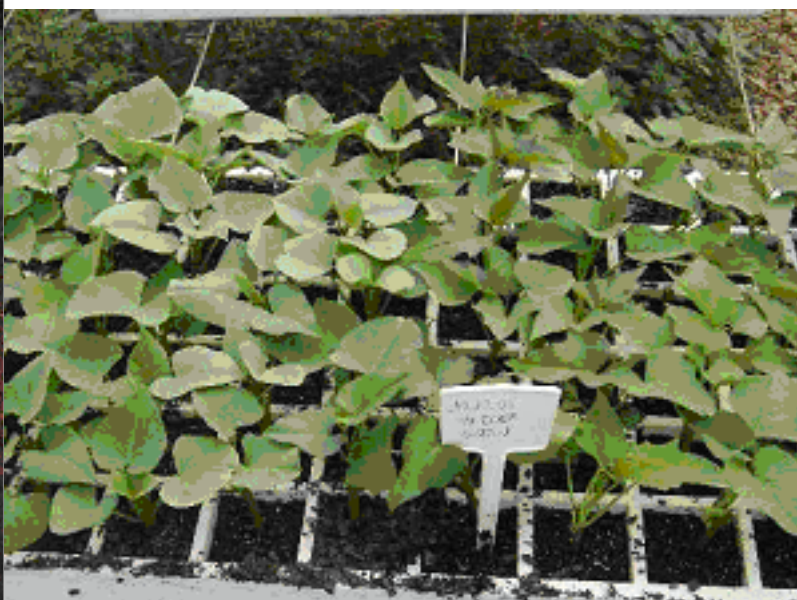


**Estudo da Variabilidade Genética de Plantas Oriundas da Embriogênese Somática de Genótipos de Batata-Doce Utilizando Marcadores RAPD**



## **República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

## **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Luis Carlos Guedes Pinto*

Ministro

## **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Conselho de Administração**

*Luiz Gomes de Souza*

Presidente

*Silvio Crestana*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Hélio Tollini*

*Ernesto Partemiani*

*Cláudia Assunção dos Santos Viegas*

Membros

## **Diretoria-Executiva da Embrapa**

*Silvio Crestana*

Diretor-Presidente

*José Geraldo Eugênio de Franca*

*Kepler Euclides Filho*

*Tatiana Deane de Abreu Sá*

Diretores-Executivos

## **Embrapa Hortaliças**

*José Amauri Buso*

Chefe-Geral

*Carlos Alberto Lopes*

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Gilmar Paulo Henz*

Chefe Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

*Osmar Alves Carrijo*

Chefe Adjunto de Administração

*Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária  
Embrapa Hortaliças  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 10***

### **Estudo da Variabilidade Genética de Plantas Oriundas da Embriogênese Somática de Genótipos de Batata-Doce Utilizando Marcadores RAPD**

*Lílian Pedrosa Marouelli  
Gláucia Salles Cortopassi Buso  
Janaina Silvestre Magalhães  
Cláudia Fortes Ferreira  
Antônio Carlos Torres □□*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Hortaliças  
BR 060 Rodovia Brasília-Anápolis km 9  
Caixa Postal 218  
70359-970 Brasília-DF  
Telefone (61) 3385-9105  
*E-mail: sac@cnph.embrapa.br*

Comitê de Publicações da Embrapa Hortaliças:

Presidente: Gilmar P. Henz  
Secretária-Executiva: Fabiana S. Spada  
Editor Técnico: Flávia A. de Alcântara  
Membros: Alice Maria Quezado Duval  
Edson Guiducci Filho  
Milza M. Lana

Supervisor editorial: Sieglinde Brune  
Normalização bibliográfica: Rosane Mendes Parmagnani  
Editoração eletrônica: José Miguel Santos

1ª edição

1ª impressão (2006): 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).

---

Marouelli, Lilian Pedrosa

Estudo da variabilidade genética de plantas oriundas da embriogênese somática de batata-doce com marcadores RAPD./Lilian Pedrosa Marouelli ... [et al.].

Brasília : Embrapa Hortaliças :Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

15 p. ; (Boletim de pesquisa e Desenvolvimento ; Embrapa Hortaliças ; ISSN 1677-2229 ; 09)

Contém bibliografia.

1. Batata-doce - Variabilidade genética. 2. Batata-doce - Embriogênese. I. Buso, Gláucia Salles Cortopassi. II. Magalhães, Janaina Silvestre. III. Ferreira, Cláudia Fortes, IV. Torres, Antonio Carlos. V. Título. VI. Série.

---

CDD 633.492 (19. ed.)

©Embrapa 2005

## Sumário

Resumo .....	1
Abstract .....	2
Introdução .....	4
Material e Métodos.....	5
Resultados e Discussão.....	7
Conclusões .....	13
Referências Bibliográficas .....	14

# **Estudo da Variabilidade Genética de Plantas Oriundas da Embriogênese Somática de Genótipos de Batata-Doce Utilizando Marcadores RAPD**

---

**Lílian Pedrosa Marouelli<sup>1</sup>  
Gláucia Salles Cortopassi Buso<sup>2</sup>  
Janaina Silvestre Magalhães<sup>3</sup>  
Cláudia Fortes Ferreira<sup>4</sup>  
Antônio Carlos Torres<sup>5</sup>**

## **Resumo**

Este trabalho teve como objetivo a observação da variabilidade genética de plantas oriundas da embriogênese somática de genótipos de batata-doce, via marcadores do tipo RAPD. Foram analisados 81 regenerantes oriundos da embriogênese somática de genótipos de batata-doce, compreendendo oito cultivares. Foram testados 32 primers, dos quais 22 foram selecionados com base no nível e qualidade de polimorfismo. Cada reação foi realizada em um termociclador MJ, programado para 40 ciclos de: 1 min. a 92°C, 1 min. a 35°C, 2 min. a 75°C. Aos produtos das reações foram adicionados 3µl de tampão de carregamento. Após eletroforese em géis de agarose a 1,5%, os fragmentos foram visualizados, com marcadores 1Kb nos poços adjacentes as amostras já carregadas. Os 22 'primers' utilizados geraram 80 marcadores polimórficos. Os marcadores RAPD mostraram-se de grande utilidade para rápida análise de fidelidade genética de plantas oriundas de embriogênese somática de Ipomea batatas. Foram detectados nove grupos polimórficos correspondentes às cultivares/regenerantes de Ipomea batatas analisadas neste estudo e de uso comercial.

Termos para indexação: batata-doce, Ipomea batatas, embriogênese

---

<sup>1</sup>Estagiária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup>Eng. Agr., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. E-mail: glaucia@cenargen.com.br

<sup>3</sup>Bióloga, Embrapa Hortaliças, E-mail: torres@cnph.embrapa.br

<sup>4</sup>Eng. Agr., PhD, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. E-mail: claudiaf@cnpmf@embrapa.br

<sup>5</sup>Eng. Agr., PhD, Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. E-mail: torres@cnph.embrapa.br

# Use of RAPD Markers to Study the Genetic Variability of Sweet-Potato Plants from Somatic Embryogenesis

---

## ABSTRACT

In this work it was investigated the genetic variability, via RAPD markers of eighty-one clones derived from somatic embryogenesis of eight sweetpotato genotypes. Twenty-two primers were selected and generated eighty polymorphic amplicons. The fragments analysis showed no relevant variability among clones. However, in some cases it was found that clones originated from the same cultivar displayed similar patterns of amplification with a distinct cultivar used in the propagation process. Therefore, it was possible to show that RAPD molecular markers are usefull in testing of plant genetic fidelity from clones derived via somatic embryogenesis and also to identify contamination during the manipulation of plant material of sweet-potato.

Index terms: *Ipomea batatas*, embriogenesis, RAPD, resistance inducer

## INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma dicotiledônea da família Convolvulacea, que inclui cerca de 50 gêneros e mais de 1.000 espécies, sendo que dentre elas apenas a batata-doce tem cultivo de expressão econômica (Woolfe, 1992). Considera-se que o centro de origem da batata-doce está no Noroeste da América do Sul e na região Maia da América Central (IBPGR, 1981).

Em geral, a planta possui caule herbáceo, apresenta hábito de crescimento rasteiro, podendo ainda ser ereto ou intermediário, com ramificações de tamanho, cor e pilosidade variáveis; folhas largas, com formato, cor e recortes também variáveis; pecíolo longo; flores hermafroditas de fecundação cruzada; frutos do tipo cápsula deiscente (Edmond e Ammerman, 1971); e dois tipos de raiz: a de reserva ou tuberosa, que constitui a principal parte de interesse comercial, e as raízes absorventes, responsáveis pela absorção de água e nutrientes do solo. As raízes tuberosas podem apresentar formato e coloração variáveis.

A batata-doce apresenta custo de produção e investimentos baixos, e retorno elevado. Quando comparada com as culturas de arroz, banana, milho e sorgo, a batata-doce é mais eficiente em quantidade de energia líquida produzida por unidade de área e por unidade de tempo (Silva et al., 2002). Segundo Woolfe (1992) essa espécie é capaz de nutrir mais indivíduos por hectare quando comparada com outra espécie.

A batata-doce é, predominantemente, hexaplóide, apresentando 90 cromossomos. Além da auto-incompatibilidade (Hernandez e Miller, 1964), essa espécie também apresenta incompatibilidade cruzada entre cultivares, o que dificulta os trabalhos de melhoramento genético. Devido ao alto grau de heterozigose, as progênes obtidas por via sexual diferem geneticamente das linhagens parentais já na primeira geração. É uma planta perene, normalmente cultivada como anual, cuja propagação comercial é feita por meio de ramos ou mudas (Woolfe, 1992), o que possibilita a transmissão e o acúmulo de doenças de um ciclo de produção para outro, causando decréscimo na produtividade.

A embriogênese somática é um método de propagação *in vitro* que tem o potencial de produzir milhões de propágulos livres de patógenos e com custos competitivos aos métodos convencionais (Murashige, 1997) e, ainda, pode ser utilizada para a transformação genética de plantas. Para tanto, existe a necessidade de se ter uma população homogênea de embriões



produzidos. Pois, durante a embriogênese somática pode haver mutação ou falha na manipulação do material, e isso só pode ser observado em estádios de desenvolvimento avançado da planta.

Uma das formas de se detectar a variabilidade no início do desenvolvimento da planta e com grande rapidez é mediante a utilização de marcadores moleculares. Dentre esses, RAPD ("Random Amplified Polimorphic DNA") se caracteriza por ser uma técnica precisa, rápida e que requer baixos custo e mão-de-obra. Este trabalho teve como objetivo a observação da variabilidade genética de plantas oriundas da embriogênese somática de genótipos de batata-doce, via marcadores do tipo RAPD.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 81 regenerantes oriundos da embriogênese somática de genótipos de batata-doce, compreendendo 8 cultivares ('92', '94', '188', '442', '449', '594', 'PI3138463' e 'Jewel') (Tabela 1). A indução de calo embriogênico foi a partir de explantes constituídos do meristema apical com dois primórdios foliares cultivados em meio básico composto de sais minerais MS (Murashige e Skoog, 1962) e vitaminas, 3% de sacarose, 0,2% de phytigel, suplementado com 2,0 mg/L de 2,4-D. As culturas foram mantidas, no escuro, a temperatura de 27°C. O desenvolvimento dos embriões somáticos ocorreu após transferência dos calos embriogênicos para meio básico, fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo de fótons de  $30\mu\text{molm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e temperatura de 27°C.

Nº Regenerantes	Cultivar
1 a 40	449
41 a 46	188
47 a 49	92
50 a 53	442
54 a 62	94
63 a 67	594
68 a 72	PI3138463
73 a 81	Jewel

**Tabela 1.** Relação dos genótipos de *I. batatas* analisados com marcadores RAPD.

O DNA foi extraído de folhas jovens de plantas de batata-doce, desenvolvidas em casa de vegetação, conforme descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). As reações de amplificação do DNA foram feitas por PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Cada 13 µl de reação continha: 3,0 µl de DNA genômico a 3,0 ng/µl; 4,92 µl de água milli-Q autoclavada; 1,30 µl de Tampão 10X para Taq DNA Polimerase; 1,04 µl de dNTPs 2,5 mM; 1,5 µl de Primer (Operon Technologies, USA) 10 ng/µl e 0,2 µl de enzima Taq DNA Polimerase.

Foram testados 32 primers, dos quais 22 foram selecionados (OPA11, OPC2, OPC8, OPC12, OPC14, OPE20, OPF6, OPJ13, OPJ19, OPK6, OPK20, OPL8, OPL12, OPL14, OPN9, OPP19, OPU10, OPV12, OPV14, OPY4, OPY19 e OPZ10) com base no nível e qualidade de polimorfismo. Cada reação foi realizada em um termociclador MJ, programado para 40 ciclos de: 1 min. a 92°C, 1 min. a 35°C, 2 min. a 75°C. Aos produtos das reações foram adicionados 3µl de tampão de carregamento. Após eletroforese em géis de agarose a 1,5%, os fragmentos foram visualizados, com marcadores 1Kb nos poços adjacentes às amostras já carregadas.

O "fingerprint" de DNA obtido a partir desta técnica permitiu gerar uma matriz binária com 81 acessos de *I. batatas* e 80 marcadores RAPD, a qual foi utilizada para estimar a similaridade genética entre os acessos empregando o Coeficiente de Jaccard. Os acessos foram agrupados em dendrograma gerado pela opção UPGMA do software NTSYS – PC versão 2.02. Uma análise de Componentes Principais baseada nas distâncias genéticas também foi realizada utilizando o programa NTSYS.

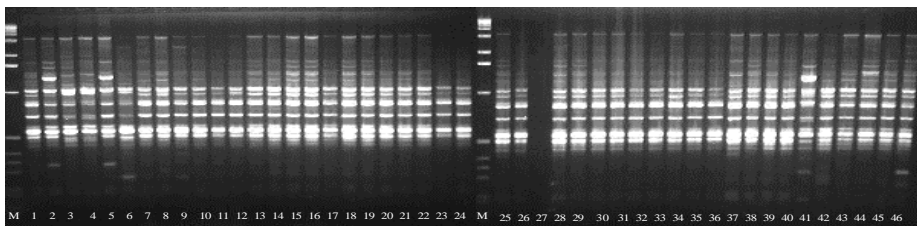
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da variabilidade genética das plantas oriundas da embriogênese somática de genótipos de batata-doce, mediante marcadores de RAPD propicia a detecção da variabilidade no início do desenvolvimento da planta e com grande rapidez, não sendo necessário esperar o crescimento e desenvolvimento subsequente da planta. Desta forma, Os 22 'primers' utilizados geraram 80 marcadores polimórficos (Figura 1). A análise da similaridade genética dos 81 regenerantes viabilizou a construção de um dendrograma (Figura 2) e de um gráfico em três dimensões (Figura 3), resultante da Análise de Coordenadas Principais, os quais permitiram visualizar a formação de nove grupos. O primeiro formado por clones da cultivar '449', o segundo da '188', o terceiro da '92', o quarto da '94', o quinto da '442', o sexto (regenerantes

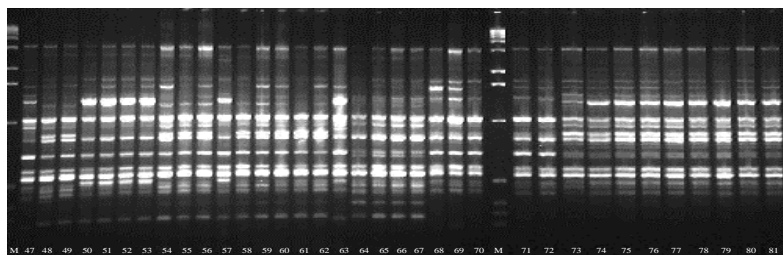
'3', '4' e '6') de origem não identificada, o sétimo da '594', o oitavo da 'PI3138463' e o nono da cultivar 'Jewel'.

Pela análise dos resultados pode-se inferir que não houve variabilidade relevante dentre os clones da maioria das cultivares. Resultados similares foram obtidos por Sharma et al. (2004) em trabalhos com plantas oriundas da embriogênese somática de batata-doce. Porém, no presente trabalho, verificou-se em clones originados da mesma cultivar, padrão de amplificação idêntico ao de outra cultivar utilizada no processo de propagação (regenerantes '2', '5' e '57'), evidenciando a contaminação de material na manipulação. Além disso, observou-se que as matrizes das cultivares: '188' (regenerante '41'), '92' (regenerante '47') e '594' (regenerante '63') apresentaram padrões de amplificação diferentes dos seus supostos clones. Com isso, deduz-se que esses acessos não correspondem às matrizes de tais clones. Provavelmente, indivíduos de mesmo número na coleção não são geneticamente idênticos.

**Figura1.** Gel de agarose de marcadores de RAPD de plantas de *I. batatas* regeneradas de embriões somáticos.

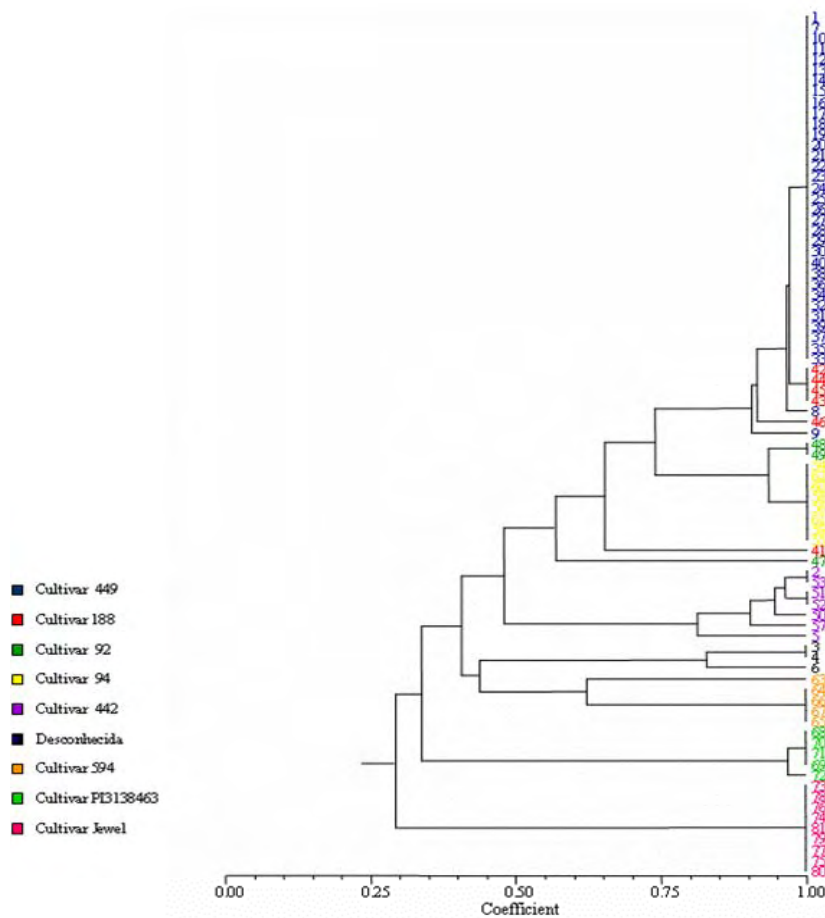


**A.** Bandas polimórficas geradas pelo primer OPC12 (5'-3'). Colunas M, marcador molecular (1 Kb); coluna 1, planta matriz da cv. '449'; colunas de 2 a 40, plantas oriundas de embriões somáticos da cv. '449'; coluna 41, planta matriz da cv. '188'; colunas 42 a 46, plantas oriundas de embriões somáticos da cv. '188'.

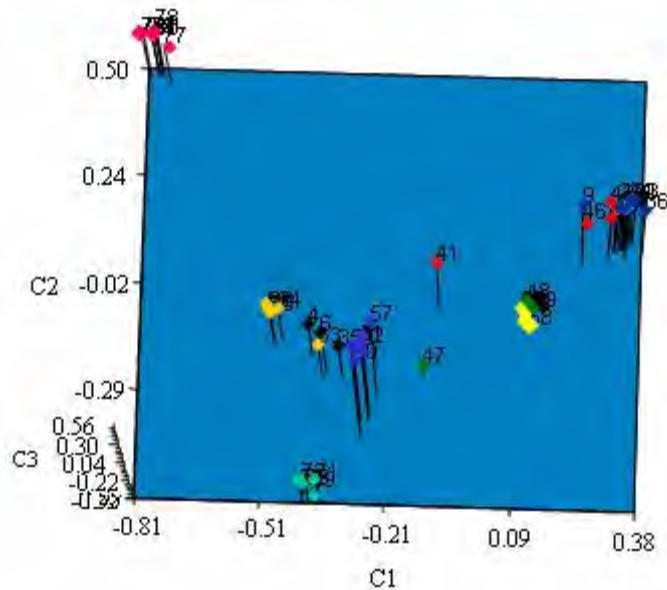


**B.** Bandas polimórficas geradas pelo primer OPC12 (5'-3'). Colunas M, marcador molecular (1 Kb); coluna 47, planta matriz da cv. '92'; colunas 48 e 49, plantas oriundas de embriões somáticos da cv. '92'; coluna 50, planta matriz da cv. '442'; colunas de 51 a 53 plantas oriundas de embriões somáticos da cv. '442'; coluna 54, planta matriz da cv. '94'; colunas de 55 a 62 plantas oriundas de embriões somáticos da cv. '94'; coluna 63, planta matriz da cv. '594'; colunas de 64 a 67, plantas oriundas de embriões somáticos da cv. '594'; coluna 68, planta matriz da cv. 'PI3138463'; colunas de 69 a 72, plantas oriundas de embriões somáticos da cv. 'PI 3138463'; coluna 73, planta matriz da cv. 'Jewel'; colunas de 74 a 81, plantas oriundas de embriões somáticos da cv. 'Jewel'.

Os regenerantes '8', '9' e '46' apresentaram padrões de amplificação distintos de suas supostas matrizes, mas como houve mistura de material não é possível afirmar que poderia ser uma variação somaclonal. Desta forma concluiu-se que para detectar variabilidade devido à embriogênese somática deve-se ter controle rígido de manipulação do material no laboratório e no momento de extração dos explantes.



**Figura 2.** Análise de agrupamento baseada no coeficiente de similaridade de Jaccard de 81 acessos provenientes da embriogênese somática de genótipos de batata-doce.



**Figura 3.** Análise gráfica em 3D, resultante da Análise de Coordenadas Principais de acessos oriundos da embriogênese somática de genótipos de batata-doce. Os três primeiros eixos explicam 81% da variação.

## CONCLUSÕES

- Marcadores RAPD mostraram-se de grande utilidade para rápida análise de fidelidade genética de plantas oriundas de embriogênese somática de *Ipomea batatas*.
- Marcadores RAPD são úteis para detectar a ocorrência de clones de origem diversa contaminante de embriogênese somática específica.
- Foram detectados nove grupos polimórficos correspondentes às cultivares/regenerantes de *Ipomea batatas* analisadas neste estudo e de uso comercial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EDMOND, J. B.; AMMERMAN, G. R. **Sweet potatoes: production, processing marketing.** The Air Publishing Company, p. 58, 1971.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética** 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.
- HERNANDEZ, T. P.; MILLER, J. C. Further Studies on the incompatibility in the sweet potato. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v. 85, p. 426-429, 1964.
- IBGPR. International Board for Plant Genetic Resources. **Genetic resources of sweet potato.** Rome: IBGPR. 30p, 1981.

MURASHIGE, T. Plant Cell and Organ Cultures a Horticultural Practices. **Acta Horticulture**, v. 78, p. 17-30, 1997.

SHARMA, S. D.; GHOSH, S. A.; MANDAL, B. B.; SRIVASTAVA, P. S. Somatic embryogenesis in a range of genotypes and genetic stability of the plants derived from somatic embryos using morphological and RAPD markers in sweet potato. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 6, n.2, p. 119-124, 2004.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. Cultura da batata-doce. In: Cereda, M. C. **Agricultura: tuberoses amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargil. 540p, 2002.

WOOLFE, J. A. The contribution of sweet potato and its products to human diet. In: HILL, W. A.; BONSE, C. K.; LORETAN, P. A. (Ed). **Sweetpotato technology for the 21st century**. Tuskegee: Tuskegee University, 1992. p.367-380.



---

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
BR 060 Km 09 Brasília/Anápolis  
Caixa Postal 218 CEP 70359-970 Brasília, DF  
Fone: (61) 3385-9110 Fax: (61) 3385-9042  
sac.hortaliças@embrapa.br  
www.cnph.embrapa.br*

**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

