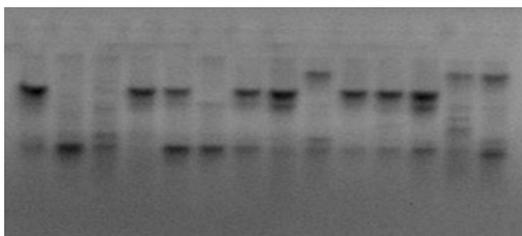
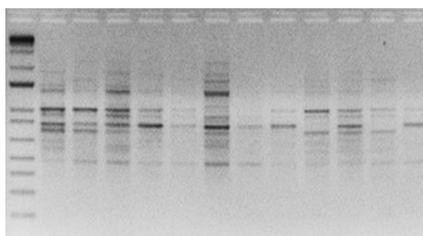


Estabelecimento de *fingerprint* molecular em abacaxi via marcadores ISSR



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
99**

**Estabelecimento de *fingerprint* molecular
em abacaxi via marcadores ISSR**

*Claudia Fortes Ferreira
Amanda Gabrielly Santana Silva
Taís Araújo Santos
Andresa Priscila de Souza Ramos
Saulo Alves Santos de Oliveira
Davi Theodoro Junghans*

**Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2019**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Rua Embrapa - s/n, Caixa Postal 007
44380-000, Cruz das Almas, Ba
Fone: (75) 3312-8048
Fax: (75) 3312-8097
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente
Francisco Ferraz Laranjeira Barbosa

Secretário-Executivo
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Membros
Aldo Vilar Trindade, Ana Lúcia Borges, Eliseth de Souza Viana, Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki, Harllen Sandro Alves Silva, Leandro de Souza Rocha, Marcela Silva Nascimento, Marcio Carvalho Marques Porto

Supervisão editorial
Francisco Ferraz Laranjeira

Revisão de texto
Adriana Villar Tullio Marinho

Normalização bibliográfica
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Anapaula Rosário Lopes

Foto da capa
Davi Theodoro Junghans

1ª edição
On-line (2019)

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Estabelecimento de fingerprint molecular em abacaxi via marcadores
microsatélites não ancorados / Claudia Fortes Ferreira... [et. al.]. – Cruz das
Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2019.

25 p.: il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e
Fruticultura, ISSN 1809-5003; 99).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Abacaxi. 2. Marcador genético. 3. Marcador molecular I. Ferreira, Claudia Fortes. II. Silva, Amanda Gabrielly Santana. 2. III. Santos; Tais Araújo. IV. Ramos, Andresa Priscila de Souza. V. Oliveira, Saulo Alves Santos de. VI Junghans, Davi Theodoro. VII. Título. VIII. Série.

CDD 634.774

© Embrapa, 2019

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	9
Material e Métodos	10
Material genético	10
Extração e quantificação de DNA total.....	12
Amplificação via ISSR.....	13
Análise Molecular.....	14
Dissimilaridade genética	14
<i>Fingerprint</i> molecular e MIPs (<i>Molecular Identification Profiles</i>).....	14
Resultados e Discussão	15
Dissimilaridade Genética	15
<i>Fingerprint</i> molecular	17
Conclusões.....	24
Referências	24

Estabelecimento de *fingerprint* molecular em abacaxi via marcadores ISSR

Claudia Fortes Ferreira^{1*}

Amanda Gabrielly Santana Silva^{2*}

Taís Araújo Santos²

Andresa Priscila de Souza Ramos¹

Saulo Alves Santos de Oliveira¹

Davi Theodoro Junghans¹

Resumo – A fruticultura é um segmento do agronegócio brasileiro que movimentava bilhões de dólares por ano e se torna cada vez mais um pilar consolidado na geração de empregos e economia do País. A cadeia produtiva do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr.) possui grande representatividade nesse setor, com amplo mercado interno e excelentes perspectivas no mercado externo. A adoção de cultivares melhoradas de abacaxi, pelos produtores atende demandas dos consumidores e contribui para a rentabilidade da cultura. Entretanto, devido às características de propagação vegetativa e ao comércio informal de materiais propagativos, o rastreamento da adoção e disseminação de uma cultivar é bastante complexo, levando-se em consideração a caracterização apenas por aspectos morfológicos. Diante disso, ferramentas de biologia molecular como o *fingerprint* se torna uma excelente opção para resguardar os direitos dos melhoristas em casos de contestação de idoneidade, ou mesmo para facilitar a mensuração da adoção de uma cultivar melhorada nas diferentes regiões produtoras do país. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a dissimilaridade genética e elaborar o *fingerprint* molecular de cultivares tradicionais e híbridas selecionadas de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura por meio de marcadores microssatélites não ancorados, também conhecidos por ISSRs (*Inter-Simple Sequence Repeat*). Um total de 68 *primers* ISSR foi testado, dos

¹ Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. E-mails: claudia.ferreira@embrapa.br, andresa.ramos@embrapa.br, saulo.oliveira@embrapa.br, davi.junghans@embrapa.br.

² Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia. E-mails: manda.gaby@hotmail.com, tai.19@hotmail.com.

*Autores contribuíram igualmente.

quais 20 eram monomórficos, 24 não amplificaram e outros 24, polimórficos, usados na avaliação. Na análise da dissimilaridade entre os genótipos, a distância genética variou de 0,15 a 0,38, com formação de nove grupos. Os fragmentos obtidos pelos 24 primers polimórficos foram capazes de gerar MIPs (*Molecular Identification Profiles*) para todos os genótipos analisados. Este trabalho revelou que os marcadores ISSR podem ser utilizados para gerar *fingerprints* moleculares para uso no melhoramento de abacaxi, seja para estimativa dos parentais mais contrastantes, quanto para a análise de perfil molecular de cultivares adotadas pelos produtores.

Termos para indexação: abacaxizeiro; marcadores de DNA; identidade genética

Establishment of molecular *fingerprint* in pineapple using microsatellite ISSR

Fruticulture is a segment of the Brazilian agribusiness that generates billions of dollars per year, becoming increasingly a consolidated pillar in the generation of jobs and economy of the Country. Pineapple (*Ananas comosus* L.) has great representation in this sector because it complies with the perspectives of the internal and external markets. The adoption of improved pineapple varieties by producers meets the demands of consumers as well as guarantees the rentability of the crop. However, due to clonal propagation characteristics and informal commercialization of propagation material, tracking of adoption and dissemination of a certain variety is very complex taking into consideration the characterization only by morphological aspects. Molecular biology tools such as *fingerprint* is an excellent option to protect breeders or even to facilitate measuring the adoption of an improved variety in different producing regions in the country. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the genetic dissimilarity and elaborate the molecular fingerprint of traditional cultivars and selected pineapple hybrids from Embrapa Mandioca e Fruticultura using non-anchored microsatellites, also known as ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) markers. A total of 68 ISSR primers were tested, of which 20 were monomorphic, 24 did not amplify and 24 were polymorphic and used in the analysis. For the dissimilarity analysis between the genotypes the genetic distance varied from 0.15 to 0.38 with nine groups formed. The fragments obtained by the 24 polymorphic primers were able to generate MIPs (*Molecular Identification Profiles*) for all the genotype analyzed. This study revealed that the ISSR markers can be used to generate molecular *fingerprints* for use in genetic breeding of pineapples for estimation of most contrasting progenitors as well as for the analysis of the molecular profile of varieties adopted by producers.

Indexation terms: Pineapple; DNA markers; Genetic identity

Introdução

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus* - Coppens & Leal) é uma planta perene, monocotiledônea, herbácea tropical, pertencente à família Bromeliaceae, cultivada em mais de 70 países de clima tropical e subtropical. O Brasil é parte do grande centro de origem da espécie de abacaxi e da grande diversidade genética encontrada nas coleções de germoplasma de abacaxizeiro (Ferreira; Cabral 1993).

Nos plantios comerciais em nosso país, existem poucas cultivares, com destaque às cultivares Pérola e Smooth Cayenne, ambas suscetíveis à fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* e que pode causar grandes prejuízos à cultura do abacaxi, pois ataca os frutos e o material propagativo. Diante disso, a Embrapa iniciou um programa de melhoramento genético do abacaxizeiro na década de 1980 com o objetivo de desenvolver cultivares com resistência genética à fusariose e com características de fruto iguais ou superiores às cultivares tradicionais. Este programa tem permitido o lançamento das cultivares BRS Imperial, BRS Vitória e BRS Ajubá. Novos híbridos vêm sendo desenvolvidos, e sua performance econômica está sendo avaliada nos principais polos de produção de abacaxi no Brasil, com vistas à sua recomendação como novas cultivares.

Os marcadores moleculares são ferramentas que podem auxiliar o melhoramento genético de plantas e vários trabalhos têm sido publicados com o uso da técnica de ISSR no estudo de diversidade e *fingerprint* molecular (White et al., 2018; Wang et al., 2017; Torre et al., 2006; Costa et al., 2015; ALVES et al. 2011; Zhu et al. 2011; Gao et. al., 2006; Vargas; Kardereit, 2001).

As comparações de *fingerprint* moleculares de espécies, híbridos ou variedades em estudos de recursos genéticos de plantas têm como finalidade principal formar um perfil eletroforético, que pode ser utilizado para assegurar os direitos dos melhoristas em caso de contestação de idoneidade, principalmente em culturas que se propagam vegetativamente (Laurentin, 2009; Torre et al., 2006). Da mesma forma, a verificação da identidade das plantas pode favorecer estudos de adoção e distribuição geográfica de cultivares lançadas pelos programas de melhoramento.

Os marcadores de DNA são importantes em estudos de caracterização pois não são afetados pelo ambiente, podem ser coletados de qualquer tecido

da planta, são altamente polimórficos e possibilitam uma ampla amostragem do genoma das plantas, enquanto os marcadores morfológicos são pouco representativos e, em sua maioria, afetados pelo ambiente (Wunsch; Hormaza, 2002).

Os marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*), ou microssatélites não ancorados, possuem as vantagens de serem mais reprodutíveis, não necessitarem do sequenciamento de DNA e serem altamente polimórficos, quando comparados a outros marcadores moleculares amplamente utilizados, como o RAPD, o AFLP e o SSR (Borner; Branchard, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a dissimilaridade genética entre cultivares tradicionais e híbridos elite de abacaxizeiro gerados na Embrapa Mandioca e Fruticultura, bem como desenvolver perfis moleculares para obtenção do *fingerprint* por meio de análises *in silico*.

Material e Métodos

Material genético

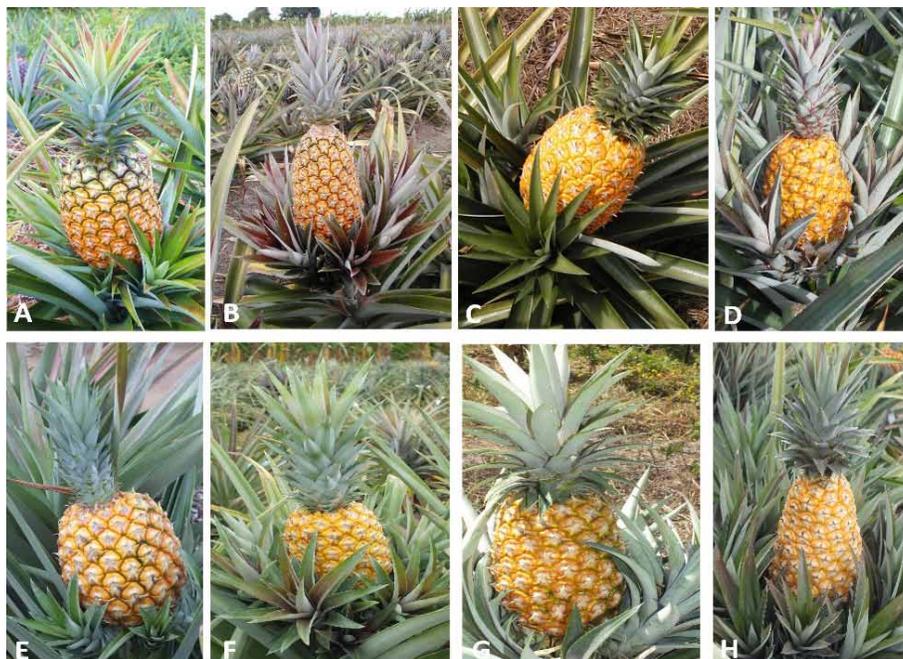
Foram utilizados 14 cultivares e híbridos de abacaxi (Tabela 1).

Tabela 1. Cultivares tradicionais e híbridos elite de abacaxizeiro utilizados para o estudo de *fingerprint* molecular e ordem de aparecimento nos géis de eletroforese.

Números	Genótipos*
1	PE x SC-73
2	PA x PE-01
3	344 x SC-08
4	344 x SC-10
5	344 x PE4-04
6	344 x Gold-61
7	344 x Gold-66
8	344 x (PE x SC-73)-15
9	Perolera
10	Smooth Cayenne
11	Gold
12	344
13	PE4
14	Pérola

*Nomenclatura dos híbridos feita em função dos parentais utilizados no cruzamento.

As cultivares Gold, Pérola, Perolera e Smooth Cayenne estão entre as mais consumidas no Brasil e no mundo, além de serem utilizadas no programa de melhoramento genético do abacaxi da Embrapa. A variedade FRF-632 (BAG 344) tem sido utilizada mais recentemente neste programa, pela sua resistência à fusariose, pelo formato do fruto e pela cor da casca. Os híbridos elite, todos resistentes à fusariose, foram selecionados no programa de melhoramento em função das excelentes características de planta e fruto, e se encontram em fase de avaliação nas principais regiões produtoras de abacaxi do Brasil. Alguns dos genótipos citados estão ilustrados na Figura 1.



Fotos: Davi Theodoro Junghans

Figura 1. Algumas cultivares e híbridos elite de abacaxi analisados no estudo de dissimilaridade genética e *fingerprint* molecular. 'Smooth Cayenne' (A); 'Pérola' (B); 'Gold' (C); FRF 632 (BAG 344) (D); PE x SC-73 (E); 344 x (PE x SC-73) -15 (F); 344 x 'Gold'-61 (G); 344 x 'Gold'-66 (H).

Todos os genótipos analisados foram cultivados na área experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Após a coleta das folhas, as amostras foram armazenadas em ultra-freezer, a uma temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido da extração de DNA total.

Extração e quantificação de DNA total

Para extração do DNA, utilizou-se apenas a parte aclorofilada da folha jovem do abacaxi (Figura 2).

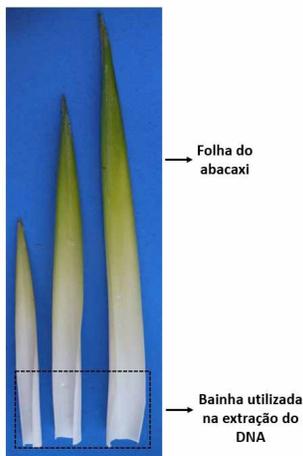


Figura 2. Representação da folha do abacaxi, com detalhe da parte utilizada na extração de DNA total.

A extração de DNA seguiu o protocolo de Doyle; Doyle (1990) com modificações, como, por exemplo, o uso de furadeira de bancada para substituir o N_2 líquido, na concentração da solução tamponante e na fase de purificação dos ácidos nucleicos. Após a extração, realizaram-se a quantificação e a verificação da qualidade do DNA em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ($1,5 \mu\text{L} \cdot 100\text{ml}^{-1}$) em 80 V por 1h (Figura 3). Para determinar a quantidade do DNA obtido, foram utilizados marcadores de DNA lambda de peso molecular conhecido (50 e 100 ng) e a concentração de DNA foi ajustada para $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, como a concentração de trabalho.

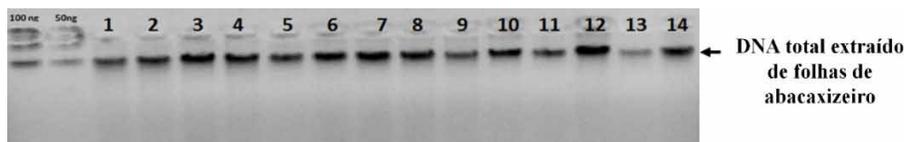


Figura 3. Quantificação do material genético extraído de folhas jovens de 14 acessos de abacaxizeiro. 100 ng e 50 ng – DNA padrão de peso molecular conhecido. As amostras de 1-14 se referem às cultivares e aos híbridos elite apresentados na Tabela 1.

Amplificação via ISSR

Foram utilizados 68 *primers* ISSR na amplificação do DNA de abacaxizeiro. Desses, 20 foram monomórficos e 24 não amplificaram durante a PCR. Para a análise de dissimilaridade e *fingerprint*, foram utilizados os demais 24 *primers* ISSR (Tabela 2), polimórficos e com bandas de padrão para a análise. As amplificações foram ajustadas para um volume final de 25 μ L contendo: tampão de enzima 1X [KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3)], 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,28 mM de cada *primer*, 10 ng de DNA genômico e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems modelo Veriti® 96-Wells com o seguinte programa de amplificação: uma etapa inicial de 94 °C por 3 min., seguida de 39 ciclos de 94 °C por 40 s, temperatura de anelamento específica de cada *primer* (Tabela 2) por 40 s, 72 °C por 1 min, com extensão final de 72 °C por 5 min. e 10 °C até a retirada das amostras do aparelho. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, submetidos a uma voltagem de 100 V durante aproximadamente 4 h. As corridas foram fotodocumentadas com uso do sistema de captura de imagens Vilber Lourmat.

Tabela 2. *Primers* ISSR utilizados no estudo de dissimilaridade genética e desenvolvimento do *fingerprint* genético de cultivares e híbridos elite de abacaxizeiro, suas seqüências (5'-3') e respectivas temperaturas de anelamento (Ta).

Número e nome do Marcador ISSR	Seqüência do primer	Temperatura de anelamento (°C)
ISSR 07 DiCA5'CY	CYCACACACACACACACA	49 °C
ISSR 09 DiCA5'T	TCACACACACACACACA	50 °C
ISSR 11 DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	50 °C
ISSR 24 DiGT5'A	AGTGTGTGTGTGTGTGT	50 °C
ISSR 25 DiGT5'C	CGTGTGTGTGTGTGTGT	50 °C
ISSR 26 DiGT5'CR	CRGTGTGTGTGTGTGTGT	50 °C
ISSR 29 TriCAC3'RC	CACCACCACCACCACRC	50 °C
ISSR 30 TriCAC3'YC	CACCACCACCACCACYC	50 °C
ISSR 32 TriCAC5'CY	CYCACCACCACCACCAC	49 °C
ISSR 37 TriCAG5'CY	CYCAGCAGCAGCAGCAG	48 °C
ISSR 40 TriGTG3'YC	GTGGTGGTGGTGGTGTC	48 °C
ISSR 46 TriTGT5'CR	CRTGTTGTTGTTGTTGT	50 °C
ISSR 49 TriAAC 3'RC	AACAACAACAACAACRC	45 °C
ISSR 54 TriATG 3'RC	ATGATGATGATGATGRC	50 °C
ISSR 55 TriACA 3'RC	ACAACAACAACAACARC	50 °C

Tabela 2. Continuação.

Número e nome do Marcador ISSR	Sequência do primer	Temperatura de anelamento (°C)
ISSR 76 TriTGG 3'RC	TGGTGGTGGTGGTGGRC	48 °C
ISSR 77 TriCAA 3'RC	CAACAACAACAACAARC	48 °C
ISSR 79 TriCAC 3'RC	CACCACCACCACCACRC	50 °C
ISSR 82 TriCTC 3'RC	CTCCTCCTCCTCCTCRC	50 °C
ISSR 96 TriGTC 3'RC	GTCGTCGTCGTCGTCRC	50 °C
ISSR 62 TriAGG 3'RC	AGGAGGAGGAGGAGGRC	50 °C
ISSR 70 TriTCA 3'RC	TCATCATCATCATCARC	50 °C
ISSR 71 TriTCT 3'RC	TCTTCTTCTTCTTCTRC	50 °C
ISSR 72 TriTCC 3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	50 °C

Degeneração: Y=C/T; K = T/G; R = A/G; N=A/T/G/C

Análise Molecular

Dissimilaridade genética

Os fragmentos oriundos das reações de amplificação foram avaliados como ausência (0) e presença (1) de bandas. A matriz de dissimilaridade genética entre os genótipos foi calculada a partir do coeficiente de Jaccard (índice do complemento de Jaccard = 1 - c) por meio do programa computacional GENES (Cruz et al., 2016). O agrupamento dos genótipos para a construção do dendrograma foi realizado pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*), com auxílio do software Statistica (Statistica, 2002).

Fingerprint molecular e MIPs (Molecular Identification Profiles)

O padrão de genotipagem seguiu a avaliação de presença (1) e ausência de bandas (0). As análises contaram com o uso de dois softwares: i) pacotes *vegan* e *poppr* do software R (R Development Core Team, 2016) e ii) GENES – comando *fingerprint* (por meio da metodologia por “exclusão” de bandas). A análise obtida com auxílio dos pacotes *vegan* e *poppr*, implementadas em ambiente R permite a obtenção de uma curva de acúmulos de bandas e a informatividade, que um dado conjunto de marcadores pode trazer, visando à maior diferenciação entre os genótipos.

O procedimento do comando *fingerprint* no software GENES tem por objetivo encontrar um número mínimo de bandas que permita discriminar todos os genótipos por meio da estratégia de “exclusão”, o qual faz uma análise preliminar com todas as marcas, com avaliação da existência de réplicas e também o total das distâncias.

Para o desenvolvimento dos MIPs, os tamanhos dos fragmentos (pb) foram calculados com base na equação de regressão (logarítmica) e certificados pelo uso do software GelAnalyzer (<https://le.ac.uk/>).

A escolha de uso das duas metodologias permitiu a identificação dos principais primers a serem utilizados no *fingerprint* e também as principais marcas responsáveis pela diferenciação entre os primers.

Resultados e Discussão

Dissimilaridade Genética

Os 24 primers ISSR utilizados geraram um total de 97 *locos* polimórficos e 70 monomórficos. O dendrograma gerado com auxílio do software STATISTICA encontra-se na Figura 4 e a matriz de dissimilaridade, na Figura 5.

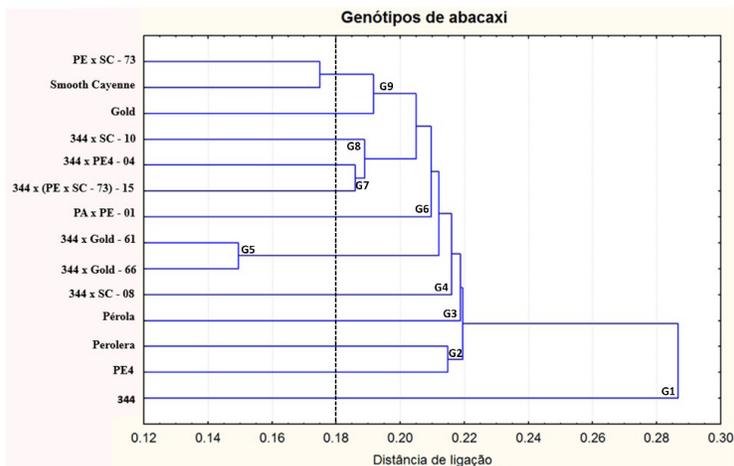


Figura 4. Dendrograma construído para 14 genótipos de abacaxizeiro a partir de 24 primers ISSR e 97 bandas polimórficas. O ponto de corte foi escolhido com base nos critérios definidos por Mingoti (2005).

	PE x SC-73	PA x PE-01	344 x SC-08	344 x SC-10	344 x PE4-04	344 x Gold-61	344 x Gold-66	344 x (PE x SC-73) 15	Perolera	Smooth Cayenne	Gold	344	PE4	Pérola
PE x SC-73	0,00													
PA x PE-01	0,21	0,00												
344 x SC-08	0,25	0,23	0,00											
344 x SC-10	0,21	0,24	0,22	0,00										
344 x PE4-04	0,26	0,25	0,22	0,19	0,00									
344 x Gold-61	0,32	0,29	0,27	0,28	0,22	0,00								
344 x Gold-66	0,31	0,31	0,29	0,30	0,23	0,15	0,00							
344 x (PE x SC-73) 15	0,28	0,27	0,26	0,22	0,19	0,22	0,21	0,00						
Perolera	0,23	0,24	0,32	0,32	0,28	0,34	0,31	0,29	0,00					
Smooth Cayenne	0,18	0,24	0,25	0,20	0,23	0,25	0,26	0,22	0,22	0,00				
Gold	0,31	0,34	0,31	0,28	0,28	0,32	0,33	0,32	0,31	0,19	0,00			
344	0,32	0,32	0,38	0,33	0,32	0,31	0,29	0,29	0,34	0,32	0,34	0,00		
PE4	0,28	0,28	0,28	0,29	0,24	0,30	0,32	0,30	0,21	0,27	0,27	0,37	0,00	
Pérola	0,31	0,22	0,32	0,33	0,28	0,29	0,28	0,28	0,26	0,23	0,22	0,32	0,25	0,00

Figura 5. Matriz de dissimilaridade genética entre 14 genótipos de abacaxizeiro - baseada no coeficiente de Jaccard pelo software GENES. Menor distância genética em azul e maior em verde.

A distância genética entre os acessos variou de 0,15 a 0,38, com a menor distância entre os genótipos 344 x Gold-61 e 344 x Gold-66 e a maior entre 344 x SC-08 e 344. O ponto de corte foi delineado de acordo com os critérios definidos por Mingoti (2005), com formação de nove grupos. O grupo G1: formado pela variedade FRF-632 (BAG 344), de origem pré-colombiana e coletada em Manicoré – AM. Essa variedade é resistente à fusariose, possui espinhos nas folhas, com polpa creme e casca laranja na maturação, com adaptação ao clima seco do semiárido da Bahia.

O grupo G2: formado por Perolera, e PE4: ambas cultivares são pré-colombianas e cultivadas nos Andes da Colômbia e Venezuela, de onde ambas são originárias. São resistentes à fusariose, com folhas completamente lisas (‘piping’) e com polpa amarela. O grupo G3: formado pela cultivar Pérola, também pré-colombiana e típica do Brasil. Essa cultivar é suscetível à fusariose, com espinho nas folhas, polpa branca e casca verde na maturação. O grupo G4: formado por 344 x SC-08, um híbrido do programa de melhoramento genético do abacaxi (PMGA) da Embrapa, oriundo do cruzamento entre a variedade FRF-632 (BAG 344) e a cultivar

Smooth Cayenne, os mesmos genitores do híbrido 344 x SC-10 (no grupo G8), o que reflete na baixa dissimilaridade entre eles (22%).

O G5: representado por dois híbridos do PMGA oriundos do cruzamento entre a variedade FRF-632 (BAG 344) e a cultivar Gold (ou MD-2). Possuem resistência à fusariose, polpa creme, frutos pesados e com espinhos apenas nas extremidades das folhas. Já o G6: formado pelo híbrido PA x PE-01, oriundo do cruzamento entre as cultivares Pérola e Perolera, é resistente à fusariose, possui polpa branca e folha lisa. O G7: formado pelos híbridos 344 x (PE x SC-73) -15 e 344 x PE4-04. Ambos possuem o mesmo genitor feminino e a cultivar Perolera como genitor masculino (híbrido 04) ou na genealogia do genitor masculino (híbrido 15). O G8, com o híbrido 344 x SC-10, do PMGA da Embrapa, é oriundo do cruzamento entre FRF-632 e Smooth Cayenne de mesma genealogia do 344 x SC-08 (no G4), o que reflete na baixa dissimilaridade (22%) entre ambos.

O G9 foi formado por uma cultivar pré-colombiana (Smooth Cayenne), uma cultivar moderna ('Gold') e um híbrido do PMGA. Na genealogia do 'Gold' (desenvolvido no extinto Pineapple Research Institute – Havaí), há grandes contribuições de genoma de Smooth Cayenne, Perolera e do 'Pérola' (WILLIAMS; FLEISCH, 1993). Portanto, a presença do híbrido PE x SC-73 nesse grupo se justifica por ser oriundo do cruzamento entre as cultivares Perolera e Smooth Cayenne. Dessa forma, a análise de dissimilaridade genética confirma a estreita base genética devido ao parentesco de alguns dos materiais avaliados, mas que permite a distinta separação dos genótipos em nove grupos.

***Fingerprint* molecular**

A análise por acúmulo de bandas gerada pelo programa R Development Core Team (2016) com uso dos pacotes *vegan* e *poppr* (Figura 6), revelou que nove *locos* já seriam suficientes para gerar o *fingerprint* desse conjunto de genótipos, ao considerar o arquivo original de dados na planilha. Entre os primers que foram mais eficazes em gerar a identidade molecular dos indivíduos, destacam-se ISSR 40 e ISSR 32.

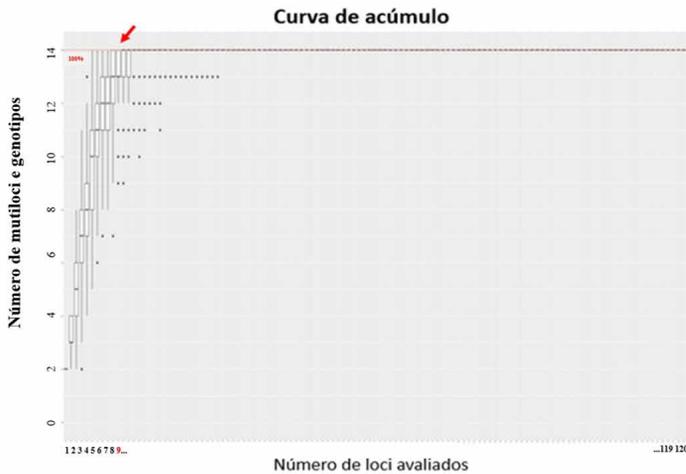


Figura 6. Análise por acúmulo de bandas geradas com auxílio dos pacotes *vegan* e *poppr* no software “R”. A seta e o número 9 em vermelho indicam o número de bandas que possuem capacidade de juntas (acumuladas), gerar um *fingerprint* para os 14 genótipos (1 a 14).

A análise pelo software R indica os primers ISSR 40 (sete primeiras bandas) e ISSR 32 (primeiras duas bandas) como úteis para uso no desenvolvimento do *fingerprint* genético dos 14 genótipos. O perfil eletroforético desses primers estão apresentados na Figura 7.

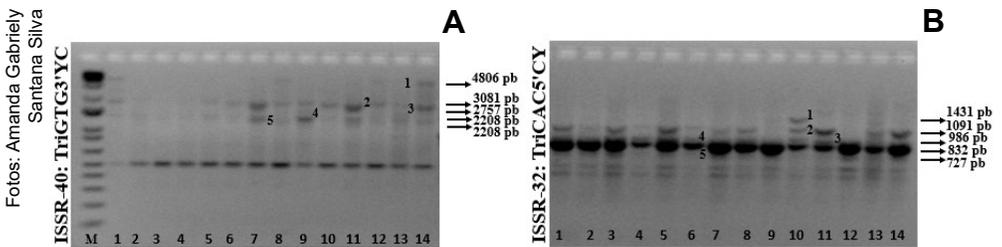


Figura 7. Perfil eletroforético dos 14 genótipos de abacaxizeiro com os dois *primers* mais informativos. A) ISSR 40 e B) ISSR 32. M = marcador molecular 1 kb (Invitrogen). 1-14: genótipos de abacaxi (Tabela 1). Setas na lateral direita indicam tamanho das principais bandas a serem usadas em conjunto no desenvolvimento do *fingerprint* genético, e os números espalhados em ambas as imagens, mostram as principais bandas polimórficas utilizadas no *fingerprint* genético.

A análise gerada pelo software GENES detectou as oito principais bandas responsáveis pelo *fingerprint* dos indivíduos. As principais bandas (*loco*) e seus primers ISSR correspondentes encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Primers correspondentes às principais bandas (*locos*) a serem usadas no *fingerprint* de abacaxizeiro com auxílio do software GENES, comando fingerprint pelo método de “exclusão”.

Banda (<i>loco</i>)	Nome do Primer	pb	Banda (<i>loco</i>)	Nome do Primer	pb
12	ISSR32 TriCAC5'CY	986	67	ISSR46 TriTGT5'CR	680
47	ISSR76 TriTGG 3'RC	748	68	ISSR49 TriAAC 3'RC	1456
56	ISSR11 DiGA3'C	631	87	ISSR82 TriCTC 3'RC	1534
58	ISSR 40 DiGA3'C	4806	54	ISSR54 TriATG 3'RC	966

Os perfis eletroforéticos gerados pelos primers ISSR82 e ISSR11 encontram-se na Figura 8.

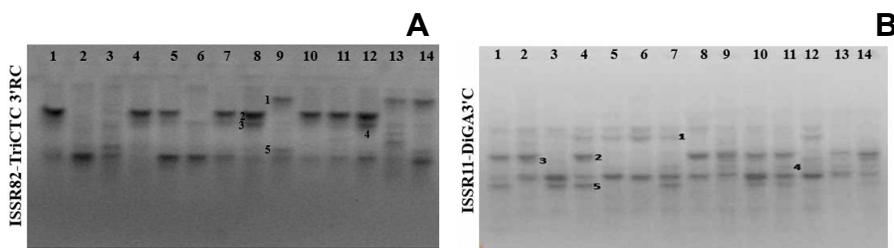


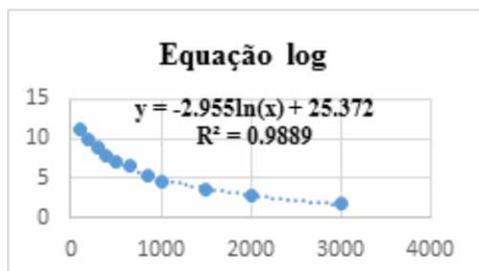
Figura 8. Perfil eletroforético dos 14 genótipos de abacaxizeiro com os *primers* ISSR 82 (A) e ISSR 11 (B). 1-14: genótipos de abacaxizeiro (Tabela 1). Números 1-5: bandas usadas no *fingerprint* genético.

Com base no resultado do software GENES, procedeu-se à construção dos MIPS (*Molecular Identification Profiles*) (Figura 9, de A até G), dos perfis de amplificação dos 14 genótipos de abacaxizeiro e 24 primers ISSR utilizados. A análise por “exclusão” de marcas com uso do software GENES identificou 12 bandas mais informativas nesse grupo de genótipos (MIPs).

MIPs – MOLECULAR IDENTIFICATION PROFILES

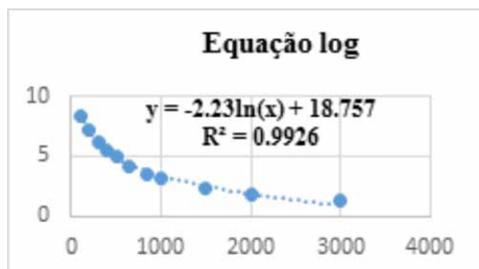
A)

ISSR32	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
ISSR32-1	1431										*				
ISSR32-2	1091	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*		*	*
ISSR32-3	986				*	*	*		*	*	*	*			
ISSR32-4	832				*	*	*	*	*		*	*	*		*
ISSR32-5	727	*	*	*		*		*	*	*			*		*



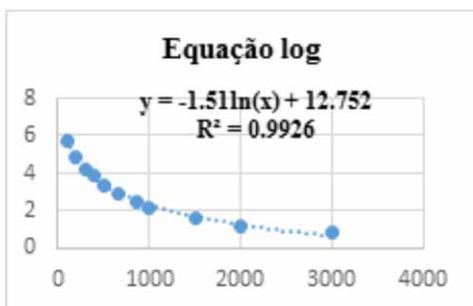
B)

ISSR76	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
ISSR76-1	748	-	-	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	*	-



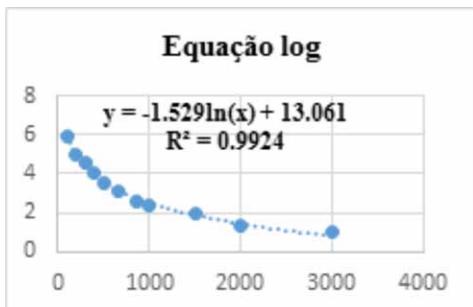
C)

ISSR11	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
ISSR11-1	998				*	*	*	*					*		
ISSR11-2	674	*	*		*				*	*	*	*		*	*
ISSR11-3	631	*	*		*					*	*		*		*
ISSR11-4	519							*		*		*	*	*	*
ISSR11-5	374	*		*	*			*			*	*			*



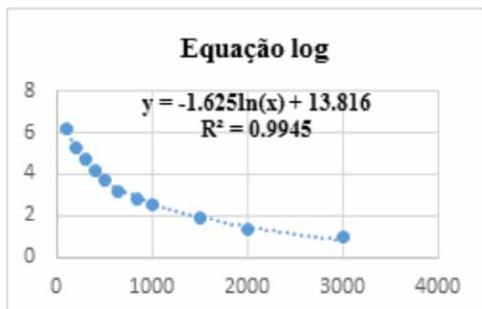
D)

ISSR46	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
ISSR46-1	2395			-			*			-		*		-	
ISSR46-2	2098	*	*	-	*	*	*	*	*	-	*	*	*	-	*
ISSR46-3	1082		*	-	*	*				-		*	*	-	
ISSR46-4	680			-		*	*	*	*	-		*	*	-	*



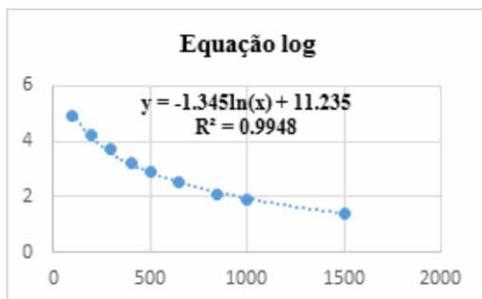
E)

ISSR49	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
ISSR49-1	1453	*	*	-	*	*			-	*	-	-		*	-
SSR49-2	311		*	-			*	*	-		-	-	*		-



F)

ISSR82	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
ISSR82-1	2400									*				*	*
ISSR82-2	1534	*			*	*		*	*		*	*	*		
ISSR82-3	1056	*			*		*	*	*		*	*	*	*	*
SSR82-4	844													*	
ISSR82-5	628		*	*						*					*
ISSR82-5	500	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*



G)

ISSR54	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
ISSR54-1	1535			*	*	*	*	*	*	*	*	*	-		*
ISSR54-2	966			*	*	*			*		*	*	-	*	*
ISSR54-3	860				*				*				-		
ISSR54-4	796	*	*	*		*	*	*			*	*	-		*

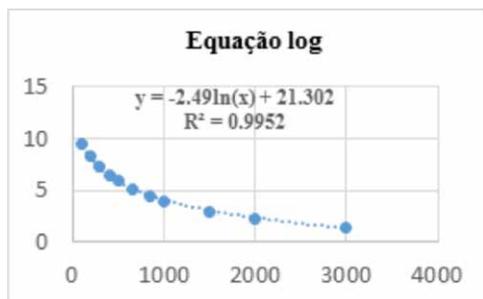


Figura 9. (A – G) *Molecular Identification Profile* (MIP) dos primers ISSR que contém as bandas mais informativas (Tabela 3) para o desenvolvimento do *fingerprint* dos 14 genótipos de abacaxi. Marcação em azul: bandas selecionadas pelo software GENES. Hífen – amostra não amplificada via PCR.

Estudos de diversidade em abacaxizeiro tem apontado alta variabilidade genética. Wang et al. (2017) utilizaram marcadores SSR e ISSR em 36 acessos introduzidos de outros países, nos quais as distâncias genéticas médias foram de 0,74 e 0,61 para os SSRs e ISSRs, respectivamente.

Vanijajiva et al. (2012) avaliaram 15 acessos de abacaxizeiro com apenas 4 primers ISSR, com distância genética entre 0,316 e 0,968. Já Campos et al. (2005) avaliaram 12 acessos de abacaxizeiro provenientes de 3 espécies diferentes com marcadores RAPD e ISSR, onde as distâncias médias foram de 0,754 e 0,634, respectivamente.

No presente trabalho, foram utilizados 14 genótipos, entre parentais e progênies. Apesar da baixa dissimilaridade genética observada, oriunda da base estreita dos genótipos, as informações geradas pelos primers ISSR, juntamente com o uso de duas metodologias, possibilitou o desenvolvimento de um *fingerprint* genético para dar suporte aos melhoristas do PMGA.

Conclusão

Foi gerado um *fingerprint* genético que garante a identidade genética das cultivares tradicionais e híbridos selecionados de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Ficou evidente que a dissimilaridade genética entre as cultivares tradicionais e híbridos elite de abacaxizeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura é baixa.

Referências

- ALVES, A.A. et al. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.
- BORNET, B; BRANCHARD, M.. Nonanchored Inter Simple Repeat (ISSR) markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 209–215, 2001.
- CAMPOS, E. T.; ANDRADE, H. G. Espinosa, MAGGenetic Characterization of Pineapple (*Ananas spp.*) Accessions by RAPD and ISSR. **Rev. Fitotec. Mex.**, v.28, n.3, p. 187-194, 2005.
- COSTA, D. F., VIEIRA, F. D. A., FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*hancornia speciosa gomes*) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2016. 442 p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. Pineapple germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.334, p.23-26, 1993.
- GAO, J., ZHANG, S., QI, L., ZHANG, Y., WANG, C., SONG, W., HAN, S. Application of ISSR markers to fingerprinting of elite cultivars (varieties/clones) from different sections of the genus *Populus* L. **Silvae Genetica**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 2006.
- LAURENTIN, H.. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, n. 2, p. 277-292, 2009.
- MINGOTI, S.A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 295p.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2016.
- STATISTICA for Windows. Computer program manual. Version 6. Tulsa: Statsoft, . 2002.1,CD-ROM

- TORRE, M.C.P. Construction of a molecular identification profile of new varieties of *Nierembergia linariaefolia* by anchored microsatellites. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n.3, p. 240-252, 2006.
- VARGAS, P.; KADEREIT, J.W. Molecular fingerprinting evidence (ISSR, Inter-Simple Sequence Repeats) for a wild status of *Olea europaea* L. (Oleaceae) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. **Flora**, v. 196, p. 142-152, 2001.
- VANIJAJIVA, O. Assessment of genetic diversity and relationships in pineapple cultivars from Thailand using ISSR marker. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, n. 5, p. 1829-1838, 2012.
- VARGAS, P.; KADEREIT, J.W. Molecular fingerprinting evidence (ISSR, Inter-Simple Sequence Repeats) for a wild status of *Olea europaea* L. (Oleaceae) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. **Flora**, v. 196, p. 142-152, 2001.
- WANG, J. S., HE, J. H., CHEN, H. R., CHEN, Y. Y., & QIAO, F. Genetic Diversity in Various Accessions of Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] Using ISSR and SSR Markers. **Biochem Genet**, v. 55, p. 347-366, 2017.
- WHITE, L. A. S., SILVA, A. V. C., ALVARES-CARVALHO, S. V., SILVA-MANN, R., ARRIGONI-BLANK, M. F., SOUZA, E. M. S., ... & BLANK, A. F. Genetic diversity of a native population of *Myrcia ovata* (Myrtaceae) using ISSR molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n.3, p. 1-11, 2018.
- WILLIAMS, D.D.F.; FLEISCH, H. Historical review of pineapple breeding in Hawaii. *Acta Horticulturae*, v. 334, p. 67-76, 1993.
- WUNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, v. 125, p. 549-67, 2002.
- ZHU, Y., HU, J., HAN, R., WANG, Y., & ZHU, S. Fingerprinting and identification of closely related wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using ISSR and fluorescence-labeled TP-M13-SSR markers. **Australian journal of crop science**, v. 5, n. 7, p. 846, 2011.

Embrapa

Mandioca e Fruticultura

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL