

Perfil Molecular da Cultivar de Batata BRSIPR Bel

Natércia Lobato Pinheiro Lima¹, Angela Rohr², Arione da Silva Pereira³, Caroline Marques Castro⁴

Resumo

A batata BRSIPR Bel, indicada para uso industrial na forma de *chips* e batata palha, foi lançada em 2012 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar). Por tratar-se de uma cultivar recentemente lançada, ainda não possui dados moleculares disponíveis. Este trabalho teve como objetivo estabelecer o perfil molecular da cultivar BRSIPR Bel. Para isso, utilizou-se 24 pares de *primers* de microssatélites (SSR), e comparou-se os padrões da BRSIPR Bel com os apresentados pelas cultivares Agata, Atlantic e Asterix, que figuram entre as mais cultivadas no Brasil. Foram obtidos 74 alelos no total, variando de 90 a 300 pares de base. Seis pares de *primers* foram altamente polimórficos e demonstraram, individualmente, perfis diferentes para as quatro cultivares, permitindo distingui-las com a análise deste *loci*. Apenas dois pares de *primers* foram monomórficos para as quatro cultivares. Dessa forma, foi possível observar que o conjunto de *primers* utilizado foi eficiente para caracterizar a cultivar BRSIPR Bel e distingui-la das outras três cultivares escolhidas para este trabalho.

Introdução

A cultivar de batata BRSIPR Bel foi lançada em 2012, pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e o Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar). Apresenta tubérculos de formato oval, película amarela e lisa, polpa creme e características de qualidade de fritura. É indicada especialmente para processamento industrial, principalmente na forma de *chips* e de batata palha (Embrapa e Iapar, 2012).

A identificação de cultivares é importante para a documentação dos recursos genéticos e para a proteção dos direitos dos melhoristas. No Brasil, a Lei de Proteção de Cultivares (nº 9.456, de 25/04/1997) estabelece que, para ser registrada e lançada no mercado, uma cultivar deve apresentar um conjunto de caracteres que a diferencie das demais. Esses caracteres deverão ser comuns a todas as plantas, e precisam permanecer estáveis ao longo dos ciclos de multiplicação (Marques, 2003). Nesse sentido, a caracterização morfológica é empregada com sucesso. Porém, em estudos de certificação de cultivares, algumas desvantagens limitam o uso desse tipo de caracterização, destacando-se o tempo e custo despendidos para acompanhar todo o ciclo de crescimento das plantas, e a influência nas características morfológicas exercida pelo ambiente.

Os marcadores moleculares podem ser utilizados para detectar diferenças ao nível de DNA, por meio de polimorfismos, formando um padrão característico de cada acesso (Faleiro, 2007), com as vantagens de não sofrerem influência do ambiente e acelerarem o processo de caracterização em relação à caracterização morfológica (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Ghislain et al (2009) propuseram um kit de marcadores microssatélites (SSR) distribuídos nos doze cromossomos, para caracterização molecular de germoplasma de batata, que pode ser usado para múltiplas aplicações, incluindo identificação de variedades, estudos de diversidade genética, estabelecimento de coleções núcleo e estudos de fluxo gênico. Kawchuk et al (1996), em um trabalho utilizando marcadores microssatélites (SSR), concluíram que tal técnica é eficiente para a identificação de cultivares de batata.

A BRSIPR Bel é uma cultivar recentemente lançada, e, portanto, ainda não foram empregados marcadores moleculares na sua caracterização.

O presente estudo teve como objetivo estabelecer o perfil molecular da cultivar de batata BRSIPR Bel, por meio de marcadores SSR, comparando-o com o das cultivares mais plantadas no país, Agata, Atlantic e Asterix.

1 Analista da Embrapa Clima Temperado - CPACT, Mestranda no Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitomelhoramento da UFPel/Pelotas. natercia.lobato@embrapa.br

2 Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitomelhoramento da UFPel/Pelotas. angelbio10@yahoo.com.br

3 Pesquisador da Embrapa Clima Temperado – CPACT. arione.pereira@embrapa.br

4 Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado – CPACT. caroline.castro@embrapa.br

Material e Métodos

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado. As amostras utilizadas pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma de Batata da Embrapa. Para comparação com a BRSIPR Bel, foram escolhidas três importantes cultivares de batata. As cultivares Asterix e Atlantic, assim como a BRSIPR Bel, são indicadas para fritura, enquanto a cultivar Agata é a mais plantada no Brasil.

Para a extração do DNA, foram coletados cerca de 150 mg de tecido de folhas jovens, e utilizou-se o protocolo descrito por DArT® (2013). As amostras de DNA foram quantificadas em fluorômetro e agarose 1%, e tiveram a concentração ajustada para 20 ng/μl.

As reações de PCR foram realizadas utilizando 24 *primers* de SSR, componentes do *Potato Genetic Identity kit*, sintetizados com cauda M13, utilizando o corante IRDye 800 (Li-cor, USA), conforme protocolo descrito por Ghislain et al (2009), com algumas modificações. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, com o marcador de peso molecular IRDye 50–350 bp (Li-cor, USA), no sequenciador Li-cor 4300. Os tamanhos dos fragmentos foram avaliados no software Saga Generation 2 (Li-cor, USA).

Resultados e Discussão

Os perfis moleculares das quatro cultivares, obtidos para cada um dos *loci* SSR estudados, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Perfis moleculares das cultivares de batata Atlantic, Agata, Asterix e BRSIPR Bel, baseados em 24 *loci* SSR, expressos em tamanho dos fragmentos amplificados (pares de base).

<i>Loci</i>	Atlantic	Agata	Asterix	BRSIPR Bel	Nº total de alelos/ <i>locus</i> SSR
STG0001	160/145	160/156/147	156/152/138	160/156/145	5
STG0010	185/178	185/182/178	185/182	185/182/178	3
STG0016	172/154/151	154/151/142	172/154/142	172/154/151	4
STG0025	219/216	219/216	219/216	219/216	2
STI0001	211/207/205/198	205/198/195	211/205/198	211/205/198/195	5
STI0003	188/180/168/159/150	188/159	188/180/159/150	168/159/150	5
STI0004	123/101	123/117/101	123/101	123/117/101	3
STI0012	200/188/184	188/184/181	188/184/181	207/188	5
STI0014	148/140	148/140	148/145/140	145/140	3
STI0030	105	125/113/105	110/105	105	4
STI0032	142/133/130	139/127	142/139/137	142/137	7
STI0033	143/131	149/131	149/140/131	149/137/131	5
STM0019*	224	224/208	214/202	208	4
	131/120/105	131/105	131/105	131	3
STM0031	204	204/184	204/184	203	3
STM0037	98/96/92/90	98/92/90	98/90	98/96/90	4
STM1052	241/224	224	224	224	2
STM1053	187	187/185	187	187/185	2
STM1064	210/206	211/206	212/206	211/206	3
STM1104	190/186	190/186	190/186	186	2
STM1106	174/160	160	160	174/160	2
STM5114	313/304/297	313/306/304	313/310/301	306/304	6
STM5121	304	302	302	302	2
STM5127	284/256/253	284/256/253	284/256/253	284/256/253	3
STPoAc58	249	249	249	255/249	2

* O marcador STM0019 amplificou em dois *loci*.

Nos 24 *loci* estudados, foram encontrados 74 diferentes alelos, que variaram de 90pb a 313pb. O número de alelos por *locus* variou de 7 (STI0032) a 2, com média igual a 3,56.

O *primer* STM0019 apresentou duas regiões de amplificação, coincidindo com os dois *loci* encontrados por Ghislain et al. (2009). Os fragmentos obtidos com o *primer* STM0019 apresentaram diferença de 18pb em comparação com os fragmentos encontrados por Ghislain et al (2004), utilizando gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata. Tal variação, porém, é compatível com a adição da cauda M13, que contém 19 nucleotídeos, no *primer forward*, necessária para eletroforese no sequenciador Li-cor 4300.

Apenas dois *loci* foram monomórficos para as quatro cultivares utilizadas (STM5127 e STG0025) (Tab. 1). Os *loci* STI0001, STI0032, STI0033, STM0019, STM0037 e STM5114, individualmente, permitiram distinguir as quatro cultivares. Com isso pode-se afirmar que é possível diferenciar as cultivares Agata, Atlantic, Asterix e BRSIPR Bel, analisando apenas um *loci*. Em um estudo de diversidade realizado com acessos de batata do Quênia, Lung'aho et al (2011) observaram que o *locus* STM0037 foi o mais informativo, e os *loci* STPoAC58 e STG0025 foram menos informativos, o que vem ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho, uma vez que o *primer* STM0037 permitiu distinguir as quatro cultivares, o *loci* STPoAC58 foi polimórfico apenas para a cultivar BRSIPR Bel, e o *loci* STG0025 foi monomórfico para as quatro cultivares.

A caracterização molecular, pelo alto nível de polimorfismo detectável, mostra-se como uma excelente técnica complementar a caracterização morfológica no processo de registro e proteção de cultivares. Uma vez que, embora a aplicação de descritores morfológicos seja fundamental para caracterizar uma nova cultivar, a caracterização morfológica tem algumas desvantagens, como o fato de exigir maior tempo de execução e ainda sofrer influência do ambiente. Além disso, com o crescente número de cultivares registradas e a eventual similaridade fenotípica das mesmas, poderá haver dificuldades em diferenciá-las somente por meio de caracteres morfológicos. Pôde-se observar que o *Potato Genetic Identity kit* proposto por Ghislain et al (2009) foi eficiente para a distinção da cultivar BRSIPR Bel das demais cultivares avaliadas, permitindo o estabelecimento do perfil molecular da mesma com sucesso e a sua discriminação com a análise de apenas um *locus* SSR.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Clima Temperado pela oportunidade de realização deste trabalho.

Referências

- DArT – Diversity Array technology®. Disponível em: <http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/pub/DaRT_DNA_isolation.pdf>, acesso em: 14/05/2013.
- Embrapa and Iapar (2012). **BRSIPR Bel: Cultivar de batata para processamento**. Disponível em : <<http://snt.sede.embrapa.br/publico/usuarios/produtos/254-Anexo1.pdf>>, acesso em 24/05/2013.
- Faleiro, FG (2007) **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa, Planaltina, 102p.
- Ferreira, ME and Grattapaglia, D (1996) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa, Brasília, 220p.
- Ghislain, M et al. (2004) Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. **Theoretical and Applied Genetics** 108: 881-90.
- Ghislain, M et al. (2009) Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 3, p. 377-388.
- Kawchuk, LM et al (1996) Characterization of *Solanum tuberosum* Simple Sequence Repeats and application to potato cultivar identification. **American Potato Journal**. v. 73, p. 325–335.
- Lung'aho, C et al (2011) Genetic Diversity of Kenyan Potato Germplasm Revealed by Simple Sequence Repeat Markers. **American Journal of Potato Research**. v. 88, p. 424-434
- Marques, EK (2003) **Diagnóstico genético-molecular**. Ulbra, Canoas, 372p.
- Pereira, A da S and Daniels, J (Ed.) (2003) **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Embrapa, Brasília, 567p.
- Pereira, A da S (Ed.) (2011) Produção de batata no Rio Grande do Sul. Embrapa Clima Temperado, Pelotas. **Sistemas de Produção 19, versão eletrônica**. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/sistema19_novo/cap4_cultivares.htm>, acesso em 16/05/2013.