

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CULTIVARES DE BATATA (*Solanum
tuberosum* L.) UTILIZANDO MARCADORES
RAPD E SSR**

ELIZÂNGELA ALMEIDA ROCHA

2008

ELIZÂNGELA ALMEIDA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CULTIVARES DE BATATA
(*Solanum tuberosum* L.) UTILIZANDO MARCADORES RAPD E SSR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos
da Biblioteca Central da UFLA**

Rocha, Elizângela Almeida.

Caracterização molecular de cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.)
utilizando marcadores RAPD e SSR / Elizângela Almeida Rocha. – Lavras :
UFLA, 2008.

87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Cultivares. 2. Marcadores moleculares. 3. Diversidade genética. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.790488

ELIZÂNGELA ALMEIDA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CULTIVARES DE BATATA
(*Solanum tuberosum* L.) UTILIZANDO MARCADORES RAPD E SSR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2008

Dra. Claudia Teixeira Guimarães

Embrapa Milho e Sorgo

Dr. Anderson Cleiton José

UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

Aos meus pais, José Lucílio e Joaquina,
pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha
vida, a minhas irmãs e aos meus irmãos pelo carinho e respeito,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiro, a Deus, responsável maior pelas minhas conquistas.

À Universidade Federal de Lavras e à Capes, pela oportunidade e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular e à Embrapa Milho e Sorgo, pela realização do experimento.

À Empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal, pela concessão dos tubérculos de batata.

Ao prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, pela oportunidade, respeito, apoio e confiança.

À Dra. Claudia, pelas valiosas colaborações e sugestões para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Anderson Cleiton José, pelo incentivo, conselhos e por participar da banca.

Ao Dr. Marcelo Murrad, pelas correções da dissertação.

Ao Prof. Dr. Antônio Chalfun, pelos ensinamentos.

A minha família, especialmente aos meus pais, pela minha formação e razão da minha existência; as minhas irmãs, Aleci e Rosângela, pela força e confiança em meu potencial; aos meus irmãos que, mesmo de longe, sempre torceram pelo meu sucesso; a minhas cunhadas pelo apoio e a meus sobrinhos simplesmente por existirem.

Aos meus eternos amigos: Priscila, Hisaias, Murilo, Rodrigo e Fabiana.

Ao pessoal do LCBM: Michele, Evânia, Humberto, Guilherme, Anderson Tadeu, Anderson Ramos e Gustavo, pela agradável convivência.

Aos meus colegas da Biotecnologia Vegetal: Lívia, Kalynka, Charles, Rondon, Marcelo e Patrícia, pelo carinho, respeito e excelente convivência.

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1. Espécie em Estudo.....	3
2.1.1. Origem.....	3
2.1.2. Aspectos Botânicos.....	3
2.1.3. Importância econômica da batata	4
2.2. Cultivares estudadas	5
2.3. Identificação de cultivares	11
2.4. Marcadores Genéticos.....	13
2.4.1. RAPD.....	16
2.4.2. SSR ou Microsatélites	18
2.5. Avaliação da divergência genética	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Material vegetal.....	25
3.2. Extração e quantificação do DNA.....	26
3.3. Marcadores RAPD	27
3.4. Marcadores Microsatélite (SSR).....	28
3.5. Avaliação dos dados moleculares	29
3.6. Análise da diversidade genética	29
3.7. Identificação do número ótimo de marcadores	30

3.8. Análise do PIC (índice de conteúdo polimórfico).....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. RAPD.....	32
4.2. Diferenciação de cultivares de batata utilizando marcadores RAPD	40
4.3. SSR.....	46
4.3.1. Diferenciação de cultivares de batata utilizando marcadores SSR.....	56
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Possíveis resultados de comparações de dois genótipos por marcadores RAPD.....	21
TABELA 2. Cultivares de batata francesas protegidas no Brasil fornecidas pela Empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda. (Andradas, MG).....	25
TABELA 3. Cultivares de batata não provenientes da França e não protegidas no Brasil fornecidas pela Empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda. (Andradas, MG).....	26
TABELA 4: <i>Primers</i> RAPD, suas respectivas seqüências de bases, PIC (<i>Polymorphic Index Content</i>) e número de bandas polimórficas obtidas em 16 cultivares de batata. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras–MG, 2008.....	34
TABELA 5. Matriz de similaridade genéticas, utilizando <i>primers</i> RAPD, entre 16 cultivares de batata analisados dois a dois. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008.....	37
TABELA 6: <i>Primers</i> SSR, suas respectivas seqüências de bases, PIC (<i>Polymorphic Index Content</i>) e número de bandas polimórficas obtidas em 16 cultivares de batata. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008.....	47
TABELA 7. Matriz de distâncias genéticas, utilizando <i>primers</i> SSR, entre 16 cultivares de batata analisados dois a dois. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008.....	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Análise do número mínimo de marcadores RAPD para estimativa das similaridade genética entre as 16 cultivares de batata estudadas, utilizando números crescentes de bandas polimórficas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008..... 35
- Figura 2.** Dendrograma representando as similaridades genéticas obtidas com base em marcadores RAPD, entre 16 cultivares de batata, gerado pelo método UPGMA. A consistência do agrupamento foi determinada pela análise de *bootstrap*. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008..... 38
- Figura 3.** Fluxograma para diferenciação das 16 cultivares de batata em estudo, utilizando marcadores RAPD. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude.). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008..... 41
- Figura 4.** Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPG08, em gel de agarose 1,2%. (Em: Emeraude, At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2007..... 42

- Figura 5.** Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPG13, em gel de agarose 1,2%. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008..... 43
- Figura 6.** Padrões de amplificação obtidos com *primer* RAPD OPJ13, em gel de agarose 1,2%. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008..... 43
- Figura 7.** Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPN02, em gel de agarose 1,2%. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008..... 44
- Figura 8.** Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPG10, em gel de agarose 1,2%. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008..... 44
- Figura 9.** Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPP04, em gel de agarose 1,2%. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela,

Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008.....	45
Figura 10. Padrões de amplificação obtidos com o <i>primer</i> SSR STM2013, em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008.....	49
Figura 11. Análise do número mínimo de marcadores SSR para estimativa das similaridades genéticas entre as 16 cultivares de batata estudadas, utilizando números crescentes de bandas polimórficas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008.....	50
Figura 12. Dendrograma representando as similaridades genéticas obtidas com base em marcadores SSR, entre 16 cultivares de batata, gerado pelo método UPGMA. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras.....	53
Figura 13. Fluxograma para diferenciação das 16 cultivares de batata em estudo, utilizando marcadores SSR. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude,). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG, 2008.....	57
Figura 14. Padrões de amplificação obtidos com o <i>primer</i> SSR STM0031, em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast:	

Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude).
Laboratório Central de Biologia Molecular da
Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG,
2008..... 58

Figura 15. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* SSR
STM1106, em gel de poliacrilamida 10% corado com
nitrato de prata. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa,
Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden,
Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast:
Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude).
Laboratório Central de Biologia Molecular da
Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG,
2008..... 58

Figura 16. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* SSR
STM2013, em gel de poliacrilamida 10% corado com
nitrato de prata. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa,
Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden,
Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast:
Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude).
Laboratório Central de Biologia Molecular da
Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG,
2008..... 59

RESUMO

ROCHA, E. A. **Caracterização molecular de cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2008. 87p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A introdução de novas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) tem sido uma estratégia adotada para aumentar a produtividade desta cultura. A batata apresenta base genética estreita, o que dificulta a identificação das cultivares por meio de marcadores morfológicos. Assim, há necessidade constante de utilizar métodos que possam identificar tais cultivares e avaliar a variabilidade genética em seu germoplasma. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a divergência genética e identificar cultivares de batata por meio de marcadores RAPD e SSR. Foram avaliadas 16 cultivares, fornecidas pela Empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda. O DNA genômico foi amplificado com *primers* RAPD e com pares de *primers* SSR e os respectivos fragmentos gerados foram analisados por eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida, dependendo do marcador. As distâncias genéticas foram obtidas pelo coeficiente de Jaccard e os agrupamentos foram realizados pelo método UPGMA. Adicionalmente, foram calculados os valores de PIC para os *primers* RAPD e SSR utilizados. Os 25 *primers* RAPD geraram 92 bandas polimórficas e os 20 pares de *primers* SSR produziram 136 bandas polimórficas, que foram suficientes para estabelecer a similaridade genética entre as cultivares em estudo. A análise de agrupamento produziu os dendogramas que permitiram uma distinção genética das cultivares. Os valores de PIC demonstraram o alto conteúdo informativo dos *primers* RAPD e SSR e, com a utilização de 6 *primers* RAPD e de 3 *primers* SSR, foi possível identificar todas as 16 cultivares analisadas neste estudo. Os marcadores RAPD e SSR foram adequados para estudos de diversidade genética e para a caracterização das cultivares de batata, confirmando o potencial das técnicas na análise de *fingerprinting* e na caracterização genética de cultivares de batata.

¹ Comitê Orientador: Prof. Luciano Vilela Paiva – UFLA (Orientador), Claudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo (Co-orientador).

ABSTRACT

ROCHA, E. A. **Molecular characterization of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) using RAPD and SSR markers.** 2008. 87p. Dissertation (Master Program in Agronomy/Plant Biotechnology) – Federal University of Lavras, Minas Gerais, Brazil.²

The introduction of new cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.) has been an adopted strategy to increase the productivity of this culture. Potato presents narrow genetic base, what makes the identification of their cultivars using morphologic markers difficult. Thus, it is necessary to use methods that can identify them and evaluate their genetic variability in its germoplasm. This work was carried out to evaluate the genetic divergence and to identify potato cultivars, using RAPD and SSR markers. A total of 16 cultivars were evaluated, supplied by the Multiplanta Vegetal Technology Ltda company. The genomic DNA was amplified with RAPD primer and with pairs of SSR primers. The generated fragments were analyzed by agarose or polyacrylamide gel electrophoresis, depending on the marker. The genetic distances were gotten by Jaccard coefficient and the groupings were carried out using UPGMA method. Additionally, the values of PIC were calculated for used RAPD and SSR primers. The 25 RAPD primers generated 92 polymorphic bands and the 20 pairs of SSR primers produced 136 polymorphic bands, which were enough to establish the genetic similarity among studied cultivars. The grouping analysis produced the dendrograms that allowed a genetic distinction of cultivars. The values of PIC demonstrated high informative content of RAPD and SSR primers and, with the use of 6 RAPD and 3 SSR primers, it was possible to identify all the 16 analyzed cultivars. RAPD and SSR markers were adjusted for genetic diversity studies and the characterization of potato cultivars, confirming the potential of the techniques in the analysis of fingerprinting in the genetic characterization of potato cultivars.

² Guidance Committee: Luciano Vilela Paiva – UFLA (Adviser), Claudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo (Co-Adviser).

1 INTRODUÇÃO

A introdução de novas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) tem sido uma importante estratégia adotada para aumentar a produtividade da cultura, uma vez que é a quarta fonte de alimento da humanidade, após arroz, trigo e 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).

Hoje, há mais de 7.500 diferentes variedades de batata que são produzidas em todo o mundo (Hamester & Hills, 2003). Entretanto, devido aos processos de melhoramento associados ao processo de cruzamento por autofecundação, a batata apresenta uma base genética estreita, o que dificulta a sua identificação por meio de marcadores morfológicos.

Diante disso, há a necessidade constante de utilizar métodos confiáveis que possam identificar corretamente tais cultivares e avaliar a divergência genética em seu germoplasma. Como alternativa, os avanços nas técnicas moleculares têm possibilitado o estudo da variabilidade genética no DNA, o que tem proporcionado um aumento significativo na precisão para avaliar a diversidade genética e a identificação de cultivares.

Dessa forma, a habilidade para discriminar e identificar clones e cultivares de batata tem aplicação na pesquisa e nos programas de melhoramento. O conhecimento da diversidade genética entre genótipos permite a organização da variabilidade desses materiais, auxiliando a seleção de progenitores e potencializando a obtenção de ganhos genéticos. A caracterização da diversidade genética também tem sido importante para a certificação de batata sementes e comercialização do tubérculo (Ford & Taylor, 1997), bem como para avaliar os direitos da propriedade intelectual e de marcas registradas (Coombs et al., 2004).

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

Dentre os vários marcadores moleculares, os mais utilizados para batata têm sido o fragmento de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e o microssatélite ou seqüência simples repetida (SSR) (Demeke et al., 1996). Os marcadores RAPD apresentam como vantagem a capacidade de detectar polimorfismo de modo simples e rápido, enquanto que os marcadores microssatélites apresentam alta reprodutibilidade, são bem distribuídos dentro do genoma e possuem elevada informatividade genética.

Diante disso, este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar e avaliar a divergência genética entre 16 cultivares de batatas francesas, que estão sendo disponibilizadas aos bataticultores brasileiros, e não francesas, por meio de marcadores RAPD e SSR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécie em estudo

2.1.1 Origem

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é originada dos Andes, próximo à fronteira entre o Peru e a Bolívia, onde é cultivada desde a antiguidade. No processo de dispersão, foi levada para a Europa, sendo introduzida na Espanha e na Inglaterra nos anos de 1570 e 1588, respectivamente. Da Europa, a batata foi levada para a América do Norte, a África do Sul e a Austrália, no início do século XVIII, só chegando ao Brasil no final do século XIX (Fedalto, 1982; Hawkes, 1994).

A batata pertence à família *Solanaceae*, ao gênero *Solanum* e tem número básico de cromossomos igual a 12. Porém, há espécies com diversos graus de ploidia, variando de diplóide ($2n = 24$) a hexaplóide ($2n = 72$). A espécie *Solanum tuberosum* é tetraplóide e a mais cultivada. A partir dela, foram diferenciadas as subespécies *tuberosum* e *andigena*, das quais a *Solanum tuberosum* spp *tuberosum* se tornou o alimento universal (Fontes, 2005).

2.1.2 Aspectos botânicos

A batateira é uma planta herbácea, dicotiledônea, anual, que possui raiz, caule aéreo, caule subterrâneo (estólion e tubérculo), folha e flores hermafroditas de coloração branca, arroxeadas ou rosadas. Normalmente, são autopolinizadas, embora possam apresentar polinização cruzada, às vezes em nível bastante elevado (Filgueiras, 2003).

O tubérculo é a ponta entumescida do caule subterrâneo, na qual são acumuladas substâncias de reserva e a forma de reprodução e a parte comercial da planta. Cerca de 77% do tubérculo é constituído de água e 19%-20% de carboidratos, dos quais destacam-se amido, açúcares não redutores (sacarose) e

reduzidores (glicose e frutose), celulose, pectinas e gomas. Também se encontram proteínas e vitaminas, minerais, glicoalcalóides e lipídeos (Fontes, 2005).

As características dos tubérculos é que determinam sua aceitação por parte do consumidor, principalmente as externas, como coloração da película externa, da polpa e o formato se alongado ou arredondado. O consumidor brasileiro é considerado, por observadores externos, um dos mais exigentes quanto ao aspecto do tubérculo (Filgueiras, 2003).

2.1.3 Importância econômica da batata

Nos últimos 10 anos, a produção mundial de batata, nos países em desenvolvimento, particularmente na Ásia, teve aumento de 4,5% na média anual, superando em crescimento a produção de muitos outros produtos alimentares importantes.

A cultura da batata ocupa a quarta posição, em importância econômica no mundo, com produção anual de 323 milhões de toneladas. A Ásia é a maior região produtora (41,24%), seguida da Europa (40,97%), América do Norte (7,4%), África (4,8%) e América do Sul (4,3%). Em relação aos países, a China é o maior produtor, com 70 milhões de toneladas, seguida da Rússia, Índia, Estados Unidos e Ucrânia, com produções de 38,5; 24; 19,4 e 19,7 milhões de toneladas, respectivamente. Na América do Sul, o Peru tem a maior produção anual (3,3 milhões de toneladas), seguido de perto pelo Brasil, com, aproximadamente, três milhões de toneladas e pela Argentina, com 2,4 milhões de toneladas (FAO, 2007).

O Brasil possui elevado potencial edafoclimático para o cultivo da batata que, em geral, é produzida com alto nível tecnológico. Em 2006, a produção foi de 3,137 milhões de toneladas em uma área de 140,7 mil hectares, colocando o Brasil como 12º maior produtor em cultivo de batata. Os estados de Minas Gerais (30%), Paraná (26%), São Paulo (20%) e Rio Grande do Sul (13%) são responsáveis pela maior parte da produção nacional (Agrianual, 2006). Nos

últimos 15 anos, a produção de batata por hectare cresceu, em média, 5% ao ano, aumentando assim a produção média de 14 a 22 toneladas por hectare (FAO, 2007).

2.2 Cultivares estudadas

Ágata – tem origem em Geerstsema Zaden B.V., Países Baixos, descrita no catálogo francês, em 1990, como resultado do cruzamento entre ‘BM 52.72’ e ‘Sirco’. Características morfológicas: gema de cor vermelho-violeta e flores brancas; apresentam tubérculos ovais de casca amarela e predominantemente lisa, polpa de cor amarelo-clara e olhos superficiais. Sua maturação é precoce a semiprecoce, apresenta alto rendimento e baixo teor de matéria seca, é bastante consistente e de cor firme quando cozida. Quanto a doenças, essa cultivar é susceptível a *Phytophthora* das folhas, pouco susceptível ao vírus Y, imune ao cancro e resistente ao patótipo A da *Globodera rostochiensis* (nematóide dourado). Essa cultivar é selecionada para consumo, pelo cozimento, no uso doméstico.

Asterix – desenvolvida pela empresa HZPC, Países Baixos, por meio do cruzamento entre ‘Cardinal’ e ‘SVP Ve 709’. Quanto às características morfológicas, possui gemas e flores de cor vermelho-violeta, apresenta um alto rendimento de tubérculos de tamanho moderado, ovais-alongados, olhos superficiais, pele de cor vermelha e polpa amarela. É resistente ao nematóide dourado, imune ao coração oco, tem boa resistência ao vírus A, X e Y, possui resistência moderada à sarna comum e à requeima. É uma variedade fácil de plantar e boa para ser armazenada; tem ótimo sabor e é excelente para ser usada no processamento de pré-fritas congeladas (todas as grandes indústrias holandesas utilizam essa cultivar). É a variedade cujo cultivo mais cresceu na Europa, nos últimos anos. Por seu alto teor de matéria seca, apresenta boas

características, tanto para o cozimento quanto para fritura, sendo bastante utilizada industrialmente na fabricação de *french fries* (pré-fritas congeladas).

Atlantic – desenvolvida no Maine Department Agriculture, Estados Unidos (1978), a partir do cruzamento entre ‘B 5141-6 (Lenape)’ e ‘Wauseon’. Em relação aos caracteres descritivos, essa cultivar possui tubérculos com formato oval-arredondado, película branca, meio áspera, olhos e inserção de estolho meio-profundo e polpa branca. É uma planta de médio a alto porte, com folhas verdes brilhantes, flores e gema vermelho-violeta. Quanto às doenças, são muito susceptíveis à requeima, ao vírus Y e à muchadeira e pouco susceptível à sarna comum. Quanto à sua utilidade, é específica para processamento na forma de rodela fritas (chips), de produção industrial.

Casteline – originada na Bretagne Plants, França, descrita no catálogo francês em 2001, como resultado do cruzamento entre ‘Safrane’ e ‘85F276.5’. Como características morfológicas, possui maturação precoce, os tubérculos apresentam formato oval alongado, olhos pouco profundos, pele amarela pálida; é planta de porte médio, com bastante folhas de cor verde clara, semi-brilhante a brilhante e de largura média. O caule não possui pigmentação. Também apresenta floração abundante, com flores brancas e gema de cor vermelho-violeta. Quanto à sensibilidade a doenças, essa cultivar é sensível ao míldio da folha, ao míldio do tubérculo, ao enrolamento e aos vírus X, Y e A, sendo resistente ao Nematóide RO 1-4. Quanto à sua utilidade, é recomendada para o cozimento no uso doméstico.

Chipie – desenvolvida pela Station de Recherche du Comité Nord, França e catalogada em 2001, como resultado do cruzamento entre ‘Pilgrin’ e ‘(Saturna x Pentland Dell)’. Como características morfológicas apresentam tubérculos com formato alongado, cor da pele e da polpa amarelo-clara, flores

brancas e gemas vermelho-violetaz. Em relação às doenças possuem resistência ao vírus X e A, pouca resistência ao vírus Y e a doenças fúngicas, como a requeima. Foram melhoradas para o uso industrial na forma de chips e palha.

Colorado – desenvolvida pela Station de Recherche du Comité Nord et G.I.P.T. (Le Groupement Interprofessionnel pour la valorisation de la Pomme de Terre), França, e catalogada em 2002, como resultado do cruzamento entre ‘Toridon’ e ‘(Desiree x Pentland Dell)’. Apresenta tubérculos com formato oval alongado, cor da pele vermelho-fosca e da polpa amarelo-clara. E, ainda, flores e gemas vermelho-violetas. Quanto a doenças, são sensíveis ao vírus X e A e possuem resistência média ao vírus Y e resistência alta as doenças fúngicas. É usada na indústria, na forma de pré-fritura e congelamento.

Cupido – desenvolvida em Meijer Seedpotoes & Research B.V., Países Baixos, gerada a partir do cruzamento entre ‘W 72-22-496’ e ‘Estima’. Apresenta tubérculo oval alongado, pele amarela e polpa amarelo-clara. Esta cultivar é susceptível à requeima (*Phitophthora infestans*) e à pinta-preta (*Altenaria solani*), e bastante susceptível à podridão-seca, provocada por *Fusarim* sp. e *Erwinia* sp. Possui, ainda, alta resistência ao enrolamento (PLRV), ao mosaico (PVY), à verruga (*Synchytrium endobioticum*) e ao nematóide do cisto patótipo A. É uma batata utilizada para mesa, de excelente sabor, textura firme e sem coloração quando cozida. No entanto, não é utilizada para fritura, devido ao alto teor de açúcares redutores.

Éden – desenvolvida pela Bretagne Plants, França, catalogada em 2000, como resultado do cruzamento entre ‘Eole’ e ‘Pentland Dell’. Como características descritivas, apresenta tubérculos grandes com formato alongado, olhos profundos, pele e polpa amareladas, gema violeta-azulada, com pilosidade média a forte. A planta é de médio porte, o caule não possui pigmentação, as

folhas têm coloração verde médio, são semibrilhantes e são de largura média. Apresenta floração baixa, com formação de flores brancas. Quanto à susceptibilidade a doenças, é resistente ao vírus X e A e ao nematóide RO 1-4, possui sensibilidade ao míldio da folha, ao míldio do tubérculo e ao vírus do enrolamento. Quanto ao consumo, é utilizada para mesa, podendo ser cozida ou frita.

Emeraude – desenvolvida na França, pela Bretagne Plants, a partir do cruzamento entre ‘Estima’ e ‘INRA 75.36.45’. Quanto às características morfológicas, apresenta tubérculos bastante numerosos e muito grandes, com formato oval alongado, regular, olhos muito superficiais, pele e polpa amarelada, gemas vermelho-violetas e com pilosidade fraca. A planta é de grande porte, do tipo arbustivo. Os caules possuem pigmentação fraca, as folhas são verde-claras a verde-escuras e a floração é razoavelmente abundante, com flores vermelhas. Quanto à susceptibilidade a doenças, essa cultivar apresenta resistência média ao vírus Y, ao vírus do enrolamento e a doenças fúngicas, como a requeima. Quanto ao consumo, é utilizada para cozimento e fritura, no uso doméstico.

Floriane – originada a partir do cruzamento entre os parentais ‘85K102.4’ e ‘Europa’, pela Bretagne Plants, França e catalogada em 2001. Quanto às características morfológicas apresenta tubérculos oval-alongados, olhos pouco profundos, pele amarela e polpa amarela pálida. A gema é vermelho-violeta com pilosidade forte. A planta é de porte médio com caule sem pigmentação e folhas verde-médio a escuro, semibrilhantes a brilhantes. Possui floração abundante, com flores vermelho-violetas. Quanto às doenças, essa cultivar apresenta resistência ao vírus X e A e sensibilidade ao míldio da folha, ao míldio do tubérculo, à sarna comum, ao vírus Y e ao nematóide RO 1-4. Quanto à utilização, é recomendada para uso doméstico, por meio de cozimento.

Florice – originou-se na Station de Recherche du Comite Nord, França, a partir dos parentais ‘Fanette’ e ‘INRA 72.68.5’. Foi catalogada em 2001. Quanto às características morfológicas, apresenta flores e gemas violeta, tubérculos com formato oval, pele e polpa de cor amarelo-clara. Em relação às doenças, apresenta resistência média ao vírus Y e à requeima. São indicadas para o uso doméstico para serem cozidas.

Isabel – originada na Grocep, França (1999), por meio dos parentais ‘Nicola’ e ‘Tenor’. Quanto às características morfológicas, essa cultivar apresenta tubérculo oval-alongado, olhos pouco profundos, pele amarela e polpa amarela-escura. A gema é vermelho-violeta, com pilosidade média e as flores são brancas. A planta é de médio porte, com ausência de pigmentação do caule e folhas verde-médio a escuro e brilhantes. Apresenta, ainda, floração abundante com flores brancas. Quanto a doenças, esta cultivar apresenta sensibilidade ao míldio da folha, ao vírus A e Y e ao vírus do enrolamento, sendo resistente ao vírus X e ao nematóide RO 1-4. Quanto ao consumo, é recomendada para uso doméstico, por meio de cozimento.

Monalisa – desenvolvida pela empresa H.Z.P.C., Países Baixos, por meio dos parentais ‘Bierma A 1287’ e ‘Colmo’, catalogada em 1982. Os tubérculos apresentam formato grande e alongado. A gema é vermelho-violeta, olhos superficiais e pouco sensíveis ao azulamento. Apresenta floração abundante, com flores brancas. É bastante susceptível à fitóftora dos tubérculos, pouco susceptível ao vírus Y e ao vírus do enrolamento e resistente ao vírus A e ao cancro. Apresenta baixo teor de matéria seca. Trata-se de uma batata indicada para mesa, apresentando alta qualidade para o cozimento.

Mondial – originada na D. Biemond, Países Baixos (1987), a partir dos parentais ‘Spunta’ e ‘SVP Ve 66.29.5’. Os tubérculos são grandes, com formato

oval-alongado, possui olhos superficiais, gema vermelho-violeta e flores brancas. Quanto a doenças, essa cultivar é bastante susceptível à *Phytophthora* das folhas e ao vírus do enrolamento, pouco susceptível à *Phytophthora* dos tubérculos e ao vírus Yn. É imune aos vírus A e X e ao cancro e, ainda, resistente ao patotipo A da *Globodera rostochiensis* (nematódeo dourado). Batata indicada para mesa, apresentando boa qualidade para o cozimento.

Naturela – desenvolvida pela Bretagne Plants, França, a partir dos parentais ‘Sirco’ e ‘Pentland Squire’ e catalogada em 1998. Apresenta maturação de média a semilonga. Como características morfológicas, apresenta tubérculo oval-alongado, olhos pouco profundos, pele amarela, polpa amarelo-clara, gema com coloração vermelha a lilás e formato ovalado. O caule não possui pigmentação, as folhas são verdes, opacas a semibrilhantes. Possui, ainda, floração abundante, com flores brancas e botão floral não pigmentado. Quanto a doenças, essa cultivar apresenta sensibilidade aos vírus X, Y e A e é pouco sensível ao enrolamento. Quanto à utilidade, é indicada para o uso doméstico por meio da fritura e do cozimento.

Oceania – desenvolvida na França, pela Bretagne Plants et Coopagri, por meio do cruzamento entre ‘Astarte’ e ‘Thomana’. Quanto às características morfológicas, essa cultivar possui tubérculo oval a arredondado, muito regular, olhos bastante superficiais, pele e polpa amarela. As gemas e as flores são vermelho-violetas. Quanto à utilidade, são recomendadas para uso industrial, na forma de chips e batata palha.

Todas as informações sobre as cultivares de batata presente neste estudo foram obtidas pela Plant de Pomme de Terre (2007), disponibilizadas no endereço <http://www.plantdepommedeterre.org/2007>.

2.3 Identificação de cultivares

A caracterização de cultivares pode se basear nas diferenças de morfologia ou ser feita a partir das moléculas de proteínas ou de DNA, as quais são comumente denominadas de diferenças moleculares (Conti, 2002a). A identificação de cultivares tem sido utilizada com os propósitos de detectar rotulagens incorretas de cultivares comercializadas (Kunihisa et al., 2003) e de proteção de cultivares (Rajapakes et al., 1992; Staub & Meglic, 1993).

Para o registro e a proteção de cultivares são necessárias informações sobre a identidade genética de cada cultivar, o que corresponde ao conjunto de características fenotípicas e genotípicas, as quais diferenciam uma cultivar das demais (Brasil, 1997). No caso de cultivares de espécies de base genética estreita, para se provar que determinada cultivar é única, as informações genotípicas são mais adequadas e precisas do que apenas informações fenotípicas como os marcadores morfológicos (Vieira, 2004).

A aprovação da Lei de Proteção de Cultivares (Lei N° 9.456 de 25 de abril de 1997, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento) estimulou o uso de técnicas que possam garantir uma identificação precisa das cultivares de plantas, assegurando, dessa forma, a propriedade intelectual do material genético desenvolvido (Brasil, 1997). Segundo a nova lei de sementes, a qual foi implementada em agosto de 2003, uma cultivar, para ser protegida, deve ser registrada e submetida ao teste de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade, também denominado teste de DHE (Brasil, 2003). Esse teste consiste na avaliação de uma série de características morfológicas nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta. Tais características, denominadas descritores mínimos, são específicas para cada espécie e recomendadas pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC).

Para a batata, os descritores mínimos considerados pelo SNPC são: formato, coloração da base, intensidade de coloração da base, pubescência da

base, aspecto do ápice, intensidade de primórdios radiculares e comprimento da proteção lateral do broto, tipo de planta em relação à folhagem, hábito de crescimento, pigmentação da haste e asas (ausente, retas, onduladas ou dentadas) da planta. Quanto às folhas, inserção, fechamento e pigmentação na nervura principal; tamanho, largura, coalescência e ondulação das bordas dos folíolos e frequência de folíolos secundários; em relação à inflorescência, deve-se determinar frequência de flores, comprimento e pigmentação do pedúnculo floral, coloração da parte interna da corola, intensidade de pigmentação na parte interna da corola em flores coloridas e pigmentação da parte externa da corola em flores brancas. Devem-se informar, ainda, a frequência de frutos, o ciclo reprodutivo; em relação aos tubérculos, devem-se informar o formato (100 x comprimento/largura), a profundidade dos olhos, a aspereza da película, a cor da película, a cor da polpa e o esverdeamento dos tubérculos (Brasil, 2007), disponibilizado no endereço <http://www.agricultura.gov.br/2007>.

Estes descritores são úteis, mas não correspondem ao critério estabilidade, uma vez que sofrem influência do meio ambiente e, além disso, são necessários maior espaço físico e tempo para as avaliações (Vieira, 2004). Diante disso, nota-se a importância da obtenção de marcadores mais estáveis para fins de caracterização e posterior registro e proteção de cultivares. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), marcadores morfológicos são específicos para um determinado tecido, o que impede a sua determinação quando há apenas alguma parte vegetativa da planta disponível e existem em menor número, o que limita a cobertura do genoma. Entretanto, os mesmos autores afirmam, também, que os marcadores moleculares permitem ao pesquisador uma maior informação de dados que, associadas aos dados fenotípicos, complementam os resultados desejados para programas de melhoramento e caracterização de cultivares, por exemplo.

Outros autores também ressaltam que os descritores morfológicos são influenciados pelo ambiente (Lombard et al., 1999) e constituem uma base fraca para medir a identidade, por apresentarem uma medida indireta da composição genética do material (Binneck et al., 2002). Os descritores de DNA, por sua vez, apresentam a vantagem de representar o genótipo, mantendo consistência nos resultados e evitando o problema da avaliação dos dados com base na expressão do fenótipo (Wünsch & Hormaza, 2002). A possibilidade de acessar a variabilidade genética diretamente no DNA vem fazendo com que, cada vez mais, sejam disponibilizadas técnicas precisas que possam vir a auxiliar o processo de proteção intelectual, a caracterização e a identificação dos materiais genéticos das cultivares (Padilha, 2002).

Vários marcadores moleculares têm sido utilizados para a caracterização genética em muitas espécies vegetais, destacando-se polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP), polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD), os microssatélites ou seqüência simples repetida (SSR) e fragmentos de comprimento polimórfico amplificado (AFLP).

2.4 Marcadores genéticos

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (Borém, 1997). Sakyama (1993), em uma definição mais abrangente, relata que a palavra marcador tem sido utilizada para designar fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos, passíveis de serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos e suas progênies.

Enfim, marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente da expressão de um gene, como no caso de proteínas ou de segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma), cuja seqüência e função podem, ou não, ser conhecidas (Ferreira &

Grattapaglia, 1998). Dessa forma, os marcadores tornaram-se poderosas ferramentas que têm facilitado o estudo de diversas áreas da biologia, pura ou aplicada, cobrindo questões de identificação de cultivares, evolução e genética de populações, entre outras (Symondson & Liddell, 1999).

Os primeiros marcadores genéticos a serem utilizados foram os morfológicos, os quais agrupam populações de acordo com similaridades morfológicas de frutos, sementes e flores, entre outras. Entretanto, tais marcadores são controlados por genes dominantes, o que não lhes permite distinguir plantas heterozigotas. Além disso, muitos desses marcadores dependem da ontogenia do vegetal e são bastante influenciados por variações ambientais (Robinson, 1998).

Os marcadores moleculares surgiram recentemente, com o advento da biologia molecular, permitindo a detecção de polimorfismos genéticos no DNA. O número de marcadores disponíveis para análise genética passou a ser virtualmente ilimitado e sua utilização pode ser estendida às espécies menos estudadas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O número elevado, o alto polimorfismo, a não-influência do meio ambiente e de microrganismos e a ausência de efeitos pleiotrópicos são algumas das vantagens dos marcadores moleculares em relação aos morfológicos.

Diante disso, os marcadores moleculares vêm sendo utilizados na construção de mapas genéticos e na seleção de germoplasma, em programas de melhoramento, permitindo a caracterização de diferentes genótipos (*fingerprinting*), o estabelecimento de filogenias, a seleção assistida de genes para caracteres de interesse, a determinação de similaridades entre indivíduos, usando análises de agrupamento e a clonagem de genes, baseada em mapa (*positional cloning ou map-based cloning*) (Painting, 1996). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), os marcadores moleculares são as principais ferramentas

em estudos de diversidade genética, localização de genes de interesse econômico e construção de mapas genéticos de riqueza genômica.

A técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), surgida na década de 1980, envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Ela baseia-se na síntese enzimática de um fragmento específico de DNA utilizando dois *primers* (oligonucleotídeos) que se anelam nas fitas opostas de um fragmento de DNA molde, flanqueando as regiões de interesse (Mullis & Faloona, 1987).

Com a descoberta da técnica PCR, surgiram várias técnicas modernas de biologia molecular que permitem a detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. Os tipos de marcadores hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade no DNA. Os principais tipos de marcadores podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA.

Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (fragmentos de restrição de segmentos polimórficos) e minissatélites ou locos VNTR (número variável de repetições em tandem). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo PCR, polimorfismo do DNA amplificado ao acaso ou RAPD, regiões amplificadas de seqüências caracterizadas ou SCAR, microssatélites ou seqüência simples repetida ou SSR e fragmentos de comprimento polimórfico amplificado ou AFLP. Destes, Milach (1998) destaca o RAPD, em função da simplicidade, dos baixos custos e da viabilidade de uso por qualquer melhorista.

Com a diversidade de técnicas moleculares disponíveis, estudos comparativos surgiram, com o propósito de buscar marcadores mais sensíveis. Patzak (2001) demonstrou que, entre os marcadores AFLP, SSR e RAPD

utilizados para variedades de *Humulus lupulus* L., os dois últimos demonstraram alto coeficiente de correlação genética (0,996).

Uma variedade de marcadores moleculares também já foi utilizada em batata para estudar a diversidade genética, estudos taxonômicos ou como ferramenta para *fingerprinting*. Gorg et al. (1992) usaram RFLP para discriminar cultivares de batata em uma lista de variedades alemãs. Ghislain et al. (1999) analisaram variação intra-específica de *S. phureja* por RAPD. Kim et al. (1998) utilizaram AFLP para caracterizar cultivares de batata e Bornet et al. (2002) compararam cultivares da Europa e da Argentina por ISSR.

2.4.1 RAPD

O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, ou RAPD, é uma variação da técnica de PCR, que utiliza um único *primer* com 10 nucleotídeos de seqüência arbitrária, que se anela em regiões aleatórias do genoma e sintetiza múltiplos produtos de amplificação, detectando polimorfismo na ausência ou na presença dos fragmentos de DNA amplificados (Williams et al., 1990). Entretanto, para que um fragmento de DNA seja amplificado por essa técnica, duas regiões do genoma complementares ao *primer* devem estar separadas a uma distância de 4.000pb e em orientações opostas (Caixeta et al., 2006).

A técnica RAPD é capaz de detectar a alteração de uma única base no DNA genômico, uma vez que a alteração de uma base do genoma pode levar à não amplificação de um fragmento. No entanto, isso não implica que todas as amplificações são resultados do pareamento perfeito entre o *primer* e o DNA molde (Williams et al., 1990; Thormann et al., 1994). Segundo Caixeta et al. (2006), as bases moleculares do polimorfismo revelado pelo RAPD podem ser mutações de ponto no sítio de pareamento do *primer*, que impedem o seu pareamento e a conseqüente amplificação do fragmento de DNA, as deleções e as inserções entre dois sítios de pareamento de *primers* podem ser outras fontes de polimorfismo gerado pelo RAPD.

As análises de polimorfismo de DNA com marcadores RAPD são muito úteis para a caracterização de recursos biológicos (Fairbanks et al., 1993), por meio da obtenção de *fingerprint* genômicos de indivíduos, cultivares, populações, análise da estrutura e diversidade genética em populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998), estudos de similaridade genética (Duarte et al., 1999) e estabelecendo relacionamento filogenético entre diferentes espécies e cultivares.

O marcador molecular RAPD apresenta vantagens como simplicidade, rapidez na obtenção dos resultados, requerimento de pequenas quantidades de DNA. No caso de estudo de variabilidade genética, este marcador apresenta, como vantagem em relação a outros marcadores o fato de poder ser gerado um número ilimitado de marcadores RAPD, ao contrário do que ocorre com isoenzimas que são limitados no genoma, além do fato de que um vasto número de *primers* RAPD pode ser sintetizado para a análise de uma ampla variedade de espécies (Cenis et al., 1993; Williams et al., 1990). Nenhum trabalho preliminar é requerido, como isolamento de sondas clonadas de DNA e preparação de filtros para hibridização. Enfim, marcadores RAPD representam uma técnica que apresenta automação e baixo custo (Williams et al., 1990).

Entretanto, os marcadores moleculares RAPD apresentam algumas limitações, como a baixa reprodutibilidade dos resultados devido à sensibilidade da técnica, uma vez que fatores como a qualidade e a concentração da amostra de DNA, como também dos reagentes da PCR (tampão de reação, Mg^{2+} , Taq DNA polimerase, dNTP e *primer*), temperatura do termociclador e efeitos ambientais, podem gerar resultados inconsistentes (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O caráter dominante também é uma limitação da técnica, já que não permite a distinção entre locos heterozigotos e homozigotos dominantes (Milach, 1998).

A gama de genomas estudados com a utilização da técnica de RAPD é a mais variada possível, podendo abranger desde microrganismos, como a bactéria

Escherichia coli (Tseng et al., 2001), fungos patogênicos (Maki, 1999) ou, até organismos mais complexos, como o feijão (Duarte, 1998) e a cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*) (Oliveira, 2000).

Em batata, os marcadores moleculares RAPD foram utilizados para estudos de identificação, caracterização e divergência genética de cultivares (Demeke et al., 1993, 1996; Quiros et al., 1993; Sosinski & Douches, 1996).

2.4.2 SSR ou microssatélites

Os genomas eucariotos são densamente constituídos por diferentes classes de seqüências curtas, com até seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes ao acaso, ao longo da molécula de DNA, conhecidos como microssatélites ou SSR (Rafalski et al., 1996).

As seqüências de SSR diferem em número e em composição de nucleotídeos, podendo ser perfeitas (sem interrupções), imperfeitas (com interrupções) ou compostas (dois tipos de seqüências SSR adjacentes). Seqüências SSR constituídas pelo di-nucleotídeo CA são as mais comuns em mamíferos. Já no genoma de plantas, seqüências do tipo AT são mais comuns (Powell et al., 1996), além disso, no genoma de plantas, as seqüências SSR são largamente distribuídas numa freqüência de uma a cada 50 mil pares de bases (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores moleculares SSR são codominantes, o que permite a separação de indivíduos heterozigotos e homozigotos, e multialélicos, o que os tornam altamente polimórficos, possuindo o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) dentre todas as classes de marcadores moleculares. Os marcadores SSR são obtidos de forma simples por meio de amplificação via PCR e são altamente reproduzíveis e passíveis de automatização em sistemas multiplex, o que permite rapidez na avaliação de um grande número de genótipos e locos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O fator limitante para essa técnica é a necessidade do conhecimento prévio do genoma da espécie para a qual se deseja desenvolver marcadores SSR. O processo de obtenção de *primers* de SSR envolve construção de bibliotecas genômicas enriquecidas, transformação, clonagem, grande trabalho de seqüenciamento e desenho e teste dos *primers* para a identificação dos locos mais informativos por meio de PCR (Rafalski et al., 1996). Após essa fase, a utilização dessa técnica caracteriza-se pela simplicidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos.

Os marcadores moleculares SSR têm sido ferramentas muito úteis e com diversas aplicações em estudos de caracterização de cultivares e análises de diversidade genética em diversas espécies de vegetais. Dentre elas, podem-se citar milho (Padilha, 2002), citros (Kijas et al., 1995), palmito (Scotti et al., 2002), copaíba (Ciampi, 1999), rosa (Esselink et al., 2003), oliveira (Cipriani et al., 2002) e tomate (He et al., 2003).

Os marcadores microsatélites ou SSR são, geralmente, específicos para cada espécie e apresentam custo elevado que está associado à identificação das seqüências de DNA repetitivo ao desenvolvimento e validação dos *primers*. Entretanto, o custo dessa técnica é reduzido quando os pares de *primer* SSR já foram identificados. Milbourne et al. (1998) publicaram um grupo de 112 pares de *primers* SSR localizados em todos os 12 cromossomos do genoma de batata.

O alto nível de heterozigosidade das batatas tetraplóides cultivadas torna os marcadores genéticos ideais para seu *fingerprinting*. Atualmente, os marcadores moleculares SSRs são atrativos para identificação e caracterização de cultivares de batata e desenvolvimento de mapas genéticos, devido à grande quantidade de *primers* SSR disponíveis, além dos avanços para a identificação dos *primers* na técnica (Coombs et al., 2004).

Em batata, os marcadores moleculares SSR foram utilizados para estudos de identificação, caracterização e divergência genética de cultivares

(Kawchuk et al., 1996; Provan et al., 1996; Schneider & Douches, 1997). Outros marcadores também já foram utilizados em estudos genéticos de cultivares de batata como isoenzimas (Douches & Ludlam, 1991), RFLP (Gorg et al., 1992) e AFLP (Kim et al., 1998).

2.5 Avaliação da divergência genética

Para o estudo da divergência genética, é necessário o estabelecimento de uma medida (coeficiente) de similaridade/dissimilaridade entre dois indivíduos. Este é o ponto inicial para várias técnicas de análise multivariada, que permite melhor visualização dos relacionamentos entre os indivíduos (Duarte et al., 1999; Krzanowski, 1988).

A análise multivariada tem sido utilizada como uma poderosa ferramenta para estimar a dissimilaridade genética (distância genética relativa) entre espécies vegetais (Gaur et al., 1978) e foi utilizada para determinar a diversidade genética de diversas culturas, como, por exemplo, o gergelim (Arriel et al., 2006) eo milho (Miranda et al., 2003).

Existem diversos coeficientes de similaridade, mas os mais indicados para a análise de dados binários, como marcadores RAPD, são aqueles que relacionam variáveis dicotômicas, ou seja, os que possuem somente dois valores (Gower, 1985).

Diversos coeficientes de similaridade podem influenciar as análises subseqüentes de agrupamento e a ordenação dos genótipos estudados. Segundo Dias (1998), a escolha do coeficiente mais adequado está diretamente relacionada com as propriedades inerentes a cada coeficiente. Para Krzanowsky (1988), a escolha deve levar em consideração aspectos como a natureza dos dados e os propósitos do estudo.

Entre os aspectos a se considerar nessa escolha estão a inclusão ou não das co-ocorrências negativas no coeficiente, estando essa inclusão muito relacionada aos tipos de características com que se está trabalhando. Para

algumas delas, pode ser que a ausência da característica, em ambos os indivíduos, indique similaridade, mas, para outras, isto não acontece. Williams et al. (1990), ao considerarem a base genética de marcadores RAPD, observaram que a ausência da amplificação de um determinado fragmento em dois genótipos não representa, necessariamente, semelhança genética entre estes. Isto faz com que coeficientes que excluem estas co-ocorrências negativas de sua expressão de similaridade, a princípio, sejam mais adequados para uso com este tipo de marcador.

Os coeficientes de similaridade mais simples relacionam-se com as variáveis dicotômicas, em que cada variável tem somente dois valores. Marcadores RAPD e SSR, em espécies poliplóides, que fornecem dados binários, são incluídos nesse tipo de variável. Para esses marcadores, as quatro possíveis observações de comparação entre dois genótipos são classificadas com base na presença (1) ou na ausência (0) de um marcador para cada genótipo, conforme evidenciado na Tabela 1.

TABELA 1. Possíveis resultados de comparações entre dois genótipos por marcadores RAPD.

Genótipo j	Genótipo i	
	1	0
1	a (1,1)	b (1,0)
0	c (0,1)	d (0,0)

Pela combinação do genótipo *i* com *j* obtêm-se: (a) presença de banda no par de genótipos; (b) presença no genótipo *i* e ausência em *j*; (c) ausência no

genótipo i e presença em j e (d) ausência de bandas no par de genótipos (Dias, 1998; Cruz & Carneiro, 2003).

A partir dos padrões de coincidência ou não coincidência das variáveis, na comparação de dois genótipos, vários coeficientes de similaridade têm sido propostos, combinando quantidades diferentes de a, b, c e d. Para isso, destacam-se os coeficientes de coincidência simples, o de Jaccard e o de Sorensen Dice (Nei & Li), dos quais os dois últimos excluem a coincidência do tipo (00) como fator de similaridade (Cruz & Carneiro, 2003).

Meyer (2002), ao comparar coeficientes de similaridade em estudos de análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes, observou que os coeficientes de Jaccard e Sorensen Dice mostram resultados semelhantes entre si, uma vez que ambos desconsideram a ausência conjunta de bandas.

Após a escolha do coeficiente mais adequado para a dissimilaridade ou a similaridade genética, segue-se para a análise de agrupamento. Segundo Cruz & Carneiro (2003), a análise de agrupamento procura discriminar geneticamente os indivíduos, e permite separá-los em grupos pela análise de um conjunto de características inerentes a cada indivíduo, agrupando-os por algum critério de classificação, de forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. O processo de agrupamento envolve, basicamente, duas etapas: estimação de uma medida de dissimilaridade entre os indivíduos a serem agrupados e a adoção de uma técnica de agrupamento visando à formação de grupos (Cruz, 1990).

O tipo de matriz gerada, similaridade ou dissimilaridade, contém informações sobre a distância genética entre os indivíduos. A matriz de similaridade pode ser, então, convertida em dissimilaridade usando qualquer método matemático de transformação (Krzanowsky, 1988). Assim, por meio da estimativa de similaridade (sg_{ij}), uma medida estabelecida entre um genótipo (i)

e outro (j), podem ser obtidas as medidas de dissimilaridade, em que $dg_{ij} = 1 - sg_{ij}$ (Cruz & Carneiro, 2003; Emygdio et al, 2003).

Análise de agrupamento pode ser feita por vários métodos. Os mais utilizados são os de otimização, que dividem os genótipos em subgrupos não vazios e mutuamente exclusivos, e os hierárquicos, pelo qual os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, gerando um dendrograma (Cruz & Regazzi, 1994). Como exemplo do método de otimização pode-se citar o método de Tocher e, para o método hierárquico, pode-se citar o método do vizinho mais próximo, do vizinho mais distante e UPGMA (sigla para *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*) (Rohlf, 2000).

Em um estudo de comparação entre os métodos de agrupamento hierárquicos, observou-se que o método UPGMA apresentou um melhor ajuste para as distâncias originais e estimadas (Arriel, 2006). Da mesma forma, Totti et al. (2001) mostraram que o método UPGMA foi superior aos outros métodos utilizados por apresentar grupos de acessos mais coerentes, com menor grau de encadeamento entre espécies e com alto valor de correlação cofenética.

Ao se fazer o agrupamento, as informações individuais são perdidas, restando apenas aquelas referentes à média dos grupos. Dessa forma, ao se trabalhar com muitos indivíduos, o número de estimativas de similaridade/dissimilaridade obtidas é relativamente grande, o que dificulta o reconhecimento de grupos homogêneos (Arriel, 2006). A distorção produzida no processo de agrupamento é estimada por um coeficiente de correlação cofenética (r_c) (Rodrigues & Diniz-Filho, 1998), estimado pelo teste Z de Mantel (teste de significância), que compara duas matrizes por meio de permutações (Manly, 1997). Assim, valores de r_c acima de 0,60 indicam um bom ajuste entre as duas matrizes (Dias, 1998).

Outra análise que vem sendo realizada é a verificação da informatividade do loco e do *primer* na análise de divergência genética (*Polymorphic Index*

Content - PIC). A informatividade do loco p_i é a frequência do alelo p no loco p_i , calculado pela equação: $I = 1 - \sum_i p_i^2$, e a informatividade do *primer* p_{ij} é a frequência do alelo p do loco i , no *primer* j , sendo calculada pela equação: $I = 1 - \sum_i \sum_j p_{ij}^2$ (Rafalski et al., 1996).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para a realização deste estudo foram utilizadas 16 cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) fornecidas pela Empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda. Destas, 10 são provenientes da França e protegidas no Brasil (Tabela 2) e 6 não são francesas e nem protegidas no Brasil (Tabela 3).

TABELA 2. Cultivares de batata francesas protegidas no Brasil, fornecidas pela Empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda. (Andradas, MG).

Cultivares	Progenitores	Origem
Casteline	Safrane x 85F276.5	Bretagne Plants - (França)
Chipie	Pilgrin x (Saturna x Pentland Dell)	Station de Recherche du Comité Nord - (França)
Colorado	Toridon x (Desiree x Pentland Dell)	Station de Recherche du Comité Nord et G.I.P.T. -(França)
Éden	Eole x Pentland Dell	Bretagne Plants - (França)
Emeraude	Estima x INRA 75.36.45	Bretagne Plants - (França)
Floriane	85K102.4 x Europa	Bretagne Plants - (França)
Florice	Fanette x INRA 72.68.5	Station de Recherche du Comité Nord - (França)
Isabel	Nicola x Tenor	Grocep - (França)
Naturella	Sirco x Pentland Squire	Bretagne Plants - (França)
Oceania	Astarte x Thomana	Bretagne Plants et Coopagri - (França)

TABELA 3. Cultivares de batata não provenientes da França e não protegidas no Brasil, fornecidas pela Empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda. (Andradas, MG).

Cultivares	Progenitores	Origem
Ágata	BM 52.72 x Sirco	Geerstsema Zaden B.V. - (Países Baixos)
Asterix	Cardinal x SVP Ve 709	HZPC – (Países Baixos)
Atlantic	B 5141-6 (Lenape) x Wauseon	Maine Department Agriculture – (Estados Unidos)
Cupido	W 7222496 x Estima	Meijer Seedpotatoes & Research B.V. (Países Baixos)
Monalisa	Bierma A 1287 x Colmo	H.Z.P.C. - (Países Baixos)
Mondial	Spunta x SVP Ve 66.29.5	D. Biemond - (Países Baixos)

Três tubérculos de cada uma das cultivares foram plantados em casa de vegetação e, após a formação de folhas, foram levados ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras, para as análises moleculares.

3.2 Extração e quantificação do DNA

Para a extração do DNA, foi utilizado o método CTAB, proposto por Murray & Thompson (1980) com adaptações. Assim, 1g de tecido foliar fresco de cada clone foi triturado em N₂ líquido, até a obtenção de um pó fino. Em seguida, o material foi transferido para microtubos congelados em N₂ líquido, adicionados 800µL de tampão de extração (2% CTAB, 100 mM de Tris pH 8,0; 20mM de EDTA pH 8,0; 1,4M de NaCl) e 2µL de β-mercaptoetanol a 65°C e incubados em banho-maria, por 1 hora, a 65°C. Após esse período, foram adicionados clorofórmio: álcool isoamil (24:1). A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação, a 18.000g, por 5 minutos. O

sobrenadante foi transferido para outro microtubo e repetiram-se as etapas de adição de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e centrifugação. A precipitação das moléculas de ácidos nucleicos foi feita com isopropanol 99% (-20°C), mantendo-se em geladeira por 30 minutos.

Após esse período, centrifugou-se o material por 5 minutos, a 18.000g e foram adicionados ao precipitado 300µL de etanol 70% gelado. Fez-se, novamente, uma centrifugação igual à anterior, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco em câmara de fluxo laminar.

Os ácidos nucleicos foram solubilizados em tampão TE pH 8,0 (1mM de Tris e 0,1mM EDTA). Em seguida, foram adicionados 2,5µL de RNase (100µg/mL) e incubados em banho-maria, por 30 minutos, a 37°C.

O DNA foi quantificado com um fluorímetro (Hoeffer DQ 200) e diluído em tampão TE para igualar as concentrações de todos os genótipos, que efetivamente foram utilizados nas reações de amplificação. Para isso, foi usada a expressão:

$$\text{Volume TE em } \mu\text{l} = [(\text{volume da amostra} \times \text{concentração da amostra}) - (10 \times \text{volume da amostra})]/10.$$

3.3 Marcadores RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12µL contendo 10ng de DNA, tampão de PCR 10X (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl), 25mM de cada base dNTPs (50mM MgCl₂), 10mM de *primer* RAPD correspondente e 5U da enzima *Taq* DNA polimerase. Foram utilizados 36 *primers* RAPD, citados na literatura e escolhidos ao acaso da Operon Technologies (Alameda, CA, EUA).

As reações de amplificação foram submetidas ao termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hanburg, Germany), programado com uma temperatura de desnaturação inicial de 95°C, por 1 minuto, seguida de 34 ciclos de amplificação compostos por 3 etapas: 94°C, por 10 segundos; 36°C, por 30

segundos e 72°C, por 30 segundos. Após os 34 ciclos, as amostras foram submetidas a uma etapa final de 7 minutos a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,2% (m/v), sob eletroforese a 100 V em tampão TAE (0,001M EDTA pH 8,0; 0,04M TRIS pH 8,0; 0,02M ácido acético), por um período de uma hora e meia. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) durante 30 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo fotodocumentador EDAS 290 (Kodak®).

Para minimizar a baixa reprodutibilidade da técnica RAPD, foram utilizados três clones de cada cultivar como repetições para cada *primer* utilizado. Só foram consideradas as bandas presentes ou ausentes nos três clones, representando a cultivar.

3.4 Marcadores microssatélite (SSR)

Para as reações com SSR, foram utilizados 21 pares de *primers*. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10µL contendo 20ng de DNA, tampão de PCR 10X (100mM de Tris-HCl pH 8,6; 500mM de cloreto de potássio, 1% de gelatina), 2mM de cloreto de magnésio, 2,5mM de cada dNTP, 1U da enzima Taq DNA polimerase e 20µM de cada *primer*.

As reações foram submetidas ao termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hanburg, Germany), programado com uma temperatura de desnaturação inicial de 95°C, por 2 minutos, seguidos de 34 ciclos de amplificação compostos por 3 etapas: 94°C, por 20 segundos; 50°C (depende da temperatura de anelamento do *primer*), por 20 segundos e 72°C, por 20 segundos. Após os 34 ciclos, as amostras foram submetidas a uma temperatura de extensão, por 4 minutos, a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 10%, com eletroforese a 200 V em tampão TBE (500mM EDTA pH 8,0; 1M

TRIS pH 8,0; 0,089M ácido bórico) por um período de 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata 0,2%, sendo visualizado no fotodocumentador Eagle Eye (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

Para os marcadores SSR, também foram realizadas três repetições para cada cultivar analisada, a fim de verificar se ocorria o mesmo padrão de bandas para todos os indivíduos analisados.

3.5 Avaliação dos dados moleculares

Para a avaliação dos resultados moleculares obtidos por marcadores SSR, cada fragmento amplificado foi considerado como um loco. Assim, as bandas polimórficas resultantes, obtidas por marcadores RAPD e SSR, foram analisadas visualmente e foi construída uma matriz considerando os dados binários, em que o valor 1 (um) foi atribuído à presença da banda e o valor 0 (zero) para sua ausência. Esses dados foram utilizados na construção de uma matriz binária.

3.6 Análise da diversidade genética

A partir dos dados binários, foi calculada a matriz de similaridade entre as 16 cultivares de batata utilizando o coeficiente de Jaccard (Anderberg, 1973), para os marcadores RAPD e SSR, segundo a fórmula: $sg_{ij} = a/(a+b+c)$ em que a corresponde à presença de banda nos genótipos i e j; b corresponde à presença da banda no genótipo i e ausência no genótipo j e, c corresponde à ausência da banda no genótipo i e presença no genótipo j. Todas as etapas da análise de diversidade genética foram realizadas utilizando-se o software NTSYS-pc versão 2.1 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 2000).

Os dendrogramas foram gerados usando o algoritmo UPGMA pelo método de clusterização SAHN (sigla para *seqüencial, agglomerative*

hierarquic, nonoverlapping clustering methods), a partir das estimativas de similaridade genética.

A consistência do agrupamento foi analisada por meio de cálculo do valor de correlação cofenética entre as matrizes do complemento aritmético do coeficiente de similaridade (dg_{ij}) e as dos valores cofenéticos, denominado teste Z de Mantel (Manly, 1997). Este teste compara duas matrizes entre si, elemento por elemento, fornecendo um valor de correlação (r_C) que significa o grau de relacionamento entre as matrizes, sendo testada a significância de r_C por meio de permutações (Mantel, 1967).

3.7 Identificação do número ótimo de marcadores

O número ótimo de marcadores gerados a partir dos 25 *primers* RAPD e 20 *primers* SSR foi determinado por meio do software GENES (Cruz, 2001), para verificar com precisão as estimativas de similaridades genéticas entre os indivíduos em estudo.

Para cada par de indivíduos, a similaridade genética foi estimada a partir de simulações com reamostragens de diferentes polimorfismos, sendo a reamostragem repetida 10.000 vezes. Os parâmetros soma de quadrados dos desvios (SQd) em relação às reamostragens e o valor de estresse (E), que indica o ajuste entre matriz original e a matriz amostral, são disponibilizados durante as análises. O número ideal de bandas polimórficas, segundo Kruskal (1964) e Dias (1998), é considerado quando o estresse assumir valor menor que 0,05.

3.8 Análise do PIC (índice de conteúdo polimórfico)

A diversidade genética do loco ou índice de conteúdo polimórfico (PIC) é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A maior informatividade de uma classe de marcadores define sua maior eficiência em detectar polimorfismos entre dois indivíduos (Rafalski et al., 1996). O PIC, para marcadores dominantes como o SSR, pode ser calculado pela

fórmula descrita por Weir (1996). Como a batata é uma espécie tetraplóide, as bandas geradas pelos marcadores SSR não foram consideradas alélicas, sendo avaliadas como marcadores dominantes. Dessa forma, tanto os dados gerados pelo marcador RAPD como os obtidos pelo marcador SSR foram determinados por meio da equação: $PIC = 1 - \sum_i \sum_j p_{ij}^2$. Sendo p_{ij} é a frequência do alelo p do loco i no *primer* j .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RAPD

Dos 36 *primers* RAPD testados, 25 foram selecionados em função da qualidade e da repetibilidade das bandas amplificadas (Tabela 4). No total, 185 bandas foram obtidas, com uma média de 7,4 bandas por *primer*, das quais 92 foram polimórficas. As bandas polimórficas variaram de uma, para os *primers* OPX02, OPG17, OPP12, OPM02, OPM20 e OPM12 até oito bandas para o *primer* OPJ13.

Em análises com marcadores moleculares RAPD, verifica-se uma variação na quantidade de *primers* testados e na quantidade de bandas obtidas, evidenciando que o número de fragmentos polimórficos utilizados tanto para a avaliação da divergência genética como para a identificação de cultivares é bastante variável dentro de uma espécie.

Em estudos de divergência genética de 36 cultivares de batata-doce, foram utilizados 15 *primers* RAPD que geraram um total de 89 bandas polimórficas, com uma média de, aproximadamente, seis bandas polimórficas por *primer* testado (Zhang et al., 1998). Para a caracterização e a identificação de cultivares de 36 acessos de pêras, foram testados 26 *primers* RAPD que produziram um total de 250 fragmentos polimórficos (Sawazaki et al., 2002). Rabbani et al. (1998) obtiveram 198 fragmentos polimórficos ao utilizar 30 *primers* RAPD para estudar a divergência genética de 52 cultivares de mostarda.

Em estudos com cultivares de batata também verifica essa variação no número de *primers* e de fragmentos obtidos. Hosaka et al. (1994), em seus estudos com 73 cultivares japonesas de batata, testaram 40 *primers* RAPD, dos quais 31 geraram 84 bandas polimórficas variando de 1 a 6 bandas por *primer* utilizado. Usando 17 *primers* RAPD, Demeke et al. (1993) obtiveram 190

bandas polimórficas com uma média de, aproximadamente, 11 bandas por *primers* testados com 36 cultivares de batata da espécie *Solanum andigena* e *Solanum acuale*. Com apenas 4 *primers* em 27 cultivares, Collares et al. (2004) conseguiram 43 bandas amplificadas, sendo 39 polimórficas, com o número de fragmentos variando de 5 a 14, com média de 10,75 bandas por *primer*. Ghislain et al. (1999), usando 12 *primers*, obtiveram 102 bandas polimórficas, na distinção de 128 acessos de batata andigena.

Dessa forma, pode-se salientar que o polimorfismo encontrado depende do grau de divergência dos genótipos analisados (Duarte, 1998). Assim, deve-se verificar não somente o número de fragmentos polimórficos encontrados, mas se este número é representativo para a divergência genética e a identificação dos indivíduos em estudo.

A informatividade dos 25 *primers* utilizados variou de 0,94, para o *primer* OPG13 a 0,1,2 para o *primer* OPX02. O *primer* OPG13 foi considerado muito informativo por apresentar um valor de PIC de 0,94 (Tabela 4), o que evidencia sua eficiência em detectar polimorfismos entre dois indivíduos. Esses valores de PIC corroboram aos resultados encontrados por Gomes (2002), em que, no estudo de divergência genética em banana, foram encontrados valores de PIC entre 0,96 e 0,18 ao utilizar 19 *primers* RAPD e por Santos (2005), que obteve uma informatividade de 0,92 a 0,22, para os 63 *primers* RAPD testados em identificação de cultivares de morango.

TABELA 4: *Primers* RAPD, com suas respectivas seqüências de bases, PIC (*Polymorphic Index Content*) e número de bandas polimórficas obtidas em 16 cultivares de batata. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Lavras, MG, 2008.

<i>PRIMER</i>	SEQÜÊNCIA (5'-3')	PIC	Número de bandas polimórficas
OPG08	TCACGTCCAC	0,88	6
OPG10	AGGGCCGTCT	0,82	4
OPG13	CTCTCCGCCA	0,94	7
OPG17	ACGACCGACA	0,49	1
OPG19	GTCAGGGCAA	0,84	4
OPJ13	CCACACTACC	0,92	8
OPM02	ACAACGCCTC	0,49	1
OPM05	GGGAACGTGT	0,76	3
OPM07	CCGTGACTCA	0,75	3
OPM12	GGGACGTTGG	0,47	1
OPM19	GTCCGTA CTG	0,89	6
OPM20	AGGTCTTGGG	0,37	1
OPN02	ACCAGGGGCA	0,90	6
OPP03	CTGATACGCC	0,84	5
OPP04	CTGATACGCC	0,85	5
OPP08	ACATCGCCCA	0,68	2
OPP12	AAGGGCGAGT	0,37	1
OPP13	GGAGTGCCTC	0,89	6
OPU14	TGGGTCCCTC	0,80	4
OPX02	TTCCGCCACC	0,12	1
OPX04	CCGCTACCGA	0,89	6
OPX07	GAGCGAGGCT	0,58	2
OPX08	CAGGGGTGGA	0,81	3
OPX09	GGTCTGGTTG	0,79	3
OPX10	CCCTAGACTG	0,77	3

As 92 bandas polimórficas encontradas foram consideradas suficientes para uma adequada avaliação da divergência genética, uma vez que, nas análises

do número ótimo de marcadores, verificou-se que, a partir da utilização de 75 bandas polimórficas, a correlação ($r = 0,94$) entre as matrizes de distância genética aproximou-se de 1, a soma dos quadrados dos desvios ($SQ_d = 0,086$) foi inferior a 0,2 e o valor do estresse (E) foi 0,045, sugerindo alta consistência na associação das matrizes (Figura 1), de acordo com Kruskal (1964). Observa-se que, a partir desse valor, a curva de correlação e o desvio padrão não sofreram alterações significativas com o incremento das 17 bandas restantes. Isso forneceu segurança e confiabilidade aos resultados obtidos para a estimativa da divergência genética entre os indivíduos estudados utilizando marcadores RAPD.

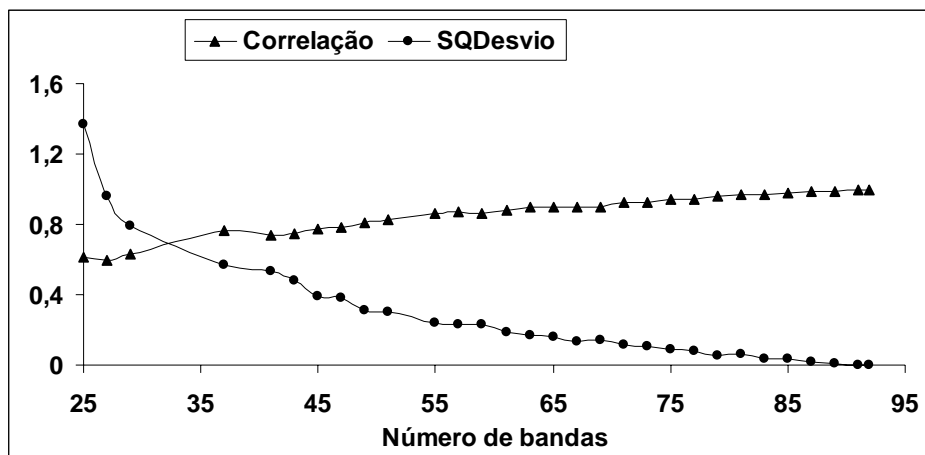


FIGURA 1. Análise do número ótimo de marcadores RAPD para estimativa das similaridades genéticas entre as 16 cultivares de batata estudadas, utilizando números crescentes de bandas polimórficas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os resultados encontrados neste estudo também estão de acordo com os dados de diversos trabalhos em diferentes espécies. Ao determinar a diversidade

genética entre cultivares de alho, Mota et al. (2004) determinaram o número ótimo de marcadores a partir de 60 bandas de um total de 100 bandas polimórficas. Gomes (2002), em seu estudo com banana, obteve o número ótimo de marcadores a partir da utilização de 58 bandas polimórficas, de um total de 108. Já Bicalho (2006), ao determinar a identidade genética de clones de seringueira, estimou o número ótimo de marcadores a partir de 83 bandas entre os 121 fragmentos polimórficos obtidos.

A similaridade média para as 135 distâncias presentes na matriz de similaridade genética foi de $0,61 \pm 0,02$, com amplitude de 0,73 a 0,38 (Tabela 5). A menor similaridade obtida foi entre as cultivares Monalisa e Atlantic, que apresentam origens distintas. A cultivar Monalisa foi desenvolvida pela empresa H.Z.P.C, nos Países Baixos e a cultivar Atlantic, desenvolvida pela *Maine Department Agriculture*, nos Estados Unidos. A maior similaridade foi observada entre as cultivares Floriane e Isabel, ambas provenientes da França e indicadas para uso doméstico, sendo de boa qualidade para o cozimento e Agata e Colorado, que são cultivares que apresentam tubérculo com polpa amarelada e resistência moderada ao vírus Y.

TABELA 5. Matriz de similaridade genéticas, utilizando *primers* RAPD, entre 16 cultivares de batata, analisados dois a dois. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

	<i>At</i>	<i>Cp</i>	<i>Ml</i>	<i>Is</i>	<i>Fc</i>	<i>Fn</i>	<i>Ch</i>	<i>Ed</i>	<i>Ag</i>	<i>Oc</i>	<i>Ca</i>	<i>Mo</i>	<i>Ast</i>	<i>Co</i>	<i>Na</i>	<i>Em</i>
<i>At</i>	1															
<i>Cp</i>	0,45	1														
<i>Ml</i>	0,38	0,57	1													
<i>Is</i>	0,55	0,56	0,69	1												
<i>Fc</i>	0,48	0,54	0,59	0,65	1											
<i>Fn</i>	0,59	0,50	0,60	0,73	0,61	1										
<i>Ch</i>	0,50	0,57	0,55	0,60	0,57	0,57	1									
<i>Ed</i>	0,56	0,57	0,56	0,55	0,55	0,57	0,67	1								
<i>Ag</i>	0,48	0,58	0,68	0,71	0,64	0,67	0,54	0,58	1							
<i>Oc</i>	0,45	0,49	0,5	0,58	0,43	0,46	0,52	0,56	0,51	1						
<i>Ca</i>	0,46	0,59	0,56	0,66	0,65	0,59	0,50	0,58	0,64	0,46	1					
<i>Mo</i>	0,55	0,61	0,62	0,65	0,67	0,65	0,62	0,66	0,64	0,50	0,61	1				
<i>Ast</i>	0,49	0,57	0,62	0,66	0,59	0,62	0,54	0,60	0,65	0,48	0,64	0,70	1			
<i>Co</i>	0,54	0,56	0,64	0,65	0,60	0,61	0,61	0,61	0,73	0,51	0,57	0,63	0,64	1		
<i>Na</i>	0,52	0,45	0,50	0,56	0,52	0,56	0,59	0,53	0,51	0,51	0,51	0,57	0,53	0,61	1	
<i>Em</i>	0,47	0,58	0,61	0,63	0,62	0,58	0,54	0,57	0,6	0,49	0,70	0,63	0,59	0,63	0,54	1

At: Atlantic, Cp: Cupido, Ml: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Édén, Ag: Ágata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude.

O dendrograma apresentado na Figura 2 pode ser considerado de alta confiabilidade na representação da variabilidade genética entre as 16 cultivares de batata estudadas, uma vez que o valor de correlação cofenética (r_c) ou teste de Mantel foi de 0,86, valor considerado alto em relação ao mínimo ($r_c = 0,6$) sugerido por Manly (1997). Este resultado condiz com o encontrado por Chakrabarti et al. (2006), em seus estudos com cultivares de batata indiana, que obtiveram um valor de $r_c = 0,92$, para a matriz de correlação cofenética, sugerindo um bom nível de associação da similaridade encontrada pelo dendrograma.

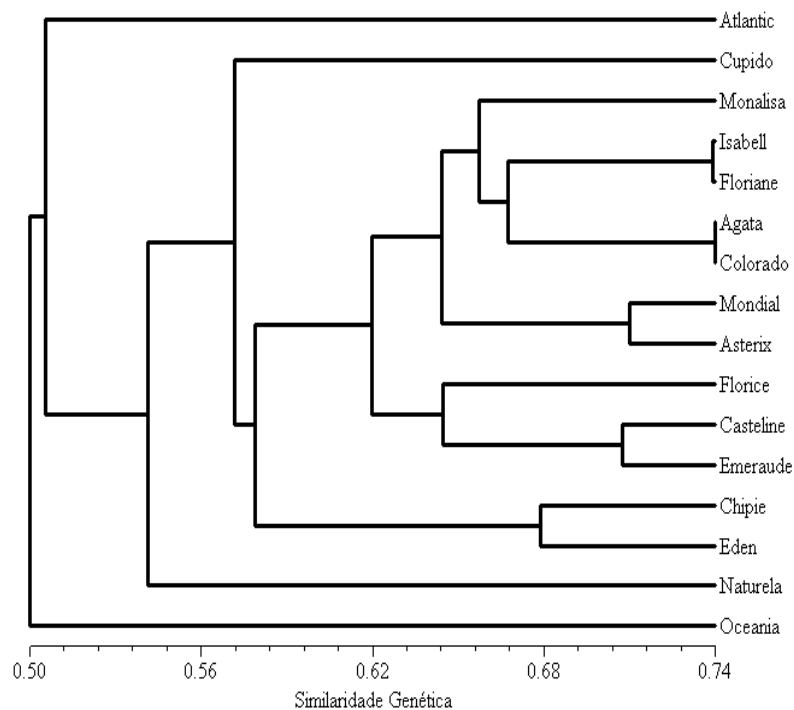


FIGURA 2. Dendrograma representando as similaridades genéticas obtidas com base em marcadores RAPD, entre 16 cultivares de batata, gerado pelo método UPGMA. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Cruz (1990) afirma que a análise de agrupamento tem como objetivo dividir um grupo original de observações em vários grupos homogêneos, segundo algum critério de similaridade ou dissimilaridade. Dias (1998) informa que o agrupamento é importante para sumarizar a informação contida na matriz de distâncias. Segundo Pigato & Lopes (2001), a média de similaridade ou dissimilaridade pode ser utilizada para a formação de grupos dentro do agrupamento formado.

A partir da média de similaridade genética (61%), houve a formação de agrupamentos, os quais separaram as cultivares Atlantic, Cupido, Naturela e Oceania das demais cultivares.

As cultivares Isabel e Floriane, provenientes da França e melhoradas pela *Bretagne Plants*, apresentaram similaridade de 73%, assim como as cultivares Ágata e Colorado, que possuem em comum características morfológicas como tubérculos ovais e polpa de cor amarelo-claro. Já a cultivar Monalisa, proveniente dos Países Baixos, possui similaridade de, aproximadamente, 66% das cultivares francesas. Essa cultivar tem em comum com as cultivares Florice, Isabel e Ágata as características de terem sido desenvolvidas para mesa, sendo utilizadas para cozimento. Apresentam também cores da pele e da polpa do tubérculo semelhantes.

As cultivares Mondial e Asterix são ambas provenientes dos Países Baixos e possuem o progenitor SVP Ve em comum, justificando o nível de similaridade de 70% entre elas.

As cultivares Florice, Casteline e Emeraude, próximas a 64% de similaridade, são provenientes da França, tendo as duas últimas sido produzidas pela *Bretagne Plants* e possuem em comum os tubérculos com formato oval alongado, olhos poucos profundos e pele amarelada. As cultivares Florice e Casteline possuem progenitores originados do INRA. As três cultivares são recomendadas para mesa, sendo de boa qualidade para o cozimento.

As cultivares Chipie e Édén apresentaram similaridade genética 67%, o que pode ser justificado por terem o progenitor *Pentland Dell* em comum e serem desenvolvidas na França.

A cultivar Atlantic ficou distante das demais cultivares, provavelmente, por ser proveniente dos Estados Unidos e apresentar progenitores bastante diferentes das demais. Do mesmo modo, as cultivares Cupido, proveniente dos Países Baixos, e Naturela e Oceania, provenientes da França, também ficaram isoladas das demais. A cultivar Cupido é a única, das 16 estudadas, que apresenta alta resistência ao enrolamento (PLRV) e à verruga (*Synchytrium endobioticum*).

No presente estudo, foi evidenciado que a técnica com marcadores moleculares RAPD foi eficiente para distinguir as cultivares de acordo com o local de origem, as características morfológicas e com alguns progenitores. Isso confirma que os marcadores moleculares RAPD são úteis para o estudo da diversidade genética de cultivares de batata. Esse resultado corrobora os encontrados por Isenegger et al. (2001) e Moisan-Thiery et al. (2001), que consideraram os marcadores RAPD uma técnica útil para a caracterização e a identificação de cultivares de batata e para a diferenciação e as estimativas de parentesco genético, além de ser uma técnica rápida para a obtenção dos resultados.

4.2 Diferenciação de cultivares de batata utilizando marcadores RAPD

A identificação de cultivares utilizando marcadores do tipo RAPD é bastante divulgada em trabalhos de caracterização molecular (This et al., 1997; Bianchi et al., 2003; Crochemore et al., 2004). O *fingerprinting* baseado neste tipo de marcador tem sido usado para a identificação de cultivares em morango (Conti et al., 2002b), banana (Jesus et al., 2006), feijão-de-vagem (Silva et al., 2005), ervilha (Samec et al., 1998) e soja (Taylor e Soliman, 1999), entre outras. Em cultivares de batata, os marcadores RAPD têm sido utilizados para a

caracterização de cultivares na América do Norte (Sosinski e Douches, 1996), na Rússia (Organisyan et al., 1996), no Japão (Hosaka et al., 1994), na Austrália (Ford e Taylor, 1997), no Canadá (Demeke et al., 1993) e na Índia (Chakrabarti et al., 1998).

Com seis *primers* RAPD (OPG08, OPJ13, OPG10, OPM19, OPG13 e OPP04), foi possível diferenciar todas as 16 cultivares de batatas avaliadas neste estudo (Figura 3).

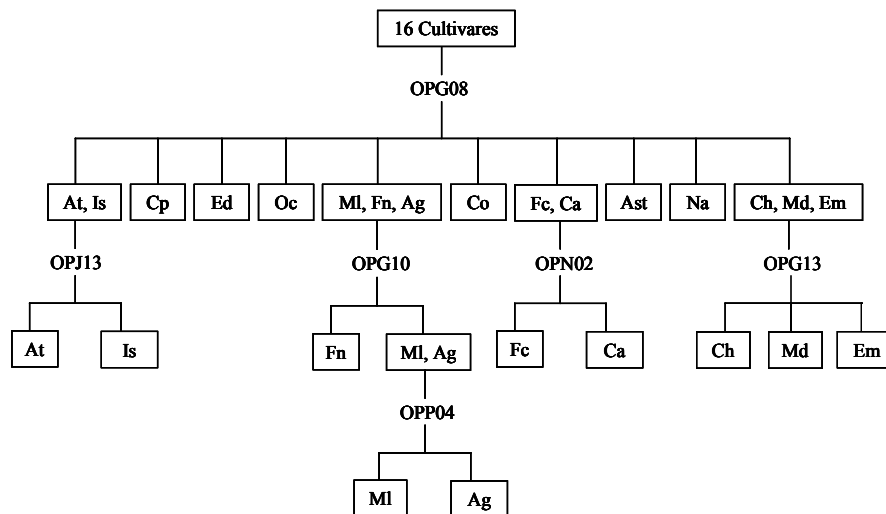


FIGURA 3. Fluxograma para diferenciação das 16 cultivares de batata em estudo, utilizando marcadores RAPD (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

A amplificação com o *primer* OPG08 gerou 10 padrões moleculares diferentes (Figura 4), permitindo a separação das 16 cultivares em 4 grupos

distintos e identificou padrões únicos para as cultivares Cupido, Édén, Oceania, Colorado, Asterix e Naturela. Dos grupos formados pelo *primer* OPG08, um foi formado pelas cultivares Atlantic e Isabel, um segundo grupo englobou as cultivares Monalisa, Floriane e Ágata. O terceiro grupo foi formado pelas cultivares Florice e Casteline e o quarto grupo incluiu as cultivares Chipie, Mondial e Emeraude. Posteriormente, estas cultivares foram separadas pelo *primer* OPG13 (Figura 5).

As cultivares Atlantic e Isabel foram diferenciadas por meio dos padrões moleculares obtidos pelo *primer* OPJ13 (Figura 6). Já o *primer* OPM19 (Figura 7) foi utilizado para separar o grupo formado pelas cultivares Florice e Casteline.

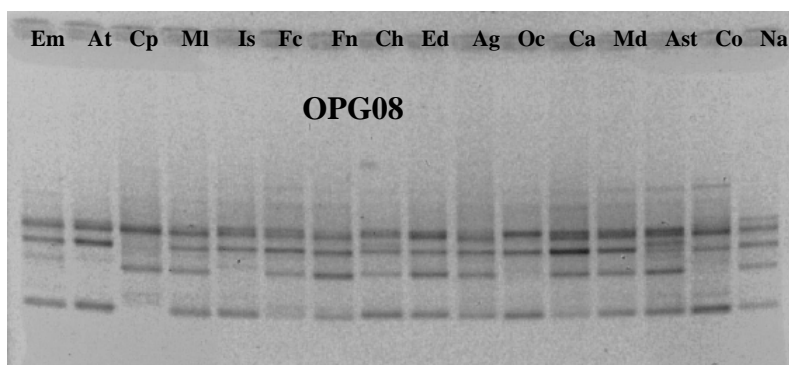


FIGURA 4. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPG08, em gel de agarose 1,2% (em: Emeraude, At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

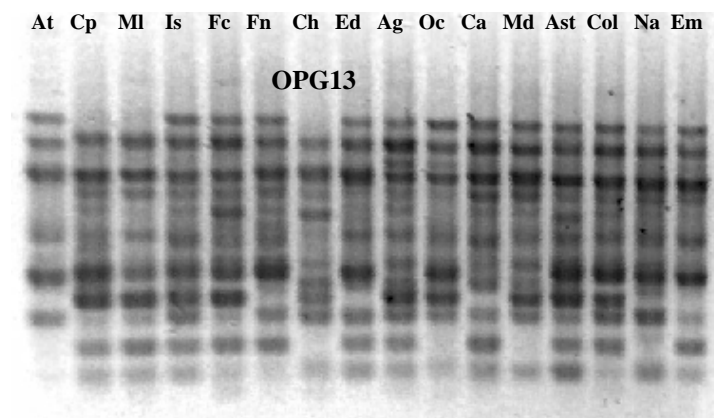


FIGURA 5. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPG13, em gel de agarose 1,2% (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

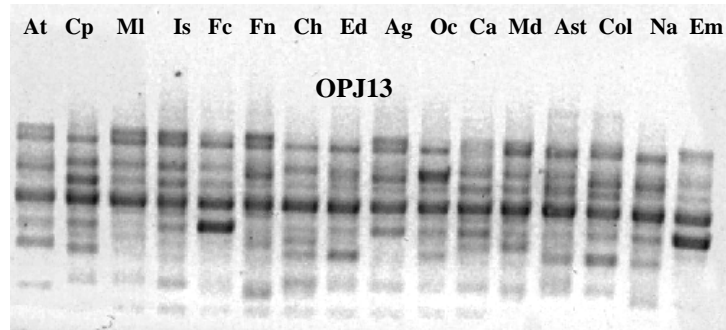


FIGURA 6. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPJ13, em gel de agarose 1,2%. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

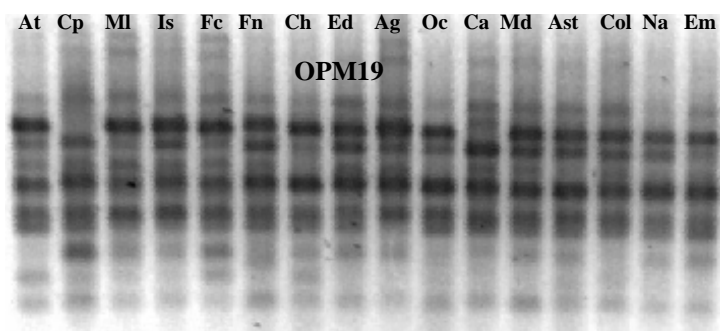


FIGURA 7. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPM19, em gel de agarose 1,2%. (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

No outro grupo formado pelo *primer* OPG08, a cultivar Floriane foi separada das cultivares Monalisa e Agata pelos padrões moleculares obtido pelo *primer* OPG10 (Figura 8). E, finalmente, as cultivares Monalisa e Agata foram diferenciadas pelo *primer* OPP04 (Figura 9).

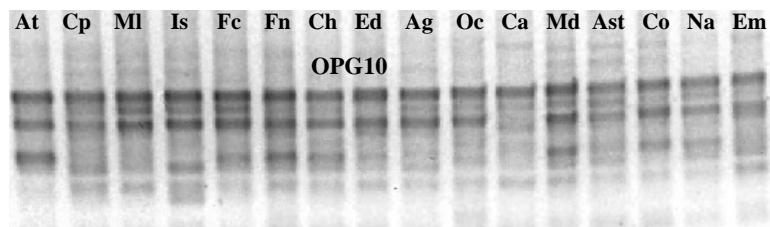


FIGURA 8. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPG10, em gel de agarose 1,2% (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

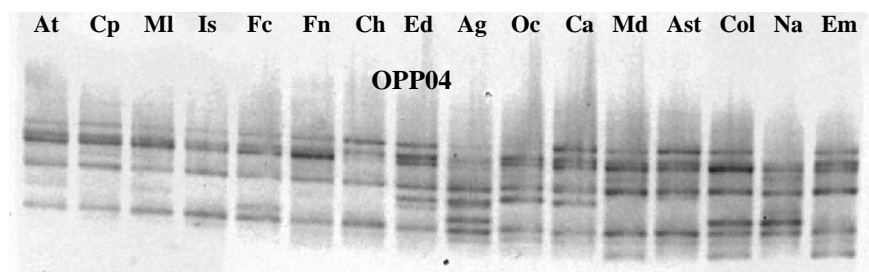


FIGURA 9. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* RAPD OPP04, em gel de agarose 1,2% (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Foram utilizados esses padrões de *primers* porque eles apresentaram valores de PIC elevados, acima de 0,80, variando de 0,82 para o *primer* OPG10 a 0,94 para o *primer* OPG19. Este último apresentou maior valor de PIC entre todos os *primers* analisados neste estudo.

Existem outras possibilidades de fluxogramas para a diferenciação das 16 cultivares de batata, que podem ser obtidos pela permutação dos *primers* utilizados. Entretanto, o fluxograma que utilizou a menor quantidade de *primers* diferentes para a diferenciação das 16 cultivares de batata foi o apresentado na Figura 3.

Os marcadores moleculares RAPD aplicados neste estudo conseguiram diferenciar e identificar as 16 cultivares de batata. Em trabalhos semelhantes com batata, verificou-se a identificação de 36 cultivares, com apenas dois *primers* (Demeke et al. 1993), 46 cultivares com dez *primers* (Sosinki e Douches, 1996) e, por meio de quatro *primers* RAPD, foi possível identificar e separar 27 genótipos de batata (Collares et al., 2004). Mori et al. (1993), identificaram 39 cultivares de batata japonesas, com apenas 13 bandas

polimórficas, usando 5 *primers* RAPD. Forapani et al. (1999) e Moisan-Thiery et al. (2001), usando três *primers* RAPD, identificaram, respectivamente, 37 e 57 genótipos de batata. E foi verificada, ainda a identificação de 13 cultivares de batata australiana, com apenas um *primer* de RAPD (Isenegger et al., 2001). Estes resultados sugerem que o marcador RAPD constitui boa ferramenta para a identificação de cultivares de batata.

4.3 SSR

No presente estudo, dos 21 pares de *primers* SSR inicialmente testados, 20 revelaram polimorfismo entre as cultivares analisadas, produzindo bandas bem definidas e reprodutíveis. Foram amplificados 136 fragmentos polimórficos, com uma média de 6,8 fragmentos polimórficos por *primer*. O número de bandas polimórficas variou de uma, para os *primers* STM0019, STM1049 e STU6SNRN a 18, para o *primer* StI046 (Tabela 6). Um padrão de amplificação obtido com os *primers* SSR está representado na Figura 10, por meio do *primer* STM2013.

TABELA 6: *Primers* SSR, suas respectivas seqüências de bases, PIC (*Polymorphic Index Content*) e número de bandas polimórficas obtidas em 16 cultivares de batata. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008: NBP: Número de bandas polimórficas.

PRIMER	SEQÜÊNCIA (Forward)	SEQÜÊNCIA (Reverse)	Ta (°C)	PIC	N B P
StI046	CAGAGGATGCTGATGGACCT	GGAGCAGTTGAGGGCTTCTT	60-54	0,97	18
STM1052	CAATTCGTTTTTTCATGTGACAC	ATGGCGTAATTTGATTTAATACGTAA	60-50	0,96	15
STPoAc58	TTGATGAAAGGAATGCAGCTTGTG	ACGTTAAAGAAGTGAGAGTACGAC	57	0,95	12
STM1016	TTCTGATTTTCATGCATGTTTCC	ATGCTTGCCATGTGATGTGT	53	0,95	12
STM0031	CATACGCACGCACGTACAC	TTCAACCTATCATTTTGTGAGTCG	57	0,90	6
StI031	AGGCGCACTTTAACTTCCAC	CGGAACAAATTGCTCTGATG	60-54	0,92	8
STM2013	TTCGGAATTACCCTCTGCC	AAAAAAAAGAACGCGCACG	55	0,90	7
STWAX-2	CCCATAATACTGTCTGATGAGCA	GAATGTAGGGAAACATGCATGA	53	0,92	8
STCAAS3	AATTCATGTTTGCGGTACGTC	ATGCAGAAAGATGTCAAATTGA	60	0,92	8
STM1104	TGATTCTCTTGCCACTGTAATCG	CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA	57	0,88	5
STM1106	TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG	ATGCGAATCTACTCGTCATGG	55	0,88	6
STM0037	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC	ATTTGGTTGGGTATGATA	53	0,87	5
STGBSS	AATCGGTGATAAATGTGAATGC	ATGCTTGCCATGTGATGTGT	53	0,89	6
STM1031	TGTGTTTGTCTTCTGTAT	AATTCTATCCTCATCTCTA	55	0,85	5
STM2022	GCGTCAGCGATTTCACTACTA	TTCAGTCAACTCCTGTTGCG	53	0,84	4
STM0030	AGAGATCGATGTAAAACACGT	GTGGCATTGTTGATGGATT	53	0,85	5
STM0019	AATAGGTGTAAGTACTCTCAATG	TTGAAGTAAAAGTCTTAGTATGTG	50	0,21	1
StI005	CTAATTTGATGGGGAAGCGA	CGGAGATAAAACCCAAGTCC	58-52	0,50	1
STM1049	CTACCAGTTTGTGATTGTGGTG	AGGGACTTTAATTTGTTGGACG	57	0,68	2
STU6SNRN	GAAGTTTTATCAGAATCC	ATCACCTCATCAGCAATC	50	0,50	1

Em estudos similares, houve grande variação na quantidade de *primers* SSR utilizados e nos polimorfismos gerados, entretanto, pode-se observar que o nível de polimorfismo produzido é geralmente alto para cultivares de batata. Ghislain et al. (2004), ao utilizarem 22 marcadores SSR, obtiveram de 3 a 27 alelos por loco, avaliando 900 acessos de batata nativa dos Andes, pertencentes a oito diferentes espécies de *Solanum*. Coombs et al. (2004), ao utilizarem 18 pares de *primers* SSR, obtiveram um total de 106 bandas polimórficas, que diferenciaram 17 cultivares de batata. Schneider e Douches (1997), com cinco pares de *primers*, amplificaram 14 bandas, com uma variação de 1 a 4 bandas por *primer*, obtendo uma média de 2,3 bandas por *primer*. Ashkenazi et al. (2001) obtiveram média de 5 alelos para cada um dos 7 marcadores SSR utilizados para a identificação de cultivares de batata. Ghislain et al. (2006), com 22 *primers* SSR, produziram 150 alelos, sendo 145 polimórficos, em 128 acessos de batata do grupo *Phureja*.

Em outras culturas, como soja (Maughan et al., 1995), arroz (Yang et al., 1994), banana (Jesus et al., 2006) e acerola (Salla et al., 2002), também foi evidente o alto nível de polimorfismo encontrado com o uso de marcadores moleculares SSR.

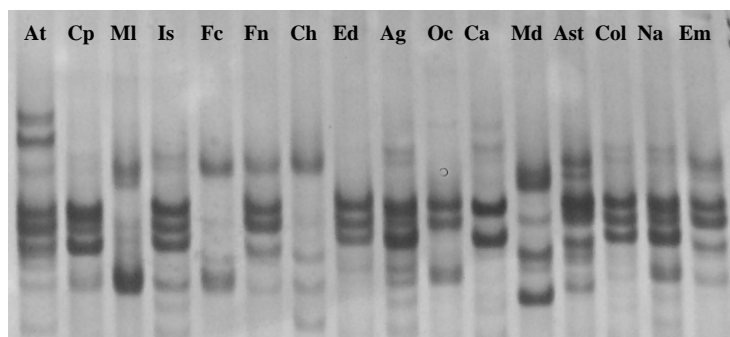


FIGURA 10. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* SSR STM2013, em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emerald). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

A informatividade dos 20 pares de *primers* SSR utilizados neste estudo variou de 0,97, para o *primer* StI046 a 0,21, para o *primer* STM0019 (Tabela 5). De forma similar, os valores de PIC também variaram de acordo com o *primer* SSR testado em outros estudos com variedades de batata. Para Barandalla et al. (2006), o valor de PIC foi de 0,74; para Norero et al. (2002), variou de 0,73 a 0,63 ao utilizarem quatro *primers* SSR; Milbourne et al. (1997) encontraram valor de PIC igual a 0,73 e média de bandas por *primer* de 5,7 para 16 cultivares de batata. O PIC variou de 0,28 a 0,89 (Ghislain et al., 2004) e de 0,95 (Feingold et al., 2005), evidenciando o alto nível de informação e de polimorfismo encontrado pelos marcadores moleculares SSR em estudos com batata.

As 136 bandas polimórficas foram consideradas suficientes para uma adequada avaliação da divergência genética, uma vez que as análises de número ótimo de marcadores indicaram que a correlação ($r = 0,97$) entre as matrizes de distância genética aproximou-se de 1, a soma dos quadrados dos desvios foi de

0,03 e o valor de estresse (E) foi de 0,044, a partir de 125 bandas polimórficas (Figura 11). Observa-se que, a partir desse valor, a curva de correlação e o desvio padrão não sofreram alterações significativas com o incremento das 11 bandas restantes. Isso forneceu segurança e confiabilidade aos resultados obtidos para a estimativa da divergência genética entre os indivíduos estudados ao utilizar marcadores moleculares SSR.

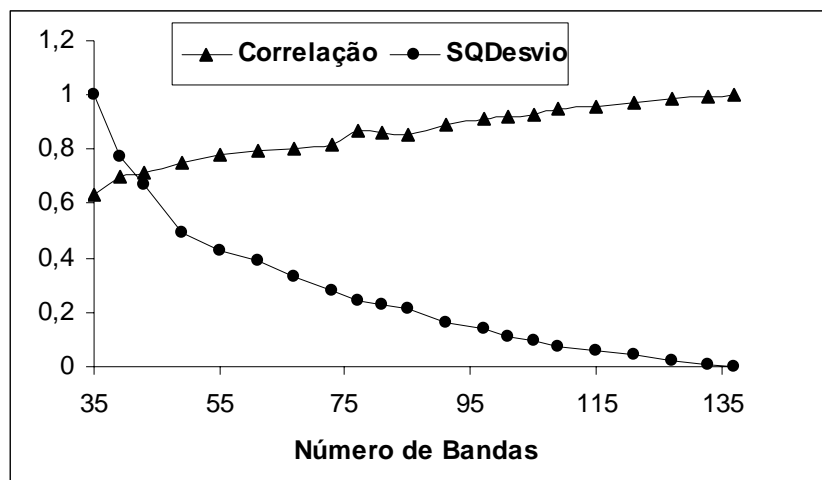


FIGURA 11. Análise do número ótimo de marcadores SSR para estimativa das similaridades genéticas entre as 16 cultivares de batata estudadas, utilizando números crescentes de bandas polimórficas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

A similaridade genética média entre as cultivares foi de 0,56, com amplitude de 0,46 a 0,72 (Tabela 7). A menor similaridade foi obtida entre as cultivares Oceania e Florice (0,46), provenientes da França, porém, com progenitores bastante divergentes. Já a maior similaridade genética foi obtida

entre as cultivares Cupido e Emeraude (0,72) e entre Ágata e Naturela (0,72). As cultivares Cúpido e Emeraude possuem o progenitor “Estima” em comum e as cultivares Ágata e Naturela possuem o progenitor “Sirco” em comum, justificando a elevada similaridade genética entre as cultivares.

TABELA 7. Matriz de distâncias genéticas, utilizando *primers* SSR, entre 16 cultivares de batata analisados dois a dois. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

	At	Cp	MI	Is	Fc	Fn	Ch	Ed	Ag	Oc	Ca	Mo	Ast	Co	Na	Em
At	1															
Cp	0,57	1														
MI	0,52	0,67	1													
Is	0,60	0,63	0,66	1												
Fc	0,48	0,54	0,70	0,70	1											
Fn	0,56	0,54	0,54	0,61	0,55	1										
Ch	0,58	0,50	0,54	0,50	0,61	0,62	1									
Ed	0,53	0,53	0,53	0,58	0,43	0,65	0,56	1								
Ag	0,70	0,59	0,54	0,68	0,48	0,62	0,58	0,64	1							
Oc	0,67	0,64	0,51	0,54	0,46	0,61	0,61	0,63	0,64	1						
Ca	0,48	0,55	0,63	0,64	0,68	0,58	0,53	0,62	0,58	0,47	1					
Mo	0,60	0,57	0,69	0,61	0,65	0,64	0,58	0,47	0,56	0,56	0,57	1				
Ast	0,53	0,50	0,59	0,54	0,55	0,61	0,55	0,63	0,63	0,52	0,70	0,56	1			
Co	0,52	0,58	0,48	0,61	0,51	0,62	0,53	0,58	0,65	0,58	0,58	0,54	0,58	1		
Na	0,65	0,70	0,59	0,67	0,54	0,63	0,54	0,64	0,72	0,67	0,59	0,56	0,64	0,71	1	
Em	0,55	0,72	0,64	0,60	0,58	0,63	0,56	0,59	0,52	0,54	0,60	0,62	0,56	0,58	0,65	1

At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Éden, Ag: Ágata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Mo: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude.

O dendrograma apresentado na Figura 12 apresenta um valor de correlação cofenética de 0,68, indicando uma representação razoável da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard. Este resultado é semelhante ao encontrado para marcadores RAPD em estudos de diversidade de batata, em que a correlação cofenética foi de 0,618 (Ghislain et al., 2006). Entretanto, é inferior ao encontrado por Barandalla et al. (2006), que obtiveram um valor de 0,94 para a matriz cofenética em estudos com batata utilizando marcadores SSR. Estes autores obtiveram o coeficiente de similaridade de Jaccard variando de 1 a 0,48, com média de 0,74, entre os pares de cultivares analisados.

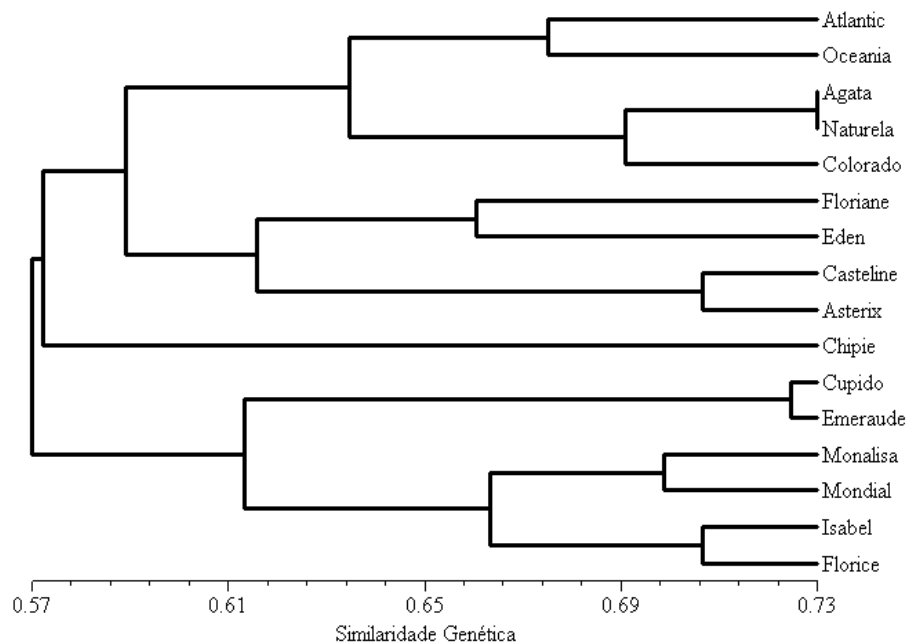


FIGURA 12. Dendrograma representando as similaridades genéticas obtidas com base em marcadores SSR, entre 16 cultivares de batata, gerado pelo método UPGMA. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

A 56% de similaridade genética, pode-se observar a formação de agrupamentos entre as cultivares analisadas, porém, a cultivar Chipie não agrupou com nenhuma outra cultivar. As cultivares Atlantic, proveniente dos Estados Unidos, e Oceania, proveniente da França, apresentaram uma similaridade genética de 67%. Essas cultivares foram desenvolvidas para uso industrial na forma de chips e com tubérculos de formato oval-arredondado.

As cultivares Ágata, Naturela e Colorado apresentaram similaridade genética de 69% e possuem em comum tubérculo com polpa amarelada. As cultivares Ágata e Naturela (72% de similaridade) possuem o progenitor “Sirco” em comum. Tanto a cultivar Naturela como a cultivar Colorado são provenientes da França e são sensíveis aos vírus X e A. Já a cultivar Ágata é proveniente dos Países Baixos.

As cultivares Floriane e Éden, agrupadas a 66% de similaridade genética, são provenientes da França e desenvolvidas pela *Bretagne Plants*. Elas apresentam resistência ao vírus X e A e sensibilidade ao míldio da folha. Morfologicamente, apresentam tubérculos de polpas amarelas, sendo cultivares desenvolvidas para mesa.

As cultivares Casteline, proveniente da França e Asterix, proveniente dos Países Baixos, apresentam similaridade genética de 70% e possuem em comum apenas o formato oval-alongado e a presença de olhos superficiais, que são características necessárias para a descrição mínima considerada pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares.

As cultivares Cupido, proveniente dos Países Baixos e Emeraude, proveniente da França, apresentaram 72% de similaridade e possuem em comum o progenitor “Estima” e foram desenvolvidas para o consumo doméstico.

As cultivares Monalisa, Mondial, Florice e Isabel apresentaram 66% de similaridade genética e foram desenvolvidas para mesa, sendo de boa qualidade

para o cozimento. Quanto às características morfológicas, as cultivares Monalisa e Mondial, provenientes dos Países Baixos, apresentam tubérculos grandes, de formato alongado, possuem olhos superficiais e gema vermelho-violeta; são susceptíveis ao vírus Y e ao vírus do enrolamento. Já as cultivares Florice e Isabel são provenientes da França e possuem tubérculo com pele e polpa amarelo-clara.

Diante dessas observações, nota-se que por meio da união das características moleculares, obtidas pelo marcador SSR, com as características morfológicas, foi possível analisar a variabilidade genética entre as 16 cultivares de batata analisadas. E, além disso, pode-se evidenciar, também, que o dendrograma apresentou tendência em aproximar as cultivares de acordo com suas utilidades comerciais, ou seja, se desenvolvidas para uso doméstico ou para uso industrial.

Além disso, podem-se notar níveis elevados de polimorfismo entre as cultivares. Segundo Provan et al. (1996), estes índices de polimorfismo revelados pelo marcador microsatélite em cada loco ocorrem porque, na análise dos dados, considera-se cada alelo como carácter único. Isso é particularmente relevante porque, em tetraplóides, cada indivíduo pode conter entre um e quatro alelos diferentes em um loco, ou seja, dentro do conjunto de genes estudado pode haver até n alelos diferentes. Para este estudo, quando foi considerado apenas um loco microsatélite, n variou de 2 a 18.

Os marcadores SSR têm sido frequentemente usados para estudos de parentesco genético entre cultivares de *S. tuberosum* (Provan et al., 1996; Schneider e Douches, 1997). Ashkenzi et al. (2001) utilizaram marcadores SSR para estudos de distância filogenética entre espécies de batata nativas e cultivadas. Raker e Spooner (2002) conseguiram separar *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* da *S. tuberosum* subsp. *andigena* usando marcadores SSR. Já Provan

et al. (1996) não conseguiram explicar os agrupamentos do dendrograma para as cultivares de batata analisadas com SSR em seu estudo.

Pode-se inferir, a partir dos dados analisados, que os marcadores moleculares SSR são eficazes para analisar a distância genética entre espécies de batata. Dessa forma, o conhecimento prévio do grau de parentesco entre espécies de batata pode ajudar na escolha de fontes genéticas para ampliar a diversidade de cultivares de batata e a introgressão de genes, com características importantes, como resistência a doenças e a pragas, de espécies nativas para espécies cultivadas (Spooner et al., 1996).

4.3.1 Diferenciação de cultivares de batata utilizando marcadores SSR

A identificação de batata é baseada nas características morfológicas, como forma do tubérculo, tipo de folha, cor da flor e aspecto do broto. Entretanto, muitas dessas características podem apresentar diferentes expressões devido às interações do ambiente ou necessitarem de plantas ou tubérculos maduros para a eficiente identificação (Demeke et al., 1993). Nas últimas duas décadas, a multiplicação e a conservação de batata têm sido baseadas na propagação *in vitro*. Neste sistema, o fenótipo está substancialmente alterado e as plantas raramente alcançam a maturidade. Assim, métodos clássicos de identificação de cultivar tornam-se frequentemente impraticáveis. Além disso, esse sistema está propenso a erros que podem levar à multiplicação indesejável dos clones. Dessa forma, uma técnica barata e confiável que possa identificar genótipos em alguns estágios da planta independente das condições de crescimento é altamente desejável (Norero et al., 2002).

Neste estudo, com apenas três *primers* SSR (STM0031, STM1106 e STM2013), foi possível diferenciar todas as 16 cultivares de batatas avaliadas (Figura 13). Esses padrões de *primers* foram utilizados porque apresentaram valores de PIC elevados, variando de 0,88, para o *primer* STM1106 a 0,90, para o *primer* STM0031.

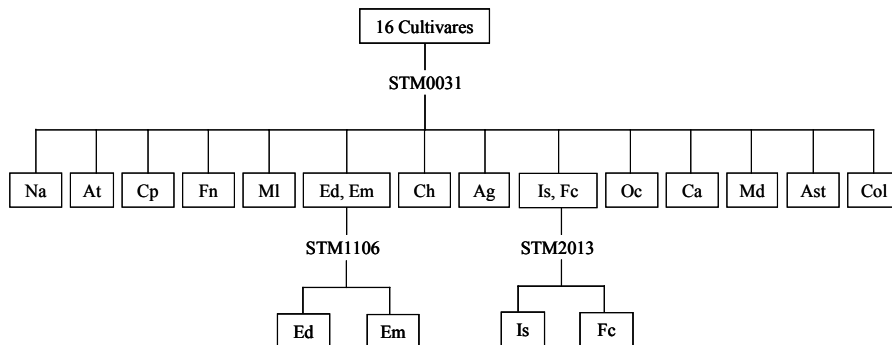


FIGURA 13. Fluxograma para diferenciação das 16 cultivares de batata em estudo, utilizando marcadores SSR (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

A amplificação com o *primer* STM0031 gerou 14 padrões moleculares diferentes (Figura 14), permitindo a separação das 16 cultivares em 2 grupos distintos, e identificou padrões únicos para as cultivares Atlantic, Cupido, Floriane, Monalisa, Chipie, Ágata, Oceania, Casteline, Mondial, Colorado, Asterix e Naturela. Dos grupos formados pelo *primer* STM0031, um foi formado pelas cultivares Éden e Emeraude e o outro grupo incluiu as cultivares Isabel e Florice.

As cultivares Éden e Emeraude foram diferenciadas por meio dos padrões moleculares obtidos pelo *primer* STM1106 (Figura 15). Já o *primer* STM2013 (Figura 16) foi utilizado para separar o grupo formado pelas cultivares Isabel e Florice.

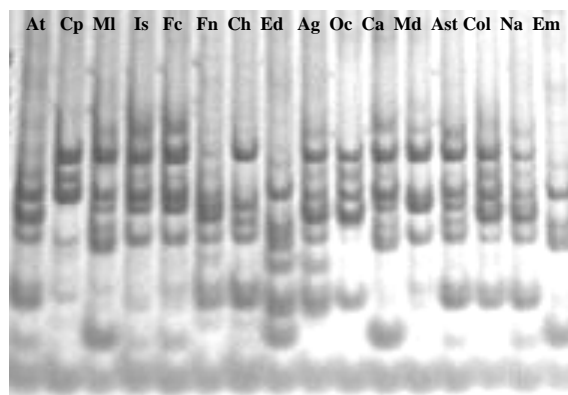


FIGURA 14. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* SSR STM0031, em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

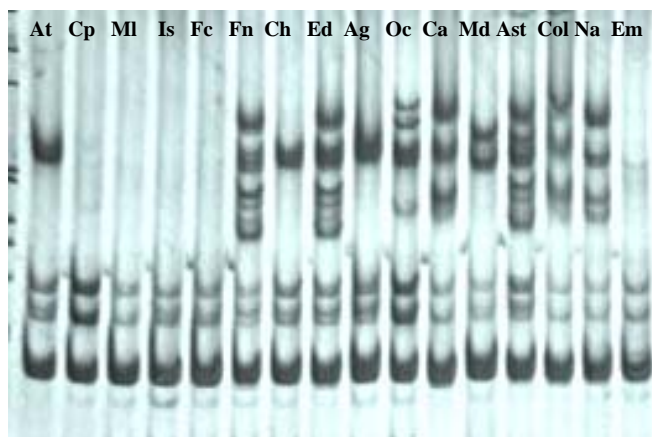


FIGURA 15. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* SSR STM1106, em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

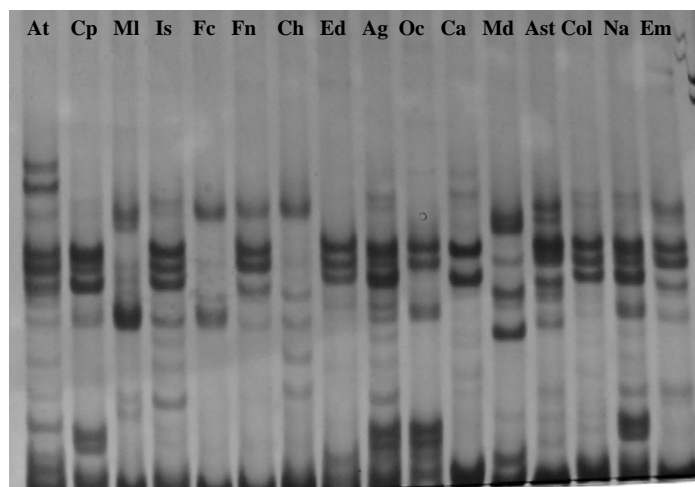


FIGURA 16. Padrões de amplificação obtidos com o *primer* SSR STM2013, em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata (At: Atlantic, Cp: Cupido, MI: Monalisa, Is: Isabel, Fc: Florice, Fn: Floriane, Ch: Chipie, Ed: Eden, Ag: Agata, Oc: Oceania, Ca: Casteline, Md: Mondial, Ast: Asterix, Co: Colorado, Na: Naturela, Em: Emeraude). Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.

A partir desses resultados, nota-se que o *fingerprinting*, para as 16 cultivares de batata, foi mais eficiente ao utilizar os marcadores SSR do que ao usar marcadores RAPD, uma vez que apenas 3 *primers* SSR permitiram distinguir todas as cultivares estudadas.

Os marcadores microssatélites possuem propriedades que os tornam bastante úteis na caracterização de cultivares, uma vez que a variação nas regiões dos microssatélites resultam em grande número de alelos detectados por loco genético, apresentando, assim, elevado poder discriminatório. Dessa forma, normalmente, poucos locos garantem a completa diferenciação dos genótipos de interesse.

Em estudos similares, no intuito de identificar cultivares de batata, observou-se que os marcadores microssatélites foram bastante promissores.

Norero et al. (2002) distinguiram 36 cultivares de batatas com apenas 3 *primers* SSR; McGregor et al. (2000b) diferenciaram 35 cultivares usando 2 *primers*; Provan et al. (1996) discriminaram 18 cultivares de batata com apenas um *primer* SSR; Ashkenazi et al. (2001) separaram 12 cultivares com dois *primers* e Ghislain et al. (2000) conseguiram diferenciar 20 cultivares de batata usando os *primers* STM0019 em combinação com o *primer* STM1104.

No entanto, Kawchuk et al. (1996) não encontraram diferenças entre sete variantes clonais de batata com o uso de SSR. Já Schneider e Douches (1997) conseguiram obter melhores resultados na identificação de 24 dos 40 acessos de batata, quando uniram os dados morfológicos como o tipo de tubérculo com os dados moleculares de 5 *primers* SSR, o que promoveu melhor separação das cultivares.

Existem outras possibilidades de fluxogramas para a diferenciação das 16 cultivares de batata que podem ser obtidas por meio da permutação dos *primers* utilizados. Entretanto, o fluxograma que utilizou menor quantidade de *primers* diferentes para a diferenciação das 16 cultivares de batata foi o apresentado na Figura 13.

Tanto os marcadores RAPD quanto os marcadores SSR foram eficientes para a análise de diversidade genética e para o *fingerprinting* das 16 cultivares de batata analisadas. Entretanto, observa-se uma discrepância entre os dois marcadores moleculares, ao analisarem-se os dendrogramas.

Uma possível explicação para tal resultado talvez seja o tipo de informação revelada por cada marcador molecular. Marcadores RAPD são distribuídos ao acaso no genoma e largamente em regiões intergênicas. Em contraste, os marcadores SSRs detectam sítios pré-determinados, podendo ser provenientes de regiões não traduzidas e de íntrons, por exemplo (Ghislain et al., 2006). Em solanáceas, foi encontrada maior frequência de microssatélites nas

regiões de íntrons, 5' não traduzida (*upstream* do gene) e da 3' não traduzida (*downstream* do gene) (Smulders et al., 1997).

Em outros estudos, foi relatado que alguns marcadores SSR não apresentaram a mesma origem polimórfica que outros marcadores moleculares, como AFLP, RAPD ou RFLP, uma vez que os SSR derivaram, principalmente por mecanismo de *slippage* mais frequentemente que por mudanças de pares de base, inserções e deleções (Tautz & Rentz, 1984; Tautz et al., 1986; Delsney et al., 1988).

Ghislain et al. (2006), ao estudarem diversidade genética em cultivares de batata, não encontraram concordância com os resultados obtidos entre os dendrogramas de RAPD e SSR. Obtiveram valor de correlação cofenética ($r_c = 0,618$) baixo para RAPD e alto (0,82) para SSR e não houve um agrupamento bem definido para nenhum dos marcadores. Milbourne et al. (1997), ao utilizarem marcadores RAPD, AFLP e SSR para análise de relação genética em cultivares de batata, observaram baixa correlação entre as três técnicas utilizadas. De forma similar, baixos valores de concordância entre marcadores RAPD e RFLP foram encontrados por Powell et al. (1996), Milbourne et al. (1997) e Russel et al. (1997). Sun et al. (1999) também conseguiram valores de correlação baixos entre marcadores RAPD e SSR, em *Elymus*.

Em contrapartida, trabalhos com cevada mostraram que correlações entre *pedigrees* e similaridade genética baseados em RFLP, RAPD, AFLP e SSR são geralmente altas. Sun et al. (1997) encontraram boa correlação quando compararam marcadores SSR e RAPD entre várias espécies de *Elymus*. Já Powell et al. (1994) obtiveram correlações genéticas, em soja. Entre similaridade genética derivada de RAPD, RFLP, AFLP e SSR foram baixas a nível intraespecífico e alto a nível interespecífico.

De acordo com Ghislain et al. (2004), cada sistema possui vantagens e desvantagens, dependendo da distância genética da população e do que se deseja

observar. Porém, um problema surge da dificuldade para determinar a contagem exata de alelos em indivíduos poliplóides (McGregor et al., 2000a). Isso pode afetar toda a análise e causar erros nas estimativas (Barandalla et al., 2006). Dessa forma, para estudos com espécies poliplóides, como a batata, deve-se ter bastante precaução ao interpretar os dados dos marcadores moleculares, para calcular medidas verdadeiras de similaridade genética (Milbourne et al., 1997).

5 CONCLUSÃO

Os marcadores moleculares RAPD e SSR mostraram-se eficientes para detectar polimorfismo entre cultivares de batata, podendo ser utilizados na análise de divergência genética e na identificação de cultivares comerciais.

Os marcadores moleculares RAPD e SSR foram eficientes para a análise da diversidade genética e para a caracterização das 16 cultivares estudadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário de agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2006.
- ANDERBERG, M. R. **Cluster analysis for applications**. New York: Academic, 1973.
- ARRIEL, N. H. C.; DI MAURO, A. O.; DI MAURO, S. M. Z.; BAKKE, O. A.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; COSTA, M. M.; CORRADO, A. R. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 801-809, maio 2006.
- ASHKENAZI, V.; CHANI, E.; LEVY, D.; HILLEL, J.; EEILLEUX, R. E. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. **Genome**, Ottawa, v. 62, p. 44-50, 2001.
- BARANDALLA, L.; GALARRETA, J. I. R. de; RIOS, D.; RITTER, E. Molecular analysis of local potato cultivars from Tenerife Island using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 152, p. 283-291, 2006.
- BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W. RAPDs na caracterização genético-molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de ameixeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, p. 272-274, 2003.
- BICALHO, K. C. **Identidade genética entre clones de seringueira *Hevea* spp, de diferentes procedências, baseada em marcadores RAPD**. 2006. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BINNECK, E.; NEDEL, J. L. N.; DELLAGOSTIN, O. A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, p. 183-196, 2002.
- BOREM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547 p.

BORNET, B.; GORAGUER, G.; JOLY, G.; BRANCHARD, M. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-dimple sequence repeats (ISSRs). **Genome**, Ottawa, v. 45, p. 481-484, 2002.

BRASIL. Decreto-lei 10.711, de 5 de agosto de 2003. Nova lei de sementes e mudas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 150, p. 1/4, 6 ago. 2003. Seção 1.

BRASIL. **Lei n. 9.456**, de 25 abr. 1997. Institui a lei de proteção de cultivares e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal, 1997. p. 18-30.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria do Apoio Rural e Cooperativismo. Serviço de Proteção de Cultivares. **Descritores mínimos da batata (*Solanum tuberosum* L.)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p. 9-78.

CENIS, J. L.; PEREZ, P.; FERERES, A. Identification of aphid (Homóptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 85, n. 5, p. 545-550, 1993.

CHAKRABARTI, S. K.; BIRMHMAN, R. K.; PATTANAYAK, D. Identification and genetic similarity analysis of Indian potato cultivars by random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). **Indian Journal Experimental Biology**, New Delhi, v. 37, p. 1123-1128, 1998.

CHAKRABARTI, S. K.; PATTANAYAK, D.; SARKAR, D.; CHIMOTE, V. P.; NAIK, P. S. Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 50, n. 4, p. 531-536, 2006.

CIAMPI, A. Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélite, AFLP e seqüenciamento de cpDNA no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaiba langsdorffii*) em matas de galeria no Cerrado**. 1999. 109 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas/Genética) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- CIPRIANI, G.; MARRAZZO, M. T.; MARCONI, R.; CIMATO, A.; TESTOLIN, R. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europae* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivar. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 2/3, p. 223-228, 2002.
- COLLARES, E. A. S.; CHOER, E.; PEREIRA, A. S. Characterization of potato genotypes using molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 9, p. 871-878, 2004.
- CONTI, J. H.; MINAMI, K.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares de morangueiro por análise de RAPD. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 145-152, 2002a.
- CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Comparação de caracteres morfológicos e agrônômicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, 2002b.
- COOMBS, J. J.; FRANK, L. M.; SOUCHES, D. S. An applied fingerprinting system for cultivated potato using simple sequence repeats. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 81, p. 243-250, 2004.
- CROCHEMORE, M. L.; NUNES, L. M.; ANDRADE, A.; MOLINARI, H. B. C. M.; VASCONCELLOS, M. E. Varietal identification of coffee seed by RAPD technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 7-11, 2004.
- CRUZ, C. D. **Aplicativo de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 1990. 188 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES**: versão Windows. Viçosa: UFV, 2001. 642 p.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. v. 2, 585 p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1994. 390 p.
- DELSNEY, M.; GRELLET, F.; TREMOUSAYGUE, D.; RAYNAL, M.; PANABIÈRES, F. Structure, evolution et expression de l'ADN nucléaire. **Bulletin Society Botany France**, Paris, v. 135, p. 23-38, 1988.

DEMEKE, T.; KAWCHUCK, 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.

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**, Berlin, v. 15, p. 662-667, 1996.

DIAS, L. A. dos S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 554 p.

DOUCHES, D. S.; LUDLAM, K. Electrophoretic characterization of north-american potato cultivars. **American Potato Journal**, Orono, v. 68, n. 11, p. 767-780, 1991.

DUARTE, J. M. **Estudo da divergência genética em raças de Feijão por meio de marcadores RAPD**. 1998. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C. Comparison of similarity coefficients base on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, 1999.

EMYGDIO, B. M.; ANTUNES, I. F.; CHOER, E.; NEDEL, J. L. Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 243-250, 2003.

ESSELINK, D. G.; SMULDERS, M. J. M.; VOSMAN, B. Identification of cut rose (*Rose hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagget microsatellite site markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 277-286, 2003.

FAIRBANKS, D. J.; WALDRIGUES, A.; RUAS, C. R. Efficient characterization of biological diversity using field DNA and random amplified polymorphic DNA markers. **Revista Brasileira de Genética**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 11-22, 1993.

FAO. Disponível em: <www.faostat.fao.org>. Acesso em: 10 out. 2007.

FEDALTO, A. A. **Avaliação da produtividade de tubérculos de plantas oriundas de sementes sexuadas de batata (*Solanum tuberosum* L.) e da primeira geração de propagação vegetativa.** 1982. 70 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FEINGOLD, S.; LLOYD, J.; NORERO, N.; BONIERBALE, M.; LORENZEN, J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p. 456-466, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas.** 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-Cernagen, 1998. 220 p.

FILGUEIRAS, F. A. R. **Solanáceas:** agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló. Lavras: UFLA, 2003. 331 p.

FONTES, P. C. R. Cultura da batata. In: FONTES, P. C. R. **Olericultura teoria e prática.** Viçosa: UFV, 2005. p. 322-343.

FORAPANI, S.; CARBONI, A.; CASTELLANI, A.; MONDOLINO, G.; RANLLI, P. RAPD markers for potato germplasm characterization. **Journal of Genetics and Breeding**, Rome, v. 53, p. 143-147, 1999.

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

GAUR, P. C.; GRUPTA, P. K.; KISHORI, H. Studies on genetic divergence in potato. **Euphytica**, Wageningen, v. 27, p. 316-368, 1978.

GHISLAIN, M.; ANDRADE, D.; RODRÍGUEZ, F.; HIJMANS, R. J.; SPOONER, D. M. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. phureja group using RAPDs and nuclear SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 113, p. 1515-1527, 2006.

GHISLAIN, M.; RODRIGUEZ, F.; VILLAMON, F.; NUNEZ, J.; WAUGH, R.; BONIERBALE, M. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. **Research on potato:** CIP program report. [S.l.: s.n.], 2000. p. 167-174.

- GHISLAIN, M.; SPOONER, D. M.; RODRIGUEZ, F.; VILLAMON, F.; NUNEZ, J.; VASQUEZ, C.; WAUGH, R.; BONIERBALE, M. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 881-890, 2004.
- 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**, [S.l.], v. 46, p. 547-555, 1999.
- GOMES, G. A. C. **Divergência genética entre cultivares e certificação genética e fitossanitária de matrizes de bananeiras**. 2002. 124 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- GORG, R.; SCHACHTSCHABEL, U.; RITTER, E.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 3, p. 815-819, 1992.
- GOWER, J. C. Measures of similarity, dissimilarity and distance. In: KOTZ, S.; JOHNSON, N. L. **Encyclopedia of statistical sciences**. 5. ed. Nova York: J. Wiley, 1985. p. 397-405.
- HAMESTER, W.; HILLS, U. (Eds.). **World catalogue of potato varieties**. Indianapolis: Que, 2003.
- HAWKES, J. G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: BRADSHAW, J. E.; MACKAY, G. R. **Potato genetics**. Wallingford: DAB International, 1994. p. 3-42.
- HE, C.; POYSA, V.; YU, K. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 363-373, 2003.
- 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.; 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. **Australian Journal Agriculture Research**, Victoria, v. 52, p. 911-918, 2001.

JESUS, O. N.; CÂMARA, T. R.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; PESTANA, K. N.; SOARES, T. L. Diferenciação molecular de cultivares elites de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1739-1748, 2006.

KAWCHUCK, L. M.; THOMAS, J.; PENNER, B.; SILLITO, D.; KULSCAR, F. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. **American Potato Journal**, Orono, v. 73, p. 325-335, 1996.

KIJAS, J. M.; FOWLER, J. C. S.; THOMAS, M. R. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. **Genome**, Ottawa, v. 38, n. 2, p. 349-355, 1995.

KIM, J. H.; JOUNG, H.; KIM, H. Y.; LIM, Y. P. Estimation of genetic variation and relationship in potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars using AFLP markers. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 75, n. 2, p. 107-112, 1998.

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.

KRZANOWSKY, W. J. **Principles of multivariate analysis: a user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1988. 563 p.

KUNIHISA, M.; FUKINO, N.; MATSUMOTO. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. **Euphytica**, Dordrecht, v. 134, n. 2, p. 209-215, 2003.

LOMBARD, V.; BARI, C. P.; DUBREUIL, P.; BLOUET, F.; ZHANG, D. Potential use of AFLP markers for the distinction of rapeseed cultivars. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 20., 1999, Canberra. **Proceedings...** Gosford: Regional Institute, 1999. Disponível em: <<http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/587.htm>>. Acesso em: 28 dez. 2005.

MAKI, C. S. **Respostas fungistáticas de *Lentinula edodes* sobre *Candida albicans* e análise da variabilidade intraespecífica**. 1999. 110 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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 Research**, Baltimore, v. 27, p. 209-220, 1967.

MAUGHAN, B. J.; SAGHAI, M. M. A.; BUSS, G. R. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 715-723, 1995.

McGREGOR, C. E.; GREYLING, M.; WARNICH, L. The use of simple sequence repeats (SSRs) to identify commercially important potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars in South Africa. **South Africa Journal of Plant Soil**, Pretoria, v. 17, n. 4, p. 177-180, 2000a.

McGREGOR, C. E.; LAMBERT, C. A.; GREYLING, M. N.; LOUW, J. H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, Dordrecht, v. 113, p. 135-144, 2000b.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 106 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Estatística e Experimentação Agrônômica) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares de plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MILBOURNE, D.; MEYER, R.; BRADSHAW, J. E.; BAIRD, E.; BONAR, N.; PROVAN, J.; POWELL, W.; WAUGH, R. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 3, p. 127-136, 1997.

MILBOURNE, D.; MEYER, R.; COLLINS, A. J.; RAMSAY, L. D.; GEBHARD, C.; WAUGH, R. Isolation characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. **Molecular Genetics Genetic**, Ribeirão Preto, v. 259, p. 233-245, 1998.

MIRANDA, G. V.; COIMBRA, R. R.; GODOY, C. L.; SOUZA, L. V.; GUIMARÃES, L. J. M.; MELO, A. V. Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 681-688, 2003.

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

MORI, M.; HOSAKA, K.; HUMEMURA, Y.; KANEDA, C. Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPD. **Japanese Journal Genetic**, [S.l.], v. 68, p. 167-174, 1993.

MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; YURI, J. E.; RESENDE, G. M.; PAIVA, L. V. Diversidade genética de cultivares de alho (*Allium sativum* L.) por meio de marcador molecular RAPD. **Ciências Agrotecnica**, [S.l.], v. 28, n. 4, p. 764-770, 2004.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 55, p. 335-350, 1987.

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

NORERO, N.; MALLEVILLE, J.; HUARTE, M.; FEINGOLD, S. Cost efficient potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar identification by microsatellite amplification. **Potato Research**, Wageningen, n. 45, p. 131-138, 2002.

OLIVEIRA, C. M. **Varição genética entre populações de *Dalbulus maidis* e mecanismo de sobrevivência na entressafra do milho**. 2000. 167 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

ORGANISYAN, A. S.; KOCHIEVA, E. Z.; RYSKIV, A. P. Fingerprinting potato species and cultivars by the RAPD-PCR method. **Genetika**, [S.l.], v. 32, p. 448-451, 1996.

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PAINTING, K. **Measuring genetic variation using molecular markers**: unit 10.1.4. International Plant Genetic Resource. Rome: Brain Ford-Lloyd; University of Birmingham, 1996. 82 p.

PATZAK, J. Comparison of RAPD, STS, ISSR e AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 121, n. 1, p. 9-18, 2001.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de calyptus urophylla S. T. Blake. **Scientia Forestalis**, [S.l.], v. 60, p. 135-148, 2001.

PLANT DE POMME DE TERRE. **Les variétés françaises**. Disponível em: <<http://www.plantdepommedeterre.org>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S. V.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for gemplasm analysis. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n. 3, p. 225-238, 1996.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. J. **Technology for plant genome analysis and breeding**: proceedings of IPBA. [S.l.: s.n.], 1994.

PROVAN, J.; POWELL, W.; WAUGH, R. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 8, p. 1078-1084, 1996.

QUIROS, C. F.; CEADA, A.; GEORGESCU, A.; HU, J. Use of RAPD markers in potato genetics: segregations in diploid and tetraploid families. **American Potato Journal**, Orono, v. 70, p. 35-42, 1993.

RABBANI, M. A.; IWABUCHI, A.; YOSHIE, M.; SUZUKI, T.; TAKAYANAGI, K. Genetic diversity in mustard (*Brassica juncea* L.) germplasm from Pakistan as determined by RAPDs. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, p. 235-242, 1998.

RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, S.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plant. In: BIRREN, B.; LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York: [s.n.], 1996. p. 75-134.

RAJAPAKES, S.; HUBBARD, M.; KELLY, J. W.; ABBOTT, A. G.; BALLARD, R. E. Identification of rose cultivars by restriction fragment length polymorphism. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 237-245, Nov. 1992.

RAKER, C.; SPOONER, D. M. The Chilena tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: microsatellite data. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1451-1458, 2002.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-358.

RODRIGUES, F. M.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Hierarchical structure of genetic distances: effects of matrix size, spatial distribution and correlation structure among gene frequencies. **Genetic Molecular Biology**, [S.l.], v. 21, n. 2, p. 233-240, 1998.

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

RUSSELL, J. R.; FULLER, J. D.; MACAULAY, M.; HATZ, B. G.; JAHOR, A.; POWELL, W.; WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 714-722, 1997.

SAKYAMA, N. S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 204-206, 1993.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D. C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2002.

SAMEC, P.; POSVEC, Z.; STEJSKAL, J.; NASINEC, V.; GRIGA, M. Cultivar identification and relationship in *Pisum sativum* L. based on RAPD and isozymes. **Biology Plantarum**, [S.l.], v. 41, p. 39-48, 1998.

SAWAZAKI, H. E.; BARBOSA, W.; COLOMBO, C. A. Caracterização e identificação de cultivares e seleções de Pereiras através de marcadores rapid. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, n. 2, p. 447-452, 2002.

SANTOS, C. G. **Análise da divergência genética e *fingerprint* em cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) usando marcadores RAPD e SSR**. 2005. 57 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SCHNEIDER, K.; DOUCHES, D. S. Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. **American Potato Journal**, Orono, v. 74, p. 149-160, 1997.

SCOTTI, I.; PAGLIA, G. P.; MAGNI, F.; MORGANTE, M. Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 6/7, p. 1035-1041, 2002.

SILVA, M. P.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R. F.; POSSE, S. C. P. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Science Agronomy**, [S.l.], v. 27, n. 3, p. 531-539, 2005.

SMULDERS, M. J. M.; BREDEEIJER, G.; RUS-KORTEKAAS, W.; ARENS, P.; VOSMAN, B. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 264-272, 1997.

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

SPOONER, D. M.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J.; MILLER, J. T.; DOUCHES, D. S.; CONTRERAS, M. A. Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relative *Solanum* section *Etuberosum* (Subgens Potatoe). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 532-540, 1996.

STAUB, J. E.; MEGLIC, V. Molecular genetic markers and their legal for cultivar discrimination: a case study in cucumber. **Horticulture Technology**, Alexandria, v. 3, p. 291-300, 1993.

SUN, G. L.; DIAZ, O.; SALOMON, B.; BOTHMER, R. von. Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD, and microsatellite markers. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 420-431, 1999.

SUN, G. L.; SALOMON, B.; BOTHMER, R. von. Analysis of tetraploid *Elymus* species using wheat microsatellites markers and RAPD markers. **Genome**, Ottawa, v. 40, p. 806-814, 1997.

SYMONDSON, W. O. C.; LIDDELL, J. E. **The ecology of agricultural pests: biochemical approaches**. London: Chapman & Hall, 1996. 517 p.

TAUTZ, D.; RENTZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 12, p. 4127-4138, 1984.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, London, v. 322, p. 652-656, 1986.

TAYLOR, G. N.; SOLIMAN, K. M. Detection of polymorphic DNA and taxonomic relationship among 10 wild perennial soybean species using specific and arbitrary nucleotide primers. **Biology Plantarum**, [S.l.], v. 42, p. 25-37, 1999.

THIS, P.; CUISSET, C.; BOURSIQUOT, J. M. Development of stable RAPD makers for identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. **American Journal of Enology and Viticulture**, [S.l.], v. 48, p. 492-501, 1997.

THORMANN, C. E.; FERREIRA, M. E.; CAMARGO, L. E. A.; TIVANG, J. G.; OSBORN, T. C. Comparison of RFLP and RAPD marked to estimating genetic relationship within and among cruciferous species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, n. 8, p. 973-980, 1994.

TOTTI, R.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Utilização de métodos de agrupamentos hierárquicos em acessos de *Paspalum* (Graminea (Poaceae)). **Ciências Exatas Tecnológica**, [S.l.], v. 22, p. 25-35, 2001.

TSENG, C.; TING, E.; JOHNSON, D.; SALUTA, M.; DUNST, R. Use of RAPD fingerprinting for differentiating *E. coli* isolates from human and animal sources. **Life Science News**, [S.l.], v. 7, p. 10-11, 2001.

VIEIRA, E. S. N. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. 2004. 137 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J. I. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 125, p. 59-67, 2002.

YANG, G.; SAGHAI MAROOF, M. A.; XU, C. G.; ZHANG, Q.; BIYASHEV, R. M. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. **Molecular Genetics Genetic**, Ribeirão Preto, v. 245, p. 187-194, 1994.

ZHANG, D.; GHISLAIN, M.; HUAMAN, Z.; GOLMIRZAIE, A.; HIJMANS, R. RAPD variation in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars from South America and Papua New Guinea. **Genetic Resources and Crop Evolution**, [S.l.], v. 45, p. 271-277, 1998.

ANEXOS

ANEXO A

TABELA 1A	Possíveis <i>primers</i> RAPD utilizados para diferenciar, duas a duas, as 16 cultivares de batatas estudadas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.....	79
TABELA 2A	Possíveis <i>primers</i> SSR utilizados para diferenciar, duas a duas, as 16 cultivares de batatas estudadas. Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2008.....	84

TABELA 1A.

Primer / CV	1 2	1 3	1 4	1 5	1 6	1 7	1 8	1 9	1 10	1 11	1 12	1 13	1 14	1 15	1 16	2 3	2 4	2 5	2 6	2 7	2 8	2 9	2 10	2 11	2 12	2 13	2 14	2 15	2 16	3 4	
OPJ13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPP04	*	*	*	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	*	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	
OPG10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	
OPG19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPM05	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	X	*	X	*	X	X	X	X	X	*	
OPP13	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X
OPG08	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPN02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPG13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPX02	*	*	*	X	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	X	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
OPM02	*	X	X	X	X	*	*	X	*	X	*	X	*	X	X	X	X	X	*	*	X	*	X	*	X	X	*	X	*	*	
OPM19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	
OPP03	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPM07	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPU14	X	*	*	*	*	*	*	*	X	X	*	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	*	
OPG17	*	*	*	X	X	X	*	X	*	X	X	*	X	X	X	*	*	X	X	X	*	X	*	X	X	*	X	X	X	*	
OPX08	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	X	*	*	X	X	X	*	*	X	*	
OPM20	*	*	*	*	*	*	X	*	*	X	X	*	*	*	*	*	*	*	*	*	X	*	*	X	X	X	*	*	*	*	
OPP12	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	
OPX04	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

...Continua...

TABELA 1A, Cont.

Primer / CV	1 2	1 3	1 4	1 5	1 6	1 7	1 8	1 9	1 10	1 11	1 12	1 13	1 14	1 15	1 16	2 3	2 4	2 5	2 6	2 7	2 8	2 9	2 10	2 11	2 12	2 13	2 14	2 15	2 16	3 4	
OPX09	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*
OPX10	X	X	X	*	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	*	X	*	*	*	*	X	X	*	*	*	X	X	X	X
OPX07	*	*	X	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	*	X	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	*	X
OPM12	X	X	*	*	*	*	X	X	X	*	X	*	*	*	*	*	X	X	X	X	*	*	*	X	*	X	X	X	X	X	X
OPP08	*	*	*	*	*	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	*

TABELA 1A cont.

<i>Primer/ CV</i>	3 5	3 6	3 7	3 8	3 9	3 10	3 11	3 12	3 13	3 14	3 15	3 16	4 5	4 6	4 7	4 8	4 9	4 10	4 11	4 12	4 13	4 14	4 15	4 16	5 6	5 7	5 8	5 9	5 10	5 11	
OPJ13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPP04	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPG10	X	X	X	X	*	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPG19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	*	
OPM05	*	X	X	X	*	X	*	X	*	*	X	X	*	X	X	X	*	X	*	X	*	*	X	X	X	X	X	X	*	X	*
OPP13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X
OPG08	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*
OPN02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPG13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPX02	X	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	X	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X
OPM02	*	*	X	X	*	X	*	X	*	*	X	*	*	*	X	X	*	X	*	X	*	*	X	*	*	X	X	*	X	*	X
OPM19	*	X	X	X	*	X	X	*	X	X	X	*	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X
OPP03	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	*	X	*	*	*	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X
OPM07	*	X	*	*	*	X	*	*	X	*	*	X	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	*	X
OPU14	*	*	*	*	*	X	X	*	X	*	X	X	*	*	*	*	*	X	X	*	X	*	X	X	*	*	*	*	*	X	X
OPG17	X	X	X	*	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	*	X	*	X	X	*	X	X	*	X	X	*	*	X	*	X	*
OPX08	X	X	X	X	*	*	X	X	X	*	*	X	X	X	X	*	*	X	X	X	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPM20	*	*	*	X	*	*	X	X	X	*	*	*	*	*	X	*	*	X	X	X	*	*	*	*	*	*	*	X	*	*	X
OPP12	X	X	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	X	X	X	X	X
OPX04	X	X	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OPX09	*	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X
OPX10	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*
OPX07	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	*	X	X
OPM12	X	X	X	*	*	*	X	*	X	X	X	X	*	*	*	X	X	X	*	X	*	*	*	*	*	*	*	X	X	X	*
OPP08	*	*	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	*	*	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	*	X

...Continua...

TABELA 1A Cont.

<i>Primer</i> / CV	5 12	5 13	5 14	5 15	5 16	6 7	6 8	6 9	6 10	6 11	6 12	6 13	6 14	6 15	6 16	7 8	7 9	7 10	7 11	7 12	7 13	7 14	7 15	7 16	8 9	8 10	8 11	8 12	8 13	8 14		
OPJ13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
OPP04	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	
OPG10	*	X	*	*	X	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPG19	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPM05	X	*	*	X	X	*	*	X	*	X	*	X	X	X	X	*	X	*	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	*	X	X	
OPP13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPG08	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	
OPN02	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	*	X	X	
OPG13	X	*	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPX02	X	X	X	X	X	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
OPM02	X	*	*	X	*	X	X	*	X	*	X	*	*	X	*	*	X	*	X	*	X	X	*	X	X	*	X	*	X	*	X	
OPM19	*	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPP03	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	
OPM07	*	*	X	*	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	*	*	*	X	*	*	X	*	*	X	*	*	*	X	*	*	X
OPU14	*	X	*	X	X	*	*	*	X	X	*	X	*	X	X	*	*	X	X	*	X	*	X	X	*	X	X	*	X	X	*	X
OPG17	*	X	*	*	*	X	*	X	*	*	X	*	*	*	X	*	X	*	*	X	*	*	X	*	*	X	X	*	X	X	*	X
OPX08	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPM20	X	X	*	*	*	X	*	*	X	X	X	*	*	*	X	*	*	X	X	X	*	*	*	X	X	*	*	*	X	X	*	X
OPP12	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	*	*	*	X	X	*
OPX04	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPX09	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	*	*	*	*	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	
OPX10	X	X	X	X	*	*	*	*	X	X	*	*	*	X	X	*	*	X	X	*	*	*	X	X	*	X	X	*	X	X	*	*
OPX07	*	*	*	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*
OPM12	X	*	*	*	*	X	X	X	*	X	*	*	*	*	X	X	X	*	X	*	*	*	*	*	*	*	X	*	X	X	X	
OPP08	X	X	X	*	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

TABELA 1A Cont.

<i>Primer/ CV</i>	8 15	8 16	9 10	9 11	9 12	9 13	9 14	9 15	9 16	10 11	10 12	10 13	10 14	10 15	10 16	11 12	11 13	11 14	11 15	11 16	12 13	12 14	12 15	12 16	13 14	13 15	13 16	14 15	14 16	15 16		
OPJ13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
OPP04	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	
OPG10	X	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	X	*	X	X	X		
OPG19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	X	X	X	X	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
OPM05	X	X	X	*	X	*	*	X	X	X	*	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X		
OPP13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPG08	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	
OPN02	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPG13	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPX02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
OPM02	*	X	X	*	X	*	*	X	*	X	*	X	X	*	X	X	*	*	X	*	X	X	*	X	*	X	*	X	*	X	X	
OPM19	X	X	X	X	*	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	
OPP03	X	X	X	*	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	*	X	*	*	*	X	*	*	X	*	X	X	X	
OPM07	*	*	*	X	*	*	X	*	*	X	*	*	X	*	*	X	X	X	X	X	*	X	*	*	X	*	*	X	*	X	X	
OPU14	X	X	X	X	*	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPG17	X	X	X	*	*	X	*	*	*	X	X	*	X	X	*	X	*	*	*	*	X	*	*	*	X	X	X	*	*	*	*	
OPX08	X	X	*	X	X	X	*	*	X	X	X	X	*	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	
OPM20	X	X	*	X	X	X	*	*	*	X	X	X	*	*	*	*	*	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	
OPP12	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	X	X	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X	*	*	*	
OPX04	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
OPX09	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	*	X	X	X	X	*	*	*	*	*	*	*	*	
OPX10	X	X	X	X	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	
OPX07	*	*	X	X	*	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
OPM12	X	X	*	X	*	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	*	*	*	*	X	X	X	X	*	*	*	*	*	*	*	
OPP08	X	X	X	*	*	*	*	X	*	X	X	X	X	*	X	*	*	*	X	*	*	*	X	*	*	X	*	X	*	X	X	

Quadro para diferenciar cultivares duas a duas, individualmente, em que “X” indica que o *primer* diferencia as cultivares e * não diferencia. Cultivares de batata: 1: Atlantic, 2: Cupido, 3: Monalisa, 4: Isabel, 5: Florice, 6: Floriane, 7: Chipie, 8: Édén, 9: Ágata, 10: Oceania, 11: Casteline, 12: Mondial, 13: Asterix, 14: Colorado, 15: Naturela, 16: Emeraude.

TABELA 2A.

<i>Primer/ CV</i>	1 x 2	1 x 3	1 x 4	1 x 5	1 x 6	1 x 7	1 x 8	1 x 9	1 x 10	1 x 11	1 x 12	1 x 13	1 x 14	1 x 15	1 x 16	2 x 3	2 x 4	2 x 5	2 x 6	2 x 7	2 x 8	2 x 9	2 x 10	2 x 11	2 x 12	2 x 13	2 x 14	2 x 15	2 x 16	3 x 4
SH005	X	X	X	*	*	X	X	X	*	X	*	X	*	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	X	*	X	X	*	X	
SH031	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM0031	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM1104	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM1106	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	
STM0019	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM0030	X	*	*	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	*	X	
STM2013	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STCAAS3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	
SH046	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM1052	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM1016	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	
STM2022	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	*	X	X	*	*	*	*	*	X	
STM1049	X	X	*	X	*	X	X	*	X	X	*	X	X	X	X	*	X	*	X	X	X	*	*	X	*	*	*	*	X	
STU6SNRN	X	*	*	X	X	X	X	X	X	*	*	*	X	X	X	*	X	*	X	*	*	*	*	*	X	X	X	*	*	*
STGBSS	X	X	X	X	X	*	X	*	X	X	X	X	X	X	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	
STM1031	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	
STPoAc58	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STWAX-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	
STM0037	*	*	X	X	*	X	X	*	X	X	X	*	X	X	*	*	X	X	*	X	X	*	X	X	X	*	X	X	*	X

...Continua...

TABELA 2A cont.

<i>Primer/ CV</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5		
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	x	X	X	X	X		
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	6	7	8	9	10	11	
StI005	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	X		
StI031	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM0031	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM1104	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM1106	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM0019	X	X	*	X	*	*	X	*	X	X	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	*	X	*	X	X	X	X	X	X	
STM0030	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	*	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	*	X	X	X	X	*	X	X	
STM2013	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STCAAS3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
StI046	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	
STM1052	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM1016	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
STM2022	X	X	X	X	*	X	X	*	*	*	*	*	*	X	*	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	*
STM1049	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	*	*
STU6SNRN	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	X	X	X	X	*	X	*	*	*	
STGBSS	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X
STM1031	X	*	X	*	X	*	X	*	X	*	X	X	X	*	X	*	X	*	X	*	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*
STPoAc58	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STWAX-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM0037	X	*	X	X	*	X	X	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X

...Continua...

TABELA 2A cont.

<i>Primer/ CV</i>	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	12	13	14	15	16	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	8	9	10	11	12	13	14	15	16	9	10	11	12	13	14
Stf005	*	X	*	X	X	X	X	X	*X	*	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X
Stf031	X	X	X	*	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM0031	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM1104	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM1106	X	X	X	X	X	X	*	X	XX	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM0019	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	X	*	*	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	*
STM0030	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*
STM2013	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*
STCAAS3	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Stf046	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM1052	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM1016	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM2022	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X
STM1049	X	*	*	*	*	X	X	*	XX	*	X	X	X	X	X	*	*	*	X	*	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X
STU6SNRN	X	X	X	*	*	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	*	*	*	X	X	X	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X
STGBSS	X	X	X	X	*	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X
STM1031	X	*	X	X	X	X	*	X	*X	*	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	*	X	*	X	*
STPoAc58	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STWAX-2	X	X	X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM0037	X	X	*	X	X	X	X	*	XX	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	*	X	X	X

...Continua...

TABELA 2A cont.

<i>Primer/ CV</i>	8 15	8 16	9 10	9 11	9 12	9 13	9 14	9 15	9 16	10 11	10 12	10 13	10 14	10 15	11 16	11 17	11 18	11 19	12 20	12 21	12 22	12 23	13 24	13 25	13 26	14 27	14 28	14 29	15 30	15 31
Stf005	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X
Stf031	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM0031	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X
STM1104	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM1106	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM0019	X	*	*	X	*	X	X	*	X	X	*	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	*	X	*	X	*	X
STM0030	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM2013	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STCAAS3	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Stf046	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM1052	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM1016	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM2022	X	X	X	X	*	*	*	*	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
STM1049	X	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	*	*	*	X	*	*	*	*	X	X	X	X	*	*	*	*	*	*	*
STU6SNRN	X	X	*	*	X	X	X	*	*	*	X	X	X	*	*	X	X	X	*	*	*	X	X	*	X	X	X	X	*	
STGBSS	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STM1031	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	*	X	*	X	X	X	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X
STPoAc58	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
STWAX-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*
STM0037	X	X	X	X	X	*	X	X	*	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X

Quadro para diferenciar cultivares duas a duas, individualmente, em que “X” indica que o *primer* diferencia as cultivares e * não diferencia. Cultivares de batata: 1: Atlantic, 2: Cupido, 3: Monalisa, 4: Isabel, 5: Florice, 6: Floriane, 7: Chipie, 8: Éden, 9: Ágata, 10: Oceania, 11: Casteline, 12: Mondial, 13: Asterix, 14: Colorado, 15: Naturela, 16: Emeraude.