especiarias e é uma das mais antigas conhecidas pela humanidade (NAIR, 2011). Geralmente usada na culinária de diversos países como aditivo para incrementar o sabor aos alimentos em diferentes preparações, pois possui um óleo volátil que proporciona sabor forte e levemente picante, proveniente de um composto químico, o alcaloide piperina o qual é responsável pelo seu aroma intenso (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005).

Trata-se de uma planta (Figura 2A) autógama cuja floração, nas condições climáticas da Amazônia, ocorre de novembro a abril, na estação de maior ocorrência de chuvas. Sua inflorescência apresenta de 70 a 100 floretas hermafroditas as quais dão origem a frutos em uma espiga pendulosa de 5 a 20 cm de comprimento (Figura 2B); trata-se de uma planta dióica com dois estames dispostos lateralmente ao ovário e ao estigma (POLTRONIERI et al., 1999). Predominantemente são autopolinizadas e a dispersão de pólen é auxiliada por gotas de chuva ou orvalho e também por geitonogamia, ocasionando a formação do fruto após seis meses de polinização (NAIR, 2004).

A pimenteira-do-reino é uma cultura genuinamente de exportação, além de sua importância econômica, a pipericultura tem importância social no cenário brasileiro, pois trata-se de um cultivo gerador de renda e atrativo de mão-de-obra para o campo (Figura 2C), diminuindo o êxodo rural para os grandes centros urbanos, uma vez que o cultivo gera cerca de 80 mil empregos no período da safra originando uma renda de mais de 50 milhões de dólares por ano (LEMOS et al., 2011). Duarte (2004) descreveu a pimenteira-do-reino como um banco verde devido este produto ser usado pelo agricultor para aumentar a renda familiar em decorrência do alto preço alcançado no mercado doméstico e internacional.

Em 2015, a produção mundial de pimenta-do-reino foi de 404,405 milhões de toneladas, sendo o Brasil o quarto maior produtor (IPC, 2016). A produção brasileira em 2015 foi de 51.739 toneladas tendo o Pará contribuído com 32.414 toneladas (IBGE, 2016) mantendo-o em primeiro lugar no *ranking* dos Estados brasileiros produtores desta especiaria.

As condições edafoclimáticas do Estado do Pará são favoráveis ao desenvolvimento da pipericultura (BARBOSA, 2002). Em diversos tipos de solo a pimenteira-do-reino se adapta, portanto os solos amazônicos prestam-se ao seu cultivo com obtenção de bons resultados, tendo em vista que, sem considerar os aspectos nutricionais da planta, a sua maior exigência é quanto às propriedades físicas, consideradas como boas na maioria destes (BAENA; RODRIGUES, 2005).



Figura 2. Fase produtiva de *Piper nigrum* L. **A-** Amadurecimento das espigas. **B-** Detalhe do fruto maduro. **C-** Mão-de-obra em época de colheita.

De acordo com dados do IBGE (2016), o Estado do Pará tem a maior área colhida (22.105 ha) entre os Estados produtores, contudo a produtividade atual é baixa por alguns fatores dentre os quais se destaca a doença fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* que ocorre a nível epidêmico nas áreas de produção. Segundo Fischer et al., (2010) a doença destrói o sistema radicular, o que provoca sérios prejuízos econômicos. A vulnerabilidade das cultivares de pimenteira-do-reino ao ataque do patógeno causador da fusariose e sua rápida disseminação em plantas provenientes da mesma base genética têm

contribuído para o agravamento da doença a qual tem dizimado grandes áreas de cultivo e reduzido o ciclo da cultura de 15 a 20 anos para menos de oito anos (LEMOS et al., 2011).

Segundo Tremacoldi (2011), a infecção radicular ocorre durante o período chuvoso, sendo favorável a multiplicação do patógeno e ao avanço da colonização nos tecidos das raízes da planta contaminada, provocando a disseminação nas plantas vizinhas. A doença geralmente inicia-se nas raízes mais jovens e raízes secundárias em pimenteiras-do-reino com idade acima de dois anos. Os primeiros sintomas consistem no amarelecimento das folhas e à medida que o fungo avança na infecção provoca a obstrução dos vasos condutores e escurecimento das raízes e da base do caule.

Dentre as estratégias para o controle da doença fusariose, a aplicação de fungicidas em estacas para formação de mudas tem sido tradicionalmente recomendada. Porém, a eficiência biológica e econômica do controle químico é limitada, podendo causar, ainda, prejuízos ao ambiente. A aplicação de materiais orgânicos ao solo pode ser considerada como uma alternativa de controle dessa doença (BENCHIMOL et al., 2006). Um dos mais recentes é a metodologia para o controle alternativo ainda na fase de produção de mudas, a partir da utilização de folhas de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.) incorporadas ao solo onde as mudas crescem e permite que estas sejam transplantadas para o campo totalmente livres da doença (TREMACOLDI, 2011).

2.1.3 Espécies de *Piper* como fonte de resistência a Fusariose

Desde quando as plantas de pimenteira-do-reino começaram a ser observadas como hospedeiras do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* no Estado do Pará e a desenvolver a doença, as espécies de *Piper* nativa da Amazônia passaram a ser consideradas como fonte alternativa para minimizar as perdas de produção de pimenteira-do-reino (ALBUQUERQUE, 1961) uma vez que algumas destas espécies nativas do gênero *Piper*, têm apresentado resistência e/ou tolerância 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 esta doença desde que a base genética e os genes de resistência dessas espécies sejam estudados (POLTRONIERI et. al., 1999).

Testes de resistência utilizando mudas de *Piper nigrum* L., *Piper peltatum* L. e *Piper colubrinum* Link., inoculadas na região do caule com esporos de *Phytophthora*

palmivora e *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, apesar dos ferimentos, indicaram/mostraram que a única espécie que desenvolveu a doença foi *P. nigrum* L. (ALBUQUERQUE, 1966). A resistência à fusariose das espécies nativas de *Piper* pode estar associada ao fato de que espécies deste gênero são excelentes produtoras de óleos essenciais com propriedades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatórias e antifúngicas (ALMEIDA et al., 2007).

Zacaroni et al., (2009) na busca por produtos naturais para atuar como fungicidas no controle de doenças de plantas que afetam diversas culturas, avaliaram o efeito fungitóxico de óleos essenciais produzidos por *Piper hispidinervum* sobre alguns fitopatógenos, como o *Fusarium oxysporum cubensis*, utilizando a concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleo essencial que inibiu totalmente o crescimento do fungo. Poltronieri et al., (1997) produziram mudas de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) inoculadas com quatro isolados virulentos de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, observaram que esta espécie não apresentou sintomas de fusariose durante o período de cinquenta dias, enquanto que plantas de *Piper nigrum* L., submetidas as mesmas condições, morreram ao final de vinte dias.

Com o intuito de detectar novas fontes de resistência entre diferentes espécies de *Piper* nativas da Amazônia, Albuquerque et al., (2001) trabalharam com *P. aduncum* L., *P. arboreum* Aublet, *P. carniconnectivum* C. DC., *P. colubrinum* Link., *P. hispidinervium* C. DC., *P. hispidum* S.W., *P. hostmannianum* (Miq) C. DC., *P. sp.*, *P. tuberculatum* Jacq., e cultivares de *P. nigrum* L. (Guajarina e Kottanadan), e obtiveram resultados satisfatórios quanto a resistência das *Piper* nativas ao serem cultivadas em solos com isolados de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. As espécies nativas não apresentaram sintomas de infecção durante o período de 110 dias, enquanto as cultivares de *P. nigrum* L. apresentaram índice progressivo de infecção atingindo os 100% aos 90 dias após a inoculação.

Meireles (2014), em triagem de espécies do gênero *Piper* com atividade antifúngica resistentes ao fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, detectou que o óleo essencial de *P. divaricatum* manteve 100% de eficiência antifúngica no decorrer do ensaio de infecção in vitro, enquanto *P. marginatum* e *P. callosum* alcançaram cerca de 80% de inibição até o quarto dia sem manter este percentual constante por todo o período de avaliação.

2.1.4 Melhoramento do gênero *Piper* (Piperaceae)

De acordo com Wenzel (1985), os programas de melhoramento genético convencional e não convencional objetivam a obtenção de variabilidade genética na população a fim de serem selecionados os genótipos desejáveis. A maioria da variabilidade genética disponível utilizada tem ocorrido naturalmente e nos Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) existem para preservar esta variabilidade. Segundo Lemos (2003), a variabilidade genética é essencial em um programa de melhoramento, pois através de estratégias e técnicas adequadas, permite o desenvolvimento de cultivares de plantas que podem ser mais adaptadas às mudanças ambientais, mais eficientes na utilização de nutrientes, mais tolerantes a pragas e doenças e mais produtivas cuja produção seja de melhor qualidade.

O melhoramento genético da pimenta-do-reino objetiva a seleção de cultivares com características de boa produtividade e resistência/tolerância a doenças causadas, principalmente, por fungos e vírus. Segundo Poltronieri et al., (2000), em 1952, principalmente na Índia, deu-se início aos trabalhos voltados ao melhoramento genético para obtenção de cultivares de pimenteira-do-reino. Em 1953, alguns experimentos foram iniciados em Porto Rico. Posteriormente, em 1960 e 1962, iniciaram-se os estudos na Indonésia e na Malásia (Sarawak), respectivamente. Nesses países, o intuito destes estudos era a obtenção de cultivares com resistência a pragas e doenças, principalmente relacionadas com a resistência à podridão-das-raízes, causada pelo fungo *Phytophthora capsici*.

No início da década de setenta, no Brasil, houve tentativa de diversificação da cultura com introdução de cultivares que apresentassem níveis de tolerância ou resistência à doença. Assim, o então Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte (IPEAN) deu início à formação de uma coleção de germoplasma com material genético vindo da região de origem da espécie, Índia, e na década de oitenta, por meio o Centro de Pesquisa Agropecuária do Tropicó Úmido (CPATU), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, hoje Embrapa Amazônia Oriental, optou pela formação do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de pimenta-do-reino com material proveniente também de Porto Rico (ALBUQUERQUE; DUARTE, 1991) a fim de caracterizar, avaliar e selecionar os genótipos mais promissores em relação à resistência à doença fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*), doença mais importante da pipericultura afetando esta

atividade de boa produtividade para indicação aos produtores. Esses estudos comprovaram a existência de estreita base genética e suscetibilidade ao patógeno em todos os acessos avaliados.

Ainda na década de setenta, o Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) juntamente com a Embrapa Amazônia Oriental desenvolveram um projeto para o aumento de variabilidade genética, por mutação induzida, utilizando raios gama em estacas e sementes de pimenteira-do-reino (ANDO et al., 1997). Na década de 1980 foram realizadas as primeiras hibridações interespecíficas utilizando a cultivar Cingapura de *P. nigrum* L. com a espécie *P. colubrinum* Link e obtiveram sementes viáveis em nível de germinação, porém não obtiveram resultados sobre o nível de fertilidade das plantas devido a não continuidade dos estudos (BARRIGA et al., 1980). Lemos (2003) em seu estudo desenvolveu estratégias de seleção *in vitro* para obtenção de material potencialmente resistente a fusariose de forma precoce utilizando a toxina do fungo em meio de cultura.

No Brasil, a Embrapa Amazônia Oriental produziu híbridos intraespecíficos, que mais tarde mostraram-se suscetíveis à fusariose (POLTRONIERI, 1997), desenvolveu também pesquisa com espécies nativas da Amazônia do gênero *Piper*, como porta-enxerto para pimenteira-do-reino, além de cruzamento interespecífico (ALBUQUERQUE; LIBONATI, 1964; POLTRONIERI, 1997; POLTRONIERI et al., 1999). Estudos visando à identificação de espécies do gênero *Piper* resistentes ao fungo *Fusarium*, mostraram que das nove espécies estudadas, sete nativas da Amazônia (*P. arboreum*, *P. carniconnectivum*, *P. colubrinum*, *P. hispidinervium*, *P. hispidum*, *P. hostmannianum* e *P. tuberculatum*.) apresentaram alta resistência e *P. aduncum* apresentou tolerância ao patógeno, podendo ser utilizadas como porta-enxertos para controlar doenças radiculares da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) que quando submetida às inoculações artificiais apresentou alta suscetibilidade ao patógeno (ALBUQUERQUE et al., 2001).

Segundo Lemos et al., (2011), devido os cruzamentos permitirem a produção de novas e desejáveis recombinações de genes, o programa atual de melhoramento genético de pimenteira-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental, dentre suas atividades, visa à obtenção de híbridos intraespecíficos e interespecífico provenientes de polinizações controladas. A hibridação intraespecífica tem o intuito de explorar a heterose por meio de combinações que expressem caracteres produtivos superiores aos pais (vigor híbrido). Para isto, os cruzamentos entre as cultivares de *P. nigrum* L., tem como progenitor feminino a

cultivar Bragantina para todos os cruzamentos por esta apresentar espigas longas, alta produtividade e ser uma das preferidas pelos produtores. Enquanto que o intuito da hibridação interespecífica da cultivar Bragantina de *P. nigrum* L. x *Piper* nativas da Amazônia (*P. aduncum*, *P. hispidinervium*, *P. attenuatum*, *P. arboreum* ou *P. colubrinum*.) tem a finalidade de obter cultivares com características de produção de *P. nigrum* L. que apresentem resistência à fusariose (LEMOS et al., 2011).

Neste sentido, desde 2008 os trabalhos de pesquisas da Embrapa Amazônia Oriental relacionados à cultura da pimenteira-do-reino são para o estabelecimento de um programa de melhoramento que agregue os métodos convencionais juntamente com algumas ferramentas de biologia celular e molecular. Deste modo, estão sendo empregadas as polinizações controladas com a finalidade de gerar híbridos intraespecíficos e interespecíficos. Outra prática a ser desenvolvida são os estudos citogenéticos de cultivares de *Piper nigrum* L. e de espécies nativas amazônicas do gênero *Piper*, a fim de dar suporte às estratégias de melhoramento genético (LEMOS et al., 2011).

2.2 Citogenética e conteúdo de DNA do gênero *Piper*

Estudos citogenéticos são importantes para o entendimento do processo evolutivo de certo grupo ou espécie de plantas, mas se tornam especialmente impactantes quando são aplicados no direcionamento do processo de melhoramento genético de uma espécie. Para tanto é necessário estabelecer informações tais como conteúdo genômico, número de cromossomos e localização de sítios nos cromossomos cujas sequências de DNA ou RNA sejam conhecidas.

O conjunto básico de cromossomos de um indivíduo nos dá informações sobre o que chamamos de ploidia. O estabelecimento de níveis de ploidia é importante na determinação dos indivíduos que devem ser envolvidos em cruzamentos controlados para gerar indivíduos com características desejáveis para o setor produtivo. Eventos de duplicação do genoma têm como consequência a poliploidia e a percentagem de poliploides em plantas pode ocorrer em números que chegam até 95% dependendo do grupo de plantas considerado (LEITCH; BENNET, 1997).

Algumas espécies do gênero *Piper* são reconhecidamente poliploides e estudos de Samuel e Morawetz (1989) relacionados à evolução cromossômica foram realizados em espécies de três gêneros da família Piperaceae: *Piper*, *Peperomia* e *Pothomorphe*. Em

Piper foram observados números cromossômicos de $2n = 26$, $2n = 52$ e $2n = 65$, sendo o número básico $x = 13$ e seus cromossomos considerados os menores entre os três gêneros estudados. O gênero *Peperomia* apresenta cromossomos maiores com número básico $x = 11$. De acordo com os autores, a evolução cromossômica em *Piper* e *Peperomia* se deu dos cromossomos médios para os menores e a distinção cariotípica e de núcleos interfásicos entre os gêneros indicando a importância dos estudos citogenéticos como complemento para a taxonomia dos gêneros de Piperaceae.

Através de bandeamento C, ainda em estudos realizados com espécies dos gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Pothomorphe*, observou-se pelo menos uma banda de heterocromatina proximal em cada cromossomo das espécies de *Piper*, sendo essas bandas de tamanhos variados desde muito pequenos até grandes blocos ocupando mais de 30% de um cromossomo. Em *Peperomia* e *Pothomorphe* foram encontrados quatro e dois cromossomos, respectivamente, com grandes blocos de heterocromatina similares de *Piper* (SAMUEL; MORAWETZ, 1989).

O gênero *Piper* apresenta algumas controvérsias e variações com relação ao número cromossômico básico que compõe as espécies. Dasgupta e Datta (1976) constataram grandes variações quanto ao número cromossômico, pois de acordo com os autores, algumas espécies de *Piper*, como *P. longum*, *P. cubeba* e *P. subpelatum*, apresentam número básico de cromossomos $x = 12$ e outras $x = 13$. Além destes, a família Piperaceae também apresenta número de cromossomos múltiplos de 8, 11 e 14. Em *P. nigrum*, ou seja, dentro de uma mesma espécie, foi encontrado número básico $x = 13$, para as plantas que apresentaram valores de $2n = 26$, 52 e 104 cromossomos e também $x = 12$, para os números cromossômicos de $2n = 36$, 48 e 60 .

O intervalo observado para número de cromossomos em *Piper* é alto, assim estudos realizados por Johansen (1931) revelaram que *Piper subpelatum* é uma espécie diploide e apresenta número de cromossomo igual a 24. Segundo Sharma e Bhattacharyya (1959), a espécie *P. chaba* tem 24 cromossomos, *P. longum* pode apresentar 24, 96 ou 148 cromossomos, *P. geniculatum*, *P. unguiculatum* e *P. medim* possuem 28 cromossomos, *P. betle* tem 32, *P. ornatum* tem 80 e *P. nigrum* pode apresentar de 48 a 128 cromossomos.

A variação no número de cromossomos é uma característica importante como fator evolutivo para os indivíduos poliploides. Portanto, estudos realizados com 53 taxas da família Piperaceae, sendo oito espécies de plantas do gênero *Piper*, foram encontradas variações cromossômicas de $2n = 24$ a 195 em variedades de *P. betle*. Todas as espécies de

Piper estudadas apresentaram número cromossômico múltiplo de 13, exceto *P. cubeba* com $x = 12$ e $2n = 24$. Os autores ressaltam que o número básico $x = 12$, encontrado nesta espécie, pode representar o conjunto básico que $x = 13$ derivou, tornando-se fixo nas espécies de *Piper* provavelmente devido a alguma vantagem seletiva (JOSE; SHARMMA, 1985).

Estudando o número cromossômico de 11 espécies de *Piper*, Samuel (1986) encontrou o número básico $x = 13$ em todas elas com diferentes níveis de ploidia ($2x = 26$, $6x = 78$ e $8x = 104$), contudo foram observados indivíduos diploides, tetraploides, pentaploides, octaploides e dodecaploides. Desse modo, estudos relacionados aos cromossomos das espécies do gênero *Piper* tem importante contribuição para a caracterização das espécies, como pode-se citar a análise cariomorfológica realizada por Joseph et al., (1999) em três espécies de *Piper* (*P. colubrinum* Link, *P. magnificum* Trelease e *Piper nigrum* L.). A análise revelou cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, sendo eles relativamente pequenos (0,32 a 2,46 μm), cujas características estruturais foram importantes para a evolução, e o número somático encontrado variou de $2n = 26$ a 52 cromossomos nas diferentes espécies.

A variação no número cromossômico de uma espécie é relevante para sua caracterização. Neste sentido, Nair (2007) observou que os indivíduos da espécie *Piper magnificum* utilizados para análise cromossômica apresentaram-se como mixoploides e citótipos, pois as variações nos número cromossômicos foram de $2n = 22$ a 28 em uma mesma lâmina com células em metáfase, sendo $2n = 26$ o número mais comumente encontrado e muito relatado para outras espécies do gênero.

Jose e Sharma (1985) realizaram comparações cariotípicas e observaram variações interespecífica e intraespecífica em relação aos pares de cromossomos com constrição secundária. Variações intraespecíficas foram encontradas em *Piper betle* as quais apresentaram de 1 a 4 pares com constrição secundária. Em *Piper attenuatum* três pares de cromossomos foram observados, enquanto que as espécies *Piper nigrum*, *Piper longum* e *Piper chaba* apresentaram dois pares de cromossomos com constrição secundária. Exceto *P. attenuatum*, todas as espécies apresentaram variação no número cromossômico dentro de cada espécie.

A classificação taxonômica de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C.DC., espécies de *Piper* nativas da Amazônia conhecidas como pimenta longa, suscita dúvida. A principal característica, até então, para distinção dessas espécies, para alguns autores, foi o

teor de Safrol produzida pelas espécies em questão, que varia de 82 a 97% para *P. hispidinervium* e 0,10 a 3,24% para *P. aduncum* (SILVA, 1993; SILVA; OLIVEIRA, 2000). O número de cromossomos é uma forte ferramenta na identificação de espécies, portanto Nunes et al., (2007), para detectar diferenças entre essas duas espécies pertencentes à coleção de germoplasma da Embrapa Acre, realizaram a análise de seus cariótipos e concluíram que, pelos descritores citogenéticos, não há diferença entre as duas espécies, ou seja, os autores afirmam tratar-se da mesma espécie, sendo as duas com $2n = 24$ cromossomos, pequenos e metacêntricos com comprimento médio de 1,38 μm em *P. hispidinervium* e 1,32 μm em *P. aduncum*.

Em contrapartida Goulart (2011) também comparou as espécies (*P. aduncum* e *P. hispidinervium*) da coleção de germoplasma da Embrapa Acre com relação ao cariótipo, tipos de núcleo interfásico e quantidade de DNA, pois morfologicamente estas espécies são muito semelhantes. Foi observado que as duas espécies apresentaram $2n = 26$ cromossomos com número básico $x = 13$, porém com morfologias cromossômicas diferentes. Mostraram-se diferentes quanto às fórmulas cariotípicas e homogêneas quanto aos núcleos interfásicos (arreticulados). A quantidade de DNA nuclear foi significativamente maior em *P. hispidinervium*, sugerindo perda de sequências em *P. aduncum* ou amplificação genômica em *P. hispidinervium*.

Samuel et al., (1986) realizou a determinação da quantidade de DNA por meio de densitometria por Feulgen analisando núcleos em G2 (4C) de nove espécies de *Piper* cultivadas e silvestre. Os resultados revelaram variação no conteúdo de DNA de 4,86 a 8,44 pg nos indivíduos diploides silvestres e de 2,73 pg nos tetraploides a 9,86 pg nos octaploide da espécie cultivada.

A quantificação do conteúdo de DNA nuclear é um dado importante para caracterização de espécies, principalmente entre aquelas que morfologicamente não é possível inferir distinção, além de ser reconhecida como um relevante parâmetro para caracterização genômica, com aplicação aos estudos evolutivos e de fornecer informações úteis para o planejamento de projetos de sequenciamento (BENNETT; LEITCH, 2005) e melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F.C. de. Podridão das raízes da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) causada por *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. **Atas do instituto de micologia**, Recife, v.5, p.468-491, 1966.
- ALBUQUERQUE, F.C. de. **Podridão das raízes e do pé da pimenta-do-reino**. IPEAN. (IPEAN-Circular, 5). 1961, 45p.
- ALBUQUERQUE, F.C. de; DUARTE, M. de L.R. de. **Comportamento de cultivares de pimenta-do-reino em áreas de ocorrência de fusariose no estado do Pará**. Embrapa-CPATU, 1991, 40p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 59).
- ALBUQUERQUE, F.C. de; DUARTE, M. de L.R.; BENCHIMOL, R.L.; ENDO, T. Resistência de Piperaceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazônica**, v.31, n.3, p.341-348, 2001.
- ALBUQUERQUE, M. de; LIBONATI, V.F. **25 anos de Pesquisa na Amazônia**. Belém, Brasil: Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Norte, 1964, 89p.
- ALMEIDA, J.G.L. de; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.A.; PESSOA, O.D.L. **Composição química dos óleos essenciais de *Piper divaricatum***. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 25, 2007, São Paulo. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2007, p.304.
- ANDO, A.; ALBUQUERQUE, F.C. de.; POLTRONIERI, M.C.; TULMANN NETO, A. **Obtenção de mutantes resistentes à fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*) em pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) através de irradiação gama**. In: SEMINÁRIO INTARENACIONAL SOBRE PIMENTA-DO-REINO E CUPUAÇU, 1, 1996, Belém. Anais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental/JICA, 1997, p.237-243, (Documentos, 89).
- ANDRADE, E.H.A.; GUIMARÃES, E.F.; MAIA, J.G.S. **Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de *Piper* da Amazônia**. Belém: FEQ/UFPA, 448p., 2009.
- ANDRADE, E.H.A.; SILVA, J.K.R.; RIBEIRO, A.F.; GUIMARÃES, E.F.; MAIA, J.G.S. **Quimiotaxonomia, sazonalidade e atividade biológica de *Piper divaricatum*, com base na análise de seu óleo essencial**. In: Caxiuanã Desafios para uma Conservação de uma Floresta Nacional na Amazônia. Ed. Pedro L. B. Lisboa. 672 p., 2009.
- BAENA, A.R.C.; RODRIGUES, T.E. **Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/p aginas/solos.htm>>. Acesso em: 05 junho 2015.
- BARBOSA, F.B. da C. Biotecnologia molecular e novo padrão de financiamento: possibilidades para pesquisa da fusariose da pimenta-do-reino. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.19, n.3, p.429-449, set./dez. 2002.

BARRIGA, R.H.M.P.; ALBUQUERQUE, F.C. de; DUARTE, M. de L.R. **Estudos sobre hibridação da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*, L.)**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 1980, 3p. (EMBRAPA-CPATU. Pesquisa em andamento, 2).

BENCHIMOL, R.L.; SUTTON, J.C.; DIAS-FILHO, M.B. Potencialidade da casca de caranguejo na redução da incidência de fusariose e na promoção do crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.2, mar/abr. 2006.

BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Plant genome size research: a field in focus. **Annals of Botany**, v.95, p.1-6, 2005.

BRAMMER, S.P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal: da era clássica à molecular**, 2007. 9p. (Embrapa. Documento on line, 87). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/852541/1/pdo85.pdf>>. Acesso em: 09 jul 2015.

CALLEJAS, R. **Taxonomic revision of *Piper* subgenus *Ottonia* (Piperaceae)**. 1986. 832 f. Thesis (Ph. D.) - City University of New York, 1986.

DASGUPTA, A.; DATTA, P.C. Cytotaxonomy of Piperaceae. **Cytologia**, Tokyo, v.41, n. 3-4, p.697-706, 1976.

DUARTE, M.L.R. **Cultivo de pimenta-do-reino na região norte**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2004, p.39-46. (Embrapa Amazônia Oriental. Sistemas de produção, 1).

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C. **Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino**. Embrapa Amazônia Oriental, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/importancia.htm>>. Acesso em: 01 outubro 2014.

EHRINGHAUS, C. ***Piper* spp. (Piperaceae). Use in an indigenous Kaxinawá community Acre, Brazil: Ethnobotany, ecology, phytochemistry and biological activity**. 1997. 284 f. Thesis (M.S.) - Florida International University, Gainesville, 1997.

FISCHER, I.H.; BUENO, C.J.; GARCIA, M. J. de M.; ALMEIDA, A.M. de. Reação de maracujazeiro-amarelo ao complexo fusariose-nematoide de galha. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p.223-227, 2010.

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

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v.120, n.3/4, p.339-350, May 2008.

GUIMARÃES, E.F.; MONTEIRO, D. Piperaceae na reserva biológica de Poço das Antas, Silva Jardim. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.57, n.3, p.567-587, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento**

das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, v.29, n.5, p.91, nov. 2016. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa_201205.pdf> Acesso em: 20 jan 2017.

INTERNATIONAL PEPPER COMMUNITY – IPC. **Pepper statistical yearbook 2006-2015.** Jakarta, 2016. 434p.

JARAMILLO, M.A.; CALLEJAS, R.; DAVIDSON, C.; SMITH, J.F.A.; STEVENS, C.; TEPE, E.J. A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron *psbJ-petA*. **Systematic Botany**, v.33, p.647-660, 2008.

JARAMILLO, M.A; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.88, n.4, p.706-716, 2001.

JOHANSEN, D.A. The chromosomes of *Piper subpeltatum*. **American Journal of Botany**, v.18, p.134-135, 1931.

JOSE, J.; SHARMMA, A.K. Structure an behaviour of chromosome en *Piper* and *Peperomia* (family Piperaceae). **Cytologia**, Tokyo, v.50, n.2, p.301 – 310, 1985.

JOSEPH, A.; JOSEPH, R.; JOSE, J. Karyomorphometrical analysis in *Piper* species using image analysis system. **Cytobios**, Cambridge, v.97, n.384, p.7-11, 1999.

LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science*, Oxford, v.2, n.12, p.470–476, 1997.

LEMOS, O. F. de. **Mutagênese in vitro no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.).** 2003. 159 f. Tese de doutorado. Piracicaba - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, n1, p.36-42, jul. 2005.

LUZ, A.I.R.; ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G.S. The essential oils of *Piper reticulatum* L. and *P. crassinervium* H. B. K. **Acta Amazônica**, v.33, n.2, p.341-344, 2003.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v.32, n.3, p.595-622, 2009.

MATHEW, P.J.; MATHEW, P.M.; PUSHPANGANDAN, P. Cytology and its bearing on the systematics and phylogeny of piperaceae. **Cytologia**, Tokyo, v.64, n.3, p.310-307, 1999.

MEIRELES, E.N. **Influência dos metabólitos secundários de *Piper divaricatum* da região amazônica no controle do *Fusarium solani* f. sp. *piperis* causador da fusariose em pimenta-do-reino**. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal do Pará, Belém. 2014.

MENEZES, I.C de. **Caracterização genética de espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) utilizando marcadores moleculares**. 2011. 144 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Pará, Belém. 2011.

NAIR, K.P.P. **Agronomy and Economy of Black Pepper and Cardamom: The "king" And "queen" of spices**. 1.ed. Elsevier, 2011. 380p.

NAIR, K.P.P. The agronomy and economy of black pepper (*Piper nigrum* L.) - the “king of spices”. **Advances in Agronomy**, 2004. v.82, 652p.

NAIR, R.R. Aneuploid variation of chromosome number in the somatic cells of *Piper magnificum* Trel. **Cytologia**, Tokyo, v.72, n.2, p.239-242, 33, Jun. 2007.

NASCIMENTO M.E do P.; VILHENA, R. C. de. Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinervium* C.DC. (Piperaceae) e suas estruturas secretoras. Belém; **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi**. 1999. Série Botânica, v.15, n.1. 1999.

NUNES, J.D.; TORRES, G.A.; DAVIDE, L. C.; SALGADO, C. C. Citogenética de *Piper hispidinervium* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.7, p.1049-1052, jul. 2007.

OLIVEIRA, D.A. de; MOREIRA, P.A.; MELO JÚNIOR, A.F.; PIMENTA, M.A.S. Potencial da biodiversidade vegetal da Região Norte do Estado de Minas Gerais. **Unimontes científica**, Montes Claros, v.8, n.1 - jan./jun. 2006.

POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C.; TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, M.C.; ROCHA NETO, O.G. Incidência de doenças em pimenta longa (*Piper hispidinervium*) nos estados do Acre e Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.4, p.563-564, Dez. 1997.

POLTRONIERI, M.C.; LEMOS, O.F. de; ALBUQUERQUE, F.C. **Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. In: **Programa de melhoramento genético e adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, documentos, v. 16, p.127-137, 1999.

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.

QUIJANO-ABRIL, M.A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D.R. Areas of endemism and distribution patterns for neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography**, p.1266-1278, 2006.

SAMUEL, R. Chromosome numbers in *Piper*. **Kew Bulletin**, London, v.42, n.2, p.465-470, 1986.

SAMUEL, R.; MORAWETZ, W. Chromosome evolution within Piperaceae. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 166, n. 1/2, p. 105-117, Mar. 1989.

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

SHARMA, A.K.; BHATTACHARYYA, N.K. Chromosome studies on two genera of the family Piperaceae. **Genetica**, v.29, p.256-289, 1959.

SHI, L.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, J.A.; KEIM, P. Soybean chromosome painting: a strategy for somatic cytogenetics. **Journal of Heredity**, v.87, n.4, p.308-313, 1996.

SILVA, B.S.O. e; DRUMOND NETO, A.P.; SILVA, M.B. da. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, Viçosa, v.1, n.1, p.84-88, julho. 2011.

SILVA, A.C.P.R. da; OLIVEIRA, M.N. de. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000, 13p. (Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa, 23).

SILVA, M.H.L. **Tecnologia de cultivo e produção racional de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C.DC)**. Dissertação - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p 87, 1993.

SMITH, J. F.; STEVENS, A. C.; TEPE, E. J.; DAVIDSON, C. Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, p.9-30, 2008.

TREMACOLDI, C. R. **Tecnologia para o controle da podridão de raízes em mudas de pimenteira-do-reino**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2011, 4p. (Embrapa Amazônia Oriental, Comunicado técnico, 226).

ZACARONI, L.M.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; PIMENTEL, F.A.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazônica**, v.39, n.1, p.193 – 198, 2009.

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

ARTIGO 1

**CONTEÚDO DE DNA E NÚMERO CROMOSSÔMICO DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Piper* (PIPERACEAE)**

Artigo redigido conforme normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

Conteúdo de DNA e número cromossômico de espécies do gênero *Piper* (Piperaceae)

Lana Roberta Reis dos Santos⁽¹⁾, Oriel Filgueira de Lemos⁽²⁾, Ilmarina Campos de Menezes⁽²⁾, Hugo Alves Pinheiro⁽¹⁾ e Mateus Mondin⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Instituto Socioambiental e dos Recursos Hídricos (ISARH), Av. Pres. Tancredo Neves, 2501, Caixa Postal 917, CEP: 66.077-530 Belém, PA, Brasil. E-mail: ana.robert@hotmail.com, hugo.ufv@bol.com

⁽²⁾Embrapa Amazônia Oriental, Pavilhão de pesquisa, Tv. Doutor Enéas Pinheiro, s/n, Caixa postal 48, CEP: 66095-903 Belém, PA, Brasil. E-mail: oriel.lemos@embrapa.br, ilmarina.menezes@embrapa.br

⁽³⁾Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Departamento de Genética, Laboratório de Citogenômica e Epigenética, Avenida Pádua Dias, 11, Caixa Postal 83, CEP: 13400-970 Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: mmondin@usp.br

Resumo - Espécies nativas da Amazônia do gênero *Piper* (Piperaceae) são ricas em óleo essencial e apresentam resistência a doença fusariose da pimenteira-do-reino, características de interesse pelo potencial uso em programas de melhoramento genético da pimenteira-do-reino. Estudos citogenéticos são essenciais, pois morfológicamente algumas espécies de *Piper* são similares. O objetivo foi analisar o conteúdo de DNA e número cromossômico de espécies do gênero *Piper* do BAG de Piperaceae da Embrapa Amazônia Oriental, por meio da citometria de fluxo e contagem cromossômica. As espécies estudadas foram *P. tuberculatum*, *P. attenuatum*, *P. hispidum*, *P. colubrinum*, *P. arboreum*, *P. alatipetiolatum*, *P. divaricatum* e cultivares de *P. nigrum*. Para estas foi realizada a contagem do número de cromossomos pelo método Feulgen e quantificação do conteúdo de DNA (2C) via citometria de fluxo. Houve variação no número de cromossomos das espécies nativas, distinção no número básico e no nível de ploidia, sendo *P. colubrinum*

($2n = 2x = 26$), *P. arboreum* ($2n = 4x = 48$), *P. alatipetiolatum* ($2n = 38$) e *P. divaricatum* ($2n = 6x = 54$). As cultivares de *P. nigrum* apresentaram o mesmo número de cromossomos ($2n = 4x = 52$). O conteúdo de DNA entre as espécies variou de 0,91 a 3,29 pg. O número cromossômico, nível de ploidia e número básico cromossômico das espécies *P. tuberculatum*, *P. attenuatum*, *P. hispidum* ainda precisam ser elucidados.

Termos para indexação: citogenética, citometria de fluxo, cultivares de pimenteira-do-reino, nativas da Amazônia.

DNA content and chromosome number of species from the genus *Piper* (Piperaceae)

Abstract - Amazonian native species from the genus *Piper* (Piperaceae) are rich in essential oil and show resistance to the black pepper fusariosis disease, which are characteristics of interest due to their potential use in plant breeding programs for black pepper. Cytogenetic studies are crucial since some *Piper* species are morphologically similar. The aim was to analyze the DNA content and the chromosome number of species from the *Piper* genus of the Embrapa Eastern Amazon germplasm bank by means of flow cytometry and chromosome counting. The investigated species were *P. tuberculatum*, *P. attenuatum*, *P. hispidum*, *P. colubrinum*, *P. arboreum*, *P. alatipetiolatum*, *P. divaricatum* and some *P. nigrum* cultivars. For these, chromosome counting was performed by the Feulgen method and quantification of the DNA content (2C) via flow cytometry. There was variation in the chromosome number of native species, distinction in the basic number and in the ploidy level, being *P. colubrinum* ($2n = 2x = 26$), *P. arboreum* ($2n = 4x = 48$), *P. alatipetiolatum* ($2n = 38$) and *P. divaricatum* ($2n = 6x = 54$). The *P. nigrum* cultivars presented the same chromosome number ($2n = 4x = 52$). The DNA content among the species varied from 0.91 to 3.29 pg. The chromosome number, ploidy level and basic

chromosome number of *P. tuberculatum*, *P. attenuatum* and *P. hispidum* still need to be elucidated.

Index terms: cytogenetics, flow cytometry, black pepper cultivars, Amazonian native.

Introdução

Os recursos genéticos são componentes estratégicos da biodiversidade e o conhecimento de determinadas espécies promove o desenvolvimento tecnológico e econômico. Portanto, a avaliação de germoplasmas, por meio da caracterização morfológica, agronômica, citogenética e molecular, é essencial para conservação, uso e valorização dos recursos genéticos.

Plantas do gênero *Piper* estão distribuídas na zona tropical do velho e novo mundo e apresentam grande importância ecológica, econômica e alta diversidade metabólica com atividades biológicas (Arzolla et al., 2010). Na Amazônia há cerca de 300 espécies, algumas com características importantes para o melhoramento genético de *Piper nigrum* L., que é a espécie de maior importância econômica do gênero por ser a especiaria mais comercializada no mundo (Jaramillo & Manos, 2001).

A determinação do nível de ploidia pode ser obtida por meio da contagem do número de cromossomos ou pela estimativa do conteúdo de DNA por citometria de fluxo, seja para caracterização de germoplasma ou verificação da eficiência de técnicas de manipulação do genoma, como autopoliploidização e haploidização (Campos et al., 2009). A variabilidade do conteúdo de DNA em diferentes espécies pode ser atribuída à perda ou adição de muitas repetições nos genomas por meio de alterações no micro e macro ambiente durante a evolução e especiação de novas espécies (Price et al., 1980, Das et al., 1998). Compreender a variação do conteúdo de DNA nuclear entre espécies de plantas é

um passo essencial em direção a um melhor conhecimento da evolução de diversificação (Garcia et al., 2010).

O programa atual de melhoramento genético da pimenteira-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental tem como estratégia a obtenção de híbridos intraespecíficos por meio de polinizações controladas, entre genótipos de pimenteira-do-reino (*P. nigrum* L.), para obtenção de combinações que expressem caracteres produtivos superiores aos pais. No entanto, as cultivares disponíveis no Brasil não apresentam fonte de resistência à doença fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (Lemos et al., 2011).

Neste sentido, espécies nativas da Amazônia do gênero *Piper*, como *P. aduncum* Linn., *P. colubrinum* Link., *P. tuberculatum* Jacq., *P. hispidinervium* C. D. C. e *P. hispidum* Sw., são potenciais fontes de resistência a esta doença. Porém, para que sejam utilizadas no programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino, a caracterização citogenética das espécies é importante para seleção dos pais compatíveis geneticamente a fim de serem gerados híbridos férteis. Portanto, estudos citogenéticos devem ser desenvolvidos em relação às cultivares de pimenteira-do-reino e às espécies silvestres do gênero *Piper*, nativas da Amazônia, para dar suporte às estratégias de melhoramento genético, visto que o conteúdo cromossômico varia entre e dentro das espécies.

Além dos estudos citogenéticos, a quantificação do conteúdo de DNA via citometria de fluxo pode ser uma ferramenta útil para o melhoramento de plantas uma vez que permite monitorar a estabilidade do nível de ploidia, além de identificar novos níveis como resultados de cruzamentos em programas de melhoramento genético (Dolezel, 1997). Portanto, esta pesquisa teve como objetivo analisar o conteúdo de DNA e número cromossômico de espécies do gênero *Piper* do BAG de Piperaceae da Embrapa Amazônia Oriental, por meio da citometria de fluxo e contagem cromossômica, para dar suporte ao programa de melhoramento da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.).

Material e Métodos

Material vegetal

Plantas de acessos de *Piper* nativas da Amazônia e cultivares de *P. nigrum* L. do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, foram avaliadas quanto ao conteúdo de DNA e número cromossômico. As espécies de *Piper* nativas deste estudo possuem registro de depósito no Herbário Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi. As espécies utilizadas foram: *Piper alatipetiolatum* Yuncker. (MG 155653), *Piper arboreum* Aubl. var. *arboreum*. (MG 150695), *Piper colubrinum* (Link ex Kunth) Link ex C. DC. (MG 165237), *Piper divaricatum* G. Mey. (MG 165391), *Piper hispidum* Sw. (MG 150675), *Piper tuberculatum* Jacq. var. *tuberculatum* (MG 165157), *Piper attenuatum* e seis cultivares de *Piper nigrum* L.: Apra, Bragantina, Cingapura, Iaçará, Kottanadan e Kuthiravally.

As espécies nativas do gênero *Piper*, provenientes de estacas de plantas do BAG da Embrapa Amazônia Oriental foram conduzidas e cultivadas em casa de vegetação, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, em substrato de vermiculita para disponibilizar raízes para análise citogenética e folhas para análise de conteúdo de DNA.

No Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental-Belém/Pará, as plantas das cultivares de *P. nigrum* L., cujas sementes provenientes do município de Tomé-Açu/Pará, foram multiplicadas via micropropagação e após o quinto subcultivo de multiplicação de brotos (aproximadamente seis meses em cultura), os brotos foram submetidas ao enraizamento in vitro em meio de cultura de ½ MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (NAA) para indução dos primórdios radiculares. Ressalte-se que o pH do meio foi ajustado para 5,8, solidificado com phytigel a 0,2%, antes da autoclavagem por 20 minutos

a 120°C e pressão de 1,5 atm. Os meios de cultura estavam em frascos com capacidade de 300 mL (40 mL/frasco), nos quais os brotos foram cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, irradiância de fótons de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por lâmpadas Sylvania F40 W T10. Em condições *in vitro*, as plantas das cultivares de *P. nigrum* foram conduzidas ao Laboratório de Citogenômica e Epigenética de Plantas do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, Piracicaba/São Paulo onde foram aclimatizadas e forneceram raízes e folhas para as análises.

Determinação do conteúdo de DNA nuclear de espécies do gênero *Piper*

O preparo das amostras e as análises de citometria de fluxo foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC. O tamanho do genoma (2C) das plantas foi avaliado por meio da técnica de citometria de fluxo utilizando-se o equipamento Partec CyFlow Ploidy Analyzer DAPI (Partec GmbH., Alemanha) equipado com lâmpada UV-LED (365 nm) e um parâmetro ótico para detecção de fluorescência.

Cada amostra foi composta por suspensões nucleares para as quais foram utilizados de 20 e 30 mg (ou $0,25 \text{ cm}^2$) de tecido da folha jovem apical, completamente expandida, com a mesma quantidade de tecido da planta padrão de referência interno. Com o auxílio de um bisturi as folhas foram trituradas, em placa de Petri, na presença de 0,2 ml do tampão de extração (kit de coloração CyStain UV precise T-DAPI, Partec GmbH.). Em seguida, as suspensões foram coradas com 0,8 ml da solução corante do mesmo kit a qual é composta por 4-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) como fluorocromo, posteriormente filtradas em CellTrics $30 \mu\text{M}$ disposable filter (Partec GmbH.), e analisadas imediatamente.

Foram realizadas cinco análises independentes (amostras) de cada genótipo e avaliados no mínimo 2.000 núcleos intactos por amostra com uso o auxílio do software

CyView (Partec GmbH.) com a seguinte calibração: Gain = 597 e Low Level (LL) = 0,64, resultando em histogramas. As amostras que apresentaram coeficientes de variação (CV) acima de 10% foram descartadas e para determinação do valor médio relativo de cada planta foram selecionadas as três melhores, dentre as cinco, com os menores CVs (< 2%), sendo que cada uma delas foi considerada como uma repetição (delineamento inteiramente ao acaso com três repetições). Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste F, e as médias do conteúdo de DNA foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para o cálculo do tamanho do genoma (2C - em Mpb) de todas as plantas utilizou-se o valor médio relativo da tangerina Clementina haploide (*Citrus clementina* Hort. Ex Tanaka), como padrão interno de referência, tendo o genoma descrito com tamanho de 310,0 Mpb (Wu et al., 2014). A espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck também foi usada para comparação, como espécie diploide. Estes padrões de referência, tanto haploide quanto diploide, foram utilizados por estarem bem estabelecidos e por esta razão são utilizados em estimativas do conteúdo de DNA nuclear de outras plantas superiores, pois a estimativa do conteúdo de DNA é calculada pela comparação das intensidades de fluorescência dos núcleos em G1 da planta que se deseja saber o conteúdo de DNA com a planta padrão de referência.

As quantidades de DNA nuclear (Mpb) das amostras foram estimadas por meio da equação: $\text{DNA amostra} = (\text{G1 amostra} / \text{G1 padrão}) \times \text{DNA padrão}$; onde: DNA amostra = quantidade de DNA nuclear da amostra (pg); G1 amostra = posição do pico G1 da amostra; G1 padrão = posição do pico G1 de *Citrus clementina* (haploide); DNA padrão = tamanho do genoma de *Citrus clementina* = 310,0 Mpb; O tamanho do genoma (2C) em pg foi calculado pela relação de 1 pg de DNA = 978 Mpb (Dolezel et al., 2003).

Análise do número cromossômico

Para análise do número de cromossomos foram coletadas pontas de raízes de *P. nigrum* do enraizamento in vitro e das espécies de *Piper* nativas da Amazônia, do enraizamento via estaca cujo cultivo foi em bandejas (50 x 40 cm) com vermiculita, em casa de vegetação, nas dependências do Laboratório da Embrapa Amazônia Oriental.

As pontas de raízes foram cortadas com tamanho aproximado de 2 cm de comprimento e pré-tratadas em solução de 8-hidroxiquinolina a 300 ppm por 4 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as pontas de raízes foram transferidas para fixador de Carnoy (etanol:ácido acético 3:1), onde permaneceram por 12 horas à temperatura ambiente e posteriormente a 4° C (Cuco et al., 2003).

Para coloração pelo método de Feulge, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Citogenômica e Epigenética de Plantas do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-ESALQ, Piracicaba/São Paulo e mantidas em freezer até o momento do preparo das lâminas. As raízes fixadas das espécies do gênero *Piper* foram hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por oito minutos seguida de duas lavagens em água destilada e coradas em reativo de Schiff por 45 minutos no escuro e lavadas em seguida. A digestão da parede celular foi obtida com pectinase/celulase (100/100u) a 37°C por 40 minutos e depois mantidas em solução tampão de citrato a 0,01M a - 4°C a fim de paralisar a reação enzimática (Mondin et al.,2007).

Para o preparo das lâminas, as pontas de raízes foram imersas em solução de ácido acético a 45% por dois minutos. Com auxílio de pinça de relojoeiro, sobre a lâmina com solução de carmim acético, a região meristemática foi excisada, e para a soltura e espalhamento das células realizou-se o esmagamento. O espalhamento das células se deu pelo depósito da lamínula sobre a lâmina seguida de breve aquecimento e leve pressão sobre a lâmina.

Para a análise cariotípica dos genótipos, cinco metáfases foram selecionadas para contagem do número de cromossomos. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência DM 4000 B Leica® acoplado a câmara Leica® DFC 365 FX, na qual as imagens foram digitalizadas pelo *software* LAS AF6000.

Resultados e Discussão

Os resultados de conteúdo de DNA e número cromossômico a partir dos métodos de análises utilizados permitiram distinguir diferenças entre os genótipos, descartando a possibilidade de serem sinônimos.

Determinação do conteúdo de DNA nuclear de espécies do gênero *Piper*

Os resultados demonstraram a distinção entre as espécies do gênero *Piper* avaliadas por meio da técnica de citometria de fluxo (Tabela 1). Os valores do conteúdo genômico variaram de 1,24 pg a 1,31 pg entre as cultivares de *P. nigrum*, mas essa diferença não foi significativa. O maior conteúdo de DNA (3,29 pg) foi obtido pela espécie nativa *P. divaricatum*, o qual diferiu das demais espécies. O menor valor (0,91 pg) foi obtido em *P. tuberculatum* o qual não diferiu de *P. attenuatum* (1,06 pg) para o tamanho do genoma (2C). Com exceção destas duas espécies, as *Piper* nativas da Amazônia apresentaram maior quantidade de DNA que as cultivares de *P. nigrum*.

As estimativas do conteúdo de DNA nuclear para *P. arboreum* (Tabela 1) diverge do obtido por Samuel et al., (1986), os quais mensuraram esta espécie com $4C = 3,12$ pg. Em relação as espécies nativas *P. tuberculatum*, *P. attenuatm*, *P. hispidum*, *P. colubrinum*, *P. alatipetiolatum* e *P. divaricatum*, não há relatos na literatura para fins de comparação, todavia, há estudos realizados com outras espécies deste gênero. Porém, no que diz respeito a pesquisas realizadas com espécies de *Piper* nativas da Amazônia, apenas duas, *P. aduncum* e *P. hispidinervium*, foram mensuradas quanto à quantidade de DNA (2C) cujos valores foram 1,88 e 2,10 pg, respectivamente (Goulart, 2011).

Samuel et al., (1986) ao determinarem a quantidade de DNA de nove espécies de *Piper* do Novo e do Velho Mundo, cultivadas e silvestres, observaram variação do conteúdo de DNA quando analisaram núcleos em G2 (4C). Os autores notaram variação nos indivíduos diploides silvestres de 2,43 a 4,22 pg, nos tetraploides de 0,68 a 1,03 pg e em uma espécie silvestre de *P. nigrum*, octaploide, o conteúdo de DNA foi de 1,20 pg. De acordo com estes autores, as espécies silvestres de *Piper* tendem a ter maior quantidade de DNA que as espécies cultivadas, sendo coerente com os resultados apresentados na Tabela 1, porém os valores de *P. tuberculatum* e *P. attenuatum* divergem, neste trabalho, da afirmação dos autores em relação às cultivares de *P. nigrum* L.

Segundo Merotra & Goyal (2014), a variação no conteúdo de DNA pode decorrer do maior acúmulo de sequências de DNA repetitivo. Porém, Samartini et al., (2016) afirma que pode ser proveniente de regiões ou genes duplicados com maior quantidade de DNA. Estas afirmativas são coerentes quando são observados os tamanhos, sob mesma escala (10 μm), dos cromossomos das espécies nativas em relação ao das cultivares de *Piper* (Figuras 1 e 2). Samuel et al., (1986) observaram que os cromossomos do gênero *Piper*, de maneira geral, são pequenos, com comprimento entre 2,27 μm a 0,7 μm e os das espécies tetraplóides cultivadas de *P. nigrum* são maiores (média 1,38 μm), em comparação com as espécies silvestres tetraplóides, como *P. ornatum* (média 0,97 μm). Para Zonneveld & Duncan (2010), dentro do gênero, a variação no conteúdo genômico muitas vezes está relacionada com diferenças no nível de ploidia, devido a alterações estruturais do genoma.

Estimativas através de análise citofotométrica de Feulgen do conteúdo de DNA nuclear na fase G2 da interfase (4C) de seis espécies de *Piper* foram obtidas e revelaram os valores de 8,74 pg para *P. nigrum*, 8,58 pg para *P. mullesua*, 7,31 pg para *P. longum*, 6,81 pg para *P. betel*, 7,57 pg para *P. retrofactum* e 4,20 pg para *P. chaba* (Chikkaswamy, et al., 2007). Os valores de DNA 4C foram relatados pela primeira vez em seis espécies de *Piper*

cujas diferenças significativas de DNA 4C apresentaram uma variação de 4,2 a 8,74 pg de conteúdo de DNA nuclear (Furuta et al., 1975).

As cultivares de *P. nigrum* avaliadas neste trabalho também não são relatadas na literatura. Samuel et al., (1986) ao estudarem dois genótipos de *P. nigrum* L. observaram que a espécie cultivada Panniyur-1 apresentou conteúdo de DNA (4C) de 1,02 pg, e o acesso Nº 12627 de Sri Lanka (silvestre) 1,20 pg, considerado como octaploide com este conteúdo de DNA. Valores esses próximos aos encontrados na Tabela 1 para as cultivares de *P. nigrum* L. para o conteúdo de DNA (2C).

Quanto à determinação do nível de ploidia através da citometria de fluxo, para potencializar a precisão, é necessária a comparação do conteúdo de DNA da planta em estudo com o de outra da mesma espécie, cujo nível de ploidia é conhecido. Neste caso, optou-se por determinar o nível de ploidia através da contagem do número de cromossomos, pois as espécies estudadas não apresentavam registro na literatura quanto aos parâmetros avaliados, impossibilitando a comparação.

Análise do número cromossômico

A contagem dos cromossomos foi um processo extremamente delongado, pela dificuldade em obter células inteiras, para não haver erros na contagem cromossômica, em metáfases mitóticas e com boa condensação dos cromossomos para todas as espécies e genótipos em estudo. Portanto, não foi possível a contagem do número cromossômico com precisão para as espécies *P. tuberculatum*, *P. attenuatum* e *P. hispidum* não sendo possível inferir o número de cromossomos destas.

Controvérsias sobre o número cromossômico básico do gênero *Piper* induziram o desenvolvimento de vários trabalhos a fim de elucidar tais discussões. A contagem do número cromossômico e nível de ploidia (Tabela 1), permitiu determinar que as cultivares Kottanadan, Bragantina, Kuthiravally, Iaçara, Apra e Cingapura de *P. nigrum* L. tem

células somáticas com $2n = 52$ (Figura 1), que corresponde ao número determinado por Rahiman & Nair, (1986), porém números díspares são apresentados em outros estudos citogenéticos e mostram grande variação quanto ao número de cromossomos para pimenteira-do-reino, $2n = 48$ (Sharma & Bhattacharyya, 1959), $2n = 52$ (Martin & Gregory, 1962) e $2n = 128$ (Darlington & Wylie, 1956).

Variação no número de cromossomos para dois diferentes acessos de pimenteira-do-reino foi registrada por Samuel (1986) cujos números encontrados foram 52 e 104. Esse intervalo na variação do número de cromossomos pode ser ainda maior, pois Dasgupta & Datta (1976) descreveram variação no número cromossômico de *P. nigrum* L. que vai de 26 a 104 ($2n = 26, 36, 48, 52, 60$ e 104).

A variação do número cromossômico dentro de uma mesma espécie foi estudada por Nair (2007) usando a espécie *P. magnificum*, a qual observou que 62% das metáfases somáticas apresentavam número de cromossomos $2n = 26$. Os 38% restante apresentaram a variação de $2n = 22, 24, 25, 27$ e 28 cromossomos, sendo $2n = 24$ o mais frequente. Vários estudos relatam números cromossômicos 26, 52 e 104 os quais apontam o número básico de $x=13$ enquanto que 36, 48 e 60 indicam $x = 12$ (Dasgupta & Datta, 1976; Samuel & Bavappa, 1981; Samuel & Morawetz, 1989; Nair, 2007; Nunes et al., 2007).

Números de cromossomos também foram relatados por Samuel & Morawetz (1989) em 26 espécies dos gêneros *Piper*, *Pothomorphe* e *Peperomia*. O gênero *Piper* exibiu uma série de poliplóide de $2n = 26$ a $2n = 52$ e $2n = 65$ entre as espécies investigadas. Dentre as espécies, as contagens realizadas revelaram em *P. officinarum* $2n = 26$, *P. chuyva* $2n = 52$ e *P. porphyrophyllum* $2n = 52$.

Em relação às espécies de *Piper* nativas da Amazônia, inicialmente foi realizada a contagem do número cromossômico em *P. columbrinum* e *P. divaricatum* (Figura 2). O número cromossômico observado de *P. columbrinum* ($2n = 2x = 26$) é compatível com o

relatado por Vanaja et al. (2008). Para *P. divaricatum*, foi observado o número cromossômico de $2n = 54$, o que classifica esta espécie como hexaploide com número básico de cromossomos $x = 9$.

Andrade et al., (2009) revelaram, por meio de uma revisão realizada do gênero *Piper*, que as espécies de *P. crasum* e *P. colubrinum* são sinônimos de *P. divaricatum*. Contudo, tanto o número de cromossomos observados no atual trabalho, $2n = 26$ para *P. colubrinum* e $2n = 54$ para *P. divaricatum*, quanto o conteúdo de DNA (2C) 1,51 e 3,29 pg para as respectivas espécies, revelam tratar-se de espécies diferentes.

O número de cromossomo observado em *P. arboreum* foi $2n = 48$, um tetraploide com número básico $x = 12$ (Figura 2A). A espécie nativa *P. alatipetiolatum* apresenta $2n = 38$ (Figura 2B), sem definição para o nível de ploidia, devido à inexistência de relato ou registro do número básico na literatura (Tabela 1).

Samuel (1986) realizou contagens cromossômicas de 11 espécies do gênero *Piper* e observou que três espécies apresentaram número cromossômico igual a 26 e outras sete espécies apresentaram 52 cromossomos. Em relação a décima primeira espécie, *Piper nigrum* L., foram avaliados um acessos proveniente do Sri Lanka, com 52 cromossomos e outro da Austrália, com 104. De acordo com o autor, a maioria das espécies provenientes do continente americano foram caracterizadas como diploides e as dos continentes africano, asiático e europeu caracterizam-se como poliploides. Essa mesma relação é encontrada em plantas silvestre e cultivadas com tendência a formar grupos diploides e poliploides, respectivamente.

De um modo geral, o conteúdo de DNA e o número de cromossomos estão relacionados à ploidia, assim para certos gêneros, tais como *Triticum* e *Hordeu*, a quantidade de DNA apresenta uma relação direta positiva apresentada para esses gêneros. Entretanto, alguns autores relatam também que essa relação, para alguns gêneros, pode se

mostrar negativa, como foi observado em *Musa sp.* onde triploides apresentaram conteúdo genômico menor que os observados pelos exemplares diploides (Madail et al, 2015). Com objetivo de estabelecer a relação entre ploidia e conteúdo genômico, Samuel et al., (1986), mostrou que ambos fenômenos também ocorrem no gênero *Piper*.

A variação no nível de ploidia em espécies de um mesmo gênero é extremamente importante, pois essa variação é uma das causas da debilidade da geração F1, dificultando ainda mais os cruzamentos entre variedades (Waard & Zeven, 1969). Sendo assim, esse aspecto constitui-se fator importante como forma de direcionar a escolha de parentais para cruzamentos em trabalhos de melhoramento genético. Por outro lado, a diferença de ploidia entre espécies do gênero *Piper* pode ser explorada em cruzamentos.

Conclusões

1. Houve distinção das espécies pelo conteúdo de DNA e do número de cromossomos;
2. O número cromossômico, nível de ploidia e número básico cromossômico das espécies *P. tuberculatum*, *P. attenuatum*, *P. hispidum* precisam ser elucidados;
3. As cultivares de *P. nigrum* tem número de cromossomo igual a 52, número básico de 13, sendo consideradas tetraploides;
4. Pelo número de cromossomo e conteúdo de DNA, os cruzamentos intraespecíficos são viáveis, enquanto para os cruzamentos interespecíficos entre as cultivares e espécies de *Piper* nativas é indicada a espécie *P. colubrinum*.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, à Embrapa Amazônia Oriental e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (Capes), pelo apoio financeiro.

Referências

- ANDRADE, E.H.A.; SILVA, J.K.R.; RIBEIRO, A.F.; GUIMARÃES, E.F.; MAIA, J.G.S. **Quimiotaxonomia, sazonalidade e atividade biológica de *Piper divaricatum*, com base na análise de seu óleo essencial**. In: Caxiuanã Desafios para uma Conservação de uma Floresta Nacional na Amazônia. Ed. Pedro L. B. Lisboa. 672p, 2009.
- ARZOLLA, F.A.R.D.P.; VILELA, F.E.S. P.; PAULA, G.C.R. de; SHEPHERD, G.J. Regeneração natural em clareiras de origem antrópica na Serra da Cantareira. **Revista do Instituto Florestal**, v.22, n.1, p.155-169, 2010.
- CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C.; SALGADO, C.C.; SANTOS, F.C.; COSTA, P.N.; SILVA, P.S.; ALVES, C.C.S.; VICCINI, L.F.; PEREIRA, A.V. In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Berlin, v.128, n.1, p.101-104, 2009.
- CHIKKASWAMY. B.K.; PARAMANIK, R.C.; VARADARAJ, N.; PARAMANIK, A.; RAMESH, H.L.; SHIVASHANKAR, M.; R. SIVASAM, V. Determination of Genetic Variation in *Piper* Species Using 4C Nuclear DNA and RAPD Markers. **Cytologia**, v.72, n.3, p.243–249, 2007.
- CUCO, S.M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v.17, n.3, p.363–370, 2003.
- DARLINGTON, C.D.; WYLIE, A.P. **Chromosome atlas of flowering plants**. 2 Ed., 519p., 1956.
- DAS, A. B.; RAI, S.; DAS, P. Karyotype analysis and 4C DNA content in some species of ginger (*Zingiber officinale* Rose.). **Cytobios**, v. 93, p. 175–184, 1998.
- DASGUPTA, A.; DATTA, P.C. Cytotaxonomy of Piperaceae. **Cytologia**, Tokyo, v.41, n.3-4, p.697-706, 1976.
- DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plants genomes. **Journal of Applied Genetics**, Olomouc, v.38, n.3, p.285-302, 1997.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry**, Malden, v. 51, n. 2, p. 127 – 128, Feb. 2003.
- FURUTA, Y.; NISHIKAWA, K.; MAKINO, T. Interspecific variation of nuclear DNA content in *Aegilops squarrosa* L. **The japanese journal of genetics**. v.50, n.6, p.257–263, 1975.
- GARCIA, S.; GARNATJE, T.; HIDALGO, O.; VALLÈS, J. First genome size estimations for some eudicot families and genera. **Collectanea Botanica**, Barcelona, v.29, p.7-16, 2010.

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

JARAMILLO M. A. and MANOS P. S.; Phylogeny and patterns of diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, v. 88, p.706-716, 2001.

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

MADAIL, R. H.; PIO, L. A. S.; SILVA, S. D. O.; PASQUAL, M.. Estimativa do conteúdo de DNA de diferentes acessos de bananeira: relações entre nível de ploidia e grupos genômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.37, n.4, p.977-983, 2015.

MARTIN, F.W. GREGORY, L.E. Mode of pollination and factors affecting fruits set in *Piper nigrum L.* in Puerto Rico. *Crop. Sci.*, Madison, v.2, n.4, p.295-299, 1962.

MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v.12, p.164–171, 2014.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.65-72, 2007.

MURASHIGE,T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia plantarum**. V.15, p.473–497, 1962.

NAIR, R. R. Aneuploid variation of chromosome number in the somatic cells of *Piper magnificum* Trel. **Cytologia**, Tokyo, v.72, n.2, p.239-242, 33, 2007.

NUNES, J.D.; TORRES, G.A.; DAVIDE, L. C.; SALGADO, C. C. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.7, p.1049-1052, 2007.

PRICE, H. J.; BACHMAN, K.; CIHAMBERS, K. L.; RIGGS, J. Detection of interspecific variation in nuclear DNA content in *Microseris douglasii*. **Botanical Gazette**. v.141, p.195–198, 1980.

RAHIMAN, B.A.; NAIR, M.K. Cytology of *Piper* species from Western Ghats. *Journal Plantation Crop*, v.14, p.52-56, 1986.

SAMARTINI, C. Q.; RESENDE, L. V.; TECHIO, V. H.; BRAZ, G. T.; SILVA, L. F. L. e; RESENDE, K. F. M. de. Chromosome number and nuclear DNA content of species of the

genus *Amaranthus* (Amaranthaceae). **Pesquisa agropecuária braileira**. [online], v.51, n.8, p.998-1001, 2016.

SAMUEL, M.R.A.; BAVAPPA, K.V.A. Chromosome numbers in the genus *Piper*. **Current Science**. v.20, p.197-198, 1981.

SAMUEL, R. Chromosome numbers in *Piper*. **Kew Bulletin**, London, v. 42, n.2, p.465-470, 1986.

SAMUEL, R.; MORAWETZ, W. Chromosome evolution within Piperaceae. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v.166, n.1/2, p.105-117, 1989.

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

SHARMA, A.K.; BHATTACHARYYA, N.K. Chromosome studies on two genera of the family piperaceae. **Genética**. V.29, p.256-289, 1959.

VANAJA, T.; NEEMA, V. P.; MAMMOOTTY, K. P.; RAJESHKUMAR, R. Development of a promising interspecific hybrid in black pepper (*Piper nigrum* L.) for *Phytophthora* foot rot resistance. **Euphytica**, v. 161, p. 437–445, 2008.

WU, G.A.; PROCHNIK, S.; JENKINS, J.; SALSE, J.; HELLSTEN, U.; MURAT, F.; PERRIER, X.; RUIZ, M.; SCALABRIN, M.; TEROL, J.; TAKITA, M.A.; LABADIE, K.; POULAIN, J.; COULOUX, A.; JABBARI, K.; CATTONARO, F.; FABBRO, C.D.; PINOSIO, S.; ZUCCOLO, S.; CHAPMAN, J.; GRIMWOOD, J.; TADEO, F.R.; ESTORNELL, L.H.; MUÑOZ-SANZ, J.V.; IBANEZ, V.; HERRERO-ORTEGA, A.; ALEZA, P.; PÉREZ-PÉREZ, J.; RAMÓN, D.; BRUNEL, D.; LURO, F.; CHEN, C.; FARMERIE, W.G.; DESANY, B.; KODIRA, C.; MOHIUDDIN, M.; HARKINS, T.; FREDRIKSON, K.; BURNS, P.; LOMSADZE, A.; BORODOVSKY, M.; REFORGIATO, G.; FREITAS-ASTÚA, J.; QUETIER, F.; NAVARRO, L.; ROOSE, M.; WINCKER, P.; SCHMUTZ, J.; MORGANTE, M.; MACHADO, M.A.; TALON, M.; JAILLON, O.; OLLITRAULT, P.; GMITTER, F.; ROKHSAR, D. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nature biotechnology**. v. 32, n.7, p. 656-663, 2014.

ZONNEVELD, B. J.M.; DUNCAN, G.D. Genome size of *Eucomis* L'He'r. (Hyacinthaceae) and a description of the new species *Eucomis grimsshawii*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 284, n. 1/2, 99-109, Jan. 2010.

WAARD, P.W.F. de; ZEVEN, A.C. **Pepper, *Piper nigrum* L.** In: FERRWERDA, F.P.; WIT, F. Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Wageningen, p.409-426,1969.

Tabela 1. Conteúdo de DNA, em pictogramas (pg), nível de ploidia e número de cromossomos de espécies do gênero *Piper* por citometria de fluxo e contagem cromossômica.

Espécie	Tamanho do genoma (2C) (Mb)	Conteúdo de DNA (2C) (pg)*	Nível de Ploidia	Número de Cromossomos (2n)
<i>C. clementina</i> (haploide)	310,00	0,32	x	-
<i>C. sinensis</i>	607,68	0,62	2x	-
<i>P. tuberculatum</i>	892,71	0,91 d	-	-
<i>P. attenuatum</i>	1034,90	1,06 cd	-	-
<i>P. hispidum</i>	1423,86	1,46 c	-	-
<i>P. nigrum</i> (Kottanadan)	1214,06	1,24 c	4x	52
<i>P. nigrum</i> (Bragantina)	1232,07	1,26 c	4x	52
<i>P. nigrum</i> (Kuthiravally)	1254,12	1,29 c	4x	52
<i>P. nigrum</i> (Iaçará)	1271,62	1,30 c	4x	52
<i>P. nigrum</i> (Apra)	1279,24	1,31 c	4x	52
<i>P. nigrum</i> (Cingapura)	1285,56	1,31 c	4x	52
<i>P. colubrinum</i>	1480,77	1,51 c	2x	26
<i>P. arboreum</i>	2186,21	2,24 b	4x	48
<i>P. alatipetiolatum</i>	2442,55	2,50 b	-	38
<i>P. divaricatum</i>	3212,85	3,29 a	6x	54

*Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

- As células com hífen representam a ausência de dados para composição da tabela.

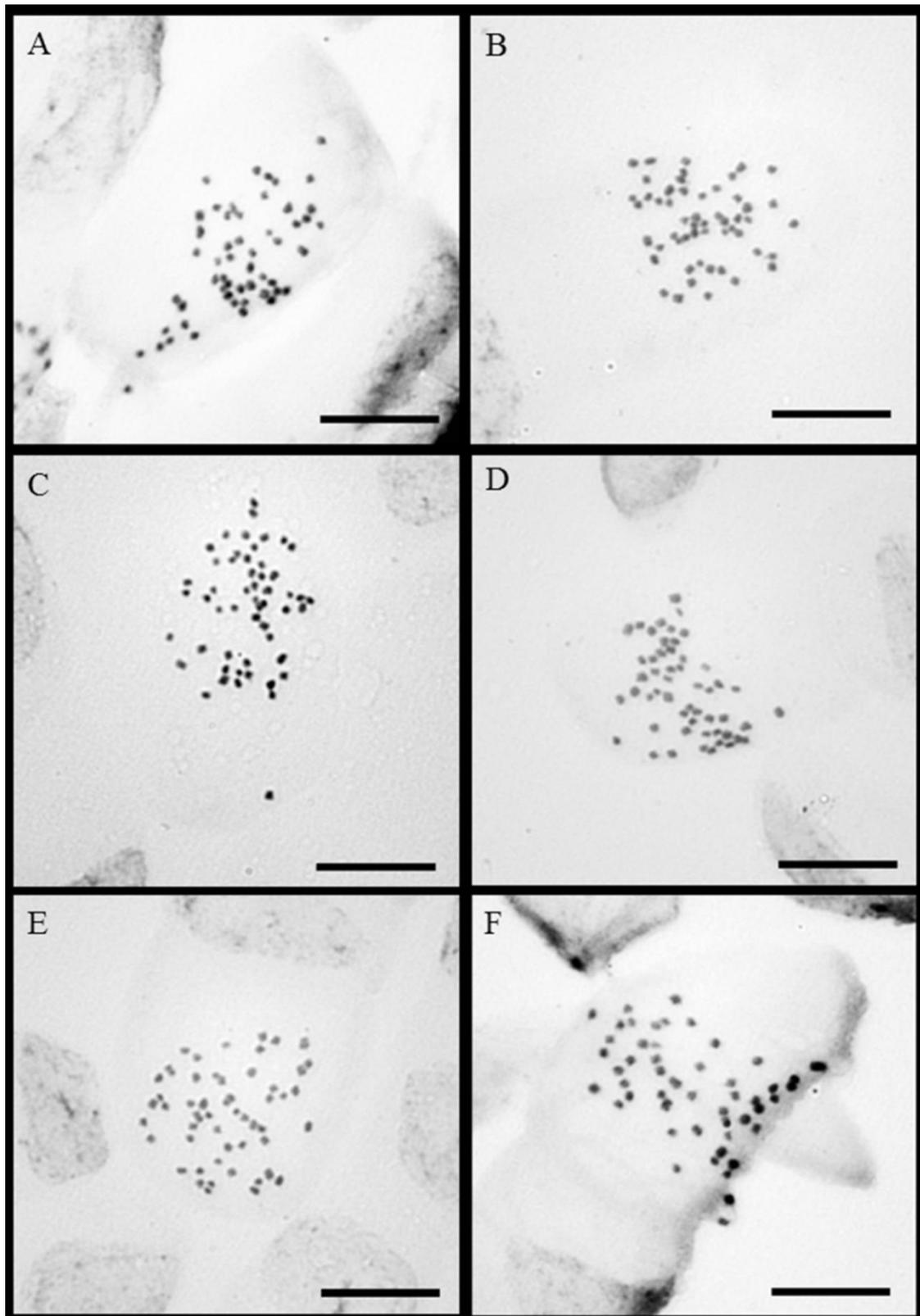


Figura 1. Metáfases mitóticas de cultivares de *P. nigrum* L. ($2n = 4x = 52$). A - Kottanadan. B - Cingapura; C - Iaçará; D - Kuthiravally; E - Bragantina; F - Apra. Barra = 10 μm .

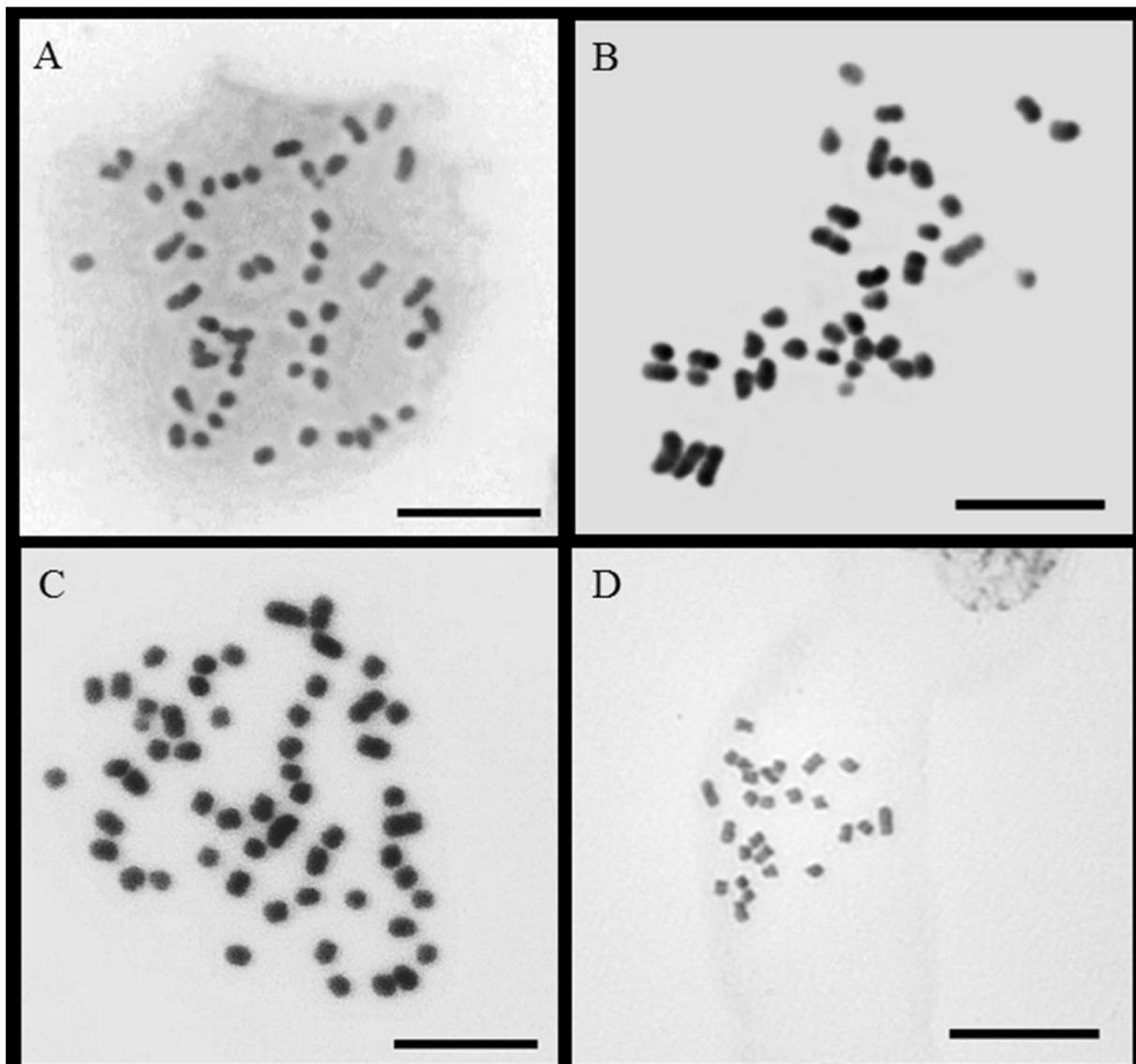


Figura 2. Metáfases mitóticas de espécies de *Piper* nativas da Amazônia. A – *P. arboreum* ($2n=4x=48$); B – *P. alatipetiolatum* ($2n = 38$); C – *P. divaricatum* ($2n=6x=54$). C e D – *P. colubrinum* ($2n=2x=26$). Barra = 10 μm .

ARTIGO 2

**ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO PARA HIBRIDAÇÃO IN SITU
FLUORESCENTE (FISH) PARA ESPÉCIES DO GÊNERO *Piper***

ADAPTAÇÃO DE PROTOCOLO PARA HIBRIDAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH) DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Piper*

RESUMO

O estabelecimento de um protocolo de hibridação molecular in situ fluorescente (FISH) é essencial para a ampliação dos estudos citogenéticos de espécies do gênero *Piper*, pois esta tem sido a técnica mais eficiente no estudo dos cromossomos e permite construir mapas físicos, analisar a estrutura cromossômica, identificar aberrações estruturais pequenas e numéricas. O objetivo deste trabalho foi adaptar protocolo de hibridação in situ fluorescente (FISH) para espécies do gênero *Piper* a fim de analisar a variabilidade no número, tamanho e posição dos sítios de rDNA 45S e 5S. Utilizou-se espécies do gênero *Piper*, nativas da Amazônia, *P. alatipetiolatum*, *P. arboreum*, *P. colubrinum*, *P. divaricatum*, *P. hispidum*, *P. tuberculatum*, *P. attenuatum* e cultivares de *P. nigrum* L. Cromossomos metafásicos foram obtidos após o pré-tratamento das pontas de raízes dos genótipos com 8-hidroxiquinolina a 300 ppm por 4h e fixados em solução de Carnoy e conservadas a -4 °C. Para a FISH, adaptações como a ausência da etapa de permeabilização da membrana e retirada do uso de formamida, foram realizadas a partir do protocolo habitualmente utilizado no Laboratório de Citogenômica e Epigenética da Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, para FISH o qual se baseia em Schwarzacher; Heslop-Harrison (2000). A partir de ajustes no protocolo para FISH, é possível localizar sítios de rDNA 45S e 5S em espécies do gênero *Piper*.

Palavras-chave: Citogenética molecular. *Piper* nativa da Amazônia. *P. nigrum* L. Sítios 45S e 5S.

**PROTOCOL ADAPTATION FOR FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION
(FISH) OF SPECIES OF THE *Piper* GENUS**

ABSTRACT

Establishing a fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is essential for widening the cytogenetic studies of species of the *Piper* genus, since this has been the most efficient technique for chromosome studying and it allows constructing physical maps, analyzing chromosome structure and identification of small and numeric structural aberrations. The aim of this work was to adapt a fluorescent *in situ* hybridization (FISH) protocol for species of the *Piper* genus, in order to analyze the variability in the number, size and position of 45S and 5S rDNA sites. Amazonian native species *P. alatipetiolatum*, *P. arboreum*, *P. colubrinum*, *P. divaricatum*, *P. hispidum*, *P. tuberculatum*, *P. attenuatum* were used as well as *P. nigrum* L. cultivars. Metaphasic chromosomes were obtained after the pretreatment of root tips from the genotypes with 8-hydroxyquinoline at 300 ppm for 4h, fixation in Carnoy solution and conservation at -4°C. For the FISH, adaptations such as absence of membrane permeabilization step and the removal of the formamide use were made from the usual protocol from the Cytogenomics and Epigenetics Laboratory of Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, for the FISH which is based in Schwarzacher; Heslop-Harrison (2000). From adjustments in the FISH protocol, it is possible to localize 45S and 5S rDNA sites in species of the *Piper* genus.

Keywords: Molecular cytogenetics. Amazonian native *Piper*. *Piper nigrum* L. 45S and 5S sites.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Piper* é um importante membro da família Piperaceae e tem uma ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais e abrange em torno de 2000 espécies (JARAMILLO; MANOS, 2001; QUIJANO-ABRIL et al., 2006) dentre as quais destacam-se as nativas da Amazônia por apresentarem importância socioeconômica. A boa representatividade comercial de algumas espécies de *Piper* nativa da Amazônia está associada à produção de óleos essenciais utilizados pela indústria farmacêutica, na produção de perfumes e cosméticos, pelo potencial para a indústria de química fina, na fabricação de inseticidas e na utilização como fungicida no controle de doenças em plantas (MAIA; ANDRADE, 2009).

Outro destaque deste gênero no cenário econômico é a espécie indiana *P. nigrum* L., também usada na indústria farmacêutica e produtora da pimenta-do-reino que é utilizada principalmente como condimento alimentar, sendo esta especiaria a mais difundida no mundo por tratar-se de um produto tipicamente de exportação. De acordo com dados do IBGE (2017), em 2015 o Pará apresentou a maior área colhida (22.105 ha) dentre os Estados brasileiros produtores de pimenta-do-reino, o que permite ocupar o primeiro lugar nacional em produção e o quarto lugar no *ranking* mundial.

No entanto, a expansão da pipericultura no Pará pode ser um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento dos problemas fitossanitários nas áreas de cultivo, como o aparecimento da doença fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, afetando diretamente a produtividade da cultura e comprometendo os volumes nas exportações brasileiras. Por estas razões, de acordo com Silva et al., (2011), nos últimos anos a vida útil da lavoura tem sido reduzida de 15 para 6 anos. Para Lemos et al., (2011), a vulnerabilidade genética das cultivares de pimenteira-do-reino à doença e a rápida disseminação do patógeno têm contribuído para o agravamento do quadro produtivo da cultura.

Espécies silvestres do gênero *Piper*, nativas da Amazônia, têm apresentado resistência/tolerância 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/tolerância a essa doença (ALBUQUERQUE et al., 1999 POLTRONIERI et. al., 1999), portanto precisam ser caracterizadas.

Além da caracterização morfoagronômica das espécies, a citogenética de um germoplasma pode ser prioritária para o manejo, organização, classificação e utilização dos recursos genéticos, pois disponibiliza informações biológicas de cada espécie (VALLS, 2007). Sendo assim, estudos citogenéticos permitem a obtenção de marcadores cromossômicos que além de serem úteis para os estudos comparativos das espécies, baseados nas diferenças cariotípicas, podem ser utilizados em programas de cruzamentos, com vistas ao melhoramento genético, pois possibilitam à identificação e monitoramento, ao longo das gerações, da presença de cromossomos, segmentos cromossômicos ou sequências de genes que eventualmente tenham sido introduzidos em espécies ou híbridos (ARTERO et al., 2006).

As pesquisas em citogenética, como parte do programa de melhoramento genético de pimenteira-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental, tem entre seus objetivos a caracterização citogenética de acessos do seu Banco de Germoplasma de espécies do gênero *Piper*, a fim de obter marcadores cromossômicos específicos mapeados por hibridação molecular in situ fluorescente (FISH) de sequências de DNA ribossomais, como os sítios de 45S e 5S, para construção de mapas cromossômicos. A determinação dos alinhamentos das sequências de diferentes espécies, permitem inferir sobre a possibilidade de pareamentos meióticos corretos em híbridos, e posteriormente o comportamento dos cromossomos nesses híbridos.

A técnica mais eficiente no estudo dos cromossomos é a de FISH, que consiste em desnaturar o DNA cromossomal e hibridizá-lo com fragmentos de DNA ou RNA marcados com moléculas fluorescentes, possibilitando a visualização direta de uma sequência de DNA no cromossomo. Esta ferramenta tem permitido construir mapas físicos, analisar a estrutura cromossômica, identificar aberrações estruturais pequenas e numéricas (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 1993; LEITCH et al., 1994). A utilização de FISH com as sequências de genes ribossomais, rRNA de 18S+5,8S+25S (rDNA 45S) ou 5S (rDNA 5S) é mais comum e frequentemente aplicada na caracterização de cariótipos, sendo um marcador primário bastante informativo.

Segundo Moscone et al., (1999), a variação no número de sítios de rDNA de 45S e 5S entre espécies de plantas do mesmo gênero tem levado a hipótese que grupos rDNA são móveis, por meio de diferentes mecanismos. A análise comparativa entre cultivares de uma dada espécie utilizando a hibridação in situ revelou polimorfismos intraespecíficos no número e no tamanho do sinal de hibridação.

As regiões transcritas do rDNA 45S, ou o *repeat* do rDNA 45S, possui cerca de 10 Kb, podendo carregar de centenas a milhares de cópias gênicas. Estas regiões são altamente conservadas entre os organismos, enquanto os espaçadores intergênicos são altamente polimórficos, podendo variar amplamente mesmo entre espécies muito próximas (HESLOP-HARRISON, 2000). A transcrição dos genes ribossomais de 45S tem por finalidade a formação das subunidades ribossomais menores (40S) e maiores (60S), que quando associados à complexos protéicos e o rRNA 5S, transcrito no nucleoplasma, formam os ribossomos.

Por ocuparem posições bastante conservadas nos cromossomos, os *loci* de rDNA se tornaram importantes marcadores citológicos no estudo da evolução cariotípica (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007; MORALES; AGUIAR-PERECIN; MONDIN, 2011). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi adaptar protocolo de Hibridação in situ Fluorescente (FISH) para espécies do gênero *Piper* a fim de analisar a variabilidade no número, tamanho e posição dos sítios de rDNA 45S e 5S.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo teve por base o protocolo habitualmente utilizado no Laboratório de Citogenômica e Epigenética da Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo o qual se baseia no livro de Schwarzscher; Heslop-Harrison (2000).

2.1 Material vegetal

As espécies de *Piper* nativa, do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, possuem registro de depósito no Herbário Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi. As espécies de *Piper* nativa utilizadas neste estudo foram: *P. alatipetiolatum* Yuncker. (MG 155653), *P. arboreum* Aubl. var. *arboreum*. (MG 150695), *P. colubrinum* (Link ex Kunth) Link ex C. DC. (MG 165237), *P. divaricatum* G. Mey. (MG 165391), *P. hispidum* Sw. (MG 150675) e *P. tuberculatum* Jacq. var. *tuberculatum* (MG 165157). Cultivares de *P. nigrum* L. (Apra, Bragantina, Cingapura, Kottanadan, Kuthiravally, Iaçará, e Guajarina) também foram objeto deste estudo.

As cultivares de *P. nigrum* L. foram cultivadas in vitro no Laboratório de Recursos genéticos e Biotecnologia de Plantas e as espécies silvestres de *Piper* foram cultivadas em

casa de vegetação, nas dependências deste laboratório, localizado na Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, onde foram realizados os pré-tratamentos das raízes.

2.2 Pré-tratamento das raízes e preparo das lâminas

As pontas de raízes foram coletadas com tamanho aproximado de 2 cm e pré-tratadas em solução de 8-hidroxiquinolina a 300 ppm durante 4 horas de acordo com Cuco et al., (2003) para inibição do fuso mitótico, permitindo o acúmulo de células em pro-metáfase e metáfase. Após o pré-tratamento, o material foi fixado em solução de Carnoy (3 partes de etanol : 1 parte de ácido acético) e conservadas em freezer a -4 °C.

As lâminas destinadas à FISH foram preparadas no Laboratório de Citogenômica e Epigenética da Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, de acordo com os procedimentos convencionais da metodologia de esmagamento celular (SCHWARZACHER; HESLOP-HARRISON, 2000). As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e a lâmina foi seca ao ar para posterior armazenamento a -20 °C até o momento de uso.

2.3 Hibridação molecular in situ fluorescente (FISH)

2.3.1 Sondas de DNA

Utilizou-se como sondas para os sítios ribossomais a sequência de rDNA 45S (genes de rRNA 18S+5.8S+26S) de 9,1 Kb de milho (CUCO et al., 2005; MONDIN et al., 2007), clonadas em plasmídeo, por tratar-se de uma sequência extremamente conservada evolutivamente tornando-a muito similar em todos os eucariotas (GUERRA, 2004). Bactérias transformadas com o vetor contendo as sequências foram cultivadas em meio com o antibiótico ampicilina (20 mg/ml). A partir de colônias isoladas dessa cultura foi realizada cultura em meio líquido e extração de DNA plasmidial por meio da solução “TENS” (MINIPREP).

Quanto a obtenção de sondas de rDNA 5S, utilizou-se um fragmento amplificado via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), do rDNA 5S de *Piper colubrinum* (Link ex Kunth) Link ex C. DC., para pareamento nas demais espécies do gênero *Piper* estudadas.

2.3.2 Extração do DNA genômico e amplificação do gene de RNA ribossômico 5S

O material vegetal utilizado foram folhas tenras da espécie *P. colubrinum*, coletadas e acondicionadas em gelo para extração de DNA genômico, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do kit “Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen)”. O DNA extraído foi amplificado via PCR sendo o produto utilizado como sonda para o mapeamento de rDNA 5S nos cromossomos por meio de FISH. Os *primers* utilizados para amplificação da sequência de rDNA 5S para os experimentos de FISH seguem as especificações abaixo:

rDNA 1(*forward*) 5' GTG CGA TCA TAC CAG CRY TAA TGC ACC GG 3'

rDNA 2(*reverse*) 5' GAG GTG CAA CAC GAG GAC TTC CCA GGA GG 3'

Na reação de PCR foram utilizados 10 ng/μl de DNA genômico de *P. colubrinum*, 200 μM de dNTPs, 300 nM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U de Taq polimerase (0,5 μl). A reação de PCR seguiu os seguintes passos: incubação a 93°C por 5 min. seguida por 30 ciclos de 94 °C por 50 seg., 57 °C por 50 seg. e 72 °C por 1 min. A reação foi finalizada após 10 min. a 72 °C e mantida a 4 °C. O produto da reação obtido foi purificado utilizando-se o kit “QIAquick PCR Purification (Qiagen)”, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Para a confirmação e quantificação dos fragmentos amplificados, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e quantificados por meio do marcador molecular λ íntegro (50 ng/μl; 100 ng/μl e 200 ng/μl) sendo tamanho das bandas conferidos por meio do marcador molecular λ DNA/*Hind* in fragments.

2.3.3 Marcação e hibridação in situ fluorescente das sondas de rDNA 45S e 5S

As sondas de rDNA 45S e 5S foram obtidas por meio da marcação de suas sequências de DNA com biotina via *nick translation* (BioNick™ DNA Labeling System - Life Technologies®) e com digoxigenina via *random primers* (Dig DNA Labeling and Detection Kit - Roche®), conforme recomendações dos respectivos kits.

A FISH seguiu os protocolos descritos por Mondin et al., (2007). As preparações cromossômicas previamente preparadas e conservadas em freezer a -20 °C passaram por uma fase de permeabilização da membrana para melhor penetração de sondas e anticorpos.

A permeabilização ocorreu através da incubação das lâminas em 1x PBST (0,1% Triton X100) por 40 minutos em câmara úmida a 37 °C, seguida de lavagens em 1x PBS e água por 5 minutos. Em seguida as preparações foram desidratadas em série alcoólica (70%, 96% e 100%) por 5 minutos em cada concentração. As lâminas foram então submetidas às lavagens de pré-hibridação com RNase (5µg/µl) e pepsina (5µg/µl) para remoção do RNA e do excesso de proteínas do material, respectivamente. Em seguida, fixadas em paraformaldeído a 4% e desidratadas em série alcóolica (70%, 96% e 100%).

A mistura para a hibridação foi composta por 50% de formamida, 2x SSC, 10% dextran sulfato, 0,1% SDS, 1 mg/ml de “*herring sperm DNA*”, 6 ng/µl e 16 ng/µl de rDNA 45S e 5S, respectivamente. Esta mistura foi desnaturada a 95-98°C por 10 minutos e imediatamente imersa em gelo. Posteriormente, foram adicionados 25 µl da mistura de hibridação sobre cada lâmina. Estas foram seladas e em seguida colocadas em termociclador (PTC-100, MJ) onde foram aquecidas a 92 °C por 10 min. e a 37 °C por 20 h, para que ocorresse a hibridação. Após a etapa de hibridação, as preparações passaram por lavagens pós-hibridação, sendo uma vez em 2x SSC a 42 °C por 5 min., duas lavagens em formamida a 20% e 0,5x SSC a 42 °C (74% de estringência) por 5 min. e uma vez em 0,5x SSC 42 °C por 5 min.

A sonda de rDNA 45S, marcada com biotina, foi detectada com o anticorpo secundário “mouse anti-biotina” (Dako®) seguido dos anticorpos secundários “rabbit anti-mouse” – TRITC (Dako®) e “swine anti-rabbit” – TRITC (Dako®), enquanto a sonda 5S marcada com digoxigenina foi detectada com “sheep anti-dig” – FITC (Roche®). A concentração de todos os anticorpos secundários utilizados foi de 1:100. As preparações foram contracoradas com 2 µl/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) e montadas com 8 µl de Vectashield H-1000.

2.3.4 Adaptação para marcação e hibridação in situ fluorescente das sondas de rDNA 45S e 5S

Posteriormente alterou-se o protocolo original em duas de suas etapas para marcação e hibridação in situ fluorescente das sondas de rDNA 45S e 5S. Retirou-se o uso de permeabilização da membrana, bem como a utilização de formamida a 20% no processo de lavagem pós-hibridação, seguindo o protocolo a partir da aplicação da solução bloqueadora.

2.3.5 Microscopia, análise de imagens e caracterização dos sítios ribossomais 45S e 5S

As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência DM5500 Leica®. As análises e processamento das imagens de metáfases mitóticas, contendo todos os sítios ribossomais condensados, foram selecionadas para caracterização da variabilidade quanto ao número, tamanho e posição dos *loci* de rDNA dos genótipos, através da análise das imagens as quais foram digitalizadas e processadas para montagem das pranchas usando a ferramenta de análise do Adobe Photoshop CS5 Extended.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Sondas de rDNA 45S

A Figura 1 demonstra a quantificação do DNA plasmidial extraído. Foram estabelecidas as seguintes quantificações para as amostras 4, 5, 6, 7, 8 e 9: 300, 300, 180, 300, 180 50 e 250 ng/μl DNA plasmidial, respectivamente. Os marcadores (de 1 a 3) utilizados para esta quantificação, não retrataram o peso molecular em pares de base (bp) do DNA extraído.

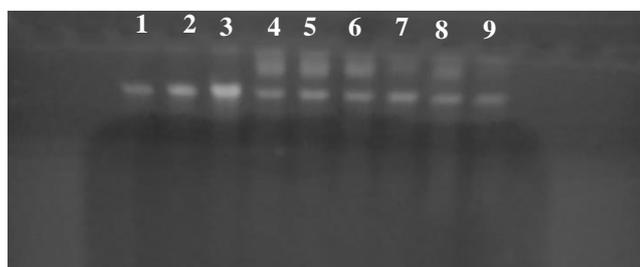


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA plasmidial. De 1-3 marcadores moleculares para quantificação do DNA genômico. 1- λ íntegro 50 ng/μl; 2 - λ íntegro 100 ng/μl e 3 - λ íntegro 200 ng/μl. As bandas de 4 a 9 representam o DNA plasmidial extraído para obtenção da sonda de rDNA 45S.

Posteriormente, o resultado desta e de novas extrações de DNA plasmidial para o preparo da sonda de rDNA 45S revelaram bandas que não apresentaram o ideal esperado, pois estas possuíam 23,130 bp ou mais (Figura 2A e 2B). De acordo com Guerra (2004) os plasmídeos bacterinos geralmente aceitam insertos de aproximadamente 10 kb de tamanho o qual representa o tamanho necessário para o preparo da sonda.

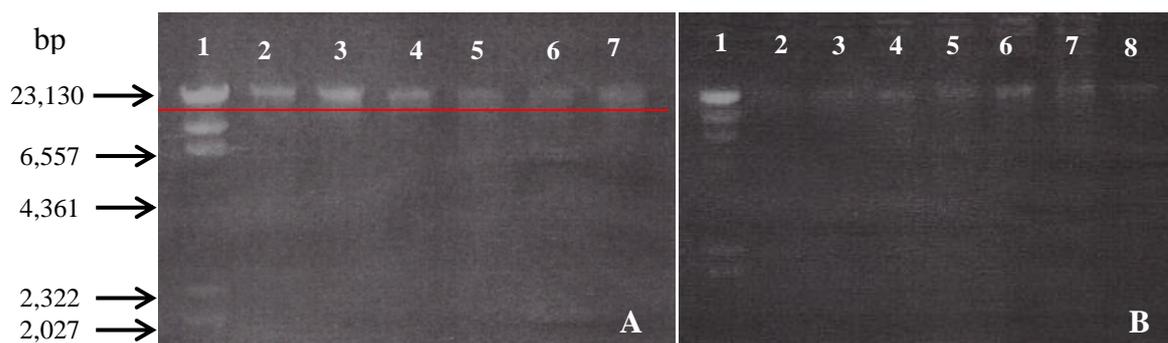


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA plasmidial. A banda 1 é o marcador molecular λ DNA/*Hind* in fragments. As demais bandas em A e B comprovam o tamanho de aproximadamente 23,130 bp. A linha vermelha representa o posicionamento ideal onde as bandas deveriam estar localizadas com aproximadamente 10 kb.

A Figura 3 representa o padrão de banda ideal de DNA plasmidial extraído para ser utilizado no preparo da sonda de rDNA 45S. Porém, este se apresentou em quantidade reduzida de DNA plasmidial sendo insuficiente para o preparo da sonda.

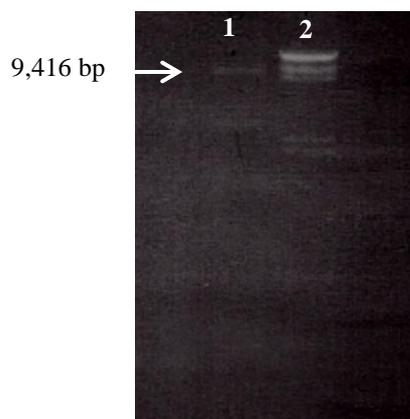


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do fragmento de DNA plasmidial. A banda na coluna 1 representa o tamanho do inserto (9,416 bp). A coluna 2 representa o marcador λ DNA/*Hind* in fragments.

3.2 Extração do DNA genômico e amplificação do gene de RNA ribossômico 5S

A extração do DNA genômico de *P. colubrinum* foi satisfatória sendo possível quantificar e visualizar a integridade do DNA. A quantificação do DNA foi estabelecida para as amostras 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 como 100, 120, 200, 180, 180, 50 e 250 ng/ μ l de DNA genômico, respectivamente (Figura 4).

A técnica de PCR proporciona a amplificação de fragmentos de DNA cuja sequência de nucleotídeos é conhecida, como é o caso do rDNA 5S ou 18S (GUERRA, 2004), mas também desconhecida, por exemplo, o marcador RAPD (*Random Amplified*

Polymorphic DNA). No entanto, se a sequência a ser hibridizada for longa ela deve ser quebrada a fim de se obter fragmentos menores, em torno de 400-500 pb. Em contrapartida, sequências muito pequenas, como os oligonucleotídeos, tem baixa estabilidade ocasionando maiores chances de hibridizar com sequências não-alvo casualmente complementares (*hibridização cruzada*) (LICHTER; CREMER, 1992).

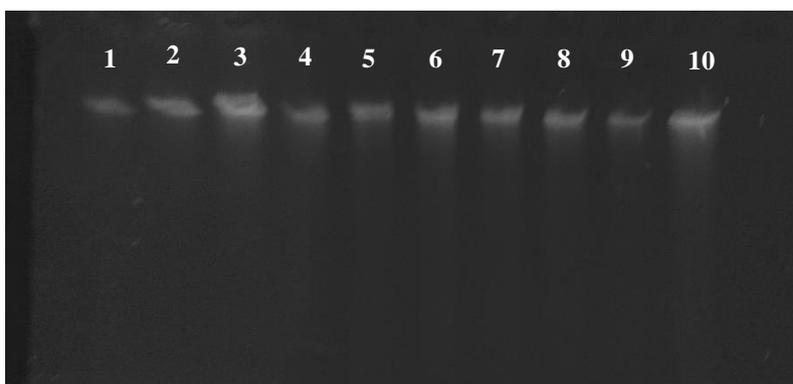


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA genômico de sete amostras de *P. colubrinum* (4 a 10) concentrado. As bandas de 1 a 3 são marcadores para quantificação do DNA genômico. 1- λ íntegro 50 ng/ μ l; 2 - λ íntegro 100 ng/ μ l e 3 - λ íntegro 200 ng/ μ l. As bandas de 4 a 10 são referentes às amostras de DNA de *P. colubrinum*.

O resultado da eletroforese em gel de agarose, apresentado na Figura 5 (amostras 3, 4, 5, 6, 7 e 8) evidenciou que não houve fragmentação nas sequências de rDNA 5S para *P. colubrinum*, pois o tamanho das bandas em todas as amostras citadas foram de aproximadamente 250 bp, sendo o tamanho de 450 pb o ideal para o fragmento de rDNA 5S. Portanto, provavelmente não houve desnaturação e hibridização em solução contendo um excesso de cópias do DNA repetitivo disperso. Em contrapartida, as amostras 9 e 10, utilizadas como controle, resultado da PCR usando DNA de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), apresentaram-se fragmentadas com bandas de tamanho aproximado a 500 pb, sendo estes ideais para utilização em experimentos de FISH com cana-de-açúcar. O resultados obtidos com as amostras controle demonstram a funcionalidade dos *primers* para o rDNA 5S.



Figura 5. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) do DNA genômico de *P. colubrinum* de seis amostras (3 a 8) amplificadas via PCR. As bandas 9 e 10 são referentes a amostras de cana-de-açúcar. Bandas 1 e 2 são marcadores para quantificação e verificação do tamanho do rDNA 5S amplificado. Coluna 1 – marcador *Low DNA Mass Ladder*. Coluna 2 – marcador 100 bp *DNA Ladder*.

3.3 Marcação e hibridação in situ fluorescente das sondas de rDNA 45S e 5S

Embora os resultados das sondas de rDNA 45S e 5S tenham apresentado sondas não satisfatórias para serem utilizadas em experimentos de FISH, as marcações das sondas realizadas com biotina via *nick translation* e com digoxigenina via *random primers*, respectivamente, apresentaram-se satisfatórias para serem usadas em FISH (Figura 6).



Figura 6. Marcação das sondas rDNA 45S com biotina (A) e 5S com digoxigenina (B). Os números de 1 a 6 representam amostras das sondas de rDNA 45S e 5S marcadas.

A partir dos resultados das marcações, as sondas marcadas utilizadas nos ensaios de FISH não foram detectadas nos sítios de rDNA 45S e 5S nas células em metáfase mitótica ao serem observadas através de microscópio de epifluorescência, visto a ineficácia das sondas obtidas.

3.4 Adaptação do protocolo para marcação e hibridação *in situ* fluorescente das sondas de rDNA 45S e 5S

As adaptações realizadas no protocolo padrão utilizado para diferentes espécies como: *Passiflora* L. (CUCO et al., 2005), *Crotalaria juncea* (L) (MONDIN et al., 2007; MORALES et al., 2011) e *Smilax rufescens* (PIZZAIA et al., 2013), foram realizadas devido a ausência de marcações cromossômicas, sítios de 45S e 5S, para espécies do gênero *Piper*. Devido as espécies deste gênero serem produtoras de óleo essenciais (MAIA; ADRADE, 2009), supõem-se que a fase de permeabilização da membrana possa ter interferido no processo de FISH, pois a incubação das lâminas em 1x PBST (0,1% Triton X100) por 40 minutos em câmara úmida a 37 °C, seguida de lavagens em 1x PBS e água por 5 minutos podem ter ocasionado o araste das células metafásicas sendo identificada a ausência de células nas lâminas que passaram pelo processo de permeabilização da membrana.

A não utilização da formamida a 20% pós-hibridação, ocorreu para reduzir o nível de estringência e assim facilitar o pareamento da sonda com o DNA-alvo. Após estas alterações no protocolo base de Schwarzacher; Heslop-Harrison (2000), pode-se observar, com auxílio de microscópio de epifluorescência, as primeiras células obtidas no final do processo de FISH. Porém, notou-se que a membrana plasmática das células, que se encontravam intacta no início do processo de hibridação *in situ*, apresentava-se rompida no final de todas as etapas do processo (Figura 7A e B).

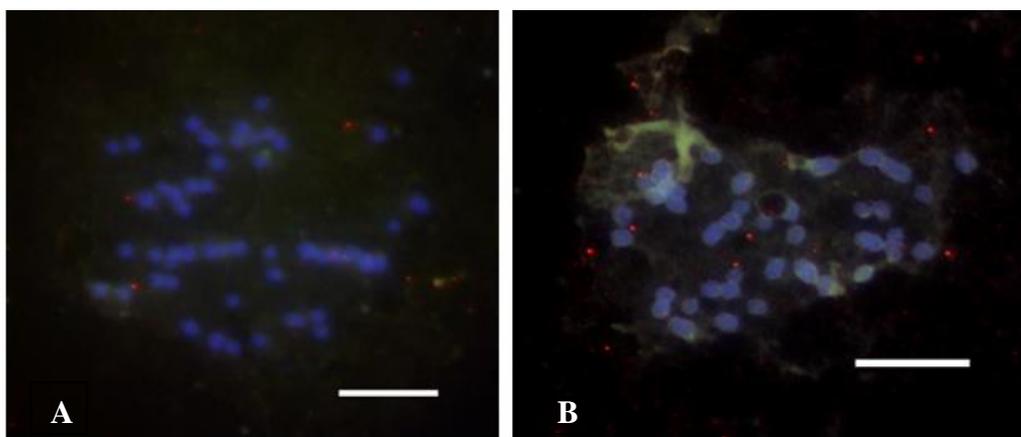


Figura 7. Células em metáfase mitótica com a membrana plasmática rompida após o processo de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Em A – Cultivar de *Piper nigrum* e B – *Piper alatipetiolatum*. Barra = 10 μ m.

Todas as espécies de *Piper* estudadas apresentaram o mesmo comportamento quanto à decomposição da membrana plasmática ou a ausência da célula mitótica nas lâminas. Supõe-se que esta ausência também pode ter decorrido as sucessivas lavagens pós- hibridação com solução de PBST (0,1% Triton X100) e SSC como parte do processo do protocolo de FISH, este fato pode justificar a ausência de estudos de FISH na literatura relacionados a espécies do gênero *Piper*.

Embora todas as espécies estudadas não tenham sido marcas, houve uma única exceção demonstrada na Figura 8. Nesta imagem é possível perceber a presença de sítios de 45S e 5S em um núcleo interfásico da espécie *Piper arboreum* o que demonstra a presença destes sítios no gênero. Contudo, devido à célula não está em metáfase, não é possível determinar em qual cromossomo encontram-se estas marcas.

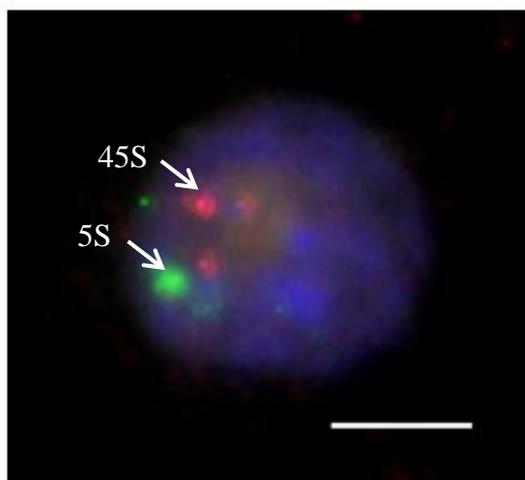


Figura 8. Núcleo interfásico da espécie de *Piper arboreum* com sinais de marcas de hibridação in situ fluorescente (FISH) de 45S e 5S. Barra = 10 μ m.

4 CONCLUSÃO

Apesar da adaptação do protocolo utilizado não ser conclusiva, contribui para confirmar que há presença de sítios de 45S e 5S em espécies do gênero *Piper*. Essas informações são importantes para continuidade da caracterização citogenética de espécies deste gênero e contribuição ao programa de melhoramento genético de pimenteira-do-reino.

REFERÊNCIAS

- 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).
- ARTERO, A.S. **Caracterização citomolecular da espécie *Coffea arabica* L., variedade *typica cramer* e cultivar *Mundo Novo***. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas, 2006.
- CUCO, S.M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 17, n. 3, p. 363–370, dez. 2003.
- CUCO, S. M.; VIEIRA, M.L.C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, Itália, v. 58, n. 3, p. 220-228, 2005.
- GUERRA, M. **FISH: Conceitos aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184p.
- HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T. Molecular cytogenetics: Biology and applications in plant breeding. In: SUMNER, A.T.; CHANDLEY, A.C. **Chromosomes Today**, Londres: Chapman and Hall, v. 11, p. 191–198, 1993.
- HESLOP-HARRISON, J.S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 5, p. 617–636, May 2000.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro v.29 n.5 p.91 nov. 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201205.pdf> . Acesso em: 20 jan 2017.
- JARAMILLO M.A; MANOS P.S. Phylogeny and patterns of diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 88, n 4, p. 706-716, abr. 2001.
- LECHTER, P.; CREMER, T. Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization. In: ROONEY, D. E.; CZEPULKOWSKY, B.H. (Eds). Human cytogenetics – a practical approach, v.1 constitutional analysis. Oxford: IRL Press, 1992. p. 157-192.
- LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. **In situ hybridization: a practical guide**. BIOS Scientific, Londres, 1994.

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

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v.32, n.3, p.595-622, 2009.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 1, p. 65–72, June 2007.

MORALES, A.G.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MONDIN, M. Karyotype characterization reveals an up and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (Leguminosae-apilionoideae) species of the section Hedriocarpae subsection Macrostachyae. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Secaucus, v. 59, n. 2, p. 277–288, Mar. 2011.

MOSCONE, E.A.; KLEIN, F.; LAMBROU, M.; FUCHS, I.; SCHWEIZER, D. Quantitative kariotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species(Leguminosae). **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 6, p. 1224-1233, 1999.

PIZZAIA, D.; OLIVEIRA, V.M.; MARTINS, A.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FORNI-MARTINS, E.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype characterization reveals active 45S rDNA sites located on chromosome termini in *Smilax rufescens* (Smilacaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.12, p.1303-1310, 2013.

POLTRONIERI, M.C.; LEMOS, O.F. de; ALBUQUERQUE, F.C. **Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.).** In: **Programa de melhoramento genético e adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, documentos, v. 16, p. 127-137, 1999.

QUIJANO-ABRIL, M.A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D.R. Areas of endemism and distribution patterns for neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography**, p.1266-1278, 2006.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. **Practical *in situ* hybridization.** Oxford: Bios Scientific, 203 p. 2000.

SILVA, B.S.O. e; DRUMOND NETO, A.P.; SILVA, M.B. da. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, Viçosa, v.1, n.1, p.84-88, julho. 2011.

VALLS, J.F.M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p.281-305.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos contribuíram para o conhecimento do germoplasma e da diversidade genética/cromossômica existente em espécies de *Piper*, nativas da Amazônia e cultivares de *Piper nigrum* L. Essas informações são importantes para a conservação e para o programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino.

Propõe-se a continuidade de estudos para o estabelecimento de um protocolo de utilização da técnica de FISH para o gênero *Piper* para o avanço das pesquisas relacionadas a este gênero.