

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE PLANTAS)

PROJETO DE PESQUISA

ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Ipomoea batatas*
(L.) Lam. EM SÃO PAULO, BRASIL, E SUA CONSERVAÇÃO *in vitro*.

Discente:

Erika Paola Arroyo Martinez

Orientador:

Prof.Dr. Pablo Forlan Vargas

Jaboticabal-SP

Junho/2023

RESUMO

A batata-doce é uma hortaliça amplamente cultivada na América Latina, sendo o Brasil um dos principais produtores. Os produtores de São Paulo têm variedades adaptadas às condições locais, sendo estas protegidas em bancos de germoplasma *in vivo* em diversas áreas da região, no entanto, a informação genética dessas cultivares é desconhecida, sendo muito comum chamar vários genótipos diferentes com o mesmo nome ou com nomes diferentes para o mesmo genótipo, e ao adicioná-los aos bancos de germoplasma, podem estar repetindo acessos baseados apenas em aspectos fenotípicos. A tudo isso se soma, que a modernização da agricultura e o êxodo rural causam a perda da diversidade genética e de suas informações e ao mesmo tempo, os acessos mantidos em bancos de germoplasma *in vivo* são expostos a condições ambientais adversas que causam sua morte e requerem amplo espaço. Por isso, o objetivo desta pesquisa será estimar a diversidade genética de entre genótipos de batata-doce localmente adaptados em São Paulo e conservar *in vitro* os acessos mais representativos. Serão feitas coletas de material vegetal, que serão caracterizados fenotipicamente e depois genotipicamente utilizando marcadores moleculares SSR e com tudo isso estimar quão próximos ou distantes os genótipos estão uns dos outros. Com os resultados obtidos, quatro desses genótipos que mais se destacam na parte agrícola serão preservados *in vitro* baixo condições de crescimento mínimo baseadas em a utilização de Ácido Abscísico (ABA) e Manitol. Desta forma, espera-se contribuir para o conhecimento e compreensão da diversidade genética desta cultura na região, evitar réplicas de acessos em bancos de germoplasma e desenvolver um protocolo de crescimento mínimo *in vitro* que permita a conservação de genótipos a baixo custo. Com tudo isso, os recursos genéticos serão protegidos e disponibilizados para permitir a criação de programas de melhoramento genético para esta cultura.

Palavras-chave: Banco de germoplasma, manitol, ABA, batata-doce, SSR, crescimento mínimo.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Ipomoea batatas (L.) Lam é uma espécie pertencente à família Convolvulaceae. O gênero *Ipomoea* contém 600 a 700 espécies (RAYAS CABRERA et al., 2019).

É uma planta herbácea de origem Sul e Centro-Americana (FLORES et al., 2015), amplamente cultivada por ser uma cultura de baixo custo, sua alta adaptação a diferentes tipos de solos e climas, além de ter tolerância às estações secas (OLIVEIRA, 2021). Batata doce é uma deliciosa raiz tuberosa que possui características muito marcantes: desde a cor de sua casca e polpa; que pode variar do laranja ao roxo, até mesmo sua forma (ALI et al., 2021).

Globalmente, cerca de 95% da colheita mundial de batata-doce é produzida em países em desenvolvimento, sendo uma cultura importante em peso fresco juntamente com arroz, trigo, milho e mandioca. Ásia destaca-se como o maior produtor deste tubérculo (VEASEY et al., 2008).

Tendo em conta o que precede; A produção brasileira de batata-doce representa cerca de 30% no mundo (OLIVEIRA, 2021). Em São Paulo, a produção de batata-doce é de 18.000 kg por hectare, o que representa 19% da produção nacional e seu uso varia do comercial ao industrial (IBGE, 2022).

Além do exposto, os aspectos que têm fortalecido o interesse pelo cultivo da batata-doce estão focados em suas qualidades nutricionais, sendo fonte de carboidratos, vitaminas (A, Complexo B) e também fonte de minerais como Cálcio (Ca), Ferro (Fe) e principalmente o Potássio (K) (OLIVEIRA, 2021; RAYAS-CABRERA et al., 2019).

A batata-doce integra vários tipos de cultivares, que se distinguem pelo seu tamanho, cor das folhas, bem como pelo comprimento e espessura dos ramos. Os tubérculos que produzem dependem da posição na planta, da cor da casca e das características da polpa. O anterior é essencial para determinar o uso que será dado ao produto; isto é, se é próprio para consumo direto ou como matéria-prima para a indústria (pães, doces, compotas ou licores) (FLORES et al., 2015).

Quanto às formas de propagação da batata-doce, ela é realizada por meio de galhos, enraizamento de folhas, mudas e raízes tuberosas. No entanto, OLIVEIRA, (2021) menciona que também existem técnicas *in vitro* muito eficientes, como a multiplicação por enraizamento de

folhas ou cultivo de segmentos nodais.

Todas as características e benefícios acima citados do cultivo da batata-doce fizeram com que ela se disseminasse por todo o território brasileiro. De tal forma que se diz que cada região tem suas próprias cultivares adaptadas localmente, mas em muitos casos são apenas cópias de outra cultivar com nomes diferentes. Este é um fator limitante para programas de melhoramento de batata-doce devido à falta de informações sobre a diversidade genética da espécie e porque as informações fenotípicas disponíveis podem causar acessos repetidos em bancos de germoplasma ou cultivares diferentes, embora tenham as mesmas características ou nomes (GOMES, 2009).

Apesar do exposto, nos últimos anos o cultivo da batata-doce foi deixado de lado devido ao deslocamento para outra cultura, êxodo rural e urbanização, o que implicou na perda de genótipos localmente adaptados e com eles sua informação genética (MOULIN et al., 2012).

Por outro lado, é comum que genótipos de batata-doce sejam protegidos em bancos de germoplasma que abundam em todo o Estado de São Paulo; apesar desse trabalho árduo, os espécimes ficam expostos a condições ambientais adversas, doenças e pragas que acabam por matar as plantas e perdem valiosos acessos (RAYAS CABRERA et al., 2019).

Consequentemente, estudos de caracterização de genótipos conservados em bancos de germoplasma devem ser realizados para evitar a duplicação de material vegetal, conforme mencionado por GONÇALVES et al., 2008; LAURENTIN, 2009 e SUDRÉ et al., 2010.

De acordo com GOMES 2009, cada vez mais genótipos estão sendo adicionados aos diferentes bancos de germoplasma; mas sua informação genética é desconhecida, havendo apenas informações sobre morfologia e caracterização agrônômica dos novos acessos. Desta forma, a caracterização molecular permite a identificação de genótipos indistinguíveis por meio de características morfológicas e desta forma será possível ter um controle adequado dos acessos nos bancos de germoplasma.

Os marcadores moleculares têm ampla aplicação, incluindo mapeamento genético, caracterização de genótipos de interesse para melhoramento genético e caracterização de recursos genéticos. Este último aspecto é importante quando se deseja discriminar molecularmente um

genótipo de outro (MOULIN et al., 2012).

Dentro das técnicas de marcadores baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR); o SSR ou Sequências Repetitivas Simples, possuem alta reprodutibilidade, baixo custo e requerem uma baixa quantidade de DNA nas amostras estudadas, o que faz com que essa ferramenta continue sendo mais utilizada em relação às outras técnicas moleculares como RAPD (Fragmentos polimórficos amplificados ao acaso) e AFLP (Polimorfismos no comprimento de fragmentos amplificados) (GOMES, 2009).

O uso desses marcadores moleculares também abrange testes de paternidade, estudos de divergência genética e relações genéticas. Isso permite sua aplicabilidade na horticultura para a identificação de genótipos contrastantes, o que é significativo nos estudos de melhoramento genético. Possuir um banco de germoplasma caracterizado de forma molecular representa uma grande vantagem em qualquer processo que envolva a seleção de genótipos com características de interesse, melhorando a qualidade do trabalho do melhorista (GOMES, 2009)

Então, levando em consideração a crescente demanda e interesse pela batata-doce, torna-se necessário e útil projetar e/ou testar ferramentas que permitam a caracterização molecular das acessões contidas nos bancos de germoplasma, de forma a eliminar ambiguidades presentes ao identificar um indivíduo como diferente de outro na coleção, baseando-se apenas em características morfoagronômicas ou simplesmente no nome. Além disso, essas ferramentas permitirão conhecer a diversidade genética presente nas variedades e aproveitar esse recurso genético. Com a implementação da caracterização molecular, será possível uma conservação mais precisa e uma gestão mais eficaz dos recursos genéticos da batata-doce, garantindo seu uso sustentável e favorecendo programas de melhoramento genético para obter variedades com características desejáveis e adaptadas a diferentes condições (ARRIGONI-BLANK et al., 2014).

Pelo anterior, é aqui que a conservação *in vitro* ganha destaque como alternativa para a conservação de espécies de grande interesse; mas que estando em condições de campo, estão expostas a perdas por doenças, pragas e épocas irregulares. Esta ferramenta também é de menor custo e mantém a integridade genética das plantas (ARRIGONI-BLANK et al., 2014; MOULIN et al., 2012).

Um dos métodos de conservação *in vitro* é através do meio de crescimento mínimo e baseia-se em fazer alterações nos meios de cultura para retardar o crescimento de células e tecidos. Apesar disso, em muitos casos não é possível reduzir o crescimento da planta e as respostas são determinadas pelo genótipo da planta em estudo. Na batata-doce, o tempo máximo de manutenção em condições mínimas de crescimento varia entre nove meses para as diferentes espécies (ARRIGONI-BLANK et al., 2014; DUGASSA; FEYISSA, 2011; MOULIN et al., 2012, PUPO et al., 2002).

Os agentes usados para mitigar o crescimento em batata-doce em condições *in vitro* envolvem ácido abscísico (ABA), Giberelinas (GA₃) e Manitol, diferentes concentrações de sacarose também são usadas para retardar o crescimento da planta. Mas, conseqüentemente, alguns protocolos não atingem os objetivos propostos uma vez que os explantes morrem antes do tempo esperado ou mesmo que as concentrações utilizadas para reduzir o crescimento não são suficientes, e por isso têm que realizar subcultivos antes do esperado (ARRIGONI-BLANK et al., 2014; RAYAS CABRERA et al., 2019).

Por essas razões; o objetivo principal deste estudo será, estimar a diversidade genética entre acessões de batata-doce de São Paulo (Brasil), em base em sua caracterização morfológica; e conservar *in vitro* por meio de um protocolo de crescimento mínimo, os genótipos de principal interesse.

Este estudo permitirá distinguir os novos acessos nas coleções caso sejam encontradas diferenças moleculares, morfológicas e agrônômicas; e ao mesmo tempo determinar se os marcadores moleculares utilizados são eficientes para caracterizar os genótipos de batata-doce. Ainda com esta pesquisa, será desenvolvido um protocolo de conservação *in vitro* por meio de crescimento mínimo para que os genótipos de batata-doce ultrapassem os nove meses de conservação sem necessidade de subcultivo e com plantas viáveis.

2. OBJETIVOS

GERAL:

Estimar a diversidade genética entre acessos de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. em São Paulo, Brasil, e sua conservação *in vitro*.

ESPECÍFICOS:

- Estimar a eficiência dos microssatélites na determinação da diversidade genética entre acessos de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. em São Paulo-Brasil.
- Avaliar o efeito do ácido abscísico e do manitol no crescimento *in vitro* de quatro variedades de *Ipomoeas batatas* (L.) Lam

3. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXCECUÇÃO

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES																																					
Objetivo1: Determinar a diversidade genética de <i>Ipomoea batata</i> (L.) Lam. em São Paulo-Brasil	TEMPO (MES)																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
Atividades																																					
Coletar plantas no campo e estabelecimento de plantas na estufa.	X	X	X	X																																	
Extração de DNA de plantas coletadas.					X	X	X																														
Quantificação								X	X																												
Análise de dados.										X	X	X																									
Objetivo 2: Avaliar o efeito do ácido abscísico e do manitol no crescimento <i>in vitro</i> de quatro variedades de <i>Ipomoea batata</i> (L.) Lam																																					
Atividades																																					
Cultura <i>in vitro</i> .													X	X	X	X																					
Multiplicação em mídia para crescimento mínimo.																	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
Análise de dados																													X								
Elaboração do documento final.																													X	X	X	X	X	X	X	X	X

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Localização geográfica.

As coletas serão feitas em diversos bancos de germoplasma *in vivo* em São Paulo, Brasil e a parte *in vitro* será realizada no Laboratório de Produção Vegetal do Departamento de Ciências Agrárias e Produção da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal.

4.2 Técnicas e procedimentos gerais.

A metodologia desta pesquisa será dividida em duas grandes fases. **1) Fase molecular:** serão feitas coletas para obtenção de acessos de batata-doce, para determinar a diversidade genética entre eles por meio de microssatélites (Marcadores SSR). Posteriormente, **2) Fase *in vitro*:** Será avaliado o efeito do NaOCl e diferentes tempos de imersão sobre o estabelecimento *in vitro* de genótipos de batata-doce para depois estimar o efeito do ácido abscísico (ABA) e do manitol (Man) no crescimento *in vitro* dos mesmos genótipos de batata-doce para desenvolver um banco de germoplasma *in vitro*.

4.2.1 Fase molecular:

4.2.1.1 Obtenção de material vegetal.

As coletas de material vegetal serão feitas acessando as coleções do banco de germoplasma e cultivo de pequenos produtores, do estado de São Paulo, levando em consideração aqueles genótipos que sejam de interesse comercial ou industrial e os nomes comuns daqueles genótipos. Posteriormente os acessos serão caracterizados fenotipicamente e agronomicamente de acordo com os parâmetros descritos por AZEVEDO et al. (2002) e SILVA (2019). Depois disso, eles serão mantidos vivos em condições de estufa ou casa de tela.

4.2.1.2 Extração de DNA.

Amostras de folhas jovens (2-3 folhas) em bom estado serão retiradas aleatoriamente de cada genótipo, e armazenadas em sacos ziploc contendo sílica gel, e levadas ao laboratório para o respectivo análises. O protocolo de extração será o proposto por DOYLE & DOYLE (1990) com modificações. Para a avaliação da qualidade e quantidade do DNA serão seguidos os protocolos

propostos por CASTAÑEDA-CARDONA et al., 2020 e MOULIN et al., 2012. Em seguida, será armazenado a -20°C até o seu uso.

4.2.1.3 Amplificação de marcadores SSR.

Para esta parte, será seguido o protocolo para determinação da diversidade genética utilizando primers SSR para batata-doce proposto por MOULIN et al., 2012 e MONTEROS-ALTAMIRANO et al., 2020 com modificações. O esquema a seguir resume a metodologia desta parte:

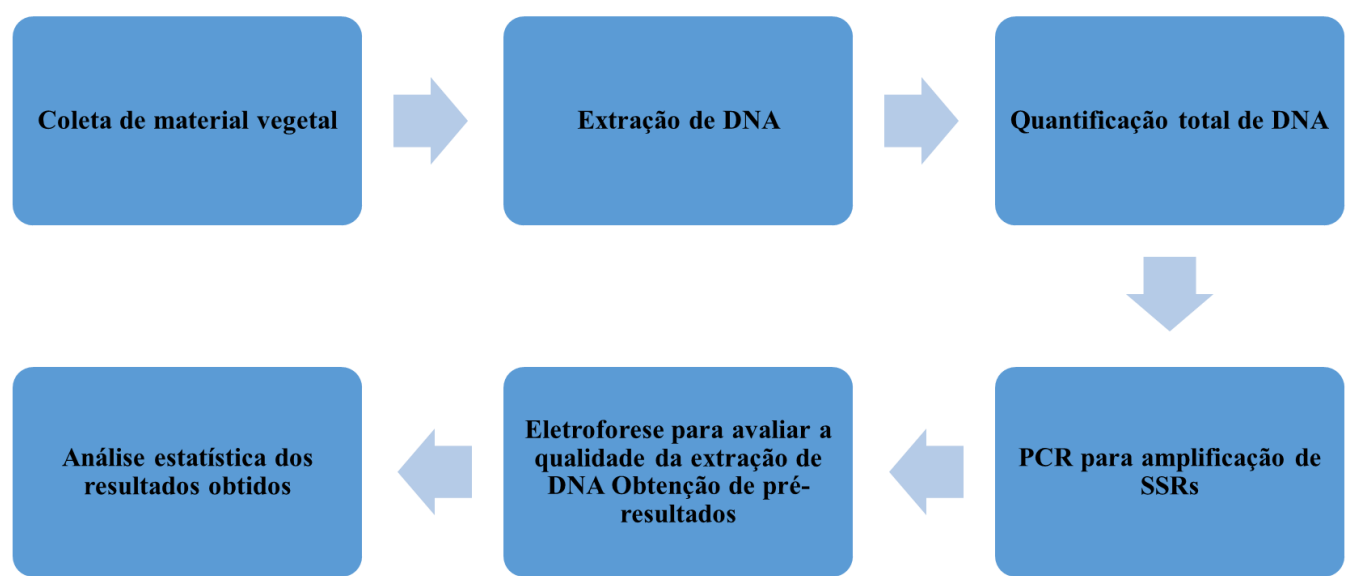


Figura 1. Esquema de procedimentos para estimar a diversidade genética entre acessos de batata-doce por meio de SSR.

Os primers SSR a serem utilizados para a estimativa da diversidade genética em batata-doce são apresentados na tabela a seguir, de acordo com MONTEROS-ALTAMIRANO et al., 2020:

PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	TAMANHO
GAAGTCAGGTTGCTAACGTG	AAATTTCTGCCTGGCTTCT	110
CTGCAATCTGATTCTCTAGCTTTCT	AGTCCTGGCGTCTTCGTAGTT	130
GCCCTTCCTTATAGGACAACAAATG	TGACACCACCGTACGTACAGCTT	178
CGCACTTCAACTCTCACTAATCC	ATCGTTGACAGCGACAAGCTCG	308
ATTCTCTCTCTATGCGTTGCCG	CACACCAAAAAGTCCCAAATCTTG	177
GCTCTTGACTTCACTCATTCTCTTC	ATCGTTGTGGTCGTTGTTCTC	220
GATGATGGAGCTATAAATCTCG	GTCAGTGTCTCCAGTTTTTC	184
TAGTAACACCATTACTTATTAACTTTG	TGTAATCTCATGGATTGCTCGTAG	144

Tabela 1. Primers SSRs que serão utilizados na estimativa da diversidade genética de acessos de batata doce.

4.2.2 FASE *in vitro*:

4.2.2.1 Estabelecimento *in vitro* de genótipos de batata-doce: *Efeito do hipoclorito de sódio (NaOCl) e tempos de imersão na desinfecção de explantes de batata-doce:*

Serão utilizados segmentos nodais de plantas adultas estabelecidas na casa de vegetação, que serão levados ao laboratório e lavados com água e sabão por 15 min. Aproximadamente, serão enxaguados com água destilada e levados para a cabine de fluxo laminar, onde será realizada a segunda parte da desinfecção com álcool etílico 70% por um (1) minuto, serão enxaguados com água estéril ou deionizada estéril e em seguida serão desinfectado com o uso de diferentes concentrações de Hipoclorito de Sódio (NaOCl) e os tempos de desinfecção mostrados na tabela a seguir:

Tabela 2. Efeito do NaOCl e tempos de imersão na desinfecção de explantes de batata-doce

Tratamentos	Concentração de NaOCl (%v/v)	Tempo de exposição (min)
1	0	0
2	2	0
3	2	2
4	2	4
5	2	6
6	5	0
7	5	2
8	5	4
9	5	6

Em seguida, são enxaguados duas vezes com água destilada ou deionizada estéril, sob condições assépticas, em cabine de fluxo laminar horizontal e sob condições controladas de temperatura-iluminação (BALBERO-OSORIO & REVOLLO-PEREZ, 2003).

4.2.2.2 Semeadura de explantes e condições de cultivo *in vitro*: Efeito do NaOCl e tempos de imersão no estabelecimento *in vitro* de genótipos de batata-doce:

Após a realização da etapa anterior, serão retirados segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento que contém a gema axilar, e os mesmos serão estabelecidos nos frascos com 30 ml de meio de cultura, que será selado com papel alumínio e fixado com papel crystalflex, rotulado de acordo com o tratamento que será usado, semeando um explante por frasco (sendo esta

a unidade experimental). Os explantes serão colocados perpendicularmente em relação ao meio de cultura na proporção de um por frasco na cabine de fluxo laminar sob condições assépticas. Por fim, serão armazenados em sala de incubação ou câmara de germinação (conforme disponibilidade) com temperatura de $28 \pm 5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 65%; fotoperíodo de 12 horas-luz; intensidade de luz de cerca de $50 \mu\text{mol/m}^2 \text{ S}^{-1}$, avaliando o comportamento das culturas durante quatro semanas (DÍAZ et al; 2015) (BALBERO-OSORIO & REVOLLO-PEREZ, 2003).

4.2.2.3 Avaliação do processo de estabelecimento *in vitro*: Efeito do NaOCl e tempos de imersão no estabelecimento *in vitro* de genótipos de batata-doce:

- **Porcentagem de sobrevivência:** Número de explantes com algum grau de oxidação, hiperidricidade, contaminação ou qualquer indicação de inviabilidade dos explantes sobre o número total deles multiplicado por porcentagem (100%) (GARCÍA-OSUNA et al., 2011; OJEDA-ZACARÍAS et al., 2010 e RODRÍGUEZ, 2006)

4.2.2.4 Conservação *in vitro*: Efeito do ácido abscísico (ABA) sozinho ou em combinação com manitol.

Após avaliação e determinação do melhor tratamento para a desinfecção dos explantes e obtenção de vitroplantas com tamanho ideal, será realizada a fase de conservação *in vitro*, para o qual segmentos nodais dos genótipos serão individualizados e transferidos para 30 ml de meio de cultura, que será selado com papel alumínio e fixado com papel crystalflex, rotulado de acordo com o tratamento que será usado para crescimento mínimo, conforme descrito por RAYAS-CABRERA et al., 2019 e será combinado com ácido abscísico (ABA) e manitol da seguinte forma:

Tabela 3. Tratamentos para avaliar o efeito do ácido abscísico (ABA) sozinho ou em combinação com manitol.

Tratamentos	Concentração de ABA mg/L	Concentração de manitol mg/L
1	0	0
2	2	0
3	4	0
4	6	0
5	8	0
6	10	0
7	12	0

8	0	0,5
9	0	1
10	0	1,5
11	0	2
12	0	2,5
13	0	3
14	2	0,5
15	4	0,5
16	6	0,5
17	8	0,5
18	10	0,5
19	12	0,5
20	2	1
21	4	1
22	6	1
23	8	1
24	10	1
25	12	1
26	2	1,5
27	4	1,5
28	6	1,5
29	8	1,5
30	10	1,5
31	12	1,5
32	2	2
33	4	2
34	6	2
35	8	2
36	10	2
37	12	2
38	2	2,5
39	4	2,5
40	6	2,5
41	8	2,5
42	10	2,5
43	12	2,5
44	2	3
45	4	3
46	6	3
47	8	3
48	10	3
49	12	3

4.2.2.5 Semeadura de explantes e condições de cultivo *in vitro*: Efeito do ácido abscísico (ABA) sozinho ou em combinação com manitol:

Cada frasco com capacidade aproximada de 240 ml conterà 30 ml de meio de cultura em com os tratamentos mencionados na **Tabela 3**. Os explantes serão colocados perpendicularmente

em relação ao meio de cultura na proporção de um por frasco na cabine de fluxo laminar em condições assépticas. Com 10 repetições por tratamento, em seguida serão armazenados na sala de incubação com as seguintes condições: $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas, avaliando o comportamento das culturas por 8 meses e 12 meses, de acordo com o protocolo de RAYAS-CABRERA et al., (2019).

4.2.2.6 Avaliação do processo de crescimento mínimo:

Após 8 e 12 meses, serão avaliadas as seguintes variáveis:

- **Sobrevivência dos explantes:** Porcentagem de explantes vivos em relação aos mortos (RAYAS CABRERA et al., 2019). Nesta variável, serão considerados como explantes mortos todos aqueles que não forem viáveis, tais como: com hiperhidricidade, com oxidação, com contaminação, entre outros parâmetros que indiquem a perda parcial e/ou total do vitroplanta ou explante utilizado.
- **Comprimento da planta:** Será medido com o auxílio de um paquímetro ou vernier em centímetros (cm) (RAYAS-CABRERA et al., 2019).
- **Número de folhas:** Quantificação de folhas produzidas por vitroplanta.
- **Número de nós:** Quantificação de brotações produzidas por vitroplanta.
- **Enraizamento:** Presença e ausência de sistema radicular em cada vitroplanta.
- **Duração da conservação:** Tempo mínimo necessário para formar uma vitroplanta e ao mesmo tempo quanto tempo dura sua viabilidade antes de precisar de um subcultivo (RAYAS-CABRERA et al., 2019)

4.2.2.7 PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA.

Tratará de um meio de cultura em estado semissólido MURASHIGE & SKOOG (MS) (1962), suplementado com 100 mg L^{-1} de Mioinositol, 30 g L^{-1} de sacarose, 1 ml L^{-1} de Tiamina e 6 g L^{-1} de Agar e Polivinilpirrolidona (PVP) $0,1\text{ mg L}^{-1}$. O pH de todos os meios de cultura deve ser ajustado para $5,7 \pm 0,1$, autoclavados por 20 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ e armazenados por 5 dias antes do uso para descartar os meios contaminados após a esterilização (COTERA, 2011).

4.3 DESENHO ESTATÍSTICO

4.3.1 Análise dos fragmentos gerados com SSRs para genótipos de batata-doce:

De acordo com os resultados obtidos na amplificação das bandas de SSRs, serão selecionados os primers que apresentarem melhores resultados na eletroforese para serem marcados com fluorescência. Em seguida, serão coletadas amostras de DNA isolado de cada genótipo e analisadas em um sequenciador automático. O objetivo é analisar os eletroferogramas gerados e estimar as distâncias genéticas entre as amostras (ALEKCEVETCH, 2013)

4.3.2 Estimativa da diversidade genética entre acessões de batata-doce:

Depois de obter os resultados do sequenciador (genotipagem), serão realizadas análises de distância para gerar matrizes de dissimilaridade genética. Essas matrizes serão utilizadas para construir dendrogramas utilizando metodologias baseadas em ALEKCEVETCH, 2013, CASTAÑEDA-CARDONA et al. 2020 e JOSEPH, 1992. Esses dendrogramas permitirão visualizar as relações de similaridade genética ou diversidade genética entre as amostras analisadas.

4.3.5 Avaliação do feito do ABA e Manitol na conservação *in vitro* de genótipos de batata-doce por meio de crescimento mínimo:

O delineamento estatístico que será utilizado para esta parte será um delineamento inteiramente casualizado (randomizado) e para sua análise uma ANOVA para determinar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos nos genótipos utilizados, caso não atendam aos requisitos de um teste ANOVA Serão utilizados testes não paramétricos como o teste de Kruskal-Wallis e serão realizadas no mínimo 10 (dez) repetições por tratamento e o experimento completo será replicado 2 (duas) vezes.

5 RESULTADOS ESPERADOS:

6.1. Espera-se que pelo menos um dos marcadores SSR amplifique e seja informativo para os genótipos de batata-doce utilizados.

6.2 Espera-se exibir e informar a diversidade genética entre os indivíduos de batata-doce selecionados pertencentes ao território de São Paulo, no Brasil.

6.3 Espera-se que alguns dos tratamentos de estabelecimento *in vitro* sejam eficientes para o estabelecimento *in vitro* de doze genótipos de batata-doce, não sendo necessário desenvolver um protocolo para cada acesso.

6.4 Espera-se que pelo menos um dos tratamentos com ABA, seja em combinação ou ausência de Manitol, seja efetivo na conservação *in vitro* dos genótipos selecionados de batata-doce. A metodologia proposta busca ser eficiente na proteção e manutenção dos indivíduos, além de reduzir os tempos de subcultivo *in vitro*.

6.5 Espera-se desenvolver um banco de germoplasma para a manutenção dos valiosos genótipos de batata-doce que representam parte da diversidade genética desta cultura no território de São

Paulo, Brasil.

9. REFERENCIAS

1. ALEKCEVETCH, Jean Carlos. Estudo da diversidade genética, por meio de marcadores moleculares de uma população de *Coffea canephora* var. Conilon. 2013.
2. ALI, Mahmoud A. et al. Initiation of *Ipomoea batatas* Through Tissue Culture Technique. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, H. Botany, v. 12, n. 2, p. 79-83, 2021.
3. ARRIGONI-BLANK MDF, TAVARES FF, BLANK AF, SANTOS MCD, MENEZES TSA, SANTANA ADD. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

4. AZEVEDO, S. M.; MALUF, W. R.; SILVEIRA, M. A.; FREITAS, J. A. Reação de clones de batata-doce aos insetos de solo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p.545-549, 2002.
5. CASTAÑEDA-CARDONA, C. C., MORILLO-CORONADO, Y., MORILLO, A. C. Assessing the genetic diversity of *Dioscorea alata* and related species from Colombia through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Chilean journal of agricultural research*, v. 80, n. 4, p. 608-616, 2020.
6. COTERA, Miguel Alberto. **AISLAMIENTO Y REGENERACIÓN DE MERISTEMOS PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS DE NOME *Dioscorea rotundata* var. “Botón” LIBRES DE POTYVIRUS A PARTIR DE PLANTAS MADRES SINTOMÁTICAS** 2011. 53 p. Dissertação (Graduação)- UNIVERSIDAD DE SUCRE FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS PROGRAMA DE BIOLOGÍA SINCELEJO.
7. DOYLE, Jeff J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
8. DUGASSA G, FEYISSA T. *In vitro* production of virus-free sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] by meristem culture and thermotherapy. **SINET: Ethiopian Journal of Science**, v. 34, n. 1, p. 17-28, 2011.
9. FLORES, Rejane et al. Otimização da produção de plantas in vitro de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 429-437, 2015.
10. García-Osuna HT, Benavides Mendoza A, Escobedo Bocardó L, Villarreal Quintanilla JA, Cornejo Oviedo E. Hyperhydricity control of in vitro shoots of *Turbinicarpus valdezianus* (Moller) Gl. & F.2011. *Phyton* 80: 175–179.
11. GOMES, Eliane. **Diversidade genética entre acessos de batata doce (*Ipomoea batata* (L.) Lam) avaliada através de marcadores microssatélites e descritores morfoagronômicos**. 2009. 32 f. Dissertação (Doutorado) - Curso em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia, Universidade de São Paulo Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, 2009.

12. GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; KARASAWA, M.; SUDRÉ, C. P. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p. 1289-1297, 2008.
13. IBGE. SIDRA: **Produção Agrícola Municipal**. 2019. Disponível em:
<<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>, acessado em 18 de Junho 2022.
14. JOSEPH, HARTRBW. **Multivariate data. sl: Analysis with Readings**. 1992.
15. LAURENTIN, H. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, n. 2, p. 277-292, 2009.
16. MONTEROS-ALTAMIRANO, A. et al. Genetic diversity of sweet potatoes [*Ipomoea batatas* (L) Lam.] in Ecuador. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 68, p. 307-320, 2021.
17. MOULIN, Monique Moreira et al. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, p. 139-147, 2012.
18. MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
19. Ojeda-Zacarias, M.C., Vázquez-Alvarado, R. E., Rodríguez-Fuentes, H. Establecimiento *in vitro* de nopal (*Opuntia ficus-indica*).2010. RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial, 176-181.
20. OLIVEIRA, Ana Carolina de. **Cultivo *in vitro* de meristemas de batata-doce**. 2021. 13 f. Dissertação (Graduação) - Curso em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), 2021.
21. OSORIO, Balbero; EDUARDO, Jorge. Cultivo *in vitro* de batata (*Ipomoea batatas*) cv" morada" a partir de segmentos nodales. 2003.
22. PUPO, JJ, HERNÁNDEZ M, LÓPEZ M, MONTES S, GONZÁLEZ OS.
Micropropagación *in vitro* del boniato (*ipomoea batatas* (L.) Lam.): alternativa para la disponibilidad de material con vista a la producción de alimentos. Alimentaria: **Revista de tecnología e higiene de los alimentos**, n. 343, p. 83-86, 2003.

23. RAYAS CABRERA, Aymé et al. Conservación *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam por crecimiento mínimo con el uso de manitol. **Biotecnología Vegetal**, v. 19, n. 1, p. 43-51, 2019.
24. RODRIGUEZ, C.; CRISTINA, Claudia. **Morfogénesis in vitro de nueve especies de interés botánico y ornamental pertenecientes a la familia Cactaceae**. 2006. Tese de Doutorado. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile.
25. SILVA, J. C. de O. **Seleção de clones de batata-doce para diferentes aptidões agronômicas**. 2019. 86 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
26. SUDRÉ, C. P.; GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JUNIOR, A. T.; RIVA-SOUZA, E. M.; BENTO, C. S. Genetic variability in domesticated *Capsicum spp.* as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 283-294, 2010.
27. VEASEY, E. A.; BORGES, A.; ROSA, M. S.; SILVA, J. R. Q.; BRESSAN, E. A.; PERONI, N. Genetic diversity in Brazilian sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Solanales, Convolvulaceae) landraces assessed with microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 725-733, 2008.