

Caracterización genética de la colección de *Ananás* del Centro Nacional de Conservación de los Recursos Genéticos, Venezuela

Genetic characterization of the pineapples collection of the National Center of Conservation of the Genetic Resources, Venezuela

D. Rodríguez¹, A. Díaz², L. Ruiz³, C. Ramis² y M. Páez¹

¹Centro Nacional de Conservación de los Recursos Genéticos/ONDB/Minamb, Maracay, Venezuela.

²Instituto de Genética. CIBA/Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

³Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) CENIAP. Maracay, Venezuela.

Resumen

La piña o Ananás (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es una planta herbácea, perenne que pertenece a la familia *Bromeliaceae*. Con el objetivo de obtener huellas moleculares de cada entrada de la colección de *Ananas* del Centro Nacional de Conservación de los Recursos Genéticos, se aplicó la técnica de electroforesis de isoenzimas con cuatro sistemas isoenzimáticos: Fosfoglucomutasa, Fosfoglucoisomerasa, Alfa Esterasa y Peroxidasa. Se evaluaron 158 entradas, correspondientes a 789 individuos de la colección. La identificación de los patrones para cada sistema isoenzimático se realizó considerando la posición y el número de bandas. Al organizar los patrones de banda de cada sistema isoenzimático para las diferentes entradas del género *Ananas*, permitió evidenciar un total de 278 patrones generales informativos. Esta técnica permitió caracterizar todos los individuos de cada entrada. La especie *Ananás comosus* variedad *comosus*, presentó el mayor número de patrones; posiblemente debido al número de muestras usadas para caracterizar esta especie.

Palabras clave: Caracterización, isoenzima, colección, *Ananás*.

Recibido el 9-1-2007 • Aceptado el 30-4-2007

Autores para correspondencia e-mail: dirodriguez@minamb.gov.ve. mpaez@minamb.gov.ve; cmcramis@yahoo.es; adiape@cantv.net; lisruiz8@hotmail.com

Abstract

Ananas comosus (L.) Merrill) is a perennial herbaceous, belongs to the family *Bromeliaceae*-. With the purpose to obtain molecular fingerprints of every entry of the collection of pineapples preserved in field of the National Center of Conservation of the Genetic Resources, the electrophoresis of isoenzymes technique was applied with four isoenzymatics systems: Phosphoglucumutase (PGM), Phosphoglucoisomerase (PGI), Alpha Esterase (Est) and Peroxidase (PER). 158 incomes were evaluated, corresponding to a whole of 789 individuals of the collection. The pattern identification of each isoenzymatic system was accomplished by taking into account the bands number and position. When organizing the band patterns of each isoenzymatic system for the different incomes of *Ananas* genus, it allowed to evidencing a whole of 278 informative general patterns. This technique let us to characterize every individual of each income. The specie *Ananas comosus* variety *comosus* have the major pattern number; possibly due to the samples number used to characterize the species.

Key words: Characterization, isoenzyme, collection, *Ananas*.

Introducción

La piña o Ananás (*Ananas comosus* (L.) Merrill) es una planta herbácea, que pertenece a la subclase de las Liliopsidae (Monocotiledóneas), y al orden Poales, familia Bromeliaceae y subfamilia Bromelioideae (3). Es la más importante fruta americana y la tercera fruta tropical después de la banana y el mango (2). Es cultivada en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Según la FAO, existen setenta países dedicados a la producción de piña y entre ellos los mayores productores son Brasil y Tailandia con una producción promedio anual de dos millones de toneladas, seguido de Filipinas, Costa Rica y China y una producción mundial para el año 2004, de 16.9 millones de toneladas. En nuestro país, Según la FAO, 2004 la superficie cultivada de piña fue de 16.256 ha con una producción de

322.768 toneladas métricas.

Al aplicar el concepto estrecho de especie (3) no encontraron diferencias fundamentales con respecto al sistema reproductor o historia evolutiva entre las especies descritas en la clasificación de Smith y Downs (5). De esta manera, se proponen una reclasificación donde el género *Ananas* contiene dos especies: *A. macrodontes* y *A. comosus*, ésta última con cinco variedades silvestres: *Ananas comosus* var. *ananassoides* (*A. ananassoides* y *A. nanus*); *Ananas comosus* var. *bracteatus* (*A. bracteatus* y *A. friztmuelleri*); *Ananas comosus* var. *comosus* (*A. comosus*); *Ananas comosus* var. *erectifolius* (*Ananas lucidus* y *A. erectifolius*); *Ananas comosus* var. *parguazensis* (*A. parguazensis*) (3).

La caracterización bioquímica y molecular ofrece una serie de venta-

jas, entre ellas la de ser una alternativa para identificar y estimar la diversidad genética (6), entre ellas se encuentra trabajos realizados en piña (1, 4) y por lo tanto ayudar a establecer criterios para mejorar la representatividad de las mismas. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización genética de las espe-

cies *Ananas comosus var comosus*, *Ananas comosus var ananassoides*, *Ananas comosus var parguazensis*, *Ananas comosus var. bracteatus*, *Ananas comosus var. erectifolius*, conservadas en campo en el Centro Nacional de Conservación de los Recursos Genéticos (CNCRG).

Materiales y métodos

Material vegetal: La colección se encuentra ubicada en las instalaciones del Centro Nacional de Conservación de los Recursos Genéticos, adscrito a la Oficina Nacional de Diversidad Biológica del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, ubicado en El Limón, municipio Mario Briceño Irragori, estado Aragua, Venezuela, a 10°18'40.1" N y 67°38'36.7" O, a una altura de 517 msnm y con una temperatura que oscila entre los 24 a 32° C. La colección está conformada por un total de 190 entradas, de cuales se evaluaron 158, que corresponden a 789 individuos. Estos materiales provienen de donaciones particulares, donaciones de otras instituciones nacionales e internacionales, y colectas de campo.

Se seleccionaron aquellas entradas que presentaban el mayor número de individuos en campo (entre 3 y 7), así como algunas entradas que se encontraban en el vivero. Los materiales estudiados son los siguientes: *Ananas comosus var. comosus*, *A. comosus var. ananassoides*, *A.comosus var. parguazensis*, *A. comosus var. bracteatus*, *A.comosus var. erectifolius* y *Ananas*

macrodontes.

Extracción: Se utilizaron 100 mg de tejido basal de la cuarta hoja en desarrollo (en sentido acrópeto). La extracción se realizó con Tris Citrato 0,1 M pH: 8.0 (tampón de extracción) en la proporción tejido: tampón 1:1. Se empleó una capa de papel de filtro Whatman N° 3, de 4 x 8 mm que se colocó en el macerado por 5 min. aproximadamente para procurar una mayor absorción. Para los geles de poliacrilamida el extracto fue clarificado por centrifugación a 5.000 rpm por 5 min. a 4°C (Centrifugadora Hermle Z233MK-2, Modelo A12M15HTS). Posteriormente el sobrenadante fue almacenado en un refrigerador hasta el momento de su utilización. Se tomaron 100 µl del sobrenadante a los que se le agregaron 12 µl de glicerol para aumentar su viscosidad y 5 µl de colorante azul de bromofenol para poder visualizar el frente de corrida.

Migración: Los geles se prepararon al 11% con almidón hidrolizado de papa (Sigma Chemical Co.) utilizando los siguientes tampones del gel - electrodo: histidina – citrato pH 5,7 y morfolina-citrato pH 6,1. Al siguiente

te día, el gel se enfrió en la nevera a 4°C por una hora, previo a la carga de las muestras. Posteriormente, los trozos de papel de filtro con el extracto se cargaron sobre un corte transversal hecho en el gel a cinco centímetros del borde catódico. Se sometió el gel a una corrida por 25 min. (precorrida) y una vez terminada, se retiraron los papeles, iniciándose una corrida de duración variable (4 a 5 horas) según el sistema tampón gel – electrodo en uso. De igual manera se hicieron geles de poliacrilamida a concentraciones discontinuas al 6% gel compilador (GC) y 10% gel separador (GS). Los geles polimerizados se colocaron en una cámara de electroforesis (BIORAD) donde se utilizó Tris Glicina a pH 8,3 como tampón de corrida.

La electroforesis en geles de almidón fue conducida a 200 V constantes para histidina citrato y 35 mA constantes para morfolina- citrato. La temperatura del gel durante el proceso se mantuvo entre 4 a 6°C. En geles de acrilamida se utilizó condiciones de 60 - 80 V, a 20 mA constantes.

Revelación enzimática: Al terminar la corrida, cada gel de almidón se rebanó horizontalmente, obteniéndose tres rebanadas efectivas para la revelación (excluyendo la capa superior). Se probaron 4 sistemas enzimáticos, y la preparación de las soluciones de revelado se realizó según el protocolo de García (3), con ligeras modificaciones: Alfa esterasa (a-

EST; EC 3.1.1.1.1): 25 mg Fast blue RR, 50 ml tampón fosfato pH 6,3 y 25 mg á- naphtyl acetate. Peroxidasa (PER; EC 1.11.1.7): 25 mg carbazole diluidos en 2 ml μ N,N dimetil formamide, 50 ml Na- acetato de sodio pH 5 50 mM; 50 mg CaCL₂, y 250 μ l H₂O₂ (3%), Fosfoglucomutasa (PGM; EC 2.7.5.): 50 mL tris 0,1 M pH 8,0; 2 ml MgCL₂ (10%); 12, 5 mg glucose 1-phosphate; 10 mg MTT; 8mg μ l NADP; 3 mg PMS y 30 μ l glucose 6-phosphate deshidrogenase. Fosfoglucoisomerasa (PGI) Tris 0.1 M, pH 8.0 100 m; MTT 20 mg; NADP 8 mg; PM 6 mg; Fructosa-6-fosfato 20 mg; Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 30 mL.

Registro electroforético: Una vez revelado el gel para cada sistema, se procedió a visualizar las bandas en el transiluminador. Se hizo un registro cualitativo basado en la presencia o ausencia de bandas. Cada banda se identificó de acuerdo a su movilidad relativa (Rf), calculada mediante las expresiones siguientes:

Para geles de acrilamida: $Rf = \text{Migración de la banda (cm)} / \text{Frente de migración (cm)}$

Para geles de almidón: $Rf = \text{Migración de la banda (cm)} / \text{Banda de referencia del genotipo patrón (cm)}$

Como huella digital de cada uno de los 789 individuos silvestres y cultivados del género *Ananas* fue considerado el patrón de bandas que presentó dicho individuo para el conjunto de sistemas enzimáticos registrados.

Resultados y discusión

Polimorfismo isoenzimático:

Las enzimas fosfoglucoisomerasa (PGI), fosfoglucomutasa (PGM), alfa esterasa (a Est), y Peroxidasa (PER), fueron usadas para caracterizar la colección de *Ananas*, por presentar mayor resolución. Los dos últimos sistemas fueron los que presentaron mayor polimorfismo.

En la figura 1 se muestran geles de las enzimas estudiadas PGM, PGI, (Est y PER, para 128 individuos, así como su movilidad relativa. Las enzimas Peroxidasa, y (esterasa presentaron 28 y 17 patrones, respectivamente. Estudios realizados encontraron variación genética dentro y entre las especies de *Ananas* con siete sistemas enzimáticos (ADH, PGI, PGM, SKD, PER, TPI y EST) con un total de 161 entradas (1).

La identificación de las diferentes entradas se realizó a través de la identificación de los patrones para cada sistema isoenzimático en donde se consideró la posición y el número de bandas. Una vez identificados los patrones de bandas de cada sistema isoenzimático, se procedió a ubicar a cada individuo (789 individuos) en un determinado patrón, lo cual corres-

ponde a su huella digital.

Al organizar los patrones de banda de cada sistema isoenzimático para las diferentes variedades y especies silvestres del género *Ananas*, se observó que existe un mayor número de combinaciones de patrones dentro que entre las variedades, especialmente en *Ananas comosus* variedad *comosus*, que presentó el mayor número de patrones; posiblemente debido al número de muestras usadas para caracterizar la especie (585 de un total de 789 individuos evaluados); así mismo, presentó el mayor número de patrones únicos. García (1988) estudió 177 genotipos y 10 sistemas enzimáticos entre ellas PGM, PER, en los cuales encontró un alto polimorfismo (80-100%), con una fuerte heterocigosis.

Se presentó un total de 278 patrones generales de los 789 individuos estudiados para las cuatro enzimas analizadas (EST, PGM, PGI y POX), en donde cada una de esas enzimas presentaron 17, 13, 16 y 28 patrones, respectivamente; lo que implica la gran variabilidad genética existente en la colección.

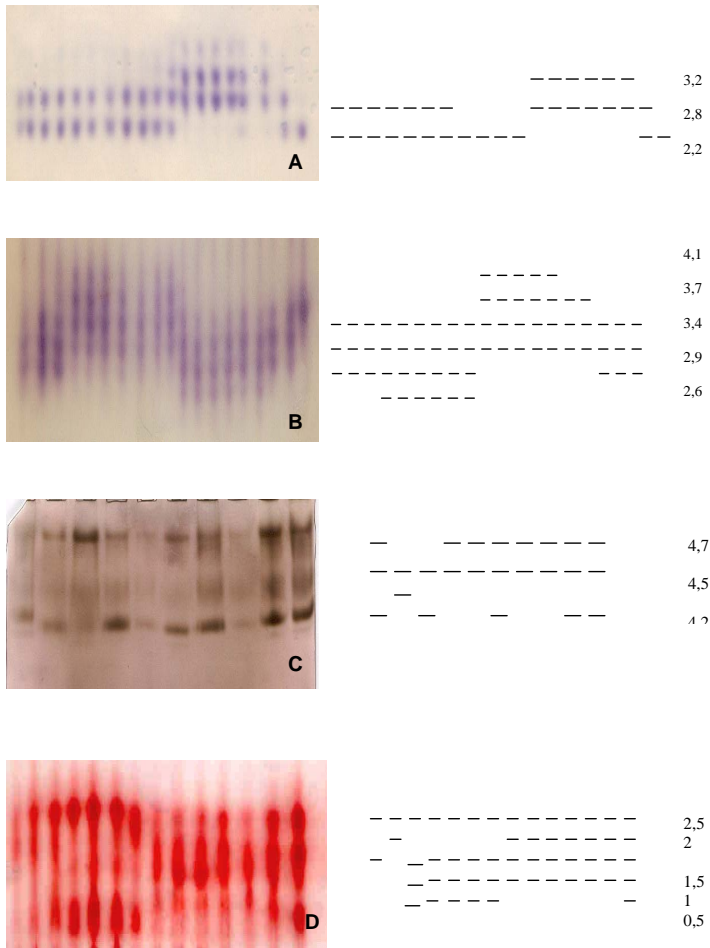


Figura 1. Representación geles: A. PGM; B. PGI; C. EST; D. POX, con su movilidad relativa

Conclusiones

Los sistemas isoenzimáticos peroxidasa y alfa esterasa presentaron mayor polimorfismo.

Las enzimas más importantes en la caracterización de los materiales de *Ananas* fueron PER y á EST por cuanto fueron los que presenta-

ron el mayor número de patrones isoenzimáticos.

Se evaluaron un total de 158 entradas correspondientes a 789 individuos, de la colección, los cuales presentaron 278 patrones electroforéticos generales

Agradecimiento

El responsable desea agradecer a los asesores Catalina Ramis y Antonio Díaz y miembros del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Genética de la Facultad de Agrono-

mía- UCV, por la asistencia técnica y al Fondo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (FONACIT) por el financiamiento de este proyecto.

Literatura citada

1. Aradhya, M.K., F. Zee y R. M. Manshardt. 1994. Isozyme variation in cultivated and wild pineapple. *Euphytica* 79:87-99.
2. Coppens d'Eeckenbrugge, G. y Leal, F. 2001. Pineapple. http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruit_from_americas/frutales/more%20about%20pineapple.htm
3. Coppens d'Eeckenbrugge y F. Leal. 2003. Pineapple. En: *Tree and Tropical Fruits*. Janick y James N. Moore. (Eds.) John Wiley. Sons, Inc.
4. García, M. L. 1988. Etude taxinomique du genre *Ananas*: utilisation de la variabilité enzymatique. Thèse de doctorat, université Montpellier II, Montpellier, France, 156 p.
5. Smith, L.B. y R.J. Downs. 1979. Bromelioidees (Bromeliaceae). *Flora neotropica*; Monograph No. 14 pt 3. 2142 p.
6. Westamn, A.L. y S. Kresovich. 1997. Use of molecular techniques for description of plant genetic variation. En: *Biotechnology y Plant Genetic Resources, conservation and use*. Callow, JA, Ford-Lloyd, BV, Newbury, HJ. *Biotechnology in Agriculture Series, No.19*. CAB International, New York, USA.