

XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA  
22 a 26 de outubro de 2007

ANÁLISE MOLECULAR DE CULTIVARES DE *Solanum tuberosum* L. POR MEIO  
DE MARCADORES RAPD.

ELIZÂNGELA ALMEIDA ROCHA<sup>1</sup>; LUCIANO VILELA PAIVA<sup>2</sup>; CLAUDIA TEIXEIRA  
GUIMARÃES<sup>3</sup>; EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA<sup>4</sup>; HUMBERTO HENRIQUE DE  
CARVALHO<sup>5</sup>

**RESUMO**

A batata é a terceira fonte de alimento da humanidade, após arroz, trigo e seguida pelo milho. A correta, rápida e segura identificação de cultivares de batata é essencial para a pesquisa e comercialização do tubérculo. A análise de diversidade foi avaliada entre 16 cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L). O DNA foi extraído utilizando o protocolo CTAB com adaptações e amplificado utilizando marcadores RAPD. Um total de 25 *primers* RAPD geraram 92 bandas polimórficas que foram suficientes para determinar a divergência genética e agrupar as cultivares em estudo. A partir de 75 bandas polimórficas a correlação entre as matrizes de distância aproximou-se de 1, a soma dos quadrados dos desvios foi inferior a 0,2 e o valor do estresse foi 0,045. O agrupamento com base no método UPGMA, produziu um dendograma o qual permitiu uma clara separação genética das cultivares. Esse agrupamento é considerado de alta confiabilidade, uma vez que o valor de correlação cofenética ( $r_c$ ) ou teste de Mantel foi de 0,86.

**Palavras-chave:** batata, diversidade genética, UPGMA.

**ABSTRACT**

Potato is the third food source of the humanity, after rice, wheat and followed by the maize. Correct, fast and the insurance identification to cultivate of potato is essential for the research and commercialization of the tubercle. The diversity analyses was evaluated in 16 cultivar of potatoes (*solanum tuberosum* L). The DNA was extracted using the protocolo CTAB with adaptations and amplified using markers RAPD. A grand total o 25 primers RAPD generated 92 polymorphic bands which were enough to determine the genetic divergence and group the cultivars in study. From 75 polimorfic bands the correlation enters the distance matrices was come close to 1, the addition of the squares of shunting lines was inferior the 0,2 and the value of estresse it was 0,045. The grouping with base in method UPGMA, produced a dendogram which permitted a clear genetic division in the cultivar. This grouping is considered of high trustworthiness, a time that the value of cofenetic correlation ( $r_c$ ) or test of Mantel was of 0,86.

**Key-Words:** Potatoes, Genetic diversity, UPGMA

<sup>1</sup> Mestranda em Agronomia/Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras – MG, [almeida.elizangela@gmail.com](mailto:almeida.elizangela@gmail.com)

<sup>2</sup> DS, Professor Associado do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras – MG, [luciano@ufla.br](mailto:luciano@ufla.br)

<sup>3</sup> DS, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, [claudia@cnpmis.embrapa.br](mailto:claudia@cnpmis.embrapa.br)

<sup>4</sup> Mestranda em Agronomia/Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras – MG, [evaniafloresta@hotmail.com](mailto:evaniafloresta@hotmail.com)

<sup>5</sup> Mestrando em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras – MG, [humberto\\_henriquec@yahoo.com.br](mailto:humberto_henriquec@yahoo.com.br)

**XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
22 a 26 de outubro de 2007

## **INTRODUÇÃO**

A batata pertence à família *Solanaceae*, ao gênero *Solanum*, sendo a espécie *Solanum tuberosum* mais cultivada mundialmente. A batata é a terceira fonte de alimento da humanidade, após arroz, trigo e seguida pelo milho. É cultivada em todo o mundo, e em alguns países o seu consumo está em torno de 75 - 95 kg per capita/ano (Fontes, 2005).

A correta, rápida e segura identificação de cultivares de batata é essencial para a pesquisa e comercialização do tubérculo (Ford & Taylor, 1997). Os avanços nas técnicas moleculares têm possibilitado o estudo da variabilidade genética em nível de DNA, o que tem aumentado significativamente a precisão para avaliar a diversidade genética e a identificação de cultivares.

Atualmente, os marcadores moleculares são as principais ferramentas em estudos de diversidade genética, localização de genes de interesse econômico e construção de mapas genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Assim, os marcadores moleculares por apresentarem uma alta resolução e confiabilidade para a identificação de cultivares têm sido aplicados para caracterização genética de batatas (Ford & Taylor, 1997).

Dentre os vários marcadores moleculares, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido usado em estudo genético de batata para diferenciação e identificação de cultivares, variação clonal e ainda, para avaliar a diversidade genética e a relação entre espécies de batata nativa e cultivada (Demeke *et al.*, 1996). Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a divergência genética entre 16 cultivares de batatas francesas por meio de marcador RAPD.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para a realização deste trabalho foram utilizados tubérculos de 16 cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) fornecidas pela Empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda. Foram plantados, em casa de vegetação, 3 tubérculos de cada cultivar: Atlantic, Cupido, Monalisa, Isabell, Florice, Floriane, Chipie, Éden, Ágata, Oceania, Castelline, Mondial, Asterix, Colorado, Naturella e Emeraude, para a obtenção de folhas.

Folhas jovens foram coletadas e imediatamente foi realizada a extração do DNA utilizando o método CTAB, proposto por Murray & Thompson (1980), com adaptações, no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras. As reações de RAPD foram preparadas em 12µL de volume total, contendo 10ng de DNA, 0,6U de Taq DNA polimerase, 20nmol/L Tris-HCl pH 8,4, 10 µmol/L de dNTPs e 10 µmol/L de *primers*. O programa utilizado no termociclador (modelo Mastercycler) para as reações de

**XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA**  
22 a 26 de outubro de 2007

RAPD foi o seguinte: uma desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguido por desnaturação 94 °C por 10 segundos, anelamento a 36 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Os passos da desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 34 vezes e, em seguida, a reação foi finalizada por uma extensão a 72 °C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) e visualizados sob luz ultravioleta e sua imagem foi captada pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®).

Foi montada uma matriz fenotípica composta de 0 e 1, representando a ausência e a presença de bandas fortes, respectivamente. A similaridade genética foi estimada para cada par de genótipos pelo coeficiente de Jaccard (Anderberg, 1973) utilizando o programa NTSYS pc 2.1 (Rohlf, 2000).

O número ótimo de marcadores RAPD polimórficos foi analisado por meio de *bootstrap* utilizando 10.000 reamostragens e números crescentes de marcadores (1, 3, 5,..., 28), até atingir o número total de bandas, por meio do programa GENES (Cruz, 2001). O número ideal de bandas polimórficas foi considerado quando o valor de estresse assumiu valor menor que 0,05 (Kruskal, 1964).

A representação gráfica das distâncias genéticas entre as cultivares foi realizada pela construção de dendrogramas pelo método de agrupamento UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average* (Sneath & Sokal, 1973), utilizando o software NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000). A consistência do agrupamento foi avaliada por meio da correlação cofenética, denominado teste Z de Mantel (Manly, 1997). Este teste compara duas matrizes entre si, elemento por elemento, fornecendo um valor de correlação ( $r_C$ ) entre as matrizes, sendo testada a significância de  $r_C$  por meio de permutações, em que valores maiores que 0,6 indicam a confiabilidade do agrupamento (Mantel, 1967).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Um total de 30 *primers* RAPD foram testados, dos quais 25 foram selecionados por gerarem pelo menos uma banda polimórfica entre as cultivares analisadas. Esses *primers* geraram 92 bandas polimórficas e 93 bandas monomórficas. As bandas polimórficas variaram de uma para os *primers* OPX02, OPM20 e OPM12 até oito bandas para o *primer* OPJ13.

As 92 bandas polimórficas utilizadas foram consideradas suficientes para uma adequada avaliação da divergência, uma vez que pelas análises de *bootstrap*, a partir de 75 bandas polimórficas a correlação entre as matrizes de distância aproximou-se de 1, a soma dos quadrados dos desvios foi inferior a 0,2 (Figura 1) e o valor do estresse foi 0,045.

XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA  
22 a 26 de outubro de 2007

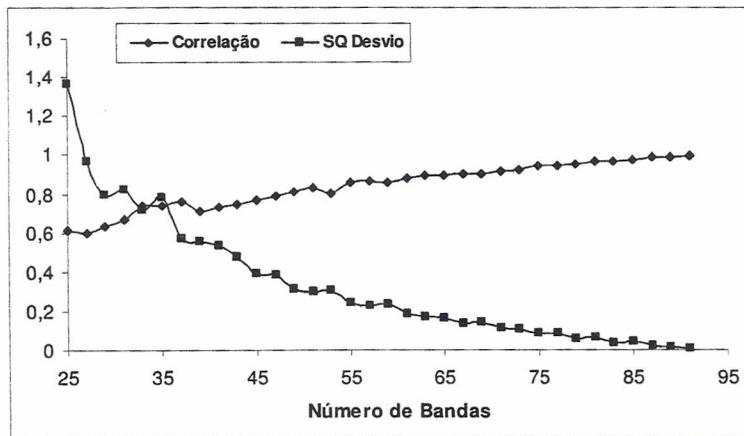


Figura 1. Análise de *bootstrap* para a determinação do número ótimo de marcadores entre as 16 cultivares de batata estudadas, utilizando números crescentes de bandas polimórficas até o máximo de bandas obtidas.

Com o propósito de avaliar a variabilidade genética entre as cultivares de batata com base em marcadores RAPD, procedeu-se a uma análise de agrupamento UPGMA como pode ser evidenciado pelo dendrograma (Figura 2). Esse agrupamento pode ser considerado de alta confiabilidade, uma vez que o valor de correlação cofenética ( $r_c$ ) ou teste de Mantel foi de 0,86.

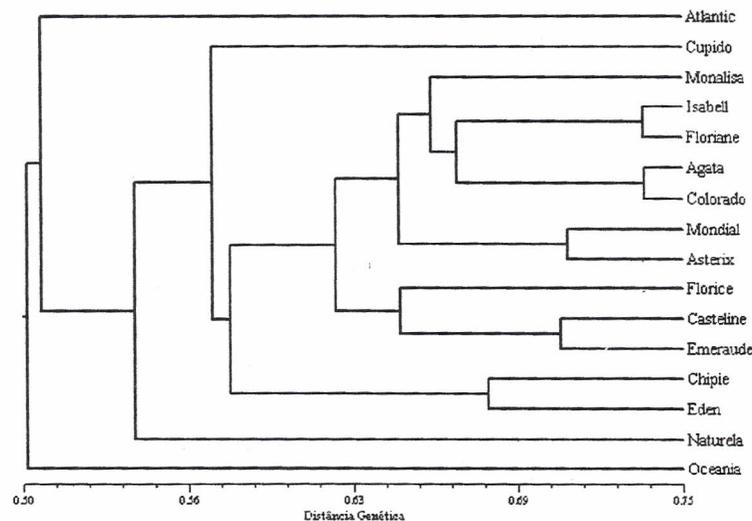


Figura 2. Dendrograma das distâncias genéticas entre as cultivares de batata, gerado pelo método UPGMA.

A quantidade de marcadores obtidos, neste estudo, foram suficientes para discriminar as 16 cultivares de batata analisadas. Estudos semelhantes evidenciaram que análises com RAPD são eficientes para distinguir e identificar cultivares de batata. Isenegger *et al.* (2001) conseguiram discriminar 64 cultivares de batata utilizando 133 marcadores RAPD, Demeke *et*

**XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
22 a 26 de outubro de 2007

al. (1993) diferenciaram 36 cultivares com o uso de apenas dois *primers* RAPD, que geraram 18 bandas polimórficas e Sosinski & Douches (1996) distinguiram 46 cultivares com 10 *primers* RAPD que produziram 43 bandas polimórficas.

Segundo Xavier (2001), os resultados gerados por marcadores RAPD são mais confiáveis que análises morfológicas, uma vez que os genótipos foram analisados em âmbito molecular, o que anula as variações causadas por fatores ambientais.

## CONCLUSÃO

Os 25 *primers* RAPD amplificaram 92 fragmentos polimórficos que foram suficientes para diferenciar as 16 cultivares de batatas analisadas, confirmando que os marcadores RAPD podem ser utilizados para identificar cultivares de batata. Evidenciando também, o potencial da técnica na análise de *fingerprinting* e sua utilidade na caracterização genética de cultivares de batata.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERBERG, M. R. *Cluster analysis for applications*. New York: Academic press, 1973.
- CRUZ, C.D. *Programa GENES – versão Windows*. Editora UFV. Viçosa, MG. 642 p. 2001.
- DEMEKE T.; KAWCHUCK, L. M.; LYNCH, D.R. Identification of potato cultivars and clonal variants by DNA tandem amplified polymorphic DNA analys. **American Potato Journal**. 70, 1993. p.561-569.
- DEMEKE T.; LYNCH, D.R.; KAWCHUCK, L. M.; KOZUB, G. C.; ARMSTRONG, J. D. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Plant Cell Reports**. 15, 1996. p.662-667.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3. ed. Brasília: EMBRAPA – CERNAGEN, 1998. p.220.
- FONTES, P. C. R. Cultura da Batata. In: FONTES, P. C. R. **Olericultura Teoria e Prática**. 1 ed. UFV: Viçosa, 2005. p. 322-343.
- FORD, R. and TAYLOR, P. W. J. The application of RAPD markers for potato cultivar identification. **Aust. J. Agric. Res.** 48, 1997. p. 1213-1217.
- ISENEGGER, D. A.; TAYLOR, P. W.; FORD, R.; FRANZ, P.; MCGREGOR, G. R.; HUTCHINSON, J. F. DNA fingerprinting and genetic relationships of potato cultivars (*solanum tuberosum* L.) commercially grown in Australia. **Aust. J. Agric. Res.** 52, 2001. p.911-918.

**XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
**22 a 26 de outubro de 2007**

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. *Psychometrika*, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.

MANLY, B. F. J. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. London: Chapman & Hall, 1997. 281 p.

MANTEL, N. *The detection of disease clustering and a generalized regression approach*. *Cancer Res* 27:209-20. 1967.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, Oxford, v.8, 1980. p. 4321-4325.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software, 2000.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, San Francisco, 1973.

SOSINSIK, B. & DOUCHES, D. S. Using polymerase chain reaction-based DNA amplification to fingerprint North American potato cultivars. *HortiScience*. 31, 1996. p.130-133.

XAVIER, K. G. *Diversidade genética em clones de Eucalyptus avaliados por marcadores RAPD, e variações nas propriedades da madeira*. Dissertação (Mestrado em Florestas de Produção) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2001.