

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

RAQUEL BARTZ KNEIB<sup>1</sup>; ROBERTA BARTZ KNEIB<sup>2</sup>; NATÉRCIA LOBATO PINHEIRO LIMA<sup>2</sup>; ARIONE DA SILVA PEREIRA<sup>2</sup>; CAROLINE MARQUES CASTRO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Clima Temperado/UFPEL – [raquelkneib@yahoo.com.br](mailto:raquelkneib@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Embrapa Clima Temperado – [natercia.lobato@embrapa.br](mailto:natercia.lobato@embrapa.br)

<sup>3</sup>Embrapa Clima Temperado – [caroline.castro@embrapa.br](mailto: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<sup>NTN</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sub>adg</sub>*. 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  $\mu\text{L}$ , contendo buffer de PCR 1X, 2,0mM de dNTPs, 20ng. $\mu\text{L}^{-1}$  de DNA genômico, 1,0 $\mu\text{M}$  de *primer* (*forward* com iniciador M-13 e *reverse*), 1U de *Taq*DNA polimerase e 1,0  $\mu\text{L}$  do iniciador M-13 marcado com corante de fluorescência (IRDye 800, LI-COR) na concentração de 1,0  $\mu\text{M}$ .

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  $\mu\text{L}$  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<sub>adg</sub>*. Para testar as hipóteses de constituições genéticas dos genitores, foi utilizado o teste  $\chi^2$ , 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<sub>adg</sub>* em pelo menos um dos genitores em cada cruzamento (Tabela 2). Porém, segundo o teste  $\chi^2$ , 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  $\chi^2$  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.