



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1516-8840

Novembro 2002

## **Documentos99**

### **Caracterização e Divergência Genética entre Genótipos de Batata através de Marcadores RAPD**

Eliana Antônia Valente Silveira Collares  
Eva Choer  
Arione da Silva Pereira

Pelotas, RS  
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Clima Temperado**

Endereço: BR 392 Km 78  
Caixa Postal 403 - Pelotas, RS  
Fone: (53) 275 8199  
Fax: (53) 275 8219 - 275 8221  
Home page: [www.cpact.embrapa.br](http://www.cpact.embrapa.br)  
E-mail: [sac@cpact.embrapa.br](mailto:sac@cpact.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Mário Franklin da Cunha Gastal  
Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia  
**Membros:** Ariano Martins Magalhães Junior, Flávio Luiz Carpena Carvalho,  
Darcy Bitencourt, Cláudio José da Silva Freire, Vera Allgayer Osório  
**Suplentes:** Carlos Alberto Barbosa Medeiros e Eva Choer

Supervisor editorial: Maria Devanir Freitas Rodrigues  
Revisoras de texto: Maria Devanir Freitas Rodrigues/Ana Luiza Barragana Viegas  
Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos  
Editoração eletrônica: Sérgio Ilmar Vergara dos Santos

1ª edição  
1ª impressão (2002): 50 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

Collares, Eliana Antônia Valente Silveira.

**Caracterização e divergência genética entre genótipo de batata através de marcadores RAPD** / Eliana Antônia Valente Silveira Collares, Eva Choer, Arione da Silva Pereira. - Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002).

18p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 99).

ISSN 1516-8840

1. Batata - Solanum Tuberosum - Melhoramento genético - Mercado molecular - DNA - Eletroforese - Potato. I. CHOER, Eva. II. PEREIRA, Arione da Silva. III. Título IV. Série.

CDD 635.21

---

## **Autores**

**Eliana Antônia Valente Silveira Collares**

M.Sc.Melhoramento Vegetal  
e-mail: eavsv@altnet.com.br

**Eva Choer**

Pesquisadora, Dra. Recursos Genéticos  
Embrapa Clima Temperado  
Cx. Postal 403  
CEP 96001-970 Pelotas, RS  
e-mail: choer@cpact.embrapa.br

**Arione da Silva Pereira**

Pesquisador, P.hD Melhoramento Vegetal  
Embrapa Clima Temperado  
Cx. Postal 403  
CEP 96001-970 Pelotas, RS  
e-mail: arione@cpact.embrapa.br

# Apresentação

Nos programas de melhoramento genético a informação da diversidade genética dentro de uma espécie é essencial. Além disso, é útil na caracterização individual dos acessos e cultivares e como guia na escolha dos pais em programas de cruzamento. Com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares no Brasil, deverá ser de grande utilidade, visto que uma cultivar poderá ter sua identidade baseada em marcadores Moleculares.

Avanços realizados na biologia molecular, principalmente com os marcadores moleculares do tipo polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), têm demonstrado que estes constituem-se em ferramentas eficazes na determinação da distância genética e no fornecimento de informação precisa a respeito da variabilidade genética entre os vários genótipos.

Assim, os resultados divulgados nesta publicação mostram que as análises de RAPD são eficientes na avaliação da divergência genética de genótipos de batata, cujos dados servem de orientação na seleção de genitores e representam um primeiro passo na caracterização ("fingerprinting") de cada cultivar.

*Arione da Silva Pereira*  
Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento



## Sumário

<b>Caracterização e Divergência Genética entre Genótipos de Batata através de Marcadores RAPD .....</b>	<b>9</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>9</b>
Análise do DNA .....	10
Caracterização molecular dos genótipos .....	11
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>17</b>



# **Caracterização e Divergência Genética entre Genótipos de Batata através de Marcadores RAPD**

---

Eliana Antônia Valente S. Collares  
Eva Choer  
Arione da Silva Pereira

## **Introdução**

A batata é uma das principais hortaliças, tanto pela área plantada como pela preferência alimentar. No Brasil, a cultura é caracterizada por apresentar dependência de importação de grandes volumes de batata-semente de cultivares de origem européia. Entretanto, no Rio Grande do Sul, graças ao programa de melhoramento de batata da Embrapa Clima Temperado, iniciado em 1946, e com o lançamento de cultivares adaptadas e de boa produtividade, o estado tornou-se pouco dependente desta importação.

O estreito relacionamento genético existente entre cultivares, na maioria das espécies, assim como a dificuldade de se efetuar grande número de cruzamentos em batata, sugere a necessidade de cruzar genótipos que apresentem divergência genética. A seleção dos genitores e a caracterização da variabilidade genética existente é decisiva para o incremento da eficiência em programas de melhoramento. Várias metodologias têm sido empregadas para caracterizar e avaliar a similaridade ou distância genética entre genótipos. A técnica de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) tem sido usada, com sucesso na identificação, na caracterização, estimativa da divergência genética e na construção de mapas de ligação gênica, pois apresentam, em geral alto conteúdo informativo, identificam um bom número de locos polimórficos por reação, além de ser uma técnica acessível, rápida, de baixo custo e de pouca mão de obra.

Isenegger et al. (2001), Thiéry et al. (2001), Polzerova et al. (2000) e Forapani et al. (1999), consideram os marcadores RAPD, uma ferramenta útil na caracterização e identificação de cultivares e na diferenciação e estimativa das relações genéticas, além de se constituir em uma técnica rápida.

### **Análise do DNA**

Para análise de DNA através da técnica de RAPD, foram coletadas 120mg de folhas jovens de plantas de batata, das cultivares comerciais Piratini, Elvira, Santa Silvana, Monte Bonito, Trapeira, Baronesa, Cristal, Achat, Santo Amor, Atlantic, Catucha, Cerrito Alegre, Cascata, Eliza, Canguçu, Asterix, BR3 e dos clones Baronesa Pinta Rosa, Baronesa Pinta Branca, C-1311-11-82, 2AC-917-7-80, C-1485-2-87, C-1226-35-80, C1485-6-87, CR-1208-98-80, C-1740-11-95, C-1750-15-95, C-1730-7-94 e C-1684-7-93.

Foram realizadas extrações de DNA de uma mesma planta, de cada um dos 29 genótipos, a partir do protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). A estimativa da concentração de DNA foi realizada com base na comparação da intensidade das bandas de DNA com o padrão lambda cortado com a enzima *Hind* III, ficando estabelecida uma concentração final de  $5\text{ng}.\mu\text{l}^{-1}$ . As reações de amplificação foram realizadas com um volume de  $13\mu\text{l}$ , conforme Ferreira & Grattapaglia (1998), com modificações contendo cada amostra  $3,64.\mu\text{l}$  de água pura autoclavada;  $1,3\mu\text{l}$  de tampão 10x;  $0,78\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50mM);  $1,04\mu\text{l}$  de dNTPs (2,5mM);  $1,04\mu\text{l}$  de BSA purificada ( $5\text{mg}.\text{ml}^{-1}$ );  $3,0\mu\text{l}$  de *primer* ( $5\text{ng}.\mu\text{l}^{-1}$ );  $0,2\mu\text{l}$  de Taq polimerase (5 unidades.  $\mu\text{l}^{-1}$ );  $2\mu\text{l}$  de DNA genômico ( $5\text{ng}.\mu\text{l}^{-1}$ ), e cobertas com uma gota de óleo mineral. As amplificações foram realizadas em um termociclador (RoboCycler 96 Temperature Cycler - Stratagene) programado para 40 ciclos repetidos nas seguintes condições: 1 minuto a  $92^\circ\text{C}$  (desnaturação), 1 minuto a  $35^\circ\text{C}$  (anelamento) e 2 minutos a  $72^\circ\text{C}$  (extensão). Após, foi efetuado um passo final de extensão de 5 minutos a  $72^\circ\text{C}$ .

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose (GIBCO) submerso, na concentração de 1,2%, com uma diferença de potencial de  $5\text{v}.\text{cm}^{-1}$  por três horas e corados com brometo de etídio. Em todos géis foi utilizada uma prova em branco e, também um DNA padrão da Ladder de 1Kb ( $4\mu\text{l}$ ), com fragmentos de tamanhos conhecidos.

Um total de sete *primers*, provenientes dos kits OPX e OPY da Operon Technologies (Alameda, CA), cada um contendo 20 tipos de oligonucleotídeos iniciadores, foram utilizados para a triagem, sendo que destes, quatro foram escolhidos pela resolução das bandas e pelo polimorfismo apresentado.

Foi construída uma matriz de dados, com atribuição de escores, baseada na ausência (0) e presença (1) de bandas. A análise de similaridade entre os genótipos foi efetuada empregando-se o coeficiente de Jaccard, através do SIMQUAL (similaridade para dados qualitativos), e o agrupamento dos genótipos foi feito pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA), através de SAHN (agrupamento seqüencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo), e usado o software NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers), v.1.5 (Rohlf, 1989).

### Caracterização molecular dos genótipos

Os quatro *primers* usados, possibilitaram distinguir todos os genótipos e geraram 39 produtos amplificados (bandas), com o número de fragmentos produzidos variando de cinco (OPX-4) a 14 (OPX-9), com média de 9,75 bandas por *primer* (Tabela 1). Dessas, 35 foram polimórficas (90% do total) e quatro foram monomórficas (10%).

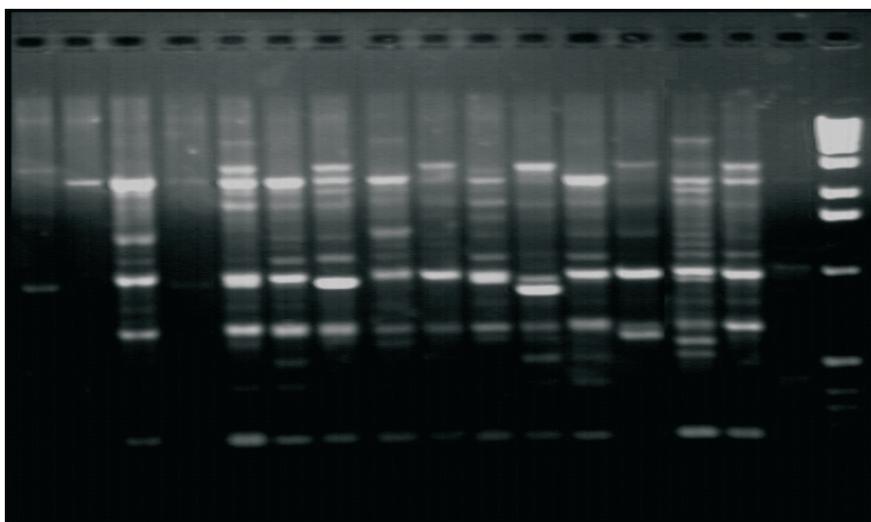
Semelhantemente, Thiéry-Moisan et al. (2001) e Forapani et al. (1999), com apenas três *primers*, identificaram respectivamente, 37 e 57 genótipos de batata. Entretanto, Hosaka et al. (1994) precisaram usar 31 *primers* para distinguir 67 das 73 cultivares japonesas de batata. Ghislain et al. (1999), com 12 *primers*, obtiveram 102 marcadores polimórficos, os quais discriminaram 128 acessos de batata andígena. Isenegger et al. (2001) diferenciaram 64 cultivares, utilizando 67 *primers*, que geraram 133 polimorfismos.

Segundo Weir et al. (1997), as diferenças no número de bandas produzidas por *primer* podem ser devidas ao comprimento e à seqüência do *primer* utilizado, bem como à interação *primer*-DNA *template*.

Cada *primer*, através de seus produtos amplificados, visualizados em gel (Figura 1), permitiu a separação dos genótipos em diferentes padrões (Tabela 2). O *primer* OPX-09 foi o que apresentou o maior número de bandas polimórficas e a formação do maior número de padrões (25), e, conseqüentemente, a melhor diferenciação dos genótipos. Rocha (2000) também constatou o OPX-09 como o mais polimórfico, diferenciando todos os nove genótipos de batata.

**Tabela 1.** Bandas monomórficas e polimórficas em genótipos de batata geradas por amplificação pela técnica RAPD.

Primer	Seqüência (5' → 3')	Bandas Polimórficas	Bandas Monomórficas	Total
OPX-01	CTGGGCACGA	10	0	10
OPX-04	CCGCTACCGA	5	0	5
OPX-09	GGTCTGGTTG	14	0	14
OPY-07	AGAGCCGTCA	10	4	6

**Figura 1.** Eletroforese de fragmentos RAPD em gel de agarose 1,2%, amplificado com o *primer* OPX-09 e corados com brometo de etídio. Da esquerda para direita: coluna 16 e 17, respectivamente, prova em branco e marcador 1 Kb; colunas de 1-15, genótipos de batata.

**Tabela 2.** Padrões eletroforéticos de 29 genótipos de batata, gerados por fragmentos de RAPD com quatro *primers* OPX e OPY (Operon Technologies Alameda, CA).

Genótipos	PRIMERS			
	OPX-09	OPY-07	OPX-04	OPX-01
Piratini	#	1	#	#
Elvira	1	2	1	1
S.Silvana	2	3	2	2
M.Bonito	#	3	2	3
B.P.Rosa	3	4	2	2
B.Branca	4	5	3	4
Trapeira	5	4	3	2
Baronesa	6	3	2	5
Cristal	7	6	3	6
Achat	8	1	4	7
S.Amor	9	7	5	8
Atlantic	10	8	3	9
Catucha	11	9	4	#
C.Alegre	12	5	2	10
Cascata	13	4	6	11
Eliza	14	5	2	12
Canguçu	15	4	2	2
Asterix	7	10	4	13
BR3	16	11	5	14
C-1311-11-82	17	5	2	10
2AC-917-7-80	18	3	2	3
C-1485-2-87	19	5	2	15
C-1226-35-80	20	12	4	#
C-1485-6-87	21	13	7	6
CR-1208-98-80	22	5	4	16
C-1740-11-95	23	14	4	12
C-1750-15-95	21	5	3	17
C-1730-7-94	24	5	4	9
C-1684-7-93	25	5	3	10

# Não geraram bandas.

A análise de similaridade genética mostrou que os clones C-1226-35-80 e C-1485-6-87 foram os que apresentaram a menor similaridade (0,15), enquanto que a maior (0,86) foi verificada entre as cultivares Trapeira e Canguçu (Tabela 3). Isenegger et al. (2001) encontraram valores de similaridade em cultivares de batata, variando de 0,67 a 0,90.

Através do dendrograma (Figura 2), verificou-se a formação de dois principais grupos, um formado apenas pela cultivar Piratini e o outro constituído por todos os demais genótipos. Este segundo grupo se subdividiu em dois subgrupos, sendo um constituído pela cultivar Catucha, BR 3 e o clone C 1226 35 80 e o outro por todos os demais acessos.

Apesar de alguns genótipos possuírem parentesco muito próximo, isto é, terem os mesmos pais, como é o caso de C-1485-2-87 e C-1485-6-87 (2 CRI-1149-1-78 x A-876-5-79), Trapeira e Santa Silvana (Baronesa Pinta Rosa x Baronesa Pinta Rosa), Cerrito Alegre e Cascata (Bintje x Baronesa), ou com apenas um dos genitores em comum, Canguçu e Piratini; Eliza e C-1311-11-82; Santo Amor, Cerrito Alegre e Cascata e C-1740-11-95 e C-1750-15-95), apresentaram valores de similaridade menor do que os detectados entre cultivares ou clones não aparentados (Tabela 3).

Da mesma forma, Demeke et al. (1996) observaram em estudos de diversidade genética de batata através de RAPD, que cultivares intimamente aparentados podem, freqüentemente, ser tão diferentes quanto aqueles com nenhuma afinidade imediata. Ao contrário, Hosaka et al. (1994) observaram que os padrões de bandas de RAPD de cultivares intimamente relacionadas ficaram num mesmo grupo, e, concluíram que estes padrões foram reflexos de sua genealogia.

Os resultados encontrados mostraram que foi possível distinguir todas as cultivares e clones, e sugerem que as análises de RAPD podem fornecer uma melhor avaliação da divergência genética na seleção de progenitores do que as análises baseadas estritamente, na informação de genealogia. Semelhantemente, Ford et al. (1997), através da técnica de RAPD, diferenciaram cultivares de batata intimamente relacionadas, o que não foi atingido com técnicas morfológicas.

**Tabela 3.** Similaridade genética, estimada pelo coeficiente de Jaccard, entre 29 genótipos de batata, com base na análise de marcadores RAPD.

	Pir	Eiv	SS	MB	BR	BB	TR	B	CR	AC	SA	AT	CT	CA	CS	EL	CG	AX	BR	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C0
Pir	1,00																												
Eiv	0,17	1,00																											
SS	0,18	0,75	1,00																										
MB	0,26	0,60	0,59	1,00																									
BR	0,17	0,76	0,81	0,50	1,00																								
BB	0,21	0,56	0,59	0,65	0,66	1,00																							
TR	0,24	0,56	0,60	0,67	0,67	0,80	1,00																						
B	0,19	0,77	0,83	0,55	0,77	0,67	0,62	1,00																					
CR	0,28	0,52	0,55	0,68	0,52	0,68	0,69	0,52	1,00																				
AC	0,29	0,48	0,42	0,56	0,44	0,64	0,46	0,43	0,52	1,00																			
SA	0,28	0,47	0,45	0,48	0,47	0,50	0,50	0,42	0,50	0,52	1,00																		
AT	0,22	0,57	0,67	0,55	0,68	0,74	0,63	0,63	0,71	0,48	0,52	1,00																	
CT	0,45	0,33	0,31	0,36	0,29	0,40	0,28	0,37	0,38	0,55	0,38	0,42	1,00																
CA	0,21	0,71	0,70	0,65	0,77	0,71	0,73	0,78	0,61	0,52	0,50	0,68	0,30	1,00															
CS	0,24	0,56	0,50	0,60	0,61	0,73	0,75	0,62	0,69	0,46	0,56	0,63	0,33	0,67	1,00														
EL	0,22	0,68	0,61	0,75	0,68	0,74	0,63	0,63	0,71	0,60	0,58	0,70	0,36	0,74	0,69	1,00													
CG	0,25	0,58	0,62	0,69	0,69	0,76	0,86	0,64	0,73	0,48	0,58	0,65	0,35	0,69	0,78	0,72	1,00												
AX	0,36	0,48	0,46	0,65	0,43	0,52	0,52	0,43	0,60	0,72	0,60	0,48	0,47	0,52	0,61	0,62	1,00												
B3	0,28	0,52	0,45	0,27	0,52	0,40	0,34	0,52	0,28	0,40	0,50	0,46	0,53	0,40	0,39	0,41	0,36	0,33	1,00										
C1	0,21	0,66	0,59	0,59	0,71	0,78	0,73	0,67	0,61	0,64	0,55	0,62	0,40	0,78	0,73	0,68	0,76	0,58	0,45	1,00									
C2	0,21	0,66	0,59	0,79	0,61	0,77	0,61	0,67	0,61	0,64	0,50	0,68	0,46	0,71	0,67	0,74	0,69	0,58	0,40	0,71	1,00								
C3	0,26	0,60	0,59	0,81	0,80	0,79	0,67	0,61	0,68	0,64	0,48	0,68	0,43	0,65	0,67	0,83	0,77	0,65	0,32	0,65	0,79	1,00							

Continuação...

Pir	Elv	SS	MB	BR	BB	TR	B	CR	AC	SA	AT	CT	CA	CS	EL	CG	AX	BR	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C0	
C4	0,27	0,28	0,33	0,22	0,32	0,25	0,30	0,35	0,37	0,35	0,33	0,67	0,22	0,25	0,28	0,32	0,35	0,35	0,27	0,37	0,33	1,00							
C5	0,24	0,61	0,60	0,48	0,67	0,50	0,56	0,57	0,46	0,44	0,63	0,28	0,73	0,55	0,57	0,52	0,40	0,44	0,67	0,50	0,48	0,15	1,00						
C6	0,19	0,72	0,71	0,55	0,67	0,61	0,57	0,73	0,52	0,53	0,58	0,32	0,72	0,52	0,58	0,58	0,54	0,42	0,67	0,67	0,55	0,30	0,52	1,00					
C7	0,21	0,61	0,64	0,59	0,66	0,65	0,61	0,67	0,61	0,58	0,55	0,52	0,30	0,71	0,55	0,68	0,63	0,52	0,35	0,65	0,60	0,59	0,27	0,55	0,72	1,00			
C8	0,23	0,64	0,69	0,58	0,70	0,64	0,65	0,65	0,60	0,44	0,38	0,80	0,32	0,77	0,53	0,61	0,55	0,44	0,38	0,59	0,59	0,64	0,24	0,72	0,60	0,53	1,00		
C9	0,29	0,53	0,57	0,64	0,59	0,71	0,65	0,59	0,75	0,54	0,52	0,74	0,47	0,64	0,65	0,74	0,76	0,63	0,40	0,64	0,80	0,37	0,52	0,53	0,58	0,62	1,00		
C0	0,25	0,58	0,57	0,77	0,58	0,76	0,78	0,59	0,81	0,54	0,52	0,72	0,35	0,76	0,78	0,79	0,74	0,62	0,31	0,69	0,69	0,77	0,26	0,58	0,53	0,57	0,68	0,76	1,00

\* Piratini (PIR), Elvira (ELV), Santa Silvana (SS), Monte Bonito (MB), Baronesa Pinta Rosa (BR), Baronesa Pinta Branca (BB), Trapeira (TR), Baronesa (B), Cristal (CR), Achat (AC), Santo Amor (SA), Atlantic (AT), Catucha (CT), Cerrito Alegre (CA), Cascata (CS), Eliza (EL), Canguçu (CG), Asterix (AX), BR3 (B3), C-1311-11-82 (C1), 2AC-917-7-80 (C2), C-1485-2-87 (C3), C-1226-35-80 (C4), C1485-6-87(C5), CR-1208-98-80 (C6), C-1740-11-95 (C7), C-1750-15-95 (C8), C-1730-7-94 (C9) e C-1684-7-93 (C0).

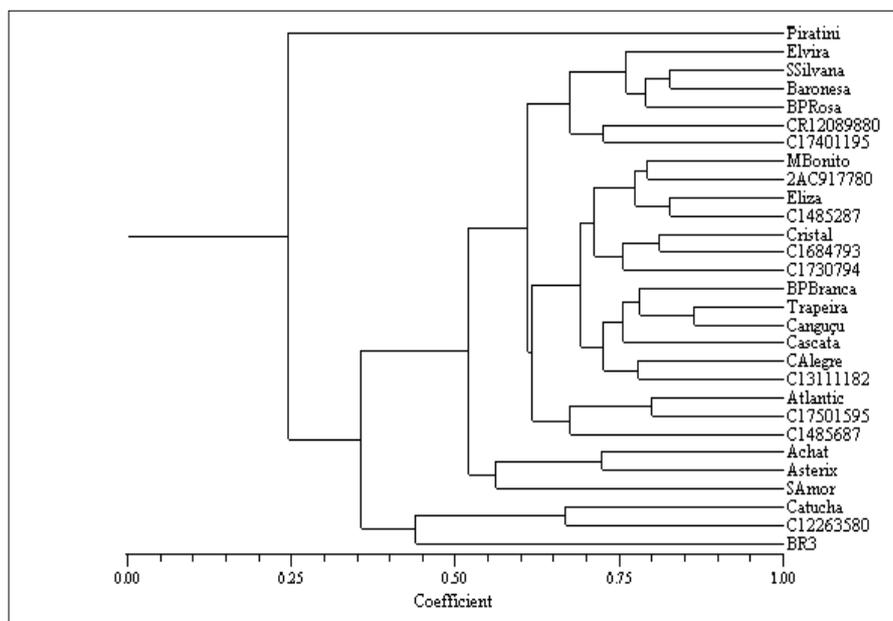


Figura 2. Dendrograma de 29 genótipos de batata, pelo método UPGMA, baseados em marcadores RAPD.

## Referências Bibliográficas

DEMEKE, T.; KAWCHUC, L.M.; LYNCH, D.R. Identification of potato cultivars and clonal variants by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. **American Potato Journal**, Orono, v.70, p.561-570, 1993.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. P.220.

FORD, R.; TAYLOR, P.W.J. The application of RAPD markers for potato cultivars identification. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.48, n.8, p.1213-1217, 1997.

FOROPANI, S.; CERBONI, A.; CASTELLANI, E.; MONDOLINO, G.; RANALLI, P. RAPD markers for potato germoplasm characterization. **Journal of Genetics and Plant Breeding**, Roma, v.53, n.2, p.143-147, 1999.

GHISLAIN, M.; ZHANG, D.; FAJARDO, D.; HUAMAN, Z.; HIJMANS, R.J. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.46, p.547-555, 1999.

HOSAKA, K.; MORI, M.; OGAWA, K. Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. **American Potato Journal**, Orono, v.71, p.535-546, 1994.

ISENEGGER, D.A. ; TAYLOR, P.W.J.; FORD, R.; FRANZ, P.; Mc GREGOR, G.R.; HUTCHINSON, J.F. DNA *fingerprint* and genetic relationships of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) commercially grown in Austrália. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.52, n.9, p.911-918, 2001.

POLZEROVA, H.; PTACEK, J. Detection of DNA polymorphism in potato cultivar using RAPD technique. **Journal of Genetics and Plant Breeding**, Roma, v.36, n.1, p.11-15, 2000.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system**: versão 1.5. New York: Exeter software, 1989. 236p.

THIÉRY-MOISAN, M.; HINGRAT, Y.L.; KERLAN. Potato cultivars identification using molecular markers. **Acta Horticulturae. The Hague**, n.546, p.471-477, 2001.

WEIR, B.J.; ST. PIERRE, R.G.; CHIBBAR, R.N. RAPD marker polymorphism among Saskatoon cultivars, clones and seedlings. **Hortscience**, Alexandria, v.32, n.6, p.1109-1113, 1997.