

## CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MATERIALES DE PIÑA (*Ananas* spp.) MEDIANTE RAPD E ISSR

### GENETIC CHARACTERIZATION OF PINEAPPLE (*Ananas* spp.) ACCESSIONS BY RAPD AND ISSR

Ernesto Tapia Campos<sup>1</sup>, Héctor Guillén Andrade<sup>2</sup> y María Alejandra Gutiérrez Espinosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa en Fruticultura, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230 Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Tel y Fax: 01 (595) 952-0233. Correo electrónico: etapia@colpos.mx <sup>2</sup>Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas, Esq. con Belín s/n, Col. Viveros. C.P. 60190 Uruapán, Mich.

\* Autor para correspondencia

#### RESUMEN

Se probaron 29 iniciadores ISSR (Inter-Secuencias Simples Repetidas) y 20 iniciadores decámeros RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) en 12 materiales de *Ananas comosus*, una de *A. ananasoides* y una de *A. bracteatus*, provenientes del Banco de Germoplasma del Campo Experimental del Papaloapan, Veracruz. El objetivo del análisis fue evaluar el polimorfismo entre genotipos, caracterizarlos y detectar la presencia de duplicados posibles. Sólo 20 iniciadores ISSR y 12 iniciadores RAPD detectaron polimorfismo, y los ISSR fueron superiores que los RAPD en porcentaje de polimorfismo (75.4 y 63.4, respectivamente). No se detectaron duplicados entre los materiales evaluados. Los agrupamientos generados tanto por ISSR como por RAPD fueron similares, ya que ambos agruparon inicialmente a los materiales más emparentados y con características morfológicas similares, pertenecientes a *A. comosus*, y finalmente los materiales menos emparentados *A. ananasoides* y *A. bracteatus*. Estos agrupamientos difirieron con el obtenido mediante datos morfológicos, sobre todo en los materiales de *A. comosus*. La variación genética encontrada en *A. comosus* se atribuye a la autoincompatibilidad de la especie, factores ambientales, la tasa de mutación y la variación somaclonal.

**Palabras clave:** *Ananas* spp., marcadores moleculares, microsatélites, reacción en cadena de la polimerasa, germoplasma.

#### SUMMARY

Twenty nine ISSR primers (Inter Simple Sequence Repeat) and 20 decamer RAPD primers (Random Amplified Polymorphic DNA) were evaluated in 20 accessions of *Ananas comosus*, one of *A. ananasoides* and one of *A. bracteatus*, coming from the Germplasm Bank of the Campo Experimental del Papaloapan, Veracruz. The main objectives were to determine polymorphism within accessions, to characterize them and to detect duplicity of accessions in the bank. Only 20 ISSR and 12 RAPD primers were capable of detecting polymorphism, and the percent of polymorphism from ISSR was higher than in RAPD, (75.4 and 63.4, respectively). There was not duplicity within the accessions. Clusters generated by ISSR and RAPD were similar. All members of *A. comosus* were grouped close cluster while the wild accessions such as *A. ananasoides* and *A. bracteatus*, were grouped in the last clusters. Variations can be due to self incompatibility species, environmental factors, mutation rate and somaclonal variation. There were some differences in clusters generated by morphological data, mainly within *A. comosus* accessions.

**Index words:** *Ananas* spp., molecular markers, microsatellites, polymerase chain reaction, germplasm.

#### INTRODUCCIÓN

Para que los materiales genéticos puedan ser intercambiados e incluso conservados en un banco de germoplasma, es necesaria su correcta clasificación e identificación, con el propósito de evitar duplicados, así como para mantener un rango adecuado de diversidad genética. El principal objetivo de un banco de germoplasma es dar un uso adecuado y oportuno al germoplasma conservado. Los métodos biotecnológicos como los marcadores moleculares, pueden ser de gran ayuda para un manejo adecuado de esta biodiversidad (Castillo, 1996). La variabilidad en caracteres morfológicos es el procedimiento clásico para evaluar la diversidad genética; en muchas especies vegetales, especialmente en cultivos anuales, ha sido la herramienta principal usada por los fitomejoradores. Sin embargo, con la tecnología de marcadores moleculares se ha desarrollado una nueva alternativa para que los recursos genéticos puedan evaluarse y caracterizarse al nivel de su ADN (Lanaud y Lebot, 1995).

Hume y Miller (1904) dividieron las variedades de piña (*Ananas comosus* L.) cultivada en tres grupos ('Cayena', 'Queen' y 'Spanish'), con base en similitudes en la morfología de la hoja, las espigas, el color de las flores, la forma y el tamaño del fruto. Py (1970) expandió esta clasificación al sumar los grupos 'Pernambuco' y 'Maipure'. Al respecto, Duval *et al.* (1997) coincidieron que si bien esta clasificación es apropiada para propósitos prácticos, no está claramente definida por sus bases genéticas. Además, muchas variedades de uso local no encajan en los grupos de tal clasificación. La clave usada para clasificar las especies de *Ananas* fue establecida por Smith y Downs (1979),

con base en características como el tamaño del sincarpio, presencia de espinas en hojas, y brácteas florales, muchas de las cuales son muy variables con el genotipo y el ambiente. Los autores no están enteramente satisfechos con la clave, y por ello no ha recibido reconocimiento universal.

En trabajos de caracterización de genotipos de piña mediante isoenzimas (DeWald *et al.*, 1992; Aradhya *et al.*, 1994; Mallikarjuna *et al.*, 1994), los autores sostienen que las isoenzimas se pueden usar efectivamente para detectar diferencias genéticas en piña; sin embargo, este tipo de sistemas presentan ciertas limitaciones debido a que están influidos por factores ambientales y por la etapa de desarrollo de la planta, así como por el número de *loci* que se pueden explorar. Noyer *et al.* (1997), al realizar un estudio de la variabilidad genética del género *Ananas* a nivel del ADN ribosómico mediante RFLP, encontraron una heterogeneidad importante del género e identificaron seis grupos. Posteriormente, Duval *et al.* (2000) realizaron un estudio de la variabilidad genética en el género *Ananas* y *Pseudoananas* en 313 genotipos del banco de germoplasma del CIRAD FLHOR, Brasil, con RFLP, y detectaron una alta variabilidad entre genotipos.

Otro uso actual de la caracterización genética es la identificación varietal, la cual se puede hacer con mayor rapidez y facilidad con técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como el polimorfismo en el ADN amplificado por secuencias aleatorias (RAPD), así como las intersecuencias simples repetidas (ISSR). Estas técnicas superan las limitaciones de tiempo y costos en comparación con las técnicas que no emplean la PCR, por lo que las técnicas moleculares han resultado altamente informativas en la caracterización de materiales altamente emparentados.

En años recientes se ha reconocido que los marcadores de ADN basados en la PCR son una herramienta poderosa para los análisis genéticos, así como para los programas de mejoramiento por su simplicidad y facilidad de manejo. La técnica de RAPD ha sido la más usada en los últimos años, pese a sus problemas de reproducibilidad y a su carácter dominante. Una técnica molecular novedosa que permite la detección de polimorfismo en *loci* minisatélites, así como microsatélites sin el conocimiento previo de la secuencia de ADN, es la denominada: intersecuencias simples repetidas (ISSR-PCR, o ISSR en inglés, *inter simple sequence repeat*) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) o polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (RAMPs, *random amplified microsatellite polymorphism*) (Wu *et al.*, 1994). Los ISSR se han propuesto como una fuente nueva de marcadores moleculares, porque superan las limitaciones técnicas de los RFLP y RAPD (Ratnaparkhe *et al.*, 1998).

Con respecto al uso de los marcadores moleculares como RAPD o ISSR, no se cuenta con antecedentes de su aplicación en piña. Estos tipos de marcadores han ido cobrando importancia por su aplicación práctica, versatilidad, y por la cantidad de información que pueden proporcionar, particularmente en el caso de los ISSR. La presente investigación se planteó para caracterizar la colección de piña del Banco de Germoplasma del Campo Experimental del Papaloapan, Veracruz mediante este tipo de marcadores, con el propósito de determinar el grado de similitud entre materiales y detectar la posible existencia de duplicados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de esta fase de la investigación se utilizaron 15 materiales del Banco de Germoplasma del Campo Experimental del Papaloapan, Veracruz. Se tomaron por separado hojas jóvenes y visiblemente sanas de cinco plantas representativas de cada uno de los 15 clones a evaluar, se etiquetaron e inmediatamente se almacenaron en hielo, para su posterior traslado al Laboratorio de Marcadores Genéticos Moleculares del Campo Experimental del Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en donde se desarrolló el análisis molecular (Cuadro 1).

Cuadro 1. Relación de materiales de piña conservados en el Banco de Germoplasma del Campo Experimental del Papaloapan INIFAP. Isla, Veracruz.

Nombre	Grupo	Procedencia	Nombre	Grupo	Procedencia
Champak 1	Cayena lisa <sup>1</sup>	Costa Rica	Cabezona	Española roja <sup>1</sup>	Tabasco
MD-2 Primavera	Híbrido <sup>1</sup>	Costa Rica	Silvestre Brasil	<i>A. ananasoides</i> <sup>2</sup>	Brasil
Champak 2	Cayena lisa <sup>1</sup>	Costa Rica	Criolla M.G.	Española roja <sup>1</sup>	Guerrero
Champak 4	Cayena lisa <sup>1</sup>	Honduras	Criolla M.N.	Española roja <sup>1</sup>	Nayarit
Champak 3	Cayena lisa <sup>1</sup>	Costa Rica	Cayena lisa M.	Cayena lisa <sup>1</sup>	Isla, Veracruz
MD-1	Híbrido <sup>1</sup>	Hawái	Kona	Cayena lisa <sup>1</sup>	Hawái
Tricolor	<i>A. bracteatus</i> <sup>2</sup>	Costa de Marfil	Hawái 2	Cayena lisa <sup>1</sup>	Hawái
MD-2 Carmelita	Híbrido <sup>1</sup>	Costa Rica			

<sup>1</sup> comestible; <sup>2</sup> ornamental.

El método de extracción de ADN se aplicó para cada una de las muestras colectadas mediante una modificación al método propuesto por Saghai-Marroof *et al.* (1984). Para ello se tomaron muestras de 400 mg de tejido liofilizado y molido y se extrajeron con una solución amortiguadora CTAB para extracción [100 mM de Tris pH 7.5; 700 mM

de NaCl; 50 mM de EDTA (tetraacetato de etilendiamina) pH 8.0; CTAB (bromuro de alquiltrimetilo de amonio mixto) 1 %; 140 mM de BME ( $\beta$ -mercaptoetanol)], centrifugación a 1500 g, lavado con cloroformo:octanol (24:1), y precipitación del ADN con 100  $\mu$ L de NaCl 0.5 M más 5 mL de EtOH absoluto. Se emplearon 29 iniciadores ISSR (GIBCO, BRL) y 20 iniciadores RAPD (Operon Technologies Inc.). El volumen total de la reacción fue de 20  $\mu$ L. En el caso de ISSR la mezcla de reacción se compuso de: 2  $\mu$ L de buffer 10X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 40 ng de ADN genómico, 2.5 mM de cada dNTP, 1  $\mu$ M de iniciador y 1 unidad de enzima Taq polimerasa. En el caso de RAPD la mezcla comprendió: 2  $\mu$ L de buffer 10X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 40 ng de ADN genómico, 2.5 mM de cada dNTP, 15  $\mu$ M de iniciador y 1 unidad de enzima Taq polimerasa.

La amplificación mediante la reacción en cadena de la ADN-polimerasa (PCR) para los ISSR se hizo en un termociclador Techné PHC 2 enfriado por agua; el programa de amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial de amplificación a 94 °C por 4 min, 35 ciclos 94 °C por 1 min de separación, 52 °C por 1 min de alineación, y 72 °C por 2 min de extensión; y un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 min. En el caso de los RAPD se usó un termociclador MJ Research PTC 225. El programa de amplificación estuvo compuesto por un ciclo inicial de desnaturación de 94 °C durante 4 min; 3 ciclos a 94 °C por 1 min, 36 °C por 1 min y 72 °C por 2 min; 36 ciclos a 94 °C por 10 s, 40 °C por 20 s, y 71 °C por 2 min; y un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 min.

Tanto para los ISSR como para los RAPD, la separación de los fragmentos obtenidos se hizo por electroforesis en un gel de agarosa ultrapura (GIBCO) a 2.0 y 1.5 %, respectivamente, en amortiguador 1X TBE (tris-borato EDTA), la cual transcurrió a 80 volts durante 4 h, después de lo cual se revelaron por tinción con bromuro de etidio a una concentración de 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. La documentación de los productos amplificados se hizo mediante la toma de fotografías instantáneas con una cámara Polaroid instantánea Dyna Tech con filtro naranja. Las bandas observadas para cada iniciador ISSR y cada RAPD se codificaron mediante un código binario, al asignar el valor de 1 a la presencia de una banda y 0 a su ausencia; de esta forma se estableció una matriz de ceros y unos, con la cual se hicieron los análisis correspondientes.

La información sobre las características morfológicas de cada uno de los materiales analizados fue proporcionada por el Banco de Germoplasma del Campo Experimental del Papaloapan, Veracruz (Uriza, D., 2000; Com. perso-

nal)<sup>1</sup>. Las características proporcionadas fueron: altura de planta (cm), cobertura de planta (cm); tamaño (cm), forma (redonda, alargada, triangular) y peso del fruto (kg); presencia o no de espinas, coloración de las hojas, largo y ancho de hojas (cm), longitud del pedúnculo (cm) y resistencia a plagas y enfermedades (resistencia o no).

Con la matriz de ceros y unos obtenida de los datos de los ISSR, los RAPD y los datos morfológicos, se hizo el análisis correspondiente mediante el uso del paquete computacional Sistema de Análisis Multivariado y Taxonómico Numérico (NTSYS-pc) versión 2.02, con el que se realizaron los cálculos de distancias genéticas entre los materiales con el programa de Similitud para datos genéticos (SIMGEND). Posteriormente a esto se construyeron los dendrogramas por el método secuencial aglomerativo jerárquico y de agrupamiento de anidamientos (SAHN Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering Method) (Rohlf, 1993).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis morfológico

A partir de la matriz de distancias genéticas obtenida del análisis (matriz no presentada), se elaboró el dendrograma de la Figura 1, en donde se observó la formación de cinco grupos bien definidos. En el grupo I se ubican los materiales Champaka 1, 2, 3 y 4, mismos que resultaron fenotípicamente iguales; MD-2 Primavera y MD-2 Carmelita, iguales fenotípicamente; MD-1, Cayena Lisa M., que unidos al grupo II con los materiales Kona y Hawaii 2, se distinguen por ser materiales del grupo Cayena, con características de interés para la producción comercial (hojas sin espinas y fruto de buena calidad).

El grupo III se conformó por los materiales del grupo Cabezona, en donde se ubicaron los materiales Criolla M.G. y Criolla M.N., los cuales resultaron morfológicamente iguales, así como el material Cabezona. Estos tres materiales se consideran más rústicos que los del grupo Cayena; sin embargo, pertenecen a la misma especie *A. comosus* y, por consiguiente, están relacionados genéticamente. Los grupos IV y V se formaron con los materiales Tricolor y Silvestre Brasil, que pertenecen a las especies *A. bracteatus* y *A. ananasoides* respectivamente, los cuales son materiales silvestres que se evaluaron en este trabajo y que son los que menor parentesco tienen con el resto de los materiales; su importancia radica en el uso ornamental y a la resistencia a plagas y enfermedades, esta última de interés en los programas de mejoramiento.

<sup>1</sup>Ing. Daniel Uriza Ávila. Investigador Titular del Programa de Piña del INIFAP. Apdo postal 43. CP 91641 Cd. Isla, Veracruz. Tel/fax: 287-216-82

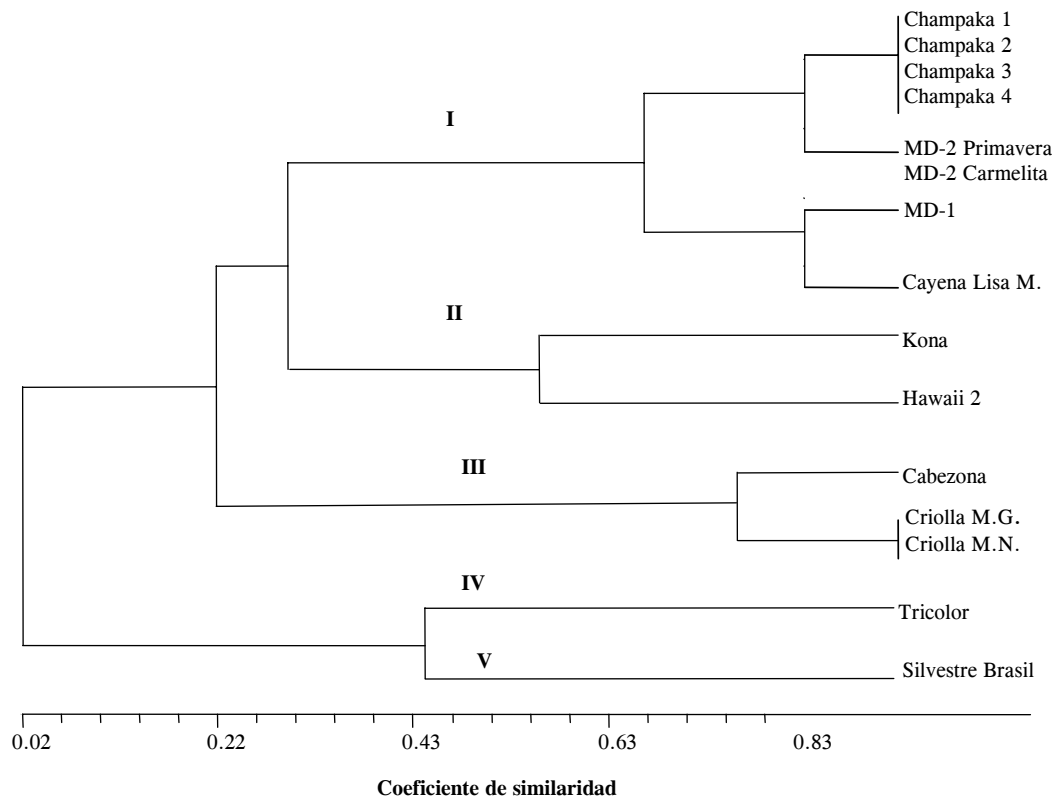


Figura 1. Dendrograma de agrupamiento de 15 materiales de piña (*Ananas spp.*), obtenido a partir de datos morfológicos.

### Análisis mediante ISSR

Se probó el iniciador HVH(CA)<sub>7</sub>T con las tres mejores muestras de cada material que previamente se seleccionaron en el gel de calidad, y con base en esta amplificación se descartó la utilización de más de una muestra por material. No se observó polimorfismo dentro de los materiales, lo cual se puede explicar por el sistema de propagación vegetativa de la piña. Cada una de las muestras colectadas de cada material provienen en su mayoría de una sola planta madre, misma que fue colectada en su centro de origen y propagada vegetativamente para formar el banco de germoplasma, de tal forma que dentro de cada material se cuenta con clones con la misma información genética.

Tanto para el análisis por ISSR como por RAPD se consideraron como bandas polimórficas aquellas que estaban ausentes al menos en uno de los materiales evaluados, de tal forma que aunque una banda estuviera presente en la mayoría de los materiales, si faltaba en sólo uno se consideraba polimórfica. De los 29 iniciadores ISSR probados, 20 fueron los que mayor información y nitidez mostraron. En el Cuadro 2 se presentan los resultados completos. Se obtuvieron 118 bandas en su mayoría polimórficas (75.4 %), y en promedio se produjeron seis bandas por inicia-

dor. Los iniciadores que mayor número de bandas generaron fueron (AG)<sub>8</sub>YC (11 bandas), (AC)<sub>8</sub>YG (11 bandas), (AG)<sub>8</sub>YA (9 bandas) y DBD(AC) (9 bandas), con un porcentaje de polimorfismo de 81.8 %, 81.8 %, 66.6 %. Y 77.7 % respectivamente. Este nivel de polimorfismo es superior al obtenido con isoenzimas por DeWald *et al.* (1992), donde sólo dos sistemas enzimáticos de 37 probados resultaron polimórficos, y superior también a lo encontrado con RFLP por Duval *et al.* (2001), quienes detectaron 43 % de polimorfismo para las sondas que utilizaron. El nivel de polimorfismo aquí detectado puede dar una estimación de la alta variabilidad genética existente entre los diferentes materiales probados. Los materiales que compartieron un mayor número de bandas con el resto de los materiales fueron los pertenecientes al grupo Cayena.

Aunque Wang *et al.* (1994) mencionan que en especies vegetales las secuencias microsatélites más comunes son los dinucleótidos (AT/TA)<sub>n</sub> seguida de las secuencias (GA/CT)<sub>n</sub>, en el caso del genoma de piña las secuencias microsatélites más comunes fueron las de los dinucleótidos (AG/AC)<sub>n</sub>, con base en el número de iniciadores que se amplificaron con estas secuencias y al número de bandas generadas con éstos, seguidos de los dinucleótidos (GT/TG)<sub>n</sub>, lo cual concuerda con lo obtenido en vid

(*Vitis vinifera* L.) por Thomas y Scott (1993), quienes reportan a los dinucleótidos microsatélite (CA/GT)<sub>n</sub> como los más abundantes en el genoma de esta especie.

Una vez analizada la matriz de ceros y unos generada a partir de los datos moleculares de las bandas de ISSR, se obtuvo una matriz de distancias genéticas (no presentada), cuyos valores se encuentran entre 0 y 1; los valores cercanos a 1 significan que son materiales más emparentados genéticamente, mientras que valores cercanos a 0 se refieren a materiales poco emparentados. Este análisis mostró que los materiales más emparentados, con base en sus coeficientes de similitud fueron: Champaka 4/Champaka 1 (0.937), Champaka 4/Champaka 2 (0.929) y Champaka 2/Champaka 1 (0.925). Estos mismos materiales presentaron un mayor número de bandas similares con los diferentes iniciadores utilizados. Los materiales con menores coeficientes de similitud genética fueron: Silvestre Brasil/MD-2 Carmelita (0.255), Criolla de Montaña de Guerrero/Silvestre Brasil (0.298) y Silvestre Brasil/Champaka 3 (0.317). El material Silvestre Brasil es el que presentó menores coeficientes de similitud genéticas, seguido del material Tricolor; ambos materiales se caracterizan por ser silvestres y de uso ornamental, lo que también se vio reflejado en el dendrograma que se derivó de estos coeficientes (Figura 2).

De la matriz de distancias genéticas se derivó el dendrograma mostrado en la Figura 2, el cual se obtuvo por el método de agrupamiento SAHN; en él se agruparon los diferentes materiales de piña analizados con base en los coeficientes de similitud determinadas entre éstos. Los materiales con mayor coeficiente de similitud genética fueron los indicados en el grupo I, que se caracteriza por contar

con los materiales del grupo Cayena lisa, que presenta características morfológicas importantes a nivel comercial. Es importante considerar que los materiales Champaka 3 y MD-2 Carmelita que morfológicamente resultaron iguales a sus homónimos (Champaka 1, 2, 4 y MD-2 Primavera), en el dendrograma generado a partir de datos moleculares (ISSRs) presentaron otro acomodo con respecto a éstos.

El grupo II se formó solamente con el material Cabezona el cual separa a los materiales del grupo Española roja de los del grupo Cayena. El grupo III, formado por los materiales Criolla M.N. y Criolla M.G., que pertenecen a Española roja, se caracteriza por incluir plantas más rústicas que los materiales del grupo Cayena; sin embargo, se encuentran emparentados genéticamente ya que ambos grupos pertenecen a *A. comosus*. Los grupos IV y V se formaron por los materiales más rústicos: el material Silvestre Brasil (*A. ananasoides*) y el material Tricolor procedente de Costa de Marfil (*A. bracteatus*).

### Análisis RAPD

De los 20 iniciadores decámeros, 12 fueron útiles para el propósito del trabajo. El resto se descartó por no tener buena resolución o no detectar polimorfismo. En el Cuadro 3 se presentan los resultados del polimorfismo detectado para cada iniciador. En total se generaron 82 bandas, de las cuales 63.4 % fueron bandas polimórficas (Cuadro 3). Los iniciadores W-06 (15 bandas), T-08 (14 bandas), Z-20 (12 bandas), R-13 (8 bandas) fueron los que generaron mayor número de bandas, con porcentajes de polimorfismo por iniciador de 66.6 %, 71.4 %, 66.6 %, y 50 %, respectivamente, y en promedio generaron seis bandas por

Cuadro 2. Nivel de polimorfismo obtenido con 20 iniciadores ISSR en 15 materiales de piña (*Ananas spp.*).

Iniciador 5'-----3' <sup>†</sup>	Número de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)	Iniciador 5'-----3' <sup>†</sup>	Número de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
HVH(TG) <sub>7</sub> T	6	4	66.6	(CT) <sub>8</sub> RC	8	6	75.0
WHVG(TG) <sub>7</sub>	4	2	50.0	(GT) <sub>8</sub> YA	4	3	75.0
BDB(TCC) <sub>5</sub>	6	4	66.6	(GT) <sub>8</sub> YC	4	3	75.0
VIVII(TCC) <sub>5</sub>	8	6	75.0	(GT) <sub>8</sub> YG	2	2	100.0
(CA) <sub>8</sub> RY	2	1	50.0	(AG) <sub>8</sub> RA	4	3	75.0
(AG) <sub>8</sub> YA	9	6	66.6	DBD(AC) <sub>7</sub>	9	7	77.7
(CA) <sub>8</sub> RT	5	4	80.0	(AG) <sub>8</sub> C	5	3	60.0
(CA) <sub>8</sub> YT	7	7	100.0	(GA) <sub>8</sub> C	7	6	85.7
(AG) <sub>8</sub> YC	11	9	81.8	(AG) <sub>8</sub> C	4	3	75.0
(AC) <sub>8</sub> YG	11	9	81.8	(AG) <sub>8</sub> T	2	1	50.0
Total	118	89	75.4				

<sup>†</sup> R = Ancla residuos de Purina; Y, para Pirimidina; B, para cualquiera menos Adenina; D, para cualquiera menos Citosina; H, para cualquiera menos Guanina; V, para cualquiera menos Timina; A, adenina; T, Timina; C, Citosina y G, Guanina.

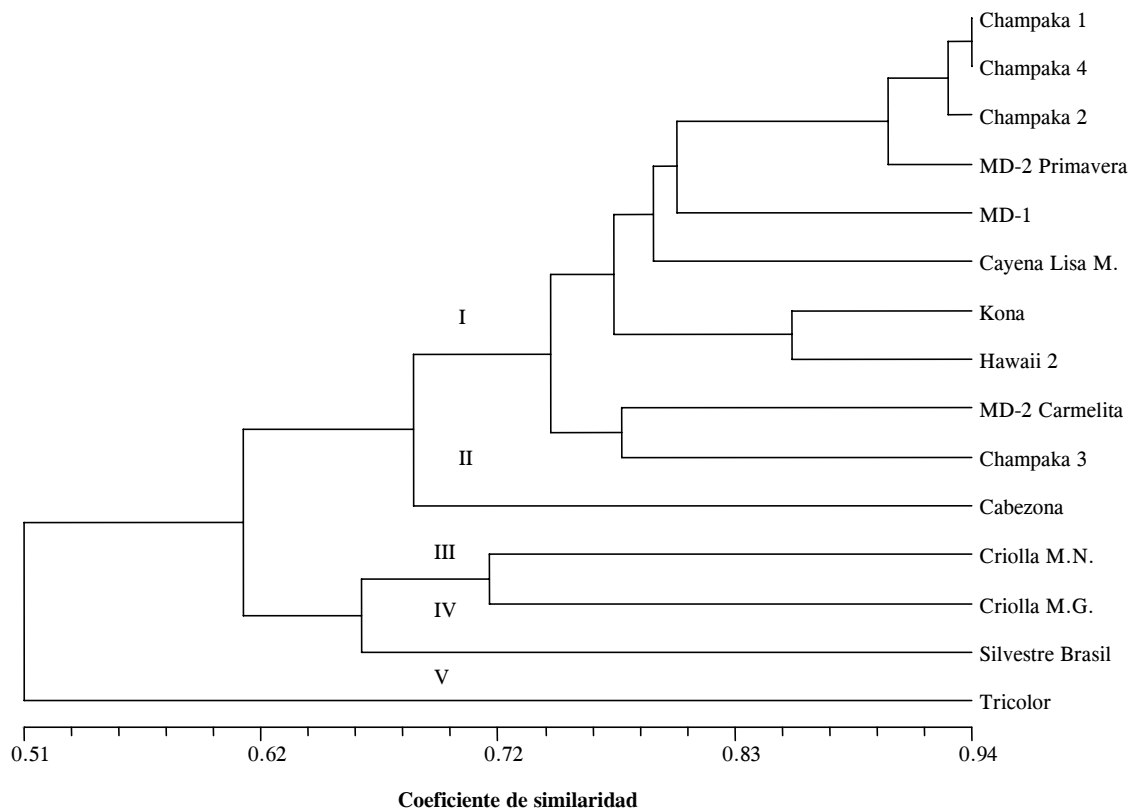


Figura 2. Dendrograma de agrupamiento de 15 materiales de piña (*Ananas spp.*), obtenido a partir de los datos moleculares de 20 iniciadores ISSR.

iniciador. El número de bandas promedio por iniciador resultó muy similar a lo obtenido para ISSR; es importante considerar que los iniciadores ISSR utilizados no fueron específicos para la piña, y pese a ello existió un alto grado de polimorfismo por iniciador. En cuanto al nivel de polimorfismo, los RAPD resultaron menos informativos que los ISSR (63.4 % contra 75.4 %). Esto concuerda con lo que se reporta en la literatura, ya que diferentes autores mencionan a que los ISSR superan a RAPD en cuanto al nivel de polimorfismo generado (Ratnaparkhe *et al.*, 1998).

El análisis de distancias genéticas mostró que los materiales con mayor coeficiente de similitud genética fueron: Champaka 4/Champaka 2 (0.965), Champaka 4/Champaka 1 (0.911) y Champaka 2/Champaka 1 (0.876), lo que era de esperarse porque se consideran materiales morfológicamente iguales. Los materiales que presentaron coeficientes de similitud genéticas menores fueron: Tricolor/MD-2 Carmelita (0.009), Tricolor/MD-2 Primavera (0.37) y Tricolor/MD-1 (0.040), similar a lo obtenido mediante ISSR.

Cuadro 3. Nivel de polimorfismo obtenido con 12 iniciadores RAPD en 15 materiales de piña (*Ananas spp.*).

Código	Secuencia 5'→3'	Total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
L-11	ACGATGAGCC	5	3	60.0
M-06	CTGGGCAACT	4	3	75.0
N-02	ACCAGGGGA	1	1	100
N-12	CACAGACACC	2	2	100
R-10	CCATTCCCCA	2	1	50.0
R-13	GGACGACAG	8	4	50.0
T-08	AACGGCGACA	14	10	71.4
W-03	GTCCGGAGTG	8	4	50.0
W-06	AGGCCCGATG	15	10	66.6
X-9	GGTCTGGTTG	4	2	50.0
Z-19	GTGCGAGCAA	7	4	57.1
Z-20	ACTTTGGCGG	12	8	66.6
Total	12	82	52	63.4

Con la matriz de distancias genéticas (matriz no presentada) se hizo el dendrograma por el método de agrupamiento de SAHN (Figura 3), en el que se presenta la formación de cinco grupos. En el más grande (Grupo I) se encuentran los materiales con un alto grado de parentesco debido a que todos pertenecen al grupo Cayena. El grupo II, formado sólo por los materiales Criolla de Montaña de Nayarit y Criolla de Montaña de Guerrero respectivamente, junto con el material Cabezona grupo III, pertenecen al

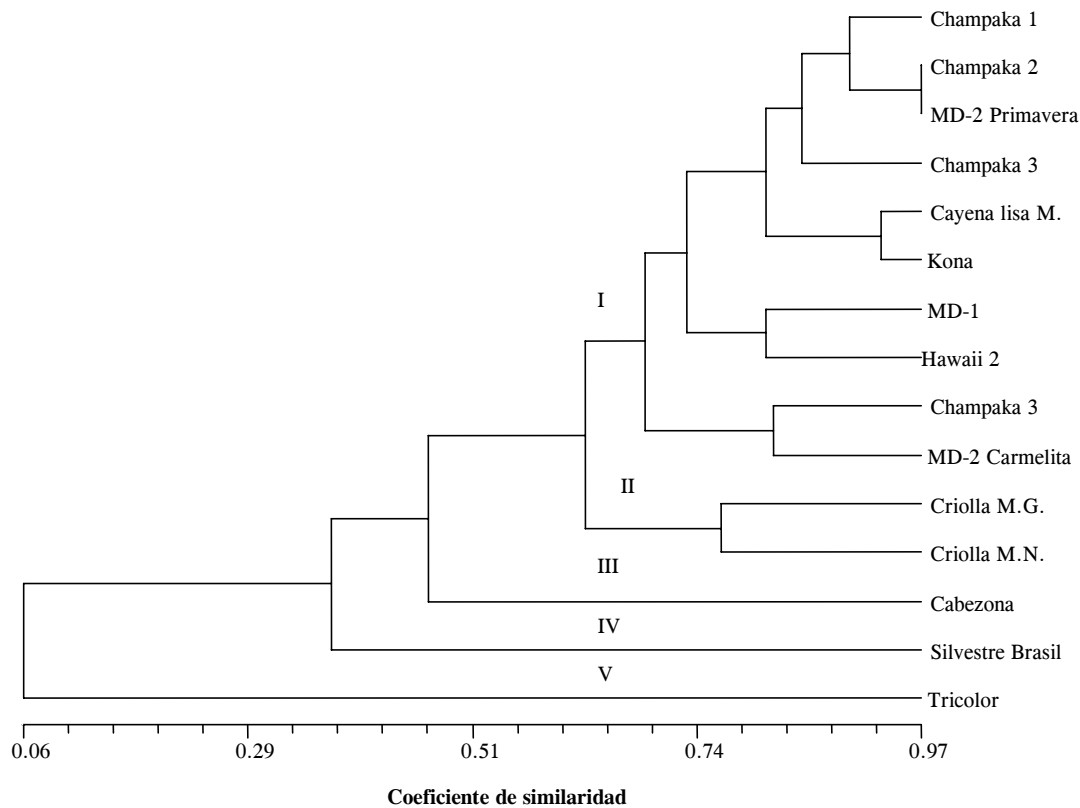


Figura 3. Dendrograma de agrupamiento de 15 materiales piña (*Ananas spp.*), obtenido a partir de datos moleculares de 12 iniciadores RAPD.

grupo de materiales Española roja (Cuadro 1). Los materiales silvestres nuevamente se ubicaron en los grupos finales del dendrograma grupos IV y V, con los materiales Silvestre Brasil y Tricolor.

En los dos tipos de análisis moleculares (RAPD e ISSR), se encontraron resultados similares en los coeficientes de similitud genética obtenidos, así como en el ordenamiento de los dendrogramas. Dichos resultados indican que no existieron materiales repetidos, ya que no hubo dos materiales que tuvieran exactamente las mismas bandas; también indica alta variabilidad entre los materiales estudiados. Los análisis por separado de ISSR y RAPD, fueron similares en cuanto al arreglo de los materiales en sus respectivos dendrogramas. En éstos se observa una tendencia a formar un grupo compacto con los materiales más emparentados entre sí, como es el caso de los materiales del grupo Cayena. El arreglo continuó con los materiales del grupo Cabezona, como son la Criolla M.G., Criolla M.N. y la misma Cabezona, pertenecientes también a *A. comosus*, pero del subgrupo Española roja. Finalmente, los materiales silvestres Tricolor y Silvestre Brasil quedaron ubicados de tal forma que el arreglo obtenido con las características morfológicas concuerda parcialmente con éstos,

pues en el caso de los materiales que pertenecen a *Ananas comosus*, sobre todo en aquellos que morfológicamente resultaron iguales, se presentó una mayor variabilidad entre ellos que la detectada con datos morfológicos.

La cantidad de polimorfismo observado entre los materiales, sobre todo entre aquéllos que se sospechaban iguales (v.g. Champaka 1, 2, 3 y 4; Criollas de Montaña de Nayarit y Guerrero; MD-2 Carmelita y MD-2 Primavera), se puede atribuir a la clasificación basada en características morfológicas, que según Py *et al.* (1984), las condiciones ambientales, nutrición, estado de desarrollo de las plantas, densidad de plantación e incluso el ataque de plagas y enfermedades, influyen en la expresión de las características morfológicas, anatómicas y fisiológicas de la piña, lo que da como resultado materiales muy parecidos, incluso iguales fenotípicamente; pero que a nivel genético estos materiales son diferentes e incluso poco relacionados. Estos mismos autores mencionan que la tasa de mutación en piña es un factor relevante que incide en la variabilidad genética del género.

Otra explicación a los resultados obtenidos es la amplia variabilidad existente entre los materiales, debido

principalmente a la autoincompatibilidad de la piña, fenómeno que ha favorecido los cruzamientos y ha conducido a un alto nivel de heterocigosis. Esto concuerda con DeWald *et al.* (1992) y Mallikarjuna *et al.* (1994), quienes reportaron una amplia variabilidad en *A. comosus*. Otra fuente de variabilidad genética en piña es la que se obtiene por variación somaclonal, que según Wakasa (1989) es muy común en plantas de piña generadas a partir de cultivo de tejidos. Una posible variación somaclonal puede explicar los resultados obtenidos en cuanto al material MD-2 Carmelita generado por micropropagación, el cual molecularmente no se agrupó con la MD-2 Primavera aunque morfológicamente resultaron iguales.

Estos resultados pueden ser el punto de partida para el desarrollo de estrategias de conservación de los materiales evaluados, debido a que fueron diferentes entre sí. Sin embargo, es necesaria la caracterización de la variabilidad genética de un mayor número de materiales para así tener una referencia mayor del grado de similitud genética entre materiales del género *A. comosus* y otras especies de *Ananas*. De igual forma, las diferencias obtenidas en relación con los resultados del análisis morfológico pueden corroborarse mediante una caracterización morfológica más completa.

### CONCLUSIONES

Los análisis por RAPD e ISSR permitieron detectar una alta variabilidad genética entre los materiales de piña evaluados, sobre todo en los pertenecientes a *A. comosus*, de modo que no se encontraron duplicados entre los genotipos y por tanto se pueden conservar como materiales individuales en el banco de germoplasma. Las diferencias moleculares encontradas con respecto a las características morfológicas, se atribuyen a la heterocigosis de la especie, al número reducido de repeticiones por individuo, y a las variables morfológicas que no se evaluaron, y en menor grado a la tasa de mutación, variaciones somaclonales y los efectos ambientales que influyen sobre esta variabilidad. Tanto los RAPD como los ISSR permitieron detectar polimorfismo en los materiales de piña, sobre todo con los ISSR.

### BIBLIOGRAFÍA

- Aradhya M K, F Zee, R M Manshardt (1994) Isozyme variation in cultivated and wild pineapple. *Euphytica* 79:87-99.
- Castillo T R O (1996) La biotecnología en la conservación y usos de la agro-biodiversidad. INIAP. Chile 6:5-17.
- DeWald M G, G A Moore, W B Sherman (1992) Isozymes in *Ananas* (Pineapple): genetics and usefulness in taxonomy. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117:491-496.
- Duval M F, G C d'Eeckenbrugge, F R Ferreira, L B Bianchetti, J R S Cabral (1997) First results from joint EMBRAPA-CIRAD *Ananas* germplasm collecting in Brazil and French Guyana. *Acta Hort.* 425:137-144.
- Duval M F, J L Noyer, P Hamon, G C d'Eeckenbrugge (2000) Study of variability in the genera *Ananas* and *Pseudoananas* using RFLP. *Acta Hort.* 529:123-131.
- Duval M F, J L Noyer, X Perrier, G Coppens d'Eeckenbrugge, P Hamon (2001) Molecular diversity assessed by RFLP markers. *Theor. Appl. Gen.* 102:83-90.
- Hume H H, H H Miller (1904) Pineapple culture II. Varieties. *Bull. Fla. Agr. Exp. Sta.* 79:37-62.
- Lanaud C, V Lebot (1995) Molecular techniques for increased use of genetic resources. In: *Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources*. Report of an IPGRI Workshop 9-11 October 1995. Rome, Italy. pp:92-97.
- Mallikarjuna K A, F Zee, R M Manshardt (1994) Isozyme variation in cultivated and wild pineapple. *Euphytica* 79:87-99.
- Noyer J L, C Lanaud, G C d'Eeckenbrugge, M F Duval (1997) RFLP study on rDNA in *Ananas* genus. *Acta Hort.* 425:153-160.
- Py C (1970) La Piña Tropical. Editorial Blume, Madrid. 568 p.
- Py C, J J Laccouilh, C. Teisson (1984) L'ananas, sa culture, ses produits. París: G.P. Maisonneuve et Larose et A.C.C.T. 562 p.
- Ratnaparkhe M B, M Tekeoglu, F J Muehlbauer (1998) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as useful for finding markers associated with disease resistance genes clusters. *Theor. Appl. Gen.* 97:515-519.
- Rohlf J F (1993) NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exceter Softwer, New York. 157 p.
- Saghai-Maroo M A, K Soliman, R A Jorgensen, R W Allard (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:8014-8018.
- Smith L B, R J Downs (1979) Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. The New York Botanical Garden, Monograph 14 part 3. 357 p.
- Thomas M R, N S Scott (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Gen.* 86:985-990.
- Wakasa K (1989) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 5 Trees II. Y P S Bajaj. (ed). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp:13-29.
- Wang Z, J L Weber, G Zhong, S D Tanksley (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Gen.* 88:1-6.
- Wu K, R Jones, L Danneberger, P A Scolnik (1994) Detection of microsatellite polymorphism without cloning. *Nucleic Acids Res.* 22:3257-3258.
- Zietkiewicz E, A Rafalski, D Labuda (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.