



## **Avaliação da diversidade genética de acessos de pimenta cumari por meio de marcadores moleculares RAPD**

Júlie Pinto Quintão<sup>(1,2)</sup>, Gustavo Augusto Lacorte<sup>(1)</sup>, Rafael Vieira Júnior<sup>(1)</sup>, Luciano Donizette Gonçalves<sup>(1)</sup>, Raphael Stenberg<sup>(1)</sup>, Nathan Felipe Morais<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG) – Campus Bambuí

<sup>(2)</sup> Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) – FAPEMIG / IFMG

### **RESUMO**

O cultivo de pimentas vem aumentando nos últimos anos sendo uma importante alternativa para o sistema de agricultura familiar. As pimentas podem ser utilizadas como condimento, o que confere sabor aos alimentos, na indústria farmacêutica ou mesmo como planta ornamental. Entretanto, existe ainda pouco interesse das companhias de sementes em produzir linhagens comerciais de pimenta, sobretudo de uma variedade de comercialização relevante no estado de Minas Gerais que é a pimenta cumari. Diante deste cenário comercial desfavorável aos produtores, o IFMG Campus Bambuí iniciou nos últimos anos um programa de melhoramento genético de pimentas cumari o que culminou com a criação de um banco de germoplasma de pimentas para a manutenção dos acessos desenvolvidos. Um dos primeiros passos para se fundar um banco de germoplasma é quantificar a variabilidade genética disponível nos acessos da espécie em questão, para se estimar o potencial e as limitações da cultura, realizada através da caracterização morfoagronômica, ou mesmo por meio do uso de marcadores moleculares. Neste contexto, estão sendo realizadas extrações de DNA dos acessos coletados seguindo o protocolo de extração, para posteriormente estimar a diversidade genética presente dentro dos três acessos coletados, com o uso de marcadores moleculares RAPD, que codificam o genoma dos indivíduos com a finalidade de propiciar a criação de um perfil genético que evidencie a identidade genética de cada acesso preservado no banco de germoplasma estimando assim, a divergência genética entre os acessos como forma de guiar o manejo deste banco de germoplasma,

**Palavras-chave:** Banco Germoplasma. Marcadores moleculares. Pimenta cumari.



## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de pimentas é bastante expressivo, mesmo abrangendo uma área relativamente pequena e sendo conduzido pelo sistema de Agricultura familiar, sendo cultivados anualmente aproximadamente 2.000 ha em todo território nacional. Os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul, a rentabilidade desta atividade é estimada em torno de 80 milhões de reais ao ano, o que tem impulsionado maior produção desta hortaliça. (REIFSCHNEIDER & RIBEIRO, 2003).

Dentro desse contexto, está inserida a Pimenta cumari que é bastante apreciada, mas não encontra-se disponível no mercado de forma ampla devido às dificuldades encontradas pelo produtor durante o cultivo e em função das companhias de sementes responsáveis pelos programas nacionais de melhoramento de pimentas terem pouco interesse em comercializar sementes de pimenta (FERRAZ, 2012).

Dessa forma, os agricultores mantêm a produção por via de sementes salvas pelos mesmos ou compartilhadas entre si, meio considerado inadequado uma vez que as sementes apresentam qualidade variável, gerando índices variáveis de germinação e risco das mesmas estarem contaminadas com doenças. Diante deste cenário, o IFMG Campus Bambuí iniciou nos últimos anos um programa de melhoramento genético de pimenta cumari e formação de um banco de germoplasma para retenção das características a serem utilizadas nos cruzamentos.

A diversidade genética de um banco de germoplasma pode ser estimada de forma complementar por meio da caracterização molecular. As avaliações morfológicas das coleções baseiam-se em quantificar a variação dos atributos externos, os fenótipos, e aqueles que são codificados pela diversidade de genes existentes que determinaram tais características, os genótipos. As avaliações moleculares representam a quantificação da variabilidade direta dos alelos constituintes dos locos gênicos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis apresentam uma ampla capacidade de amostragem do genoma, sendo de grande potencial para a avaliação da diversidade genética (GUIMARÃES et al., 2009).

Neste contexto, o presente estudo ainda em andamento se propôs a coletar acessos e diferenciá-los através da utilização de marcadores moleculares, estimando sua diversidade genética, para compor o banco de germoplasma de pimenta cumari do IFMG Campus Bambuí bem como estimar a divergência genética entre os mesmos como forma de guiar seu manejo.

## 2 METODOLOGIA

O experimento foi implantado e conduzido em casa de vegetação do setor de Olericultura do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Minas Gerais Campus Bambuí utilizando-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, em que foram semeados três acessos de pimentas cumari coletados nos municípios de Bambuí e Candeias, sendo estes denominados de BA2, BS4 e CR8. e foram transferidas para tubetes (Figura 1), sendo 30 repetições.

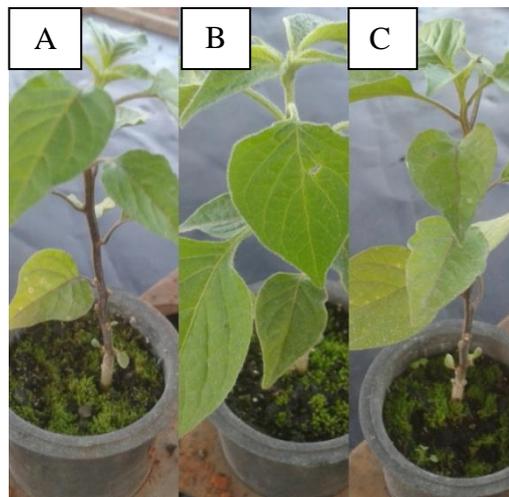


Figura 1 – Acessos de pimenta cumari em desenvolvimento (A) Indivíduo acesso BS4 (B) Indivíduo acesso CR8 (C) Indivíduo acesso BA2.

Fonte: Autoria própria.

No estágio no qual as mudas encontravam-se com número mínimo de 6 folhas novas emitidas, iniciou-se a extração do DNA do tecido vegetal dos três acessos, que está sendo realizada no Laboratório de Biologia Molecular do IFMG Campus Bambuí, seguindo adaptações do protocolo Doyle & Doyle (1987).

Inicialmente, foram coletadas amostras de tecido fresco, das folhas novas, de indivíduos com peso de aproximadamente 200 mg. Para cada amostra foram utilizados quatro conjuntos idênticos de tubos Eppendorf de 1,5 mL devidamente identificados, contendo em seu interior 4 beads. Logo após a pesagem do tecido vegetal, estes foram inseridos nos tubos sendo pipetados 700  $\mu$ L de tampão de extração contendo a solução de 2 $\mu$ L de 2-mercaptoetanol para cada mL de tampão de extração (CTAB 2%) e macerados no equipamento Mini Beadbeater-96 pelo tempo estimado de 2 minutos, na velocidade 5, em seguida os tubos foram agitados no vórtex para homogeneização.



Foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de Proteinase K (10 mg/mL) e incubados em banho-maria a uma temperatura de 65 °C durante uma hora. Os tubos foram agitados a cada 10 minutos para manter a solução homogeneizada, e após retirá-los foram deixados para serem ambientados à temperatura ambiente.

A extração foi realizada com a adição de 600  $\mu\text{L}$  de CIA (clorofórmio – álcoolisoamílico 24:1), sendo os tubos, lacrados com parafilme e agitados no vórtex e centrifugados em microcentrífuga na velocidade máxima de 14000 r.p.m no período de aproximadamente 5 minutos, e retirados de forma cuidadosa, evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas. A fase superior foi transferida para um novo tubo. No tubo contendo a fase aquosa foi acrescentado usando a pipeta de Pasteur uma gota de solução 10% CTAB, 1,4 M NaCl que foi agitada e misturada no vórtex durante 3 minutos até homogeneizar a solução.

Logo após estes procedimentos a extração foi repetida adicionando-se novamente 600  $\mu\text{L}$  de CIA, seguido de agitação no vórtex, até fazer uma emulsão homogênea, e submeter à centrifugação. A fase aquosa superior formada foi transferida, cuidadosamente, para um novo tubo de 1,5 mL. Nesta solução foram acrescentados 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado (-20 °C), sendo misturados para precipitar os ácidos nucleicos, os tubos foram levados ao freezer (-20 °C) pelo tempo de 2 horas e ao serem retirados foram centrifugados a 7500 rpm em microcentrífuga durante 5 minutos, para formar um pellet.

O procedimento seguinte compreendeu a lavagem com NaCl 1M, adicionando-se 500  $\mu\text{L}$  ao pellet, que foi dissolvido por pipetagem e aquecido em banho maria a 65 °C durante 15 minutos. Os tubos foram incubados a 4 °C por 30 minutos a 1 hora, e logo após, centrifugados a 15000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante formado foi transferido para outro tubo, o DNA foi lavado com a adição da solução aquosa de isopropanol gelado (-20 °C), sendo misturado calmamente para este precipitar os ácidos nucleicos, em seguida os tubos foram levados ao freezer (-20 °C) por 2 horas e centrifugados a 7500 rpm em microcentrífuga durante 5 minutos, para formar novamente um pellet. O sobrenadante foi derramado restando o pellet.

O pellet foi lavado em 1 mL de etanol 70%, deixando-o imerso pelo tempo estimado de 10 minutos e logo após centrifugado. A secagem foi realizada em estufa aquecida a 60°C, que após estar na coloração transparente foi acrescido 50  $\mu\text{L}$  de TE e levado ao banho maria por 65°C durante 30 minutos e posteriormente os tubos foram armazenados na temperatura de -20°C.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento encontra-se em andamento devido a impasses que ocorreram na germinação das sementes de pimenta cumari, que passaram pelo programa de melhoramento genético, tendo-se, portanto que serem coletados novos acessos não sendo possível ainda, obter resultados concretos, foram realizadas extrações do DNA de amostras de tecido de diferentes indivíduos dos acessos coletados.

### 4 CONCLUSÃO

De acordo com o andamento do presente estudo, não foi possível até o momento estimar a variabilidade existente entre os acessos de pimenta cumari, utilizando-se os marcadores moleculares RAPD caracterizados para esta determinada espécie, e, por conseguinte, selecionar progênies que possivelmente apresentarem características divergentes para comporem o Banco de Germoplasma da instituição.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG pela concessão de bolsa para condução do projeto.

### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOYLE, J. J. AND DOYLE J. L. (1987). **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus 12: 13-15.
- GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. D.; LANZA, M. A., & SCHUSTER, I. (2009). Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 30(253), 86-95.
- FERRAZ, R. M. **Caracterização preliminar morfológica e agrônômica de pimentas cumari (*Capsicum baccatum* L. var. *praetermissum* e *Capsicum baccatum* L. var. *baccatum*)**. 2012. 62 folhas. Monografia de Graduação – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2012.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3<sup>a</sup> ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998.
- REISCHNEIDER, F. J. B. & RIBEIRO, S. C. **Sistema de produção de Pimentas (*Capsicum* spp.)** – Introdução e importância econômica. Embrapa, 2003.