

SEGREGAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS Y (Ry_{ADG}) EM FAMÍLIAS CLONAIS DE BATATA.

RAQUEL BARTZ KNEIB¹; ROBERTA BARTZ KNEIB²; NATÉRCIA LOBATO PINHEIRO LIMA²; ARIONE DA SILVA PEREIRA²; CAROLINE MARQUES CASTRO³

¹Embrapa Clima Temperado/UFPEL – raquelkneib@yahoo.com.br

²Embrapa Clima Temperado – natercia.lobato@embrapa.br

³Embrapa Clima Temperado – caroline.castro@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

A resistência ao *Potato vírus Y* (PVY) é uma das características mais importantes nas cultivares de batata (ZIMNOCH-GUZOWSKA ET AL. 2013). O PVY pertence ao gênero dos Potivírus e causa degenerescência dos tubérculos-sementes, diminuição no tamanho e número de tubérculos colhidos, podendo chegar até 90% de perdas no rendimento (JEFFRIES, 1998; NOVY ET AL. 2002). Além disso, a estirpe PVY^{NTN} induz sintomas de necrose nos tubérculos, reduzindo a sua qualidade (FONSECA ET AL. 2005).

O fato da batata ser propagada vegetativamente, perpetuando o vírus de uma geração para outra via tubérculos contaminados, assim como a ocorrência natural de inúmeras solanáceas silvestres e soqueiras de lavouras de batata, as quais servem como repositório de vírus, associado à baixa eficiência do controle de insetos vetores, faz com que a resistência genética ao PVY seja um dos principais meios de controle dessa virose (ÁVILA ET AL. 2009).

Genes de resistência ao PVY foram identificados e mapeados em espécies silvestres de batata. Em *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* foi identificado o gene Ry_{adg} o qual controla um tipo de resistência extrema, durável e de alta herdabilidade (GADUM ET AL. 2003). KASAI ET AL. (2000) desenvolveram um marcador SCAR, denominado RYSC3, para a detecção do gene Ry_{adg} . Embora o nível de resistência de genótipos simplex ($Ryryryry$) seja o mesmo de genótipos duplex ($RyRyryry$), triplex ($RyRyRyry$) ou quadruplex ($RyRyRyRy$), a segregação em uma progênie resultante do cruzamento de genótipos simplex com nuliplex resulta em apenas 50% dos clones resistentes, enquanto que no cruzamento de genótipos triplex ou quadruplex com um nuliplex praticamente 100% da progênie é resistente (ANDRADE ET AL. 2009).

Neste sentido o objetivo deste trabalho foi estimar a dosagem alélica do gene Ry_{adg} nos genitores do Programa de Melhoramento de Batata da Embrapa Clima Temperado através do estudo da segregação em famílias clonias.

2. METODOLOGIA

Foram avaliadas progênies de cinco cruzamentos escolhidos devido aos pais serem contrastantes quanto à presença do gene Ry_{adg} (Tabela 1). As sementes sexuais foram semeadas em sementeiras e aproximadamente 120 'seedlings' de cada cruzamento foram transplantados para vasos contendo 0,25kg de substrato organo-mineral. Para a extração de DNA foram coletadas folhas jovens de cada clone e a extração foi realizada de acordo com protocolo descrito por DarT® (DART, 2010). O DNA foi quantificado em fluorômetro e diluído a 10 ng.µl⁻¹ para as reações de amplificação via PCR.

Tabela 1. Identificação das famílias clonais avaliadas.

Família	Mãe	Pai
22	BRS Clara	C1883-22-97*
66	Shepody	C2080-02-00*
102	BRS Ana	C1883-22-97*
118	BRS Ana	C2372-02-02*
120	Caesar	C2372-02-02*

*resistente ao PVY. Fonte: TERRES et al., 2012.

A genotipagem foi realizada com base no marcador SCARRYSC3 (KASAI et al. 2000) para a detecção do gene *Ry_{adg}*. Um iniciador CACGACGTTGTAAAACGAC M-13 foi adaptado na sequência *Forward* do *primer*. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 9,0 µL, contendo buffer de PCR 1X, 2,0mM de dNTPs, 20ng.µL⁻¹ de DNA genômico, 1,0µM de *primer* (*forward* com iniciador M-13 e *reverse*), 1U de *Taq*DNA polimerase e 1,0 µL do iniciador M-13 marcado com corante de fluorescência (IRDye 800, LI-COR) na concentração de 1,0 µM.

O programa de amplificação para o marcador RYSC3 foi executado em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*) com ciclo inicial de desnaturação a 93°C por 9 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto para o anelamento do *primer* e extensão a 72°C por 5 minutos, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 4 minutos. A reação de PCR foi diluída na proporção de 1:20 e foi adicionada solução *Blue Stop* (LI-COR) numa proporção de 1:1. Foram aplicados 0,8 µL em gel de poliacrilamida 6,5% para separação dos produtos por eletroforese com sistema de análise de DNA do sequenciador LI-COR 4300. O tamanho dos alelos foi dimensionado com o marcador de DNA de peso molecular de 50-350 pb (LI-COR). Para visualização, registro e análise dos fragmentos amplificados foi utilizado o software Saga GT (LI-COR).

A presença de fragmento de 321pb indica a presença do gene de resistência *Ry_{adg}*. Para testar as hipóteses de constituições genéticas dos genitores, foi utilizado o teste χ^2 , considerando a frequência de redução $\alpha = 0,1566$ (MENDOZA et al. 1996). Foram testadas as seguintes proporções (presença:ausência de bandas): Nuliplex, *ryryryry*, (0 : 1); Simplex, *Ryryryry*, (1:1,17); Duplex, *RyRyryry*, (3,56:1); Triplex, *RyRyRyry*, (24,5: 1); Quadruplex, *RyRyRyRy*, (1:0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O marcador RYSC3 amplificou fragmentos de 321pb confirmando presença do gene *Ry_{adg}* em pelo menos um dos genitores em cada cruzamento (Tabela 2). Porém, segundo o teste χ^2 , apenas no cruzamento 66 foi observada proporção estatisticamente igual a esperada na segregação de um cruzamento entre genitores nuliplex e simplex. Tal fato, pode ser justificado em função do tamanho da população amostrada Andrade et al. (2009).

Tabela 2 Frequências observadas nas progênes de famílias clonais de batata coma presença da banda (+) e ausência (-) e os valores obtidos pelo teste χ^2 para cada constituição genética.

Família	Bandas		Total de plantas	% de plantas resistentes	Constituição genética		
	+	-			Nuliplex	Simplex	Duplex
22	14	91	105	13	1,87 ns	45,30 **	257,11 **
66	33	72	105	31	10,4ns	9,08 ns	77,98 **
102	35	82	117	30	10,3 ns	12,27 **	157,7 **
118	28	89	117	24	6,70 ns	23 **	200,24 **
120	19	85	104	18	3,47ns	32,37 **	165,57 **

ns: não-significativo; * significativo a 5%; ** significativo 1% de probabilidade.

Embora a estimativa da dosagem alélica nos genitores ainda não tenha sido estimada de forma eficiente, por outro lado o marcador SCARRYSC3, permitiu selecionar entre 13 e 31% da progênie dos cruzamentos como resistente.

Como o processo de seleção no desenvolvimento de novas cultivares ocorre em vários locais, incluindo avaliações a campo, estufa e análises de laboratório e requer de 10 a 15 anos a partir do cruzamento inicial até o lançamento de uma nova variedade, a utilização deste tipo de marcador que amplifica regiões específicas do DNA genômico de forma confiável, tem grande potencial, pois possibilita reduzir, já em fases iniciais de seleção, o número de genótipos à prosseguirem nas avaliações proporcionando maior eficiência ao programa de melhoramento.

4.CONCLUSÕES

A estimativa da dosagem alélica nos genitores avaliados ainda não foi estimada de forma eficiente em função do tamanho da população. Porém, o marcador SCARRYSC3 mostra-se como uma excelente ferramenta para ser usada pelos programas de melhoramento de batata visando acelerar o processo de desenvolvimento de cultivares com resistência ao PVY.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C.M.A.; PINTO, C.A.B.P.; RIBEIRO, S.R.R.P.; PEIXOUTO, L.S.; VILELA, X.M.S. Potato clones with multiple copies of the Ryadg allele conferring resistance to PVY. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa v.9, p.286-292, 2009.

ÁVILA, A.C.; MELO, P.E.; LEITE, L.R.; INOUE-NAGATA, A.K. Ocorrência de vírus em batata em sete Estados do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.27, n.4, p.490-497, 2009.

DART (DiversityArrays Technology Pty. Ltd.) **Protocolo de extração de DNA de plantas para DArT**, Austrália 2008. Acessado em: 15 set. 2012. Online. Disponível em: <http://www.diversityarrays.com>

FONSECA, L.N.; INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T.; SINGH, R.P.; ÁVILA, A.C.; Diferenciação de estirpes de *Potato virus Y* (PVY) por RT-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.904-910, 2005.

GADUM, J.; PINTO, C.A.B.P.; RIOS, M.C.D. Desempenho agrônômico e reações de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) ao PVY. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, p.1484-1492, 2003.

JEFFRIES, C.J. Potato. **FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm**, Roma, v.19, p.70-72, 1998.

KASAI, K.; MORIKAWA, Y.; SORRI, V.A.; VALKONEN, J.P.T.; GEBHARDT, C.; WATANABE, K.N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ryadg based on a common feature of plant disease resistance genes. **Genome**, Ottawa, v.43, n.1, p.1-8, 2000.

MENDOZA, H.A.; MIHOVILOVICH, E.J.; SAGUMA, F. Identification of triplex (YYYy) *Potato virus Y* (PVY) immune progenitors derived from *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. *American Potato Journal*, v.79, p.9-18, 2002.

NOVY, R.G.; NASRUDDIN, A.; RAGSDALE, D.W.; RADCLIFFE, E.B. Genetic resistances to potato leafroll virus, potato virus Y and green peach aphid in progeny of *Solanum tuberosum*. **American Journal of Potato Research**, New York, v.79, p.9-18, 2002.

SAGREDO, D.B.; MATHIAS, R.M.; BARRIENTOS, C.P.; ACUÑA, I.B.; KALAZICH, J.B.; SANTOS, J.R. Evaluation of a SCAR RYSC3 Marker of the Ryadg Gene to Select Resistant Genotypes to Potato Virus Y (PVY) in the INIA Potato Breeding Program. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Casilla, v.69, n.3, p.305-315, 2009.

ZIMNOCH-GUZOWSKA, E.; YIN, Z.; CHRZANOWSKA, M.; FLIS, B. Sources and Effectiveness of Potato PVY Resistance in IHAR's Breeding Research. **American Journal of Potato Research**, New York, v.90, p.21-27, 2013.