

# ESTIMATIVA DA DOSAGEM ALÉLICA DO GENE *Ry* EM CRUZAMENTOS ENTRE CLONES DE BATATA IMUNES E SUSCETÍVEIS AO PVY

Mirtes Freitas Lima<sup>1</sup>; Paulo Eduardo de Melo<sup>1</sup>; Arione da Silva Pereira<sup>2</sup>

## Resumo

Neste trabalho, relata-se o estudo da dosagem alélica do gene *Ry* em três clones de batata imunes a PVY. Os clones foram cruzados com um genótipo suscetível (clone 07-10) e de 21 a 30 genótipos da progênie foram avaliados em casa-de-vegetação, utilizando inoculação artificial e inóculo composto de de PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N</sup>. As cultivares Bintje e Ágata foram utilizadas como testemunhas suscetíveis. A avaliação foi feita pela observação visual de sintomas, com as plantas assintomáticas sendo submetidas a ELISA. Os clones foram selecionados com base na resistência, formato do tubérculo e profundidade dos olhos. Os clones imunes C2076-2-00 e C2080-3-00 quando cruzados com o clone suscetível 07-10 apresentaram progênies segregando em 1:1, enquanto o clone C2071-1-00 apresentou progênie segregando em 3:1 para suscetibilidade:resistência. Quando foram consideradas as características dos tubérculos, o clone C2071-1-00 teve a maior porcentagem de seleção.

## Introdução

A produção brasileira de batata em 2008 foi superior a 3,5 milhões de toneladas, cobrindo uma área de 144 mil hectares (IBGE, 2008). Em 2007, o agronegócio da batata movimentou cerca de 1,9 bilhão de reais. Esses números colocam a batata como a principal hortaliça cultivada no Brasil.

Como os demais cultivos explorados em larga escala, a produção de batata em bases sustentáveis enfrenta constantes desafios. Uma das maiores dificuldades é trabalhar com tubérculos-sementes de alta qualidade fitossanitária, já que propagação vegetativa por si só já é um complicador para manutenção da sanidade em comparação à propagação via sementes. Quando o índice de adoção de tubérculos-sementes de qualidade cai, os impactos negativos sobre a sanidade da lavoura e sobre a produtividade são imediatos. As viroses são o problema fitossanitário que primeiro aparece e, entre elas, os mosaicos, causados por PVY, com predominância das estirpes necróticas (PVY<sup>N</sup>), são hoje o principal obstáculo (ÁVILA *et al.*, 2007). PVY é transmitido por pulgões. PVY causa mosaico com pontuações cloróticas e deformação nas folhas da batateira, sendo que o subgrupo PVY<sup>NTN</sup> pode causar também necrose na forma de anéis, números e letras nos tubérculos. As perdas podem variar de 30 a 100%, dependendo da cultivar (CÂMARA *et al.*, 1986), (FILGUEIRA; CÂMARA, 1986) e (KUS, 1995).

O cultivo de batata em condições tropicais e sub-tropicais, como é o caso das regiões produtoras brasileiras, sofre grande pressão de viroses. Os afídeos vetores estão presentes durante todo o ano e há ocorrência natural de um sem número de solanáceas silvestres (FONTES; MELO, 1999) e de soqueiras de lavouras de batata, que funcionam como repositório de vírus. Essa constante presença de vetores e viroses, que dificulta o manejo das lavouras, e a ineficiência do controle químico dos vetores sobre a dispersão do mosaico, colocam a resistência genética ao vírus como uma das formas mais eficientes e sustentáveis de controle da doença.

Os genes *N* e *R*, originários de parentes silvestres da batata, conferem reações de hipersensibilidade ao hospedeiro quando desafiado por PVY. O gene *Ny* é de expressão variável e dependente da estirpe do vírus, ao contrário do gene *Ry*, estável e efetivo contra todas as estirpes de PVY (SONG *et al.*, 2005). Transferido para a espécie cultivada, o gene *Ry* já vem sendo utilizado no melhoramento da batata (BRUNE *et al.*, 1997, 1999) e (DALLA RIZZA *et al.*, 2006).

Entretanto, como a batata cultivada comercialmente é tetraplóide, para utilizar mais eficientemente o gene *Ry* no melhoramento, é necessário conhecer sua dosagem alélica no genótipo que se deseja utilizar como parental. Com isso, é possível prever a segregação do cruzamento e estimar com maior precisão o tamanho da população descendente necessária para identificação de clones ao mesmo tempo imunes e apresentando características favoráveis do progenitor suscetível.

<sup>1</sup> Pesquisadores da Embrapa Hortaliças, Caixa Postal 218, 70.351-970 Brasília – DF, [mflima@cnph.embrapa.br](mailto:mflima@cnph.embrapa.br), [paulo@cnph.embrapa.br](mailto:paulo@cnph.embrapa.br)

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Caixa Postal 403, 96.001-970 Pelotas – RS, [arione@cpact.embrapa.br](mailto:arione@cpact.embrapa.br)

Este trabalho teve como objetivo estimar a dosagem alélica em uma fonte de resistência ao PVY, portadora do gene *Ry*.

## Material e Métodos

Três clones de batata (C2071-1-00, C2076-2-00 e C2080-3-00) identificados na Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) como imunes a PVY devido à presença do gene *Ry* foram cruzados com clone 07-10, suscetível ao PVY, mas com excelentes características comerciais. Entre 21 e 30 genótipos de cada cruzamento (um tubérculo por genótipo) foram plantados em vasos de plástico de 3 L de capacidade, contendo uma mistura composta por solo de cerrado, areia lavada, esterco de gado e palha de arroz queimada, na proporção de 1:1:1:1. À mistura, adicionaram-se também, 300 g de NPK (4:30:16) e 300 g de calcário dolomítico, por 300 kg de solo. O plantio dos tubérculos foi realizado em 06 de outubro de 2008, na Embrapa Hortaliças, em Brasília.

Como fonte de inóculo para batata utilizaram-se plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun), inoculadas mecanicamente com dois isolados de PVY de estirpes diferentes: PVY<sup>O</sup>, proveniente de Araxá, Minas Gerais, e PVY<sup>N</sup>, obtido em Brasília, DF. Uma vez inoculadas, as plantas de fumo exibiram os sintomas típicos incitados por estas estirpes: necrose e clareamento de nervuras, respectivamente. As folhas utilizadas como inóculo para batata foram coletadas cerca de 7-10 dias após a inoculação. O inóculo foi preparado macerando-se, em tampão fosfato pH 7,0, quantidades iguais de folhas de plantas de fumo infectadas com as estirpes PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N</sup>, na proporção de 1 g de folhas para 10 mL de tampão. As plântulas de batata, originadas da brotação dos tubérculos, foram inoculadas três vezes: 13, 15 e 17 dias após o plantio dos tubérculos, respectivamente em 20, 22 e 24 de outubro de 2008. Antes da inoculação, as plantas foram polvilhadas com carborundo. As plantas permaneceram em casa de vegetação até o final da avaliação. Plantas das cultivares Bintje e Ágata, no mesmo estágio de desenvolvimento, foram utilizadas como testemunhas suscetíveis no ensaio.

A avaliação da resistência foi feita pela observação visual da presença de sintomas típicos causados pelas estirpes de PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>O</sup> nas plantas inoculadas, até 22 dias após a primeira inoculação, 13 de novembro de 2008. Plantas que não exibirão sintomas típicos foram submetidas ao teste ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (CLARK ADAMS, 1977), utilizando antisoro policlonal contra a capa protéica de PVY.

Ao final do experimento, foram selecionados, entre os clones que não se infectaram aqueles que produziram tubérculos de formato uniforme, alongado ou redondo, e olhos rasos. Essas são características pouco influenciadas pelo ambiente e vantajosas para o futuro desenvolvimento de cultivares, seja para mesa, seja para o processamento industrial.

## Resultados e Discussão

As plantas das cultivares suscetíveis Ágata e Bintje apresentaram os sintomas característicos de PVY: clareamento e ou necrose de nervuras, acompanhado de mosaico leve (PVY<sup>O</sup>) ou somente mosaico (estirpe PVY<sup>N</sup>) (Figura 1), sem escapes, garantindo a efetividade da inoculação. As plantas de batata dos cruzamentos em estudo também apresentaram sintomas típicos de PVY, havendo poucos casos de plantas assintomáticas com resultado positivo em ELISA (Tabela 1). A ocorrência de um grande número de plantas assintomáticas em um cruzamento não é vantajosa para futuros trabalhos de melhoramento. Plantas assintomáticas exigem que todo o processo de melhoramento seja acompanhado de testes sorológicos, que são muito mais caros e trabalhosos que o simples diagnóstico visual. Além disso, cultivares que se infectam de forma silenciosa, ou seja, sem apresentar sintomas, são de difícil certificação, quando da produção de tubérculos-sementes comerciais, além de funcionarem como repositórios silenciosos de vírus.

Dois dos clones imunes, C2076-2-00 e C2080-3-00, quando cruzados com o clone suscetível 07-10, apresentaram segregação suscetibilidade:resistência próxima a 1:1 na progênie (Tabela 1), indicando que provavelmente carregam dois alelos do gene *Ry* em seu genoma tetraplóide. Já o clone C2071-1-00, quando cruzado com clone suscetível 07-10, apresentou segregação resistência:suscetibilidade mais próxima a 3:1, indicando que provavelmente carrega apenas um alelo do gene *Ry*. Desta forma, a

utilização dos clones C2076-2-00 e C2080-3-00 em melhoramento é, em princípio, mais vantajosa, por produzirem uma maior proporção da progênie com resistência a PVY.

Na colheita, foram selecionados cinco clones cujo progenitor feminino foi C2071-1-00 (19,2% do total de clones gerados no cruzamento; 62,5% dos clones que não se infectaram), três oriundos do cruzamento utilizando C2076-2-00 (14,3%; 33,3%) e cinco do cruzamento com C2080-3-00 (16,7%; 35,7%). Assim, ao contrário do esperado quando se leva em consideração apenas a dosagem alélica do gene *Ry*, a progênie mais vantajosa para o melhoramento foi aquela onde o clone C2071-1-00, embora com apenas um alelo do gene *Ry*, foi utilizado como progenitor. O resultado indica a importância da fonte de resistência apresentar também outras características vantajosas, neste caso, características de tubérculos, que possibilitem o avanço mais rápido do melhoramento.

Os clones selecionados têm potencial para serem utilizados como fontes de resistência a PVY no melhoramento de batata ou, eventualmente, até mesmo como cultivares. Este potencial será observado nos próximos ciclos de seleção, quando os materiais serão levados a campo para avaliações adicionais e acompanhamento da resistência a PVY.

## Conclusões

Os cruzamentos entre os clones imunes e o clone resistente produziram segregações distintas nas respectivas progênies;

Os clones imunes C2076-2-00 e C2080-3-00 provavelmente carregam dois alelos do gene *Ry* em seu genoma;

O clone imune C2071-1-00 provavelmente carrega apenas um alelo do gene *Ry* em seu genoma;

O clone imune C2071-1-00 apresentou maior número de genótipos selecionados em sua progênie quando, além da resistência a PVY, as características de tubérculo também foram consideradas.

## Referências

ÁVILA, A.C. de; MELO, P.E. de; LEITE, L.R. O vírus Y da Batata (Potato virus Y) e a Batata-Semente Nacional: Quem vencerá? *Batata Show*, v. , p. 14-17. 2007

BRUNE, S.; MELO, P.E. de, ÁVILA, A.C. de. Embrapa/CIP-PP018 e Embrapa/CIP-PP039: novos clones de batata resistentes a pinta-preta, 1997. *Horticultura Brasileira*, v. 16, p. 90-91. 1998.

BRUNE, S.; MELO, P.E. de, ÁVILA, A.C. de. Novas progênies de batata imunes a PVY e PVX e resistentes a PLRV. *Horticultura Brasileira*, v. 17, p. 173-174. 1999.

CÂMARA, F.L.A.; CUPERTINO, F.P.; FILGUEIRA, F.A.R. Incidência de vírus em cultivares de batata multiplicadas sucessivamente em Goiás. *Fitopatologia Brasileira*, v. 11, p. 711-716. 1986.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, v. 34, p. 475-483. 1977.

DALLA RIZZA, M.; VILARÓ, F.L.; TORRES, D.G.; MAESO, D. Detection of PVY extreme resistance genes in potato germplasm from the Uruguayan breeding program. *American Journal of Potato Research*, v. 86, p. 297-304. 2006.

FILGUEIRA, F.A.R.; CÂMARA, F.L.A. Comportamento de cultivares européias de batata em gerações sucessivas. *Horticultura Brasileira*, v. 4, p. 29-31. 1986.

FONTES, E.G.; MELO, P.E. de. Avaliação de riscos na introdução no ambiente de plantas transgênicas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa Comunicação Tecnológica, 1999. p. 815-843

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Levantamento sistemático da Produção Agrícola*. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa>. Acessado em 18 de maio de 2009

KUS, M. The epidemic of the tuber necrotic ringspot strain of *Potato virus Y* (PVY<sup>NTN</sup>) and its effect on potato crops in Slovenia. In: EUROPEAN ASSOCIATION FOR POTATO RESEARCH MEETING, Virology Section. 9. *Proceedings...*Bled: EAPR. p.159-160. 1995.

SONG, Y.S.; HEPTING, L.; SCHWEIZER, G.; HARTL, L.; WENZEL, G.; SCHWARZFISCHER, A. Mapping of extreme resistance to PVY (*R<sub>Ysto</sub>*) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 111, p. 879-887. 2005.



**Figura 1.** Planta de batata, cultivar Bintje, apresentando mosaico foliar induzido pela inoculação com PVY<sup>N</sup>, 20 dias após a inoculação. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2009.

**Tabela 1.** Número de plantas inoculadas com PVY e número de plantas apresentando sintomas visuais ou resultados positivos em ELISA em três cruzamentos de batata envolvendo um progenitor imune ao vírus. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2009.

Cruzamento	Plantas Inoculadas (n <sup>o</sup> )	Plantas com Sintomas Visuais (n <sup>o</sup> )	Plantas Assintomáticas com ELISA Positivo (n <sup>o</sup> )	Total Plantas Infectadas (n <sup>o</sup> )
C2071-1-00 x 07-10	26	14	4	18 (69,2%)
C2076-2-00 x 07-10	21	10	2	12 (57,1%)
C2080-3-00 x 07-10	30	16	0	16 (53,3%)