

Caracterização Molecular de Abacaxizeiro Visando o Desenvolvimento de Produtos Tecnológicos Biodegradáveis

Jéssica Cristine Guimarães Passos Amaral¹, Edímille Vívian Batista Menezes Ramalho¹, Rangeline Azevedo da Silva¹, Francielle Nunes de Almeida¹, Fernanda Vidigal Duarte Souza², Cláudia Fortes Ferreira².

Resumo

As fibras naturais têm emergido como uma alternativa de baixo custo, pouco peso e com um apelo ambiental superior a outros materiais usados na indústria, substituindo, principalmente as fibras de vidro e gerando um impacto ambiental significativamente menor. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre 23 acessos de abacaxizeiro, pertencentes ao BAG-Abacaxi da Embrapa-CNPMF, contrastantes para a característica de textura de fibra, utilizando marcador molecular do tipo ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*). A menor distância entre os acessos foi de 0,29 entre os acessos BGA690 e BGA119 e a maior, 0,95, entre os acessos BGA83 e BGA25 e entre HB750 x 128 e BGA83. Os marcadores ISSRs foram eficientes em separar os acessos quanto à textura da coroa. Portanto, existe variabilidade genética entre os acessos avaliados, o que demonstra o grande potencial deste germoplasma para uso no melhoramento genético.

Introdução

A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui um total de 670 acessos do gênero *Ananas* e outras bromeliáceas, sendo considerada a maior coleção de abacaxizeiro e espécies afins do mundo (Cabral et al., 2004). A variabilidade genética do gênero *Ananas* é ainda muito pouco explorada, apesar do potencial que essas plantas possuem para a geração de diversos produtos (Souza et al., 2010). Estudos voltados para o uso de fibras, entretanto, ainda não foram realizados e o potencial para a identificação de fibras de qualidade e que abarquem todas as propriedades necessárias para seu uso na indústria, pode ser melhor explorado.

As fibras naturais apresentam propriedades superiores em relação a outras fibras, como resistência mecânica, combustibilidade, estabilidade dimensional e o fato de serem biodegradáveis (Leão et al., 2000). Dessa forma, um dos desafios no desenvolvimento de materiais é a obtenção de compósitos poliméricos, utilizando fibras vegetais adicionadas a polímeros provenientes de fontes renováveis (matrizes poliméricas biodegradáveis) como, por exemplo, o poli(ácido láctico) (PLA), poliésteres, poliamidas, poliuretanas provenientes de óleos vegetais, o polietileno “verde” (PEAD) e os polímeros à base de amido termoplástico. Os reforços de fibras vegetais podem contribuir com o aumento das propriedades mecânicas, tais como módulo elástico e resistência à tração, quando adicionados aos polímeros, obtendo-se compósitos. Dentre as fibras vegetais usadas, a fibra do curauá, um abacaxi, se destaca por sua qualidade e já vem sendo usada na indústria automobilística (Leão et al., 2000).

O potencial de uso dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas é bastante amplo, destacando-se a identificação e discriminação de genótipos, proteção de cultivares, avaliação de linhagens pela previsão da produtividade de seus híbridos, alocação de linhagens em grupos heteróticos, certificação de pureza genética, monitoramento de cruzamentos, caracterização de germoplasmas, estudos de diversidade e distância genética, dentre outros. O marcador molecular utilizado para o estudo da variabilidade genética no presente estudo foi o ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*). Esses marcadores não requerem informações prévias de seqüências de DNA da espécie-alvo, produzem fragmentos com grande reprodutibilidade, quando comparados a outros marcadores com base em PCR não-específico como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Wolfe & Liston, 1998).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre 23 acessos de abacaxizeiro, pertencentes ao BAG-Abacaxi da Embrapa-CNPMF, utilizando marcadores do tipo ISSR. Os marcadores ISSRs foram capazes de separar a maioria dos acessos quanto à textura da coroa demonstrando existir variabilidade genética entre os acessos a ser estudada. Essa avaliação inicial servirá de base para a próxima etapa que visa correlacionar bandas de ISSRs com fibras de alta resistência termogravimétrica, dentre outras características

¹Estudantes de Graduação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, respectivos e-mails:

jessica.cgpa91@gmail.com, viih_viih@hotmail.com, rangeazevedo@hotmail.com, fran_nual_@hotmail.com

²Pesquisador da Embrapa de Mandioca e Fruticultura, respectivos e-mails: fernanda@cnpmf.embrapa.br, claudiaf@cnpmf.embrapa.br

desejáveis na formulação de compostos poliméricos visando o desenvolvimento de produtos tecnológicos biodegradáveis. Os resultados desse trabalho irão somar aos trabalhos em paralelo de forma a possibilitar o estabelecimento das bases para o melhoramento genético de abacaxi voltado para fibras de qualidade para indústrias diversas.

Material e Métodos

Foram avaliados 23 acessos do BAG-abacaxi- Embrapa Mandioca e Fruticultura, a citar: *Ananas comosus* var. *ananassoide* (BGA315, BGA174), *Ananas comosus* var. *bracteatus* (BGA119, BGA690), *Ananas comosus* var. *erectifolius* (BGA739, BGA804), *Ananas comosus* var. *comosus* (BGA137, BGA380), *Ananas macrodentes* (BGA81, BGA83), *Neoglaziovia variegata* (BGA808) e dois híbridos de curauá (BGA 750 x BGA 128 e BGA 526 x BGA 804) (material cedido pelo CPATU), bem como os matérias, 129, 751, 755, 776, Híbrido 804 e cinco materiais de folha lisa (378, 385, 324, 325 e 25).

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Após a quantificação, a concentração das amostras foi ajustada para $2,5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ por meio da diluição destas em tampão TE, a fim de realizar as reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Foram utilizados um total de 6 primers ISSRs em reações de PCR contendo os seguintes reagentes: 12,5 ng de DNA, 2,5 mM de MgCl_2 , 1,5 mM de cada dNTPs, $0,3 \mu\text{M}$ de cada primer e 1,0 U de *Taq* em tampão 10x em volume final de $15 \cdot \text{L}$. Os seguintes ciclos foram utilizados para a amplificação em termociclador MyCycler Thermocycler (BioRad): 94°C por três minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 45 segundo, 48°C , ou 50°C (dependendo de cada primer) por 40 segundos e 72°C por um minutos, com uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram revelados em gel de agarose 2 % (p/v), durante 3 horas. Utilizou-se padrão de peso molecular de 50 pb para análise dos fragmentos. O gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), visualizado em transiluminador com luz UV (UVITEC, Modelo SXT 40 M) e fotografado em sistema fotodocumentação (Vilber Lourmat).

Os fragmentos em gel de agarose 2 % foram computados como presença (1) e ausência (0) e a matriz de dissimilaridade gerada utilizando-se o índice do complemento de Jaccard pelo programa GENES (Cruz, 2003). A análise de agrupamento foi conduzida pelo método UPGMA (*Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e o dendrograma construído pelo programa Statistica (Statistica, 2000).

Resultados e Discussão

Os seis primers de ISSR amplificaram um total de 70 bandas polimórficas (nenhuma banda monofórmica). O padrão de bandejamento do primer ISSR-2 está apresentado na Figura 1.

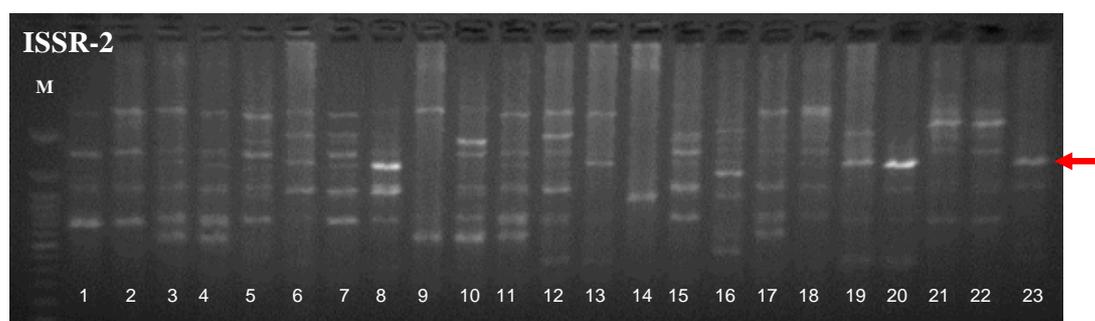


Figura 1. Padrão de bandejamento em gel de agarose 2% com o *Primer* ISSR-2.. 1 – BGA315, 2-BGA174, 3-BGA119, 4-BGA690, 5-BGA759,6-BGA804, 7-BGA137, 8-BGA380, 9-BGA81, 10-BGA83, 11-BGA808, 12-Hib750 x 128, 13-BH526 x 804, 14-BGA129, 15-BGA751, 16-BGA755, 17-BGA776, 18-BGA804H, 19-BGA378, 20-BGA385, 21-BGA324, 22-BGA325, 23-BGA25. M= Marcador ladder 50 pb (Invitrogen). Seta vermelha = banda polimórfica.

O dendrograma baseado nas informações obtidas pelos ISSRs separou os acessos em 5 grupos (G) maiores (ponto de corte definido de acordo com os critérios propostos por Mingoti 2005) (Figura 2).

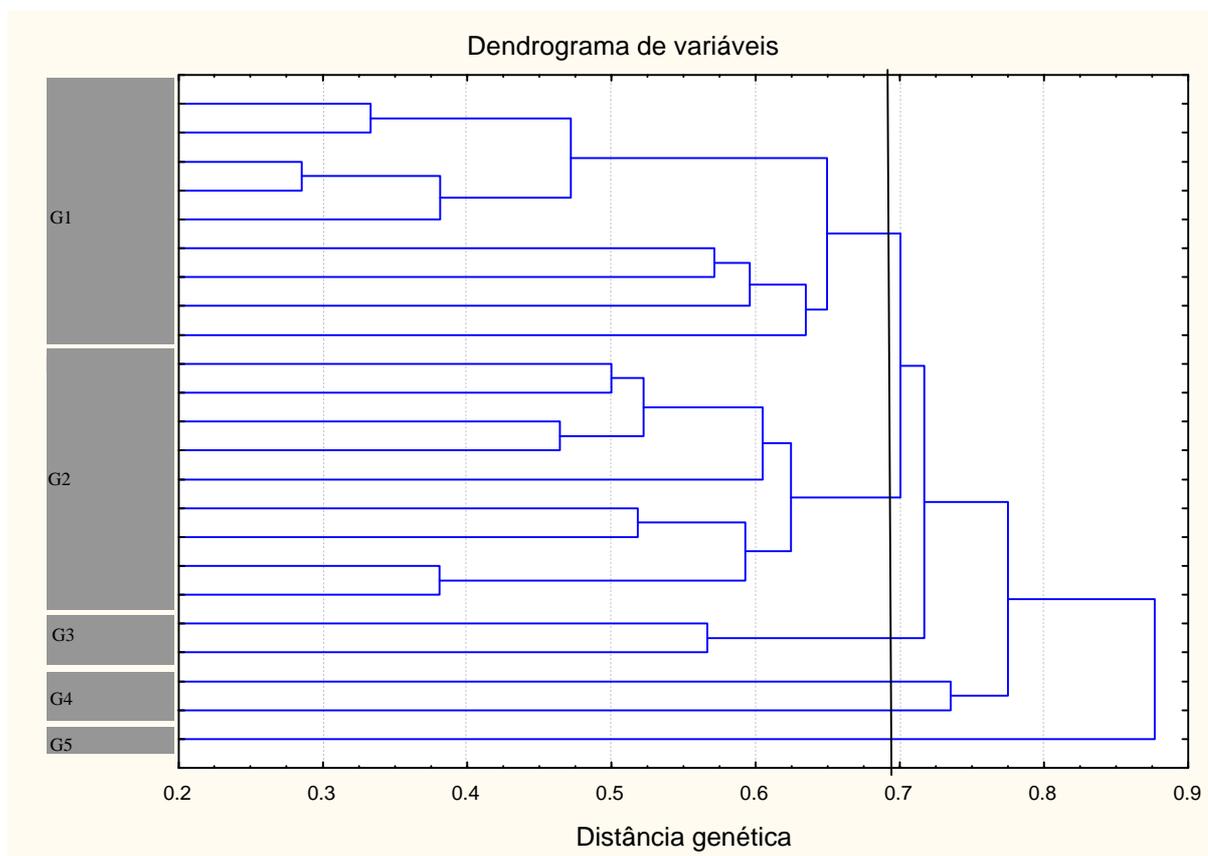


Figura 2. Dendrograma construído a partir de 70 bandas polimórficas provenientes de marcadores ISSRs utilizando-se o método UPGMA de agrupamento pelo programa STATISTICA (Statistica, 2002). (Melhorar a Figura 2 com os nomes dos acessos)

O valor da correlação cofenética foi de 0.78**, considerado ideal, uma vez que de acordo com Vaz Patto et al. (2004), $r > 0,56$, já reflete uma boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento. De acordo com os valores da matriz de dissimilaridade, os acessos mais próximos foram o BGA690 e BGA119 (ambos *Ananas comosus* var. *erectifolius*), com distância de 0.29. Os acessos mais distantes foram o BGA83 e BGA25 (um acesso com potencial para uso da fibra e o outro um controle-fibras lisas) e HB750 x 128 e B83 (um acesso caruá e um controle, fibras lisas), com distância de 0.95. As distâncias, tanto a menor quanto a maior refletem bem as características dos materiais. Em relação aos grupos, o primeiro grupo conseguiu reunir todos os acessos sendo estudados quanto às características desejáveis de fibras para uso na formulação de compostos poliméricos visando o desenvolvimento de produtos tecnológicos biodegradáveis, a citar BGA315, BGA174, BGA119, BGA690, BGA808, BGA739, BGA137, BGA83 e BGA380. O grupo dois foi formado pelos acessos: HIB750x128, BGA385, BGA378, BGA25, BGA776, B804H, BGA324 e BGA325. Nesse grupo encontram-se alguns controles (fibra lisa), como o acesso B25, B324, B378, B385, refletindo mais uma vez uma concordância com as características morfológicas observadas. Já o grupo 3, formado pelos acessos H526x804 e H804, demonstra a proximidade do híbrido e seu parental, o grupo 4 formado por mais dois acessos promissores e o grupo 5 formado apenas pelo acesso 129, também promissor.

Os marcadores ISSRs foram eficientes em mostrar que existe variabilidade genética entre os acessos de abacaxizeiro avaliados. Sendo assim, estes marcadores poderão ser úteis em estudos de correlação com

características associadas a fibras com características desejáveis na formulação de compostos poliméricos, visando o desenvolvimento de produtos tecnológicos biodegradáveis. Vale ressaltar que os estudos de termogravimetria estão sendo conduzidos nos mesmos acessos de forma a subsidiar novas informações para o estudo de correlação e melhoramento genético da cultura.

Agradecimentos

À Embrapa pelo financiamento do projeto e da bolsa de iniciação científica.

Referências

Cabral JRS, Ferreira FR, Matos AP, Sanches NF. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas. Embrapa – CNPMF, 2004. 30p. (Documentos, 80).

Cruz CD (2003) **Programa GENES**, Versão Windows (2003.0.0). UFV, Viçosa, Brasil.

Doyle JJ, and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus 12**:13-15.

Guimarães CT, Moreira MA (1999) **Genética Molecular aplicada ao melhoramento de plantas**. In: Borém, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p.715-740.

Leão AL, Caraschi JC and Tan IH. Curauá fiber- A tropical natural fiber from Amazon - potential and applications in composites. In: **Natural polymers and agrofibers composites**, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, p.257-272. 2000.

Mingoti SA (2005) **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**, Editora UFMG, Belo Horizonte, 295p.

Statistica (2002) STATISTICA for Windows v. 6.0: Computer Program Manual. Editora StatSoft Inc. Tulsa, UK (CD-Rom).

Souza EH. **Pré-melhoramento e avaliação de híbridos de abacaxi e banana para fins ornamentais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010, 156p.

Vaz patto MC, Satovic Z, Pêgo S, Fevereiro P (2004) Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica 137**: 63-67

Wolfe AD, Liston A. **Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology**. In: SOLTIS, D.E.;SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). Molecular systematics of plants II: DNA sequencing. Boston: Kluwer, 1998. p.43-86.