

# DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE DOZE GENÓTIPOS DE ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus* L, Merrill.) ESTIMADA POR ANÁLISE DE MARCADORES RAPD<sup>1</sup>

CÍCERO DONIZETE PEREIRA<sup>2</sup> & WARWICK ESTEVAM KERR<sup>3</sup>

**RESUMO** - Por meio de estudos moleculares, este trabalho determinou a distância genética entre 12 genótipos de *A. comosus* por marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), utilizando 11 “primers” decâmeros da OPERON Technologies Inc. Dos 12 genótipos, 1 foi proveniente da Jamaica, 2 do Estado do Acre (Quinari e RBR-1), 2 do Estado do Maranhão (Turiaçu e São Domingos), 3 do Estado do Piauí (Cefas, Floriano-1 e Floriano-2), 2 do Estado da Bahia (Monte Alegre-1 e Monte Alegre-2) e 2 de Minas Gerais (Pérola e Smooth Cayenne). Pela análise de “cluster”, utilizando o método de UPGMA, foi constatada uma grande divergência entre os genótipos de *A. comosus* estudados com a separação destes em dois grupos a uma distância genética de 31,1%.

**Termos para indexação:** Biologia molecular, Caracterização molecular.

## GENETIC DIVERGENCE AMONG TWELVE GENOTYPES OF PINEAPPLE (*Ananas comosus* L, Merrill.) ESTIMATED BY RAPD MARKERS

**ABSTRACT**- Through molecular studies, the genetic distance among 12 genotypes of *A. comosus* for RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) was determined using 11 primers (decamers) of the OPERON Technologies Inc. From the 12 genotypes, 1 came from Jamaica, 2 from the State of Acre (Quinari and RBR-1), 2 from the State of Maranhão (Turiaçu and São Domingos), 3 the State of Piauí (Cefas, Floriano-1 and Floriano-2), 2 from the State of Bahia (Monte Alegre-1 and Monte Alegre-2) and 2 from Minas Gerais (Pérola and Smooth Cayenne). By the analysis of cluster, using the method of UPGMA, a great divergence was verified among the genotypes of *A. comosus* studied or tima separation in two groups of a genetic distance of 31,1%.

**Index terms:** Molecular biology, Molecular chacterization.

### INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma expressiva participação na produção mundial de abacaxi, estando entre os três primeiros produtores. A cultura ocupa aproximadamente 50000 ha, destacando-se o Estado de Minas Gerais, primeiro produtor, seguido pelos Estados do Pará, Paraíba, Bahia, São Paulo e Espírito Santo (Agrianual, 2000). Em Minas Gerais, o Triângulo Mineiro é responsável por 92% da produção do Estado (Couto, 1982).

O comércio mundial de abacaxi *in natura* atingiu 700 mil toneladas, e o comércio de abacaxi transformado em suco ou conserva é equivalente a 4 milhões de toneladas de frutas frescas (Agrianual, 2000).

Na bibliografia, estudos moleculares sobre o abacaxizeiro, ganhou um valioso espaço nos últimos anos. A bromelina, uma protease sulfídrica presente nesta espécie, é, talvez, o enfoque científico mais estudado. Isto se dá pela importância desta proteína na farmacologia, onde foi registrada sua interferência no crescimento de células malignas, inibição de coágulos, atividade fibrinolítica e ação antiinflamatória (Taussig & Batkin, 1998). Estudos com marcadores moleculares ligados a doenças, pragas ou mesmo estudos de divergência genética ainda são pouco encontrados na literatura sobre abacaxi.

A técnica de RAPD, uma das derivações da PCR, trouxe uma melhoria acentuada à técnica por utilizar iniciadores (*primers*) curtos e de seqüências arbitrárias como um método de geração de marcadores moleculares polimórficos, não exigindo assim o conhecimento prévio de seqüências do DNA a ser estudado (Welsh & McClelland, 1990). Esta técnica abre uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e populações (Chalmers *et al.*, 1992; Howell *et al.*, 1994; Ferreira & Grattapaglia, 1998;)

Vários trabalhos mostraram que a técnica RAPD foi eficiente na caracterização, identificação, estudos de filogenia, análise genômica, identificação de marcadores moleculares ligados a genes de interesse e estudos de composição genômica (Stiles *et al.*, 1993; Young & Kelly 1996; Fang *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997).

Ruas *et al.* (1995) citaram a importância das estimativas da relação e da diversidade genética de cultivares de abacaxizeiro para avaliação de recursos genéticos. Estes autores encontraram uma relação genética bastante similar entre quatro cultivares de abacaxizeiro (Pérola, Smooth Cayenne, Primavera e Perolera) e compatibilidade dos resultados obtidos por meio de marcadores moleculares RAPD e análises das características morfológicas e

<sup>1</sup> Trabalho nº 178/2000. Recebido: 14/08/2000. Aceito para publicação: 03/05/2001. (Trabalho 178/2000).

<sup>2</sup> Universidade Federal de Uberlândia – Instituto de Genética e Bioquímica – Laboratório de Genética – Campus Umuarama, Bloco 2E – CEP 38400-902 – Uberlândia, MG – cdpereira@ufu.br

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, INPA – Av. André Araújo 2936 – Petrópolis – Caixa Postal 478 – CEP 69083-000 – Manaus/AM – warwick@inpa.gov.br

agronômicas, mostrando que a análise por RAPD pode ser usada de maneira eficiente para caracterização de recursos genéticos no gênero *Ananas*.

Duval *et al.* (1999), por meio da utilização de enzimas de restrição, estudaram o parentesco filogenético de uma coleção de 96 acessos de *Ananas* utilizando DNA cloroplástico. Os resultados mostraram variações entre o gênero *Ananas* e *Pseudananas* em regiões de cpDNA, sem, no entanto, sugerir uma nova divisão dentro do gênero estudado.

Este trabalho teve como objetivo determinar a distância genética entre doze cultivares de abacaxi por meio da técnica de RAPD.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, no período de janeiro/1997 a fevereiro/1999.

Os abacaxizeiros utilizados neste experimento foram coletados no Brasil (Acre, Maranhão, Piauí, Bahia, Minas Gerais) e Jamaica (Tabela 1). Os abacaxizeiros provenientes do Acre foram coletados no banco de germoplasma da EMBRAPA/AC; os do Maranhão, Bahia e Minas Gerais foram coletados em lavouras comerciais de suas respectivas regiões e os do Piauí foram coletados numa pequena coleção do CEFAS (Centro Educacional São Francisco de Assis). Todos os abacaxizeiros obtidos foram plantados na área experimental da Universidade Federal de Uberlândia.

**TABELA 1-** Genótipos de abacaxizeiros (*Ananas comosus* L. Merrill) e seus respectivos locais de coleta de 1993 a 1997. Uberlândia (MG), 1999.

Local de Coleta	Cultivar (es)
Jamaica	Jamaicano*
Acre	Quinari, RBR-1
Maranhão	Turiaçu*, São Domingos*
Piauí	Cefas*, Floriano-1*, Floriano-2*
Bahia	Monte Alegre-1, Monte Alegre-2*
Minas Gerais	Pérola, Smooth Cayenne (Havaiano)

\* Nome da cultivar arbitrário de acordo com o local de coleta

Também foram coletadas duas outras espécies do mesmo gênero (*A. ananassoides* e *A. nanus*) para serem avaliadas juntamente com os abacaxizeiros (*A. comosus*).

Para extração de DNA, foi coletada uma folha jovem (a mais interna e clorofilada da roseta) de cada indivíduo. Destas folhas, após serem bem lavadas com detergente e água, foram utilizados 300 mg cortados em pequenos pedaços, para se extrair o DNA.

O protocolo utilizado para extração foi o proposto por Ferreira & Gratapaglia *et al.* (1998), com algumas modificações. Inicialmente, 300 mg de folha fresca foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e transferidas para um tubo de 2 ml. Sobre cada extrato, foi adicionado 1,5 ml de tampão de extração (Polivinilpirrolidone a 2%; NaCl 1,4M; Tris HCl pH 8,0 100mM; EDTA 20 mM; CTAB a 2%; β-Mercaptoetanol a 0,2%) e incubado em banho-maria a 65°C por uma hora com posterior centrifugação a 11300g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo e adicionado 4μl de

RNAase (10 ng/μl), incubando o extrato vegetal por 30 minutos a 37°C. Em seguida, completou-se o volume do tubo com Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1) e centrifugou-se por 10 minutos a 11300g. O sobrenadante foi coletado procedendo-se mais uma vez a extração com Clorofórmio:Álcool Isoamílico. O DNA foi precipitado adicionando-se ao sobrenadante 2/3 do volume de Isopropanol absoluto PA e 1/10 do volume de Acetado de Sódio 3M. Após permanecer durante a noite a 4°C, os tubos foram centrifugados a 11300g por 15 minutos e o DNA ("pellet") lavado com etanol a 70%. Depois, o DNA foi seco em estufa a 37°C e ressuspenso em 100 μl de Tris-EDTA (TE) – DNA estoque.

De 119 primers testados, 11 foram selecionados para estudos de divergência genética por serem mais informativos (Tabela 2). Todos os *primers* utilizados foram fabricados pela OPERON Technologies Inc. sendo todos oligonucleotídeos com 10 bases e de seqüências arbitrárias.

**TABELA 2-** *Primers* arbitrários utilizados e suas respectivas seqüências de nucleotídeos. Uberlândia (MG), 1999.

<i>P r i m e r</i>	<i>S e q ü ê n c i a ( 5 ' → 3 ' )</i>
O P M - 0 5	G G G A A C G T G T
O P Y - 1 3	G G G T C T C G G T
O P G - 0 9	C T G A C G T C A C
O P V - 0 6	A C G C C C A G G T
O P G - 1 9	G T C A G G G G C A
O P T - 1 3	A G G A C T G C C A
O P G - 1 0	A G G G C C G T C T
O P V - 0 4	C C C C T C A C G A
O P C - 1 1	A A A G C T G C G G
O P C - 0 7	C T C C C G A C G A
O P G - 1 2	C A G C T C A C G A

O volume total de cada reação foi de 20 μl. Cada reação continha Tris-HCl 10 mM, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, 400 μM de dNTPs (100 μM de dGTP, 100 μM de dCTP, 100 μM de dATP e 100 μM de dTTP), 8 pmoles de *primer*, 1,0 U de Taq DNA Polimerase, 15 ng de DNA genômico (ausente no controle negativo feito para cada bateria de reações) e água ultrapura para completar o volume de 20 μl. Em cada reação, foi adicionada uma gota de óleo mineral para evitar a evaporação. Antes de ir para o termociclador, cada reação foi submetida a um pulso de 1810g.

Para cada bateria de reações, foi feito um controle negativo com todos os compostos da reação exceto o DNA, para confirmar se os produtos amplificados das reações representavam DNA genômico amplificado, contaminações ou artefatos do *primer*.

As reações foram amplificadas em termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100, por 3 ciclos de 94°C/1 min, 35°C/1 min e 72°C/2 min; 34 ciclos de 94°C/10s, 40°C/20s, 72°C/2 min, conforme descrito por Young & Kelly (1996).

Para cada *primer*, foram realizadas no mínimo duas reações para confirmar o padrão de banda obtido, conforme descrito por Oliveira (1998).

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% de 20cm x 24,5cm x 6mm em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). A visualização dos produtos amplificados foi feita em luz

ultravioleta por meio do corante Brometo de Etídio, diluído no gel, numa concentração aproximada de 0,5 µg/ml de gel.

Para a eletroforese, foram adicionados em cada amostra (15 µl) 3 µl de um tampão de carregamento (Azul de bromofenol 3,61M, Xileno Cianol 4,64M, Sacarose 1,17M e EDTA 0,1M pH8,0). A eletroforese foi conduzida a 0,23 V/ml por 2 horas. Os géis foram visualizados em transluminador UV e fotografados em VDS Image System – Pharmacia, usando filtro laranja e com tempo de exposição 2,17 segundos, contraste de 0 a 6, e 0,45 de fator de correção da câmera.

Para análise dos dados, foi montada uma matriz binária de acordo com presença (1) e ausência de (0) bandas reproduzíveis e mais intensas. A matriz gerada pelo programa STATISTICA 4,5A (1993) foi usada para o cálculo das distâncias genéticas e análise de agrupamento. As distâncias genéticas foram calculadas pelo método de Porcentagem de Desacordo, que é dado pela fórmula:  $N'_{AB}/N_T$ , onde  $N'_{AB}$  é o número total de bandas polimórficas entre os genótipos comparados e  $N_T$  é o número total de bandas.

A análise de grupos ou “clusters” foi feita pelo método não ponderado de agrupamento aos pares, utilizando médias aritméticas (UPGMA – “Unweighted pair-group method using arithmetic average”), o qual agrupa indivíduos de acordo com a similaridade. Sendo que os indivíduos mais similares são agrupados inicialmente e assim, sucessivamente, até os indivíduos ou grupos mais distantes.

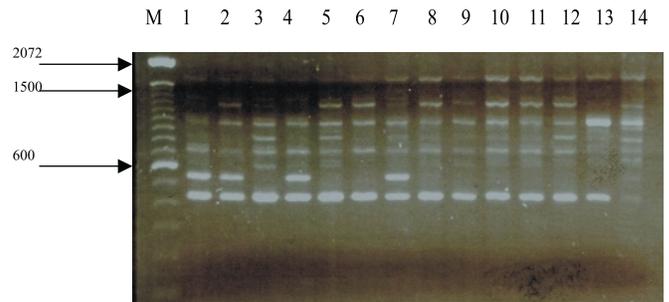
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para aumentar a eficiência na identificação de polimorfismo, os 11 *primers* decâmeros utilizados foram selecionados de 119, de acordo com o maior número de bandas geradas e a melhor definição dos produtos amplificados. Estes 11 *primers* geraram 79 regiões polimórficas em 12 genótipos de abacaxizeiro. Estas bandas apresentaram tamanhos estimados na faixa de 200 a 2700pb.

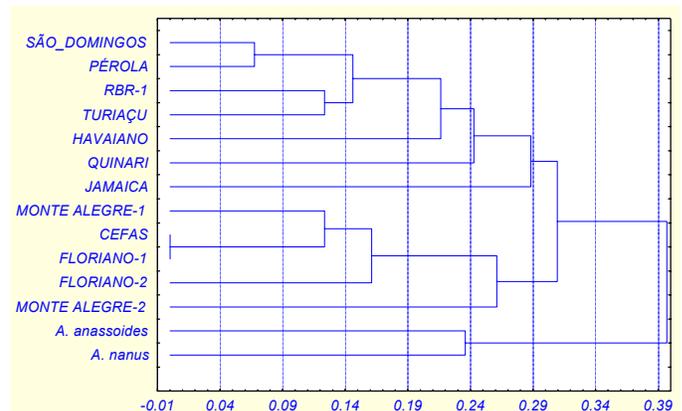
Para cada *primer*, foram realizadas duas ou mais repetições, sendo computadas apenas as bandas que mostraram boa repetibilidade e intensidade. Estes cuidados na montagem da matriz reduzem a possibilidade de eventuais erros na contagem incorreta de produtos fracamente amplificados que não correspondam à verdadeira história evolutiva da espécie (Lowe *et al.*, 1996; Cabral, 1997; Oliveira, 1998).

A Figura 1 exemplifica um bom padrão de amplificação obtido nas repetições para os doze genótipos analisados, como também mostra o tamanho-padrão dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD que é de fragmentos entre 400 e 1500pb (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A Figura 2 mostra a análise de agrupamento baseada na Porcentagem de Desacordo utilizando o método UPGMA. Ao nível de 40% de divergência, as espécies do gênero *Ananas* foram separadas, conforme esperado, sendo *A. anassoides* e *A. nanus* agrupadas, demonstrando entre os dois últimos um grau de semelhança maior do que algumas variedades dentro de *A. comosus*. Ao nível de 31,1% de distância genética, houve a definição de dois grupos para a população de *A. comosus*. O grupo A, com distância genética variando de 6,7% a 28,9%, foi constituído de 7 genótipos, entre os quais o São Domingos,



**FIGURA 1.** Padrão de amplificação de fragmentos de DNA obtido com o *primer* OPG-19 para 12 genótipos de abacaxizeiros, onde (M) DNA Marcador de 100 pb, (1) São Domingos, (2) RBR-1, (3) Jamaica, (4) Pérola, (5) Havaiano, (6) Turiaçu, (7) Quinari, (8) Monte Alegre-1, (9) Monte Alegre-2, (10) CEFAS, (11) Floriano-1, (12) Floriano-2, (13) *A. anassoides*, (14) *A. nanus*. Uberlândia (MG), 1999.



**FIGURA 2-** Dendrograma em porcentagem de desacordo, representando distâncias genéticas entre 12 genótipos de abacaxizeiro gerados por 79 marcadores RAPD, utilizando o método de UPGMA. Uberlândia (MG), 1999.

Pérola, RBR-1, Turiaçu, Smouth Cayenne, Quinari e Jamaica. O grupo B, com a distância genética entre os genótipos variando de 0% a 26,1%, ficou representado por 5 genótipos: Monte Alegre-1, CEFAS, Floriano-1, Floriano-2 e Monte Alegre-2. *Ananas anassoides* e *A. nanus* apresentaram-se como “outgroup”. Estas duas espécies, apesar de as suas características fenotípicas serem bastante similares ao *A. comosus* e de se cruzarem com esta espécie (Kinjo, 1993), apresentaram uma distância genética de 39,7% em relação ao abacaxizeiro comum. Os dados moleculares confirmam a classificação taxonômica dessas espécies. No entanto, estudos com RAPD com maior número de *primers* e estudos da viabilidade dos híbridos entre estas espécies deveriam ser feitos para comprovar ou não a classificação taxonômica atual (Oliveira, 1998; Skelton, 1996).

Os genótipos CEFAS e Floriano-1 são molecularmente idênticos. Isto confirmou a eficiência da técnica RAPD para estudos de distâncias genéticas, já que estes genótipos são derivados de propagação vegetativa de um mesmo abacaxizeiro, sendo assim clones (Ruas *et al.*, 1995).

A proximidade entre os genótipos Pérola e São

Domingos, bastante similares fenotipicamente, e a divergência entre os genótipos Havaiano e Quinari, também bastante similares fenotipicamente, mostraram a não-correlação entre a caracterização fenotípica e a caracterização molecular.

### CONCLUSÕES

- 1 - A uma distância genética de 31,1%, houve a separação dos genótipos de *Ananas comosus* em dois grupos.
- 2 - Não foi encontrada divergência entre CEFAS e Floriano-2 com os 11 *primers* testados, reforçando a hipótese de que estes materiais são originários de um mesmo abacaxizeiro por meio de propagação vegetativa.
- 3 - *Ananas anassoides* e *A. nanus* divergiram de *A. comosus* a 39,7%.
- 4 - A técnica RAPD mostrou-se eficiente para o cálculo da divergência genética.
- 5 - Agrupamento por análise molécula nem sempre coincide com semelhanças fenotípicas.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; ao pesquisador José Renato Santos Cabral – CNPMF/EMBRAPA; aos Engenheiros Agrônomos José Roberto Silva (EMATER – Monte Alegre de Minas) e José Alberto Leitão (EMATER - Frutal).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultório e Comércio, 1999, 521 p.

CABRAL, T. A. T. 1997. **Divergência genética entre genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) estimada por análise de marcadores RAPD**. 1997. 47f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997

CHALMERS, K. J.; WAUGH, R.; SPRENT, J. I.; SIMOM, A. J.; POWELL, W. 1992. Detection of genetic variation between and Within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. **Heredity**, Oxford, v. 69, p. 465-472, 1992.

COUTO, F. A. D. A cultura do abacaxizeiro em Frutal e Monte Alegre de Minas. **Boletim Técnico**, Belo Horizonte; v. 15, p. 1-20, 1982.

DUVAL, M. F.; BUSO, G. S. C.; CABRAL, J. R.; BIANCHETTI, L. de B.; FERREIRA, F. R.; FERREIRA, M.E. Phylogenetic relationships in *Ananas* and other related genera using chloroplast DNA restriction site variation. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, supplement, p. 502, 1999.

FANG, D. Q.; FEDERICI, C. T.; ROOSE, M. L. Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus. **Genome**, Ottawa, v. 40, p. 841-849, 1997.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D.. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. , Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998 , 220p.

HOWELL, E. C; NEWBURY, H. J.; SWENNEM, R. L.; WITHERS, L. A.; FORD-LLOYD, B.V. The use of RAPD for identifying and classifying musa germplasm. **Genome**, Ottawa, v.37, p. 328-332, 1994.

HU, S. Y.; OHM, H. W.; DWEIKAT, I. Identification of RAPD markers linked to the gene PM1 for resistance to powdery mildew in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 832-840, 1997.

KINJO, K. Inheritance of leaf margin spine in pineapple. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 334, p. 59-66, 1993.

LOWE, A. J.; HANOTTE, O.; GUARINO, L. Standardization of molecular genetic technique for the characterization of germplasm collections: The case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). **FAO**, p. 50-54, 1996.

OLIVEIRA, R. C. **Divergência genética por marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Uberlândia, 1998. 50f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1998.

RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; FAIRBANDS, J. D.; ANDERSEN, R. W.; CABRAL, J. R. S. Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 413 – 416, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual 1**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 608p.

SKELTON, P. **Evolution - a biological and palaeontological approach**. Wokingham - England, 1996. 1064 p.

STILES, J. I.; LEMME, C; SONDUR, S.; MORSHIDI, M. B.; MANSCHARDT, R. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 697-701, 1993.

TAUSSIG, S. J.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. **Journal Ethnopharmacology**, Limerick, v. 22, n.2, p. 191-203, 1998.

WELSH, J.; MACCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

YOUNG, R. A.; KELLY, J. D. RAPD markers finding the Are gene for anthracnose resistance in common bean. **Journal of the American Horticulture**, Alexandria, v. 121, n. 1, p. 37-41, 1996.