



OTÁVIO LUIZ GOMES CARNEIRO

**INTROGRESSÃO DO ALELO Ri_{adg} DE
RESISTÊNCIA AO *Potato leafroll virus* (PLRV)
EM GERMOPLASMA DE *Solanum tuberosum***

LAVRAS – MG

2014

OTÁVIO LUIZ GOMES CARNEIRO

**INTROGRESSÃO DO ALELO RI_{adg} DE RESISTÊNCIA
AO *Potato leafroll virus* (PLRV) EM GERMOPLASMA
DE *Solanum tuberosum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto

Coorientadora

Dra. Silvia Regina Rodrigues de Paula Ribeiro

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Carneiro, Otávio Luiz Gomes.

Introgressão do alelo RI_{adg} de resistência ao *Potato leafroll virus*
(PLVR) em Germoplasma de *Solanum tuberosum* / Otávio Luiz
Gomes Carneiro. – Lavras : UFLA, 2014.

59 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: César Augusto Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Virose. 2. Batata. 3. Plantas - Melhoramento genético. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.213

OTÁVIO LUIZ GOMES CARNEIRO

**INTROGRESSÃO DO ALELO RI_{adg} DE RESISTÊNCIA
AO *Potato leafroll virus* (PLRV) EM GERMOPLASMA
DE *Solanum tuberosum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2014.

Dr. José Alberto Caram de Souza Dias IAC

Dr. João Bosco dos Santos UFLA

Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto
Orientador

LAVRAS – MG

2014

Dedico,

Aos meus pais, Jorge Luiz e Solange Maria, pela confiança, princípios e ensinamentos, ajudando na construção desta pessoa que sou hoje.

À minha irmã, Maria Tereza, e ao Guilherme, pelo respeito, carinho e honestidade.

À minha avó, Dirce Maria, pelo carinho.

À Stephanie Harumi, por todo amor, compreensão, paciência e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia pelo curso ofertado e oportunidades oferecidas durante estes dois anos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor César Brasil por todo ensino e paciência.

À Silvia pelos ensinamentos.

À Professora Antônia dos Reis Figueira pela disponibilização dos laboratórios de virologia e do centro de indexação de vírus. Agradeço ainda principalmente à Luciana, pelos inúmeros testes DAS-ELISA realizados, à Jaci, pelos trabalhos de inoculação, além da Priscila, Suelen, Dani e Nara por toda ajuda nos trabalhos de laboratório.

À Lea por disponibilizar pulgões-verdes.

À todos os funcionários da EPAMIG de Lambari, em especial ao André, Pedro e Selestino, por toda ajuda nos trabalhos de campo.

Ao Professor João Bosco dos Santos pela disponibilização do laboratório de Genética Molecular. Agradeço ainda ao Lamartine, por toda ajuda nas reações de PCR, e aos colegas de laboratório Chadreque, Filipe, Danuza e Isabel.

Aos professores Magno, Elaine, Flávia, Vânia, João Cândido, Adriano Bruzi e José Airton pela importância em minha formação e amizade.

Ao Raimundo, peça fundamental para o sucesso dos experimentos e grande companheiro do grupo de melhoramento da batata.

Aos colegas batateiros e ex-batateiros pela importante e indispensável ajuda na condução dos experimentos, sem os quais não seria possível o trabalho no programa de melhoramento genético de batata: Carol, Márcio, Bahiano,

Guilherme, Izabel, Leandro, Vitor, Cláudio, Pedro, Rafaela, Tiago, Gustavo, Jéssica e Fran.

Pelos colegas de curso, Josiel, Sheila, Cinthia, Nayara, Rita, Natália e Istalone; além dos colegas de república, Kaio e Luis Paulo.

Aos meus tios, Simoni e Fred Nilson, e à minha prima, Nina, por toda confiança e carinho.

Aos meus amigos de infância, Fernandinho, Ric e Bobrão, sempre presentes.

À todos que, de alguma forma, ajudaram à construir este trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

Uma das principais viroses que ocorrem na cultura da batata no Brasil é causada pelo *Potato leafroll virus* (PLRV), também conhecido por Vírus do Enrolamento da Folha da Batata. A resistência genética a essa virose é de controle poligênico, dificultando a obtenção de cultivares resistentes a esse vírus. Porém, trabalhos do *Centro Internacional de la Papa* (CIP) identificaram um acesso andígena denominado LOP-868, com altos níveis de resistência herdáveis e baixa acumulação do PLRV. Posteriormente, estudos demonstraram ser esta resistência governada por um gene de efeito maior, $R_{I_{adg}}$. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram verificar a transferência do alelo $R_{I_{adg}}$ em famílias oriundas de cruzamentos do LOP-868 com clones do programa de melhoramento genético de batata da UFLA, por meio de marcador molecular, verificar a possibilidade de resistência desses clones ao PLRV por meio da inoculação do vírus e ainda obter as suas características agrônomicas sob condições de campo. Visando a reação ao PLRV, clones foram inoculados por meio de afídeos virulíferos (*Myzus persicae*) e, para detectar a presença do alelo $R_{I_{adg}}$, recorreu-se ao uso do marcador molecular SCAR RGASC850, específico para o alelo $R_{I_{adg}}$. Para o desempenho agrônomico, os clones foram avaliados em campo quanto à produção total, ao peso específico, ao formato e aparência de tubérculos. Dos clones experimentais inoculados com PLRV utilizando afídeos virulíferos, 49,3% apresentaram resultados negativos no teste sorológico aos 30 e 40 dias após a inoculação, podendo ser um indicativo que esses clones possuem resistência ao PLRV. Quanto aos clones avaliados por meio do marcador, 31% apresentaram a banda de 850pb, característica do alelo $R_{I_{adg}}$, demonstrando ser possível a transferência deste alelo de resistência ao PLRV. Do total de clones avaliados em campo e submetidos ao teste molecular, 48(40%) apresentaram o alelo $R_{I_{adg}}$, destacando-se os clones OGC 6-45, OGC 6-16, OGC 6-68, OGC 5-80, OGC 6-104, OGC 6-34, OGC 1-02, OGC 6-44, OGC 6-20 e OGC 5-79 por apresentarem produção total, peso específico e/ou aparência geral de tubérculos superior aos demais clones. Esses resultados indicam que estes clones portadores do alelo de resistência ao PLRV e com características agrônomicas desejáveis poderão ser usados em futuros programas de melhoramento como genitores doadores ou não recorrentes em retrocruzamentos.

Palavras-chave: Genética e melhoramento de plantas. Virose. Batata.

ABSTRACT

One of the main viral diseases which occur in the potato crop in Brazil is caused by the *Potato leafroll virus* (PLRV). The genetic resistance to this disease has polygenic control, making the attainment of resistant cultivars difficult. However, works in the *Centro Internacional de la Papa* (CIP) identified an andigena assessment denominated LOP-868, with high levels of heritable resistance and low PLRV accumulation. Further studies demonstrated that this resistance is governed by a gene of higher effect, $R_{I_{adg}}$. Thus, the objectives of this work were to verify the possibility of transference of the $R_{I_{adg}}$ allele into families derived from LOP-868 crossed with clones from the Potato Breeding Program performed in UFLA, by means of a molecular marker; verify these clones' resistance to PLRV by means of virus inoculation, and evaluate their agronomic performance under field conditions. Aiming to obtain a reaction to PLRV, clones were inoculated through infected aphids (*Myzus persicae*) and, in order to detect the presence of the $R_{I_{adg}}$ allele, we used the SCAR RGASC850 molecular marker, specific to the $R_{I_{adg}}$ allele. For the agronomic performance, the clones were evaluated in the field regarding total tuber production, tuber specific gravity, tuber shape and general appearance. Of the experimental clones inoculated with PLRV using infected aphids, 49.3% presented negative results in the serological test at 30 and 40 days after inoculation, which might indicate that these clones are resistant to PLRV. In regard to the clones evaluated through the SCAR marker, 31% presented the 850bp band, characteristic of the $R_{I_{adg}}$ allele, demonstrating that the transference of this PLRV resistance allele is possible. Of the total number of clones evaluated in the field and submitted to the molecular test, 48 (40%) presented the $R_{I_{adg}}$ allele, highlighting clones OGC 6-45, OGC 6-16, OGC 6-68, OGC 5-80, OGC 6-104, OGC 6-34, OGC 1-02, OGC 6-44, OGC 6-20 and OGC 5-79 for presenting total tuber production, tuber specific gravity and/or general appearance of tubers superior to the other clones. These results indicate that these clones bearing the PLRV resistance allele and with desirable agronomic traits may be used in future breeding programs as non-recurrent parents in backcrosses.

Keywords: plant genetics and breeding, virus disease, potato.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Frequência (%) do número de pulgões por planta	37
Figura 2	Presença ou ausência de bandas (indicadas pela seta) amplificadas pelo par de <i>primers</i> RGASC850 por meio de PCR, nos controles LOP-868 (1) resistente e Perricholi (2) suscetível e nos clones resistentes OGC 1-02 (3), OGC 1-12 (4), OGC 2-18 (5), OGC 2-26 (6), OGC 5-07 (7), OGC 5-51 (8), OGC 5-79 (9), OGC 6-44 (10), OGC 6-45 (11), OGC 6-46 (12), OGC 6-52 (13), OGC 6-69 (14), OGC 6-89(15), OGC 6-105 (16), UFLA, 2013.....	40
Figura 3	Distribuição de 134 clones experimentais e quatro testemunhas para produção total de tubérculos (A), peso específico dos tubérculos (B), formato dos tubérculos (C) e aparência geral dos tubérculos (D).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genealogia e número de clones obtidos do cruzamento LOP-868 com clones da UFLA.....	28
Tabela 2	Características dos clones utilizados nos cruzamentos	29
Tabela 3	Resumo das análises de variância para as características produção total de tubérculos por planta, peso específico, formato e aparência geral de tubérculos, avaliados em Lambari, MG, 2013-2014.....	45
Tabela 4	Médias estimadas dos 134 clones experimentais e das testemunhas para produção total de tubérculos por planta, peso específico, formato e aparência geral de tubérculos, avaliados em Lambari, MG, 2013-2014.....	47
Tabela 5	Médias ajustadas de 48 clones que apresentam o alelo Rl_{adg} para produção total de tubérculos, peso específico de tubérculos, notas de formato e de aparência de tubérculos, avaliados em Lambari, MG, 2013-2014.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Doenças viróticas e suas implicações na bataticultura	15
2.2	Vírus do enrolamento da folha da batata (<i>Potato leafroll virus</i> - PLRV)	16
2.2.1	Transmissão do PLRV	18
2.3	Resistência da batata a viroses	20
2.4	Estratégia de melhoramento visando resistência a doenças viróticas	22
2.5	Resistência genética ao PLRV	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Local	28
3.2	Material experimental	28
3.3	Inoculação com afídeos virulíferos	29
3.3.1	Criação e manutenção de <i>M. persicae</i>	30
3.3.2	Período de acesso à aquisição do vírus	30
3.3.3	Período de acesso à inoculação do vírus	30
3.4	Deteção da presença do alelo Rl_{adg}	32
3.4.1	Extração de DNA	32
3.4.2	Reação de PCR	33
3.5	Avaliação agronômica dos clones	34
3.5.1	Modelo estatístico	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Inoculação do PLRV por meio de afídeos virulíferos	37
4.2	Identificação do alelo Rl_{adg}	39
4.3	Desempenho agronômico	44
5	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma planta propagada vegetativamente para fins comerciais, permitindo a disseminação de doenças, principalmente de natureza virótica. Esses patógenos ocasionam queda drástica de produtividade e qualidade na cultura, denominada degenerescência (CUPERTINO; COSTA, 1970; MALLOZI, 1982; DANIELS, 1995; FIGUEIRA, 1995). No Brasil, as viroses assumem importância maior que em países de clima temperado devido ao alto potencial de disseminação por insetos vetores, principalmente o pulgão verde (*Myzus persicae*) e por não existir regiões nem épocas livres deste vetor (COSTA, 1970; YUKI, 1982; GALLOTTI; HIRANO; BERTOCINI, 1992). Desta forma, o potencial produtivo da cultura é inferior em relação ao alcançado nos países de origem das principais cultivares do mercado (RESENDE; MASCARENHAS; PAIVA, 1999). Apesar de existir a possibilidade do controle desse vírus por meio da aplicação de inseticidas sistêmicos (LOWERY; BOITEAU, 1988), geralmente implicações ambientais e aumento de custos têm levado à busca de outras estratégias de controle, como a resistência genética, no contexto de manejo integrado.

Dentre os vários vírus que ocorrem na cultura da batata, o vírus do enrolamento da folha da batata (Potato leafroll virus - PLRV) é considerado um dos principais vírus no Brasil, responsável por perdas acima de 50% no peso de tubérculos durante a infecção secundária, sendo historicamente apontado como um dos, senão o principal problema fitossanitário na produção de batata-semente no Brasil, tornando o país dependente da importação anual, que, apesar da redução de mais de 15.000 toneladas nas décadas de 70-80, para menos de 5.000 toneladas atuais, ainda é expressiva essa evasão de divisas (SOUZA DIAS; IMAUTI, 2005; SOUZA DIAS, 2009).

A obtenção de cultivares nacionais adaptadas às nossas condições de cultivo e resistentes às principais doenças é a alternativa mais viável para tornar a cultura mais produtiva e rentável ao produtor (ZAAG, 1987; GADUM; PINTO; RIOS, 2003). Porém, existe certa dificuldade de desenvolver cultivares resistentes ao PLRV, pelo fato desta resistência ser governada por vários genes, dificultando a seleção direta de genótipos resistentes (ROSS, 1986; BARKER; HARRISON, 1985; SOLOMON-BLACKBURN; BARKER, 1993). Em trabalho de Daniels e Pereira (2004), avaliando 20 cultivares e clones de batata quanto à resistência ao PLRV, sete cultivares foram agrupados como resistentes a esse vírus. Um segundo problema diz respeito à interação do PLRV com outros vírus, principalmente o PVX e PVY, podendo reduzir o nível de resistência ao PLRV drasticamente (BRANDOLINI; CALIGARI; MENDONZA, 1992).

Porém, mesmo tendo seu controle poligênico, Velásquez, Mihovilovich e Bonierbale (2007) demonstraram que existe um gene de efeito maior ou região genômica, Rl_{adg} , que controla um único mecanismo de resistência à infecção e acúmulo do PLRV.

A cultivar andígena LOP-868 (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*) é apontada em inúmeros trabalhos como fonte interessante de resistência ao PLRV, apresentando o gene Rl_{adg} na condição duplex (MIHOVILOVICH et al., 2007; VELÁSQUEZ; MIHOVILOVICH; BONIERBALE, 2007; MIHOVILOVICH et al., 2014). Contudo, visto a ligação dos genes que conferem resistência ao PLRV a caracteres indesejáveis, como formato irregular e tamanho pequeno de tubérculo e baixa produtividade (BARKER; HARRISON, 1985), a comercialização dos tubérculos desta cultivar torna-se algo inviável.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar características agronômicas de clones de batata obtidas de cruzamentos de cultivar resistente ao PLRV com seis clones resistentes ao PVY e PVX; verificar a resistência ou suscetibilidade dos clones ao PLRV por meio de inoculação com

afídeos virulíferos; transferir o alelo $R_{I_{adg}}$ de resistência ao PLRV do LOP-868 para *Solanum tuberosum* e detectar a presença do alelo $R_{I_{adg}}$ por meio de marcador molecular SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças viróticas e suas implicações na bataticultura

O uso de tubérculos como sementes facilita a transmissão de diversas doenças na bataticultura. Dentre estas, as viroses podem ser classificadas como um risco potencial, visto que uma infecção generalizada poderá ocorrer pela incidência mínima de vírus no campo (CUPERTINO; COSTA, 1970). Desta forma, a cultura acaba sendo muitas vezes inviabilizada pelo uso sucessivo de tubérculos-sementes contendo vírus e que, com o passar do tempo, leva à degenerescência dos mesmos (MALLOZI, 1982). No total, mais de 40 diferentes viroses são relatadas em várias localidades produtoras do mundo (BERGER; GERMAN, 2001).

Apesar do grande número de viroses que podem infectar a batateira, poucos vírus destacam-se como causadores de doenças importantes, tanto no Brasil (PEREIRA; DANIELS, 2003) como em outras partes do mundo (JEFFRIES, 1998). As viroses mais importantes para a bataticultura brasileira são o vírus Y da batata (*Potato virus Y* – PVY), o vírus do enrolamento das folhas da batata (*Potato leafroll virus* – PLRV), o vírus X da batata (*Potato virus X* – PVX), seguido do vírus S (*Potato virus S* – PVS). Apesar de se ter dado pouca importância ao PVX e PVS nos últimos anos, estes vírus estão inclusos na instrução normativa nº 32, de 20 de novembro de 2012, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entretanto, outros vírus transmitidos por mosca branca vêm sendo apontados como potencial agravante no contexto de rápida degenerescência da batata-semente no Brasil, como o *Tomato severe rugose virus* -ToSRV, *Tomato yellow vein streak virus* – TYVSV, Begomovirus, e atualmente o *Tomato chlorosis virus*– ToCV, Crinivirus (FREITAS et al., 2012; SOUZA DIAS et al., 2011).

O PLRV pode acarretar perdas na produção de até 80% (FIGUEIRA, 1999), sendo aproximadamente 10% na infecção primária e, na infecção secundária, os pesos dos tubérculos geralmente sofrem uma queda acima de 50% e o número de tubérculos de 20% (SOUZA DIAS; IAMAUTI, 2005). O PVS pode causar perdas na produção em torno de 10 a 20% (WETTER, 1971). No caso do PVX, observam-se reduções de mais de 80% na produção, quando verificado sinergismo com o PVY ou outros *Potyvirus*. No entanto o PVX praticamente não vem sendo mais observado nos últimos anos em campos de produção (SOUZA DIAS; IAMAUTI, 2005).

A mais rápida degenerescência da cultura em países tropicais e subtropicais está, em grande parte, associada à maior população de afídeos vetores, que se reproduzem durante todo o ano, favorecendo a disseminação e estabelecimento das principais viroses em campos de produção (GALLOTTI; HIRANO; BERTOCINI, 1992).

2.2 Vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll virus* - PLRV)

O PLRV pertence ao gênero *Polerovirus* e à família *Luteoviridae*. Apresenta partículas isométricas, com 24 nm de diâmetro, e tem como ácido nucléico o RNA de fita simples, com aproximadamente 5,6 kb (SOUZA DIAS; IAMAUTI, 2005).

Este vírus é encontrado principalmente no tecido floemático da planta, sendo mais abundante nas células companheiras, podendo ser visualizado, ocasionalmente, em células parenquemáticas. Sua multiplicação se dá nas células companheiras do floema, mas em células adjacentes do mesófilo também parece ocorrer. Quanto à sua translocação, sua principal via de transporte é por meio dos vasos crivados. Assim, a disposição do PLRV nas folhas da batata possui implicações na sua aquisição por afídeos (HEUVEL et al., 1995).

Os sintomas causados pelo PLRV podem ser de dois tipos: os provenientes de infecção na estação corrente, chamados primários, e os provenientes de tubérculos contaminados oriundos de plantas infectadas na estação anterior, chamados secundários.

A infecção primária pode ocorrer na fase de brotos da batata-semente ou em plantas com 3 a 5 cm de altura. Os sintomas primários aparecem nas folhas jovens, no topo da planta, que mostra folhas mais eretas e as bordas dos folíolos enroladas para cima. Estes ficam quebradiços, com uma cor amarelo pálido, e algumas cultivares de batata podem reagir com epinastia e um arroxamento ou avermelhamento das bordas dos folíolos. Se a infecção primária ocorrer no final do ciclo, a planta pode não mostrar nenhum sintoma (CUPERTINO; COSTA, 1970; SOUZA DIAS; IAMAUTI, 2005).

Quanto aos sintomas secundários, as plantas apresentam crescimento mais ereto, ramos menos desenvolvidas, amarelecimento das folhas inferiores, produzindo tubérculos pequenos. Os folíolos enrolam para cima e suas margens se tornam arroxeadas ou necrosadas. As folhas apicais novas têm crescimento vertical com coloração amarelo-pálida (SOUZA DIAS; IAMAUTI, 2005).

Os sintomas citológicos do PLRV provenientes de infecção secundária mostram necrose na região dos tubos crivados e nas células companheiras, na porção da haste localizada logo acima do tubérculo. As células afetadas pelo PLRV mostram um tipo de goma amarelada, que lembra lignina ou suberina, e que aparece nas paredes celulares e no lúmen das células que sofreram colapso. As células do parênquima ficam hipertrofiadas, comprimindo as células necróticas. A necrose do floema caminha tanto em direção ao topo como em direção as raízes e também aparece antes dos sintomas externos se tornarem visíveis. Já nas infecções primárias, a necrose caminha primeiramente em direção ao topo, de modo que, em alguns casos, é possível perceber o ponto de infecção pela posição em que começa o enrolamento das folhas. Uma grande

quantidade de calose é depositada nos tubos crivados do floema de pecíolos, hastes e tubérculos infectados (RAGSDALE; RADCLIFFE; DIFONZO, 2001).

2.2.1 Transmissão do PLRV

A transmissão do PLRV se dá principalmente por meio de afídeos vetores de maneira circulativa não propagativa sendo que, para a aquisição do vírus, este precisa ser ingerido pelo afídeo que se alimenta nos tecidos do floema infectado, o que exige um tempo maior para aquisição e transmissão do que o requerido por outros tipos de vírus (HEUVEL, 1991).

O tempo necessário para aquisição é variável, dependendo da estirpe do vírus, do inseto vetor e da planta hospedeira. Os dados existentes na literatura são variáveis, relatando um tempo mínimo de aquisição desde 2 minutos até 4 horas. No caso do *Myzus persicae*, este pode adquirir o PLRV de uma planta infectada num período muito curto, como dois minutos (ROBERT; BOURDIN, 2001).

Logo após a ingestão, o vírus é direcionado para o intestino do inseto, passando para a hemolinfa e, finalmente, para as glândulas salivares do vetor. Esse círculo é restrito, havendo uma especificidade antigênica da proteína capsidial do PLRV com células vesiculares do afídeo. Mesmo não ocorrendo replicação do vírus no vetor, há uma longa retenção da infectividade do PLRV pelo afídeo, explicado pela associação de uma região do genoma viral com uma proteína de bactérias endossimbióticas do vetor. Desta forma, ao passar pela hemolinfa do afídeo, a partícula viral acaba não sendo degradada (HEUVEL; VERBEEK; WILK, 1994; SOUZA DIAS; IMAUTI, 2005).

O período de latência, compreendido pelo tempo necessário para que o afídeo comece a transmitir o vírus, após a sua aquisição, também não é muito constante, podendo variar de um para outro vírus. Tanaka e Shiota (1970) encontraram um período de latência para o PLRV, em seu inseto vetor, variável

entre 12 e 54 horas. Esse período pode ser também influenciado pela temperatura, aumentando quando esta diminui. No entanto, Syller (1994), apesar de ter observado que o conteúdo de vírus em afídeos que se alimentaram a 27°C era menor que o daqueles que se alimentaram a 15°C, não notou nenhuma influência dessas temperaturas no período de latência do vírus.

Esta transmissão é influenciada por inúmeros fatores ambientais, principalmente a temperatura, que altera o comportamento destes afídeos durante a aquisição e a inoculação, além de interferir junto às plantas-fonte e às novas hospedeiras, influenciando assim a perpetuação do fitovírus (SALAS, 2004). A temperatura mais elevada de algumas regiões – Pariquera-Açu – Ubatuba, e as temperaturas mais baixas de outras regiões, como de Itararé, foram comparadas e avaliadas com vistas à possível exploração prática dessas evidências na menor eficiência de transmissão e mais lenta degenerescência da batata-semente (SOUZA-DIAS; COSTA; RAMOS, 1984).

Dentre as espécies de pulgões que transmitem os vírus da batata, as principais são: *Myzus persicae*, *Aulocorthum solani*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Rhopalosiphum padi*, *Aphis nasturtii* e *A. frangulae*. Sendo a espécie *M. persicae* a que possui maior eficiência para o vírus PLRV (SIGVALD, 1992; RAGSDALE; RADCLIFFE; DIFONZO, 2001; SOUZA DIAS; IAMAUTI, 2005).

Solanum tuberosum L. é considerado o principal hospedeiro deste vírus, porém outros hospedeiros, como *Solanum sarrachoides*, já foram citados na literatura como sendo também importantes para a disseminação do PLRV (THOMAS, 2002). Em trabalho de Souza Dias, Costa e Nardin (1993), as espécies *Solanum aculeatissimum*, *S. lycocarpum*, *S. paniculatum*, *S. variabile* e *S. erianthum* foram identificadas como hospedeiras alternativas do PLRV, com resultados positivos no teste ELISA em 18,8%, 34,6%, 25%, 27,7% e 20% das plantas testadas respectivamente.

A quantidade de luteovírus e a eficiência de transmissão do vírus pelo inseto aumentam com o período de aquisição (POWER; GRAY, 1995) até um tempo ótimo depois do qual a eficiência de transmissão se torna constante. Para o PLRV, esse período foi de 5 a 7 dias (SALAZAR, 1996).

2.3 Resistência da batata a viroses

A monocultura e o plantio durante o ano todo da batata ocasionam a perpetuação e disseminação de doenças, principalmente viróticas, empregando-se excessivamente o controle destas por meio de inseticida. Além deste fato, a baixa produtividade é ocasionada pela suscetibilidade das principais cultivares a doenças, dentre elas algumas viroses. As viroses, além de reduzir a produtividade, são responsáveis pela elevação dos custos de produção, já que os produtores se veem obrigados a renovar com frequência seu estoque de tubérculos-sementes.

Dentre as medidas de controle de viroses, a resistência genética é considerada uma das mais eficientes. Visando obter esta resistência, genes de genótipos silvestres podem ser utilizados em programas de melhoramento de longo prazo.

Várias formas de resistência a viroses têm sido descritas para a batata, tais como:

- a) Resistência à infecção ou resistência de campo: as plantas não se tornam facilmente infectadas em condições de cultivo (SALAZAR, 1982). Controlada por genes menores, exige que ambos os pais possuam, pelo menos, um nível intermediário de resistência, pois uma pronunciadamente baixa diminui consideravelmente o nível de resistência da progênie (ROSS, 1986);

- b) Resistência associada à tolerância: apesar da planta ser suscetível ao vírus, não se verifica queda significativa de produtividade (SALAZAR, 1982);
- c) Tolerância aos vetores: presença de tricomas nas folhas resultam em maior dificuldade na alimentação do inseto ou simplesmente a não alimentação, podendo levar à morte do inseto. Tais tricomas são encontrados em grande quantidade na superfície axial das folhas maduras nas espécies selvagens e em número reduzido nas variedades comerciais (SALAS, 2004);
- d) Resistência associada à hipersensibilidade: ocorre a morte rápida da célula hospedeira infectada, restringindo a disseminação da partícula viral na planta, conferindo à mesma proteção absoluta (HOOKER, 1981);
- e) Imunidade: o vírus não consegue se replicar na célula da planta, nem mesmo após a enxertia de uma planta imune em uma planta infectada, diferentemente da resistência associada à hipersensibilidade que mostra necrose na parte superior do enxerto. Não há alteração da proteção imune pela ação de fatores climáticos, como se observa nos outros tipos de resistência (SALAZAR, 1982). Dois importantes exemplos desta forma de resistência é a imunidade ao PVY e ao PVX, condicionadas pelos alelos $R_{y_{adg}}$ e R_{x_1} respectivamente.

No Brasil desenvolvem-se trabalhos de controle genético para as mais importantes viroses na cultura de batata. Todavia, dependendo do vírus em questão, torna-se uma tarefa difícil, devido ao controle desta herança possuir um caráter poligênico, como no caso do PLRV (ROSS, 1986).

Desta forma, visando identificar uma cultivar de batata resistente ao PLRV, foi realizado um estudo genético pelo *Centro Internacional de la Papa* (CIP), o qual identificou um acesso andígena denominado LOP-868, com altos níveis de resistência herdáveis para infecção ao vírus por afídeos virulíferos, combinado com baixa acumulação de vírus quando as plantas eram inoculadas via enxertia. Este acesso silvestre, cujo nome da cultivar é “Alca Tarma”, foi coletado sob número do CIP 702.853, na província de Huancane (Puno, Peru) a 3.850 metros. As progênies oriundas do LOP-868 carregam ou expressam níveis de resistência tão altos quanto os observados no LOP-868, sugerindo a presença de um gene com grande efeito no controle da resistência nesta espécie andígena. Também foi demonstrado que a resistência deste acesso poderia ser facilmente transferida para variedades comerciais, sem qualquer tipo de interação negativa (MIHOVILOVICH et al., 2007; VELÁSQUEZ; MIHOVILOVICH; BONIERBALE, 2007).

2.4 Estratégia de melhoramento visando resistência a doenças viróticas

De forma geral, os programas de melhoramento de batata buscam obter cultivares resistentes às principais doenças da cultura (LOPES; REIFSCHNEIDER, 1999). O cruzamento entre genótipos com bons níveis de resistência a doenças, seguido de um *screening*, é uma estratégia eficiente para reunir alelos de resistência a mais de um tipo de patógeno em uma mesma cultivar.

A batata é uma espécie autotetraploide, de herança tetrassômica, podendo apresentar, para cada loco gênico, cinco constituições genéticas diferentes em função do número de alelos dominantes: AAAA - quadriplex; AAAa - triplex; AAaa - duplex; Aaaa - simplex e aaaa - nuliplex. As reações de hipersensibilidade e imunidade são controladas por genes maiores que atuam na

condição simplex. Entretanto, o cruzamento com cultivares suscetíveis (nuliplex) produz apenas 50% de descendentes imunes. Por meio da estratégia desenvolvida no CIP, pode-se aumentar a frequência dos alelos para imunidade ao PVY e PVX, possibilitando, primeiramente, a identificação de genitores simplex imunes, e posteriormente, os genitores duplex. Do intercruzamento de clones duplex, pode-se obter genótipos imunes triplex e quadriplex (MIHOVILOVICH, 1996) que, quando cruzados com qualquer outro genótipo, geram 100% de indivíduos resistentes na descendência.

Procurando uma melhor utilização de todas as fontes de resistência, desenvolve-se no CIP uma estratégia de melhoramento populacional baseada na aplicação de ciclos de seleção recorrente com testes de progênie (MENDOZA, 1990).

Alguns fatores interferem neste processo, como a pobreza em características agronômicas e qualitativas, muitas vezes observadas em genótipos de alta resistência (JELLIS, 1992). Outro problema é o que acontece na seleção de clones resistentes ao PLRV, nos quais se observa interação entre este vírus e o PVY e PVX, pois, se eventualmente, um clone resistente ao PLRV for infectado por um destes vírus, o nível de resistência inicial diminui drasticamente (BRANDOLINI; CALIGARI; MENDONZA, 1992).

Silva, Pinto; Figueira (2000), visando obter genótipos imunes ao PVX e PVY, realizaram cruzamentos biparentais entre clones portadores dos genes Rx_1 e Ry na forma simplex, provenientes do CIP, no Peru, obtendo progênies clonais, que foram avaliadas quanto seu desempenho agronômico e resistência às viroses, por meio de inoculação mecânica e do teste sorológico DAS-ELISA. Dessa forma, foi possível identificar e selecionar clones imunes aos vírus X e Y, denominados OAS, com bom desempenho agronômico e boa qualidade para processamento.

Gadum, Pinto e Rios (2003) obtiveram clones a partir de cruzamentos biparentais entre clones imunes, da mesma forma que Silva et al. (2000), realizando cruzamentos entre clones imunes ao PVY e a cultivar Chiquita. O seu objetivo foi identificar as constituições genéticas destes clones para o loco Ry e selecionar clones duplex. Para isso, usou a inoculação mecânica do vírus e a detecção por meio do teste sorológico DAS-ELISA, além de testes com enxertia em plantas de tomate previamente infectadas. Entretanto, nesse trabalho não foi possível identificar os clones de constituição duplex, tendo a inoculação dos clones de batata e tomateiro se mostrado ineficaz na determinação da imunidade devido à baixa taxa de infecção pelo tomateiro, explicada pela temperatura elevada em que a planta foi infectada.

Ribeiro et al. (2006), trabalhando com enxertia de batata em plantas de tabaco infectadas com PVY, identificaram clones de batata imunes ao PVY e, por meio de marcador SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), clones duplex para o alelo Ry. Além do mais, os clones apresentaram alta produção e alto peso específico de tubérculos.

Em outro trabalho, Andrade et al. (2009), identificaram clones de batata triplex e quadriplex para o alelo Ry_{adg}, o qual confere resistência ao PVY, utilizando o marcador SCAR RYSC3. O desempenho agrônomico dos clones que continham o alelo Ry_{adg} foi superior às cultivares utilizadas como testemunhas.

Neder et al. (2010) selecionaram 20 clones de batata com alto desempenho agrônomico e resistentes à pinta preta (*Alternaria solani*) e ao PVY, contendo o alelo Ry_{adg}. Destes clones, apenas um foi identificado como portador do alelo Rx₁, denotando resistência ao PVX.

2.5 Resistência genética ao PLRV

A resistência ao PLRV é provavelmente controlada por genes menores, sendo, portanto, poligênica, expressa como uma resistência quantitativa e de baixa herdabilidade (ROSS, 1986). Assim, uma porcentagem muito pequena de progênies de um genitor resistente mostrará resistência de nível moderado.

Segundo Barker e Harrison (1985), tais desenvolvimentos de cultivares resistentes ao PLRV têm sido frustrados devido a um segundo fator: os genes que conferem resistência ao vírus são frequentemente ligados com caracteres indesejáveis, como formato irregular e tamanho pequeno de tubérculo e baixa produtividade.

Porém, herança controlada por um gene de efeito maior foi relatada para alguns tipos de resistência para este vírus. Brown e Thomas (1994) detectaram resistência ao PLRV em *Solanum chacoense* Bitter, o qual seguia herança monogênica dominante. Solomon-Blackburn et al. (2003) concluíram que a resistência à acumulação do vírus era controlada por um ou poucos genes maiores que não são complementares. Também Souza Dias (1988), estudando concentração do PLRV nas cultivares Kathadin e Maris Piper, observou restrição à replicação ou translocação viral como fator de resistência e controle a ser explorado.

Marczewski et al. (2001) foram os primeiros a detectar um QTL para resistência e acumulação do PLRV, revelando um QTL maior (PLRV.1), localizado no cromossomo XI. Este é considerado um “hot spot”, com resistência a vários patógenos (GEBHARDT; VALKONEN, 2001), sendo capaz de explicar mais de 50% da variação fenotípica para resistência ao PLRV. Além deste QTL, dois outros menores, PLRV.2 e PLRV.3, foram localizados respectivamente nos cromossomos VI e V.

Com a inoculação de materiais diáplóides, Marczewski et al. (2004) também identificaram um QTL principal que confere resistência à acumulação do PLRV.

Um gene de efeito maior ou região genômica que controla resistência ao PLRV parece controlar um único mecanismo de resistência à infecção e acúmulo deste vírus na fonte de resistência LOP-868, que possui este gene na condição duplex com segregação cromatídica. Este gene, $R_{I_{adg}}$, foi mapeado no braço curto do cromossomo V, em trabalho realizado por Velásquez, Mihovilovich e Bonierbale (2007). Em outras cultivares andígenas, como HUA-332, foi verificado que, mesmo na forma simplex, este gene é capaz de conferir resistência (MIHOVILOVICH et al., 2014).

Em outro experimento, Mihovilovich et al. (2013) desenvolveram um marcador SCAR, denominado RGASC850 (*Resistance gene analog* derivado do SCAR). Este pode ser usado de forma eficiente para identificação do gene $R_{I_{adg}}$, com baixa probabilidade de identificação de falsos positivos.

De qualquer forma, mesmo com tais relatos, até o momento não foram identificados materiais adaptados com genes maiores de resistência extrema e que possam ser utilizados comercialmente.

A característica de resistência à infecção pelo PLRV tem sido estimada por meio de experimentos utilizando-se a exposição de genótipos em campo, sendo, portanto, demorada, dispendiosa e, muitas vezes, imprecisa, não fornecendo muita informação sobre os mecanismos de resistência envolvidos (SOLOMON-BLACKBURN; BARKER, 1993). Desta forma, ensaios de infecção de campo precisam ser replicados ao longo de várias gerações para alcançar resultados confiáveis. Por outro lado, inoculação controlada é trabalhosa, além de estar relacionada à criação de falsos resultados, acarretando escapes.

A seleção assistida por marcador pode melhorar significativamente e acelerar esse processo, podendo a seleção ser feita precocemente, diminuindo os custos em geral de um processo de seleção fenotípica. Além do mais, com o auxílio dos marcadores moleculares, pode-se eliminar certos aspectos indesejáveis da seleção puramente fenotípica, melhorando a eficiência do processo, uma vez que os marcadores não são influenciados pelo ambiente e são transmitidos mendelianamente. Porém, mesmo com toda eficiência que o marcador proporciona, este não garante uma eficiência absoluta, devendo ser visto com certa cautela.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia, no Laboratório de Genética Molecular e em casa de vegetação do Departamento de Biologia, ambos os departamentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Além destes, também foi conduzido um experimento de campo na área experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), na fazenda experimental de Lambari, MG.

3.2 Material experimental

Foram avaliados 220 clones de batata oriundos de seis famílias, denominadas OGC, obtidas por cruzamentos biparentais de materiais do Programa de Genética e Melhoramento da Batata (PROBATATA) da Universidade Federal de Lavras, com o clone LOP-868 (CIP 702853), resistente ao PLRV (Tabela 1).

Tabela 1 Genealogia e número de clones obtidos do cruzamento LOP-868 com clones da UFLA

Família	Clones Genitores	Número de Clones
OGC 1	LOP-868 x OAS 1-21	15
OGC 2	LOP-868 x JUG 2-20	23
OGC 3	LOP-868 x OAS 2-22	4
OGC 4	LOP-868 x CBM 16-16	19
OGC 5	LOP-868 x CMA 370	62

OGC 6	LOP-868 x CMA 57	97
-------	------------------	----

Os clones do programa utilizados neste trabalho foram escolhidos de acordo com as características apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Características dos clones utilizados nos cruzamentos

Clone	Característica
OAS 1-21 e OAS 2-22	Resistência ao PVY (GADUM; PINTO; RIOS, 2003); além de apresentar boa produtividade, elevado teor de matéria seca, tubérculos com película e cor da polpa amarela, “olhos” superficiais e formato oblongo e adaptado às condições do sul de Minas Gerais (SILVA; PINTO; FIGUEIRA, 2000).
JUG 2-20	Genótipo duplex para o alelo Ryadg, pode ser utilizado com intuito de produzir aproximadamente 80% de progênies imunes ao PVY, apresentando razoável porcentagem de tubérculos graúdos, além de alta produção e peso específico de tubérculos (GADUM et al., 2003; RIBEIRO et al., 2006). Segundo Moreira (2014), apresenta ainda resistência ao PVX (comunicação pessoal ¹)
CBM 16-16	Tolerante ao calor, apresentando alto potencial produtivo e alto peso específico de tubérculos (MENEZES; PINTO; LAMBERT, 2001).
CMA 370 e CMA 57	Fonte de resistência ao PVY, sendo também promissores para serem usados em programas de melhoramento de batata, visando à obtenção de materiais com resistência múltipla a doenças e caracteres agrônômicos desejáveis (ANDRADE et al., 2009).

¹Informação fornecida por Carolina Mariane Moreira, em janeiro de 2014.

3.3 Inoculação com afídeos virulíferos

Para avaliar a reação ao PLRV dos clones experimentais, foram realizadas inoculações por meio de afídeos virulíferos (*Myzus persicae*).

3.3.1 Criação e manutenção de *M. persicae*

Os pulgões *M. persicae* foram criados em plantas de *Datura stramonium* L. em casa de vegetação com temperatura e luminosidade naturais. Adultos ápteros foram retirados das folhas e transferidos com o auxílio de um pincel fino para placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo folhas de *D. stramonium* L., fixadas em 1 cm de agar-agar a 1%. Cada placa foi vedada com filme PVC perfurado, permitindo a aeração, identificadas e mantidas em câmara climatizada a 25 ± 2 °C, com umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

3.3.2 Período de acesso à aquisição do vírus

Foram plantados tubérculos sabidamente contaminados com o PLRV, avaliados previamente pelo teste DAS-ELISA, em vasos de 5 L. Estes foram mantidos em casa de vegetação e, quando atingiram aproximadamente 30 dias após a emergência, serviram de fonte de alimentação para pulgões sadios. Pulgões foram colocados em contato com tais plantas por 96 horas, coletando-se estes das folhas de *D. stramonium* L. por meio de pincel e encaminhando-os até a parte adaxial da folha das plantas de batata, para o período de acesso à aquisição (PAA). Tal procedimento foi realizado sob temperatura variando entre 20 e 25 °C e umidade relativa do ar entre 65 e 90%.

3.3.3 Período de acesso à inoculação do vírus

Os clones experimentais foram plantados em vasos plásticos de 0,5 L com substrato comercial e, assim que atingiram entre 15 à 20 cm de altura, foram inoculados com 50 afídeos virulíferos no estado de ninfa, caracterizando

uma pressão alta de afídeos (CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA, CIP, 2010). Foram inoculadas duas plantas de cada clone (duas repetições).

Os pulgões foram colocados em contato com cada planta por 96 horas, para o período de acesso à inoculação (PAI), coletando-se os afídeos das folhas de cada planta fonte de inóculo com o auxílio de pincel e encaminhando-os até a parte adaxial das folhas das plantas dos clones. Visando evitar a quebra do estilete do pulgão no momento da captura deste na folha, inicialmente era feito um leve contato no afídeo com o pincel para que este locomovesse, realizando-se logo em seguida a captura propriamente dita. Este procedimento também foi realizado em casa de vegetação, sob gaiolas com tela antiafídica, com temperatura variando entre 20 e 25 °C e umidade relativa do ar entre 65 e 90%. Passado este período, fez-se a contagem visual do número de pulgões na parte abaxial de cada folha da planta, obtendo o total de pulgões por planta. Em seguida, os pulgões foram eliminados com a aplicação de inseticida. Como pôde ser observado, este processo exigiu grande esforço, sendo o trabalho em equipe essencial para cumprir esta etapa.

Após duas e três semanas da retirada dos pulgões, foram coletadas de três a quatro folhas jovens de cada planta a fim de se realizar o teste sorológico DAS-ELISA (CLARK; ADAMS, 1977), empregando-se antissoros policlonais da AGDIA para a diagnose do PLRV.

Os tampões utilizados no DAS-ELISA foram: tampão de cobertura (carbonato e bicarbonato 0,025 M, pH 9,6, contendo 0,02 g L de azida sódica); tampão de extração do vírus (Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,8% de NaCl, 2% de PVP, 0,02% de KCl e 0,02% de azida sódica); tampão do conjugado (Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,8% de NaCl, 2% de PVP, 0,2% de BSA, 0,02% de MgCl₂, 0,02% de KCl, 0,02% de azida sódica, 0,05% de Tween – 20); tampão do substrato (dietanolamina, pH 9,8) e tampão de lavagem (solução salina

tamponada – PBS, contendo 0,05% de Tween – 20). As diluições dos antissoros seguiram as instruções do fabricante.

Foram utilizadas as microplacas padrão de poliestireno com 96 orifícios. As leituras foram realizadas entre 30 e 60 minutos após a adição final do substrato, a 405 nm no espectrofotômetro MRX (Dynatech). Foram consideradas positivas amostras cujas absorbâncias foram iguais ou superiores a duas vezes a média da absorbância do controle sadio.

Como testemunhas suscetíveis, foram utilizadas as cultivares Ágata, Caesar, Markies e Perricholi e como resistente o LOP-868.

3.4 Detecção da presença do alelo Rl_{adg}

Em torno de 20 a 30 dias após o plantio, foram coletadas folhas jovens das plantas para extração de DNA.

3.4.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA, utilizou-se o método descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998) com modificações. Coletou-se 180 mg de folhas de cada planta, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido, juntando-se ao macerado 730 μ L do tampão de extração (0,2 g de brometo de centiltrimetilamônio – CTAB; 1 mL de Tris 1 M; 0,4 mL de EDTA 0,5 M; 0,82 g de NaCl; 0,1 g de polivinilpirrolidona 40.000; 8,6 mL de água pura) previamente adicionado de 2- β -mercaptoetanol na proporção de 2%. Em seguida, o macerado foi mantido em banho-maria, a 65 °C por 60 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. Passado esse período, foram adicionados 600 μ L da solução 24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico, seguindo para a centrifugação do material por 8 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e adicionado 400 μ L de isopropanol frio. Esse preparado foi, então, mantido no freezer de um dia para o

outro para precipitação do DNA. Em seguida, foi centrifugado por 7 minutos a 12.000 rpm para a formação de um pellet. O sobrenadante foi descartado e o pellet submetido a duas lavagens, uma com 1 mL de etanol 70% e outra em etanol absoluto, intercalando-se com centrifugações por 5 minutos a 12.000 rpm. Eliminado o etanol, na última lavagem, o pellet foi deixado para secar e realizou-se sua diluição com 50 µL de TE (Tris 1 mM e EDTA 0,1 mM; pH 8,0). O DNA extraído foi quantificado comparando-se com padrões de DNA Low Mass Ladder, nas concentrações de 40, 80 e 100 ng/µL, por meio de eletroforese em gel de agarose em TBE (tris, ácido bórico e EDTA) sob uma corrente de 120 V. Posteriormente, o DNA foi diluído com TE para concentração de 10 ng/µL, que foi utilizado nas análises de PCR.

3.4.2 Reação de PCR

Para um volume total de 25 µL, cada reação de PCR continha: 5,0 µL de 5X Buffer Colorless GoTaq; 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM); 1,0 µL de dNTP (10 mM); 0,75 µL de cada *primer*; 0,125 da enzima Go Taq DNA polimerase flexi; 0,25 µL do DNA genômico e 15,625 µL de água ultrapura.

Foi utilizado o par de *primers* SCAR, designado por RGASC850, que produz fragmento de 850 pb, característico do gene *Rl_{adg}*, do qual as sequências são PLOOP-F1.2 (5' GAATGCCAGGAATGGGAAAGACTACTTT 3') e LR.R1 (5' TCACATCCAAGCAAAACCAA 3'), desenvolvidos por Mihovilovich et al., 2014.

As reações de amplificação foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, utilizando termociclador. O seguinte programa foi utilizado para a reação de PCR: 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto para desnaturação, anelamento do *primer* a 46 °C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 1 minuto a 72 °C.

Os produtos obtidos dessa reação de amplificação do DNA foram então analisados em gel de agarose a 0,7% corado com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain*.

Como testemunha suscetível foi utilizada a cultivar Perricholi e, como testemunha resistente, o LOP-868.

3.5 Avaliação agronômica dos clones

O ensaio de campo foi instalado na área experimental da EPAMIG, em Lambari, MG, no período de outubro de 2013 à janeiro de 2014. Lambari situa-se a 21°58' de latitude sul e 45°22' de longitude oeste, com altitude média de 845 m e clima tropical de altitude, com precipitação anual de 1.642 mm e temperatura média anual de 20,8 °C. O solo do experimento caracteriza-se como Latossolo vermelho-escuro distrófico.

Devido à pequena quantidade disponível de tubérculos de alguns clones, empregou-se o delineamento de blocos aumentados (FEDERER, 1956) com 134 clones como tratamentos regulares, distribuídos em oito blocos com 24 tratamentos cada. Os tubérculos utilizados de cada clone foram selecionados com diâmetros variando entre 2 e 4 cm, sendo tratados com bissulfureto de carbono na dosagem de 25 ml/m³ por 72 horas para induzir a brotação. Os tratamentos comuns utilizados foram as cultivares Cupido, Voyager, Caesar e o clone CBM 16-16. Cada parcela consistia de uma linha de cinco plantas espaçadas de 0,35 m e entre linhas de 0,75 m.

No plantio foi realizada adubação com a formulação 4-14-8 (N, P₂O₅ e K₂O), na dosagem de 3,0 t/ha e inseticida de solo (aldicarb) na dosagem de 10,0 kg/ha. Por volta dos 40 dias após o plantio, foi feita a adubação de cobertura, com 300 kg/ha de sulfato de amônio e 160 kg/ha de cloreto de potássio, seguida a amontoa. Os tratos fitossanitários foram realizados durante a condução do

experimento, visando mantê-lo sem a competição de plantas invasoras e danos de pragas e doenças conforme padrão do plantio comercial na região.

Os seguintes caracteres agronômicos foram avaliados:

- a) produção total de tubérculos por planta (g/planta);
- b) peso específico dos tubérculos, obtido pela fórmula: PE = peso ar (peso ar - peso água), sendo os pesos no ar e na água determinados em balança hidrostática.
- c) nota de aparência geral de tubérculos, variando de 1 (má aparência) a 5 (ótima aparência), levando em consideração formato, aspereza da pele e profundidade de olhos ou gemas, sendo as notas tomadas por três avaliadores.
- d) formato de tubérculo, avaliado por notas individuais, atribuindo 1 (formato redondo), 2 (formato redondo-oval), 3 (formato oval), 4 (formato oval-alongado) e 5 (formato alongado), sendo as notas tomadas por três avaliadores.

3.5.1 Modelo estatístico

Os dados oriundos da avaliação agronômica dos clones foram submetidos a análise de variância para cada caráter separadamente, usando o modelo de blocos aumentados (FEDERER, 1956).

$$Y_{ij} = \mu + t_{i'} + t_{i(j)} + b_j + e_{(ij)} \text{ em que:}$$

Y_{ij} : é a observação do i -ésimo tratamento regular ou i' -ésimo tratamento comum no j -ésimo bloco;

μ : é o efeito fixo da média geral do ensaio;

$t_{i'}$: é o efeito fixo do i' -ésimo tratamento comum ($i' = 1, 2, 3$);

$t_{i(j)}$: é o efeito aleatório do i -ésimo tratamento regular ($i = 1, 2, \dots, 65$) dentro do j -ésimo bloco;

b_j : é o efeito aleatório do j -ésimo bloco incompleto ($j = 1, 2, \dots, 7$);

$e_{(ij)}$: é o efeito aleatório do erro experimental do i -ésimo tratamento regular ou i' -ésimo tratamento comum dentro do j -ésimo bloco, assumindo-se que os erros são independentes e normalmente distribuídos com média zero e variância σ^2 .

A análise de variância foi realizada por meio do procedimento “mixed”, do pacote estatístico “*Statistical Analysis System*” (SAS).

Os valores das médias dos tratamentos regulares e comuns foram analisados pelo teste de Scott e Knott, apenas para as características produção total de tubérculos e peso específico dos tubérculos, utilizando o programa computacional R.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação do PLRV por meio de afídeos virulíferos

A frequência do número de pulgões por planta é apresentada na Figura 1. O número médio foi de 77,3 pulgões planta⁻¹. Do total de plantas avaliadas, 82,3% apresentaram média de pulgões planta⁻¹ acima de 50, o que pode ser considerado como uma alta pressão de inóculo (CIP, 2010).

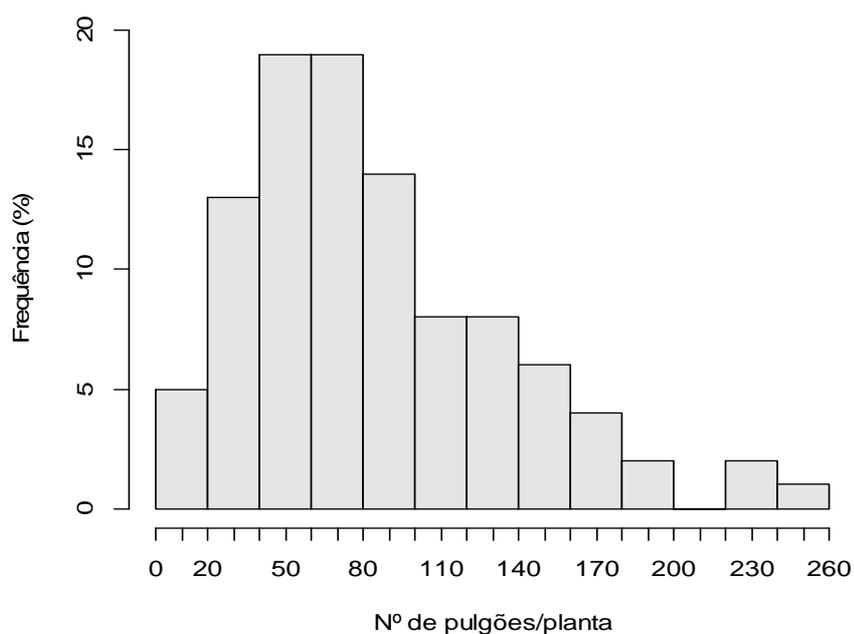


Figura 1 Frequência (%) do número de pulgões por planta

Os resultados do teste sorológico demonstraram que as testemunhas suscetíveis Ágata, Caesar, Markies e Perricholi foram positivos, enquanto que o LOP-868 apresentou resultados negativos. As cultivares Perricholi e LOP-868

têm sido usadas como testemunhas para avaliação de resistência ao PLRV devido à ausência ou presença do alelo $R_{I_{adg}}$ respectivamente (VELÁZQUES; MIHOVILOVICH; BONIERBALE, 2007; MIHOVILOVICH et al., 2014).

Dos clones experimentais avaliados, 49,3% apresentaram resultados negativos no teste sorológico DAS-ELISA aos 30 e 40 dias após a inoculação (DAI), podendo este ser um indicativo que esses clones possuem nível de resistência ao PLRV. Certos clones não foram avaliados aos 40 DAI, pois as respectivas plantas morreram antes da avaliação neste período. Desta forma, estas não foram consideradas como possíveis resistentes. Outros trabalhos como os de Velásquez, Mihovilovich e Bonierbale (2007) e Mihovilovich et al. (2013), que empregaram a inoculação de PLRV por meio de afídeos virulíferos, adotaram o teste sorológico DAS-ELISA apenas aos 40 DAI, tempo suficiente para que o teste detecte com precisão a presença ou ausência do PLRV na planta em questão.

Beekman (1987) afirma que a resistência à infecção é altamente dependente da pressão de inóculo, o qual depende dos níveis da população de afídeos vetores. No presente trabalho, das plantas com resultados negativos aos 30 e 40 DAI, 77,7% apresentaram mais de 50 pulgões planta⁻¹ e, das plantas com resultados positivos aos 30 e 40 DAI, 81,4% apresentaram mais de 50 pulgões planta⁻¹. Desta forma, a pressão de inóculo foi adequada para a maioria dos tratamentos, sendo a aplicação de 50 afídeos virulíferos planta⁻¹ ideal para a infecção, pois, sob esta pressão, 100% das cultivares suscetíveis inoculadas tornaram-se infectadas. Segundo Mihovilovich et al. (2007), foi possível definir diferenças nos níveis de resistência de tratamentos de acordo com a aplicação de diferentes pressões de pulgões, sendo a aplicação de 50 afídeos por planta considerada adequada. Ainda segundo estes autores, uma pressão de afídeos por planta além de 50 pode resultar mais dano por praga à infecção de vírus.

Neste trabalho, foi avaliada apenas a reação ao PLRV por meio de inoculação com afídeos virulíferos, o qual não fornece informações suficientes para inferir sobre resistência à acumulação do PLRV nas plantas, resistência ao movimento do vírus da folhagem aos tubérculos e resistência indireta por meio da não-preferência do pulgão ou antixenose (BARKER; HARRISON, 1985; SOUZA DIAS, 1988).

4.2 Identificação do alelo Rl_{adg}

A avaliação das plantas com o marcador RGASC850 (MIHOVILOVICH et al., 2014) permitiu a identificação do alelo Rl_{adg} . Na Figura 2, são apresentadas duas cultivares andígenas, LOP-868 e Perricholi, com reação ao PLRV conhecidas e 14 clones com a banda de 850 pb que identifica a resistência devida ao alelo Rl_{adg} . A cultivar LOP-868 é resistente ao PLRV e apresenta a banda, como verificado por Mihovilovich et al. (2013), enquanto que a cultivar Perricholi é suscetível ao PLRV, não apresentando a referida banda.

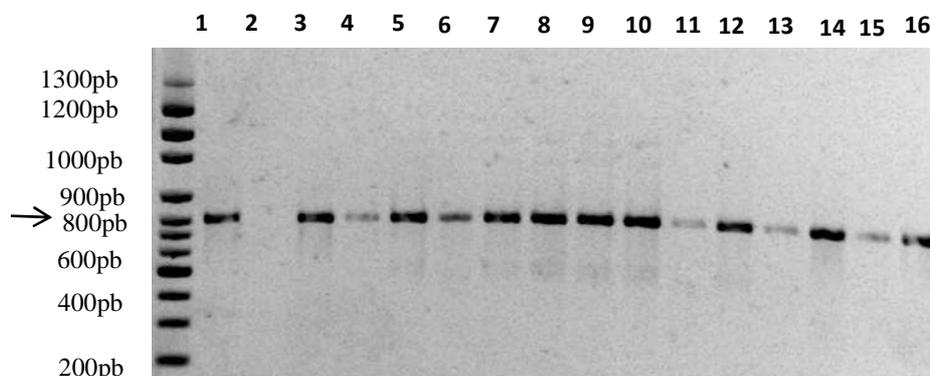


Figura 2 Presença ou ausência de bandas (indicadas pela seta) amplificadas pelo par de *primers* RGASC850 por meio de PCR, nos controles LOP-868 (1) resistente e Perricholi (2) suscetível e nos clones resistentes OGC 1-02 (3), OGC 1-12 (4), OGC 2-18 (5), OGC 2-26 (6), OGC 5-07 (7), OGC 5-51 (8), OGC 5-79 (9), OGC 6-44 (10), OGC 6-45 (11), OGC 6-46 (12), OGC 6-52 (13), OGC 6-69 (14), OGC 6-89(15), OGC 6-105 (16), UFLA, 2013

Do total de clones OGC avaliados por meio do marcador molecular RGASC850, 31% apresentaram a referida banda (presença do alelo RI_{adg}) e 69% não a apresentaram (ausência do alelo RI_{adg}).

Possivelmente, problema na amplificação do *primer* foi o principal responsável por revelar apenas 31% dos clones contendo a banda de 850 pb. Devido ao genitor LOP-868 possuir o alelo RI_{adg} na condição duplex (MIHOVILOVICH et al., 2014), era de se esperar aproximadamente 83% das progênies contendo o referido alelo.

Outra possível razão de discrepância no aparecimento de bandas foi devido às modificações da metodologia de amplificação do *primer* de Mihovilovich et al. (2013), que utilizaram temperatura de anelamento diferente

do presente trabalho. Enquanto que Mihovilovich et al. (2013) trabalharam por 30 segundos com temperatura de anelamento decrescendo de 60 para 45 °C por 0,5 °C a cada ciclo, seguido de etapa final de anelamento de 45 °C por 30 segundos, o presente trabalho utilizou uma temperatura de anelamento constante nos 35 ciclos de 46 °C durante 1 minuto.

Dos clones avaliados tanto pelo marcador RGASC850 quanto pela inoculação do PLRV por meio de afídeos virulíferos, observou-se que 22,2% apresentaram a banda e possível resistência ao PLRV aos 30 e 40 DAI, ou seja, resultado negativo no teste DAS-ELISA, enquanto que 29% não apresentaram a banda e tiveram resultado positivo no teste sorológico. Ambos os resultados eram esperados, visto que na presença ou ausência do alelo Rl_{adg} é esperada a ausência ou presença do PLRV respectivamente.

Em torno de 40,3% dos clones não apresentaram a banda e possível resistência ao PLRV aos 30 e 40 DAI. Esses resultados mostram que, apesar do número de pulgões planta⁻¹ ter sido adequado, a inoculação com o PLRV não deve ter sido eficaz, pois ocorreram escapes. Tal fato se deve principalmente às poucas plantas por clone testadas, o que constituiu pequeno número de repetições (BASTOS, 1997). Além do mais, em trabalho publicado por Chuquillanqui e Jones (1980), a técnica de transferência de pulgão de plantas fonte de inóculo para o tratamento por meio de pincel acarreta em perturbar os pulgões e/ou leva à fadiga do operador. No presente trabalho, foram manipulados cerca de 4.000 pulgões à cada inoculação realizada (totalizando 17.000 pulgões), o que pode ter contribuído para o cansaço do operador. Uma técnica visando evitar a fadiga seria aprimorar a tecnologia de inoculação com técnicas mais eficazes de coleta, manipulando grande número de afídeos por meio da tecnologia da acetona (SOUZA-DIAS; COSTA; NARDIN, 1993).

Além de escapes, estes clones denotados como possíveis resistentes pela inoculação, porém com ausência da banda, podem ser considerados como falsos

positivos devido à recombinação. Esta hipótese não deve ser descartada, pois mesmo que o marcador esteja à 1,2 cM do gene de resistência Rl_{adg} , existe uma pequena probabilidade de permuta entre o gene de resistência e o marcador. Este foi o caso de alguns tratamentos identificados como possíveis falsos positivos do trabalho de Mihovilovich et al. (2013), no qual utilizaram o marcador RGASC850 ligado ao gene Rl_{adg} . Estes resultados revelam que o marcador molecular no melhoramento ou seleção de caracteres deve ser visto com certa precaução.

Existe ainda a possibilidade do surgimento das chamadas “bandas fantasmas”, ou seja, casos em que surgem bandas, porém não há a presença do alelo Rl_{adg} . Provavelmente, este foi o caso de 8,5% dos clones que apresentaram resultados positivos no teste DAS-ELISA e ocorreu a presença da banda. Tal fato pode vir a ser explicado pela temperatura de anelamento do *primer* que está relacionada à temperatura de desnaturação (T_m) em que a molécula do DNA irá se dissociar e se tornar um fita simples. A T_m depende da composição de bases do *primer*, a qual aumenta tanto com o comprimento quanto com o aumento do teor de bases de guanina (G) e citosina (C) do *primer*.

Uma fórmula simples para o cálculo da T_m é: $T_m = 4x (G + C) + 2x (A + T) ^\circ C$. No presente trabalho, a T_m foi entre 56 e 80 $^\circ C$, contendo entre 40 a 43% de bases G + C. Portanto, as temperaturas de anelamento estimadas ideais para formar banda específica são entre 46 a 51 $^\circ C$. Apesar de ter sido usada essa temperatura mínima, ainda há possibilidade de surgir banda fantasma devido à grande diferença de composição dos *primers*. Também é importante que esses tenham T_m similares, não sendo maior que 2 a 3 $^\circ C$ (APTE; DANIEL, 2003). No estudo em questão, esta diferença foi de 24 $^\circ C$. Além do mais, a T_m é influenciada pelas concentrações de Mg^{2+} , a qual influencia na atividade enzimática. Neste trabalho, a concentração de $MgCl_2$ foi alta, 25 mM, o que

pode ter ajudado a aumentar a ligação não específica do iniciador e aumentar a não especificidade da reação.

Ainda em relação ao trabalho de Mihovilovich et al. (2013), a T_m e a concentração de bases GC's observadas foram as mesmas que no presente trabalho, visto que os *primers* utilizados em ambos os experimentos foram iguais. Porém, estes autores utilizaram concentração de $MgCl_2$ menor. Desta forma, existe uma maior probabilidade da concentração de Mg^{2+} ter influenciado no aparecimento de bandas fantasmas neste estudo quando comparado à T_m e à concentração de GC. Portanto, para uso de marcador, é importante otimizar as condições de reação para minimizar o surgimento de bandas fantasmas. Provavelmente será necessário encontrar a maior temperatura de anelamento do *primer* associado à menor concentração de $MgCl_2$.

Outra explicação seria problemas na detecção do PLRV pelo teste DAS-ELISA, podendo resultar em falsos positivos ou falsos negativos. Tratando-se de vírus de baixa concentração na planta, como no caso do PLRV (família *Luteoviridae*), resultados inconstantes são descritos na literatura (GUEDES, 1999). Tal fato pode ser explicado por diferenças na quantidade do antígeno e de desenvolvimento de cada planta. No trabalho de Figueira, Domier e D'arcy, (1997), comparando três técnicas de detecção do *Barley Yellow Dwarf Virus* – PAV-IL (família *Luteoviridae*), esse autores concluíram que resultados do teste DAS-ELISA em plantas de cevada eram variáveis, especialmente quando diferentes coberturas e/ou preparações de anticorpos conjugados eram usados.

Mihovilovich et al. (2013) também encontraram resultados inesperados no estudo, como a observação da presença de banda homomórfica ao marcador SCAR RGASC850 em uma cultivar altamente suscetível, Flor Blanca. Ainda segundo esses autores, a comprovação deste fato não é algo surpreendente, visto que existe uma alta frequência de regiões genômicas RGA no genoma da batata, além de sequências homólogas (BAKKER et al., 2011). Sendo assim, a presença

de bandas homomórficas também merece atenção nos clones do presente trabalho, avaliados como possíveis suscetíveis pela inoculação e que apresentaram a banda.

A construção de outro marcador SCAR flanqueando o alelo RI_{adg} seria interessante para o presente estudo. Desta forma, seria possível aumentar a eficiência com o uso deste novo marcador, simultaneamente com o RGASC850. Esta construção poderia ser baseada no marcador AFLP P12M43. 167, localizado no braço curto do cromossomo V a 10 cM do alelo RI_{adg} (VELÁSQUEZ; MIHOVILOVICH; BONIERBALE, 2007).

4.3 Desempenho agrônômico

O resumo das análises de variância para produção total de tubérculos por planta, peso específico de tubérculos, formato e aparência de tubérculos são apresentados na Tabela 3.

Os coeficientes de variação experimental (CV) foram altos para a produção total de tubérculos e formato de tubérculos (Tabela 3). Nas fases iniciais dos programas de melhoramento, a baixa precisão experimental é mais notada devido à pequena disponibilidade de batata-semente, impossibilitando a obtenção de um número adequado de repetições e tamanho da parcela, aliada à necessidade de avaliação de um grande número de clones (BROWN, 1987). Outro fator que pode ter acarretado maior valor de CV foi o tamanho desuniforme dos tubérculos utilizados como semente, podendo afetar no desenvolvimento e produtividade dos clones. Além do mais, a temperatura média durante a condução do experimento em campo foi muito elevada, em torno de 23,10 °C (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, INMET, 2014), o que pode ter contribuído para CV alto. É difícil estimar uma temperatura ideal para a bataticultura, porém segundo Haverkort e Verhagen

(2008) as temperaturas médias diárias entre 5 e 21 °C são consideradas as mais favoráveis.

Tabela 3 Resumo das análises de variância para as características produção total de tubérculos por planta, peso específico, formato e aparência geral de tubérculos, avaliados em Lambari, MG, 2013-2014

FV	GL	Prod. total/planta (g x planta ⁻¹)	QM		
			Peso específico (x10 ⁻⁴)	Formato	Aparência
Bloco	7	9042,30	1,14	0,55	0,48
Genótipos	137	28987,64	1,06*	0,67	0,27
Trat. Comuns (TC)	3	257144,00**	1,92*	0,99	0,16
Trat. Regulares (TR)	133	23815,00	1,03*	0,32	0,25
TR vs. TC	1	1760361,80**	2,13	46,24**	3,79**
Errointerbloco	22	32479,00	0,51	0,50	0,24
R²		0,89	0,93	0,89	0,90
Média		265,73	1,0514	2,17	2,69
CV (%)		67,82	0,68	32,46	18,06

** e *: significativo aos níveis de 1% e 5% de probabilidade respectivamente pelo teste F.

As distribuições de números de clones para os caracteres: produção total de tubérculos, peso específico, formato e aparência de tubérculos estão apresentados na Figura 3.

A amplitude de variação para produção total de tubérculos foi entre -6,9 à 1.156,0 g/planta (Figura 3). A média dos clones foi baixa (217,1 g/planta), sendo que cerca de 10% da população de clones apresentaram média acima de 400 g/planta (Tabela 4). A baixa produção total de tubérculos dos clones se deve à cultivar andígena LOP-868, utilizada como genitor nas seis famílias clonais, que apresenta certos caracteres indesejáveis, como baixa produtividade (BARKER; HARRISON, 1985). Além do mais, os demais genitores não apresentam caracteres agrônômicos tão bons quando comparados às testemunhas. A média elevada da temperatura durante a permanência do

experimento em campo também não favoreceu a produção de tubérculos. Menezes, Pinto e Lambert (2001) mostraram produção de batata reduzida em 25,5% em condições de alta temperatura, devido ao atraso no início da tuberização e redução na partição dos fotoassimilados para os tubérculos. Neste trabalho, provavelmente a testemunha CBM 16-16 tenha se destacado dos demais tratamentos (Tabela 4) por apresentar tolerância ao calor (MENEZES; PINTO; LAMBERT, 2001).

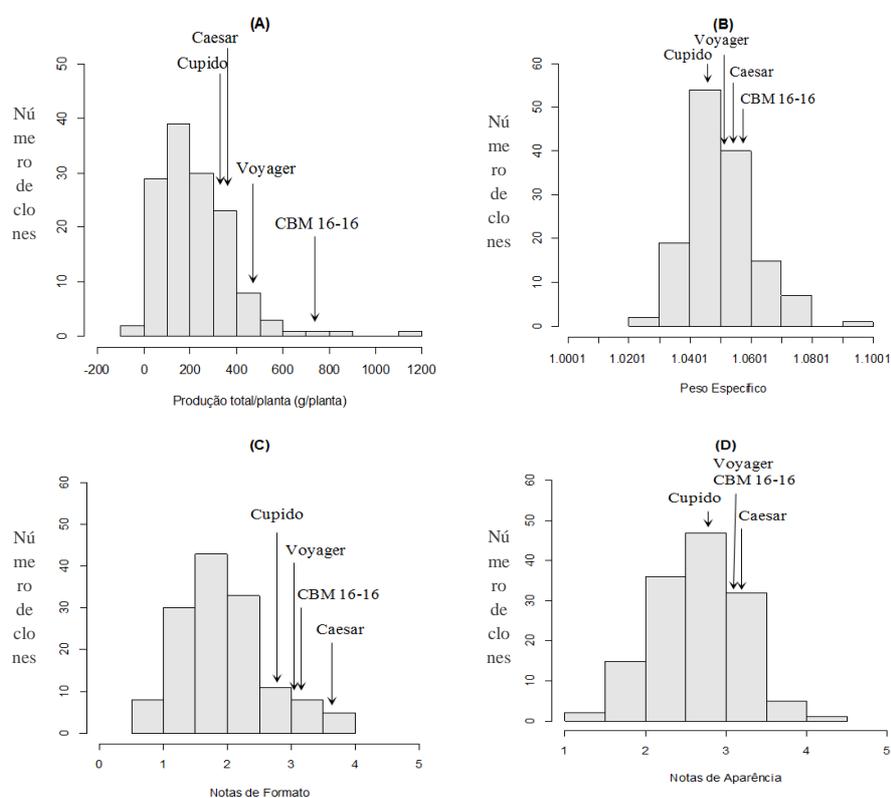


Figura 3 Distribuição de 134 clones experimentais e quatro testemunhas para produção total de tubérculos (A), peso específico dos tubérculos (B), formato dos tubérculos (C) e aparência geral dos tubérculos (D)

O peso específico é altamente correlacionado com o teor de amido e matéria seca do tubérculo, influenciando na absorção de óleo. Para esta característica, a variação dos tratamentos foi de 1,0260 a 1,0920 (Figura 3). Somente para peso específico de tubérculos os tratamentos regulares diferiram significativamente, indicando haver variabilidade genética para este caráter (Tabela 3). A média geral dos clones para este caráter foi baixa (1, 0509) em relação aos valores desejados para qualidade de tubérculos (Tabela 4). Também houve diferença significativa entre os tratamentos comuns para este caráter, sendo CBM 16-16 e Caesar superiores aos demais controles (Tabela 4). Provavelmente a testemunha CBM 16-16 apresentou maior peso específico de tubérculos que os demais controles por apresentar tolerância ao calor (MENEZES, PINTO; LAMBERT, 2001).

Tabela 4 Médias estimadas dos 134 clones experimentais e das testemunhas para produção total de tubérculos por planta, peso específico, formato e aparência geral de tubérculos, avaliados em Lambari, MG, 2013-2014

	Prod. total/planta ** (g x planta⁻¹)	Peso esp. *	Formato	Aparência
Clones	217,1	1,0509	1,9	2,6
CBM 16-16	724,7 a	1,0592 a	3,2	3,1
Caesar	359,8 b	1,0560 a	3,7	3,1
Cupido	330,8 b	1,0478 b	2,9	2,8
Voyager	462,0 b	1,0525 b	3,1	3,1

** e *: Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott aos níveis de 1% e 5% respectivamente.

Quanto às notas de formato, a amplitude de variação foi de 0,7 a 3,8 (Figura 3). A média dos clones foi 1,9 (Tabela 4), a qual denota tubérculos redondo-ovais, diferente das testemunhas que apresentaram média de notas 3,2, ou seja, tubérculos ovais. Tubérculos redondo-ovais é uma característica herdada

do genitor LOP-868 (*S. tuberosum* ssp. *andigena*), o qual apresenta formato irregular (BARKER; HARRISON, 1985).

A variação dos tratamentos para aparência de tubérculos foi entre 1,2 a 4,3 (Figura 3), sendo a média dos clones para esta característica igual à 2,6 (Tabela 4). De fato o experimento mostrou que a aparência de tubérculos foi prejudicada pelas altas temperaturas. De modo geral, os clones não apresentaram boas notas neste caráter e os tubérculos foram de pequeno tamanho e em grande número, características herdadas do LOP-868 (andígena), devido à ligação do gene que confere resistência ao PLRV a estes caracteres indesejáveis (BARKER; HARRISON, 1985).

Dos clones testados com o marcador molecular RGASC850 e avaliados em campo, 48 (40%) apresentaram o alelo $R_{I_{adg}}$. As respectivas médias ajustadas para os caracteres: produção total de tubérculos, peso específico de tubérculos, formato e aparência de tubérculos estão apresentadas na Tabela 5.

Alguns dos clones que apresentaram o alelo $R_{I_{adg}}$ avaliados em campo merecem destaque, como é o caso do clone OGC 6-45 que apresentou produção total de tubérculos por planta igual a 495,3 g/planta; além de obter nota igual a 3,1 para aparência geral de tubérculos. Quanto ao peso específico de tubérculos, o clone OGC 6-16 apresentou valor significativamente superior a todos os demais tratamentos (1,0916). Para este último caráter, os clones OGC 2-18, OGC 5-46 e OGC 5-75 também merecem destaque por apresentarem valores significativamente superiores aos demais clones, com exceção do clone OGC 6-16. Para aparência geral de tubérculo, os clones OGC 6-68, OGC 5-80, OGC 6-104, OGC 6-34, OGC 1-02, OGC 6-44, OGC 6-20 e OGC 5-79 apresentaram notas superiores em relação aos demais clones (Tabela 5).

Tabela 5 Médias ajustadas de 48 clones que apresentam o alelo Rl_{adg} para produção total de tubérculos, peso específico de tubérculos, notas de formato e de aparência de tubérculos, avaliados em Lambari, MG, 2013-2014

Clone	Produção total/planta (g x planta ⁻¹)	Peso Específico	Formato	Aparência
OGC 1-02	174,3	1,0420 h	1,1	3,1
OGC 1-05	81,8	1,0467 g	3,3	2,1
OGC 1-10	141,8	1,0443 g	3,3	1,8
OGC 1-12	314,3	1,0473 g	1,4	2,3
OGC 1-22	64,3	1,0381 h	0,7	2,4
OGC 2-01	174,3	1,0414 h	2,0	2,3
OGC 2-11	36,8	1,0642 e	2,0	2,8
OGC 2-14	111,8	1,0394 h	1,8	2,1
OGC 2-16	349,3	1,0551 f	2,3	2,6
OGC 2-18	216,8	1,0792 b	2,3	3,0
OGC 2-26	308,1	1,0477 g	1,4	2,9
OGC 4-02	291,5	1,0508 g	1,4	2,4
OGC 4-16	253,1	1,0510 g	2,0	2,2
OGC 5-02	210,2	1,0410 h	1,3	1,9
OGC 5-07	332,5	1,0589 f	1,6	3,1
OGC 5-11	95,0	1,0478 g	3,1	2,6
OGC 5-22	136,4	1,0554 f	2,0	2,7
OGC 5-37	336,4	1,0487 g	2,0	2,4
OGC 5-46	182,5	1,0780 b	1,1	1,9
OGC 5-51	82,5	1,0426 h	2,1	2,4
OGC 5-58	141,5	1,0455 g	2,4	1,9
OGC 5-69	121,5	1,0372 h	2,7	2,9
OGC 5-72	291,5	1,0521 g	2,7	2,9
OGC 5-74	19,8	1,0743 c	1,6	2,2
OGC 5-75	52,5	1,0767 b	2,1	2,3
OGC 5-79	114,4	1,0304 i	2,3	3,1
OGC 5-80	18,1	1,0534 g	1,6	3,4
OGC 5-82	-6,9	1,0510 g	2,0	2,4
OGC 6-13	448,7	1,0676 d	1,9	2,8
OGC 6-16	82,5	1,0916 a	1,7	2,1
OGC 6-20	261,5	1,0389 h	2,4	3,1
OGC 6-24	307,5	1,0494 g	2,1	1,9
OGC 6-33	151,6	1,0654 e	1,3	2,6
OGC 6-34	289,4	1,0432 h	1,8	3,1
OGC 6-39	23,7	1,0725 c	1,6	2,6

“Tabela 5, conclusão”

Clone	Produção total/planta (g x planta ⁻¹)	Peso Específico	Formato	Aparência
OGC 6-43	216,4	1,0427 h	2,0	1,9
OGC 6-44	351,5	1,0422 h	2,1	3,1
OGC 6-45	495,3	1,0611 e	2,0	3,1
OGC 6-46	270,3	1,0588 f	3,5	3,2
OGC 6-52	145,0	1,0673 d	1,1	2,6
OGC 6-68	332,5	1,0503 g	2,1	3,6
OGC 6-69	270,3	1,0551 f	1,7	3,2
OGC 6-82	185,2	1,0367 h	2,3	2,2
OGC 6-89	315,3	1,0430 h	3,7	2,6
OGC 6-104	285,2	1,0265 i	2,3	3,4
OGC 6-105	161,2	1,0407 h	2,9	2,8
OGC 6-107	252,7	1,0406 h	2,4	2,9
OGC 6-119	165,8	1,0689 d	2,1	2,6

* Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott (P<0,05)

Assim, os clones OGC 6-45, OGC 6-16, OGC 2-18, OGC 5-46, OGC 5-75, OGC 6-68, OGC 5-80, OGC 6-104, OGC 6-34, OGC 1-02, OGC 6-44, OGC 6-20 e OGC 5-79, por apresentarem o alelo RI_{adg} e característica(s) interessante(s) ao melhoramento de batata, poderão ser usados em futuros programas, visando, principalmente, o aproveitamento destes como genitores doadores ou não recorrentes em programas de retrocruzamentos. Desta forma, serão necessários vários retrocruzamentos para *S. tuberosum* para recuperar os atributos de interesse.

Visto que alguns dos genitores dos clones experimentais possuem os alelos Ry_{adg} e Rx₁ que conferem resistência extrema ao *Potato virus Y* (PVY) e *Potato virus X* (PVX), respectivamente, novos testes deverão ser realizados nestes clones a fim de comprovar a presença destes alelos, agregando resistência múltipla a viroses.

O número de clones contendo o alelo RI_{adg} foi grande (78). Assim, visando aproveitá-los melhor, em trabalho futuro seria interessante avaliá-los em condições mais favoráveis para então realizar a seleção dos que se destacarem.

5 CONCLUSÕES

A inoculação de clones por meio de afídeos virulíferos com PLRV é trabalhosa e demanda grande período de tempo, além de não ser eficaz para a comprovação de resistência ou suscetibilidade dos clones. A fim de obter confirmação de resistência ou suscetibilidade, seria necessário realizar maior número de repetições de inoculações.

É possível transferir o alelo Rl_{adg} de resistência ao PLRV do LOP-868 para *Solanum tuberosum*.

Foram identificados clones contendo o alelo Rl_{adg} por meio do marcador molecular SCAR RGASC850 e que deverão ser utilizados em retrocruzamentos com a espécie *Solanum tuberosum*.

A média dos clones para produção total de tubérculos, peso específico de tubérculos e notas de formato e aparência geral de tubérculos foram baixas, devido principalmente ao genitor não adaptado LOP-868 (cultivar andígena). Outra razão para isso foi as altas temperaturas registradas durante a condução do experimento no campo.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. M. et al. Potato clones triplex for the *Ry_{adg}* allele conferring resistance to *Potato virus Y* (PVY). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 9, n. 4, p. 286-292, Dec. 2009.
- APTE, A.; DANIEL, S. **PCR primer design**. 2nd ed. Cold Spring Harbor: CSHL, 2003. (Adapted from PCR Primer: a laboratory manual).
- BAKKER, E. et al. A genome wide genetic map of NB-LRR disease resistance loci in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 123, n. 3, p 493-508, Aug. 2011.
- BARKER, H.; HARRISON, B.D. Restricted multiplication of potato leafroll virus in resistance potato genotypes. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 107, n. 2, p. 205–212, Oct. 1985.
- BASTOS, C. **Resistencia en clones de germoplasma de papa (*Solanum sp.*) al PLRV, PVS y APMV**. 1997. 43 p. Thesis (Ingeniero Agrónomo) - Universidad Nacional del Centro del Perú Huancayo, Lima, 1997.
- BEEKMAN, A. G. B. Breeding for resistance. In: BOKX J. A.; WANT, J. P. H. van der. **Viruses of potatoes and seed-potato production**. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1987. p. 162–170.
- BERGER, P.; GERMAN, T. Biotechnology and resistance to potato viruses. In: LOEBENSTEIN, G. et al. **Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes**. Dordrecht: Klumer Academic, 2001. p. 341-363.
- BRANDOLINI, A.; CALIGARI, P. D. S.; MENDONZA, H. A. Combining resistance to potato leafroll virus (PLRV) with immunity to potato viruses X and Y (PVX and PVY). **Euphytica**, Wageningen, v. 61, n. 1, p. 37-42, Apr. 1992.
- BROWN, C. R.; THOMAS, P. E. Resistance to potato leafroll virus derived from *Solanum chacoense*: characterization and inheritance. **Euphytica**, Wageningen, v. 74, n. 1-2, p. 51-57, 1993/1994.

BROWN, J. A. A comparison between single plant plots and five plants plot for the initial selection stage of potato breeding programme. **Euphytica**, Wageningen, v. 36, n. 3, p. 711-718, Jan. 1987.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. **Procedimientos para pruebas de evaluaciones estándar de clones avanzados de papa**: guía para cooperadores internacionales. Lima, 2010. 96 p.

CHUQUILLANQUI, C.; JONES, R. A. C. A rapid technique for assessing the resistance of families of potato seedlings to potato leaf roll virus. **Potato Research**, Wageningen, v. 23, n. 1, p. 121-128, Mar. 1980.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method for enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 34, n. 3, p. 475-483, Mar. 1977.

COSTA, C. L. Variações sazonais da migração de *Myzus persicae* em Campinas nos anos de 1967-1969. **Bragantia**, Campinas, v. 29, n. 32, p. 347-360, nov. 1970.

CUPERTINO, F. P.; COSTA, A. S. Avaliação das perdas causadas por vírus na produção da batata. **Bragantia**, Campinas, v. 29, n. 31, p. 337-345, out. 1970.

DANIELS, J. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Rio Grande do Sul. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3-4, p. 269-270, 1995.

DANIELS, J.; PEREIRA, A. S. Resistência de genótipos de batata ao vírus do enrolamento da folha da batata (PLRV) e ao vírus Y (PVY). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 521-524, jul./set. 2004.

FEDERER, W. T. Augmented (orthonuiaku) designs. **Hawaiian Planters Record**, Aiea, v. 55, p. 191-208, 1956.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEN, 1998. 220 p.

FIGUEIRA, A. R.; DOMIER, L. L.; D'ARCY, C. J. Comparison of techniques for detection of barley yellow dwarf virus-PAV-IL. **Plant Disease**, Ames, v. 81, n. 11, p. 1236-1240, Nov. 1997.

FIGUEIRA, A. R. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no estado de Minas Gerais: histórico do problema e soluções. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3-4, p. 268-269, 1995.

FIGUEIRA, A. R. Viroses da batata: situação atual e perspectivas futuras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 97, p. 86-96, mar./abr. 1999.

FREITAS, D. M. S. et al. First report of tomato chlorosis virus in potato in Brazil. **Plant Disease**, Ames, v. 96, n. 4, p. 593, Apr. 2012.

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

GALLOTTI, G. J. M.; HIRANO, E.; BERTOCINI, O. Virose da batata: principais causas de degenerescência. **Agropecuário Catarinense**, Canoinhas, v. 5, n. 4, p. 47-48, dez. 1992.

GEBHARDT, C.; VALKONEN, J. P. T. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 79-102, Sept. 2001.

GUEDES, M. V. **Eficiência na detecção dos vírus PLRV, PVX e PVY em tecidos vegetais de gema apical dormente mais estolão, brotos e folhas da batata, pelo método sorológico Enzyme-linked immunosorbent assay-elisa**. 1999. 52 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

HAVERKORT, A. J.; VERHAGEN, A. Climate change and its repercussions for the potato supply chain. **Potato Research**, Wageningen, v. 51, n. 3-4, p. 223-237, Oct. 2008.

HEUVEL, J. F. J. M. van den. **Acquisition and transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae* quantitative aspects**. Wageningen: Virologie, 1991. 107 p.

HEUVEL, J. F. J. M. van den et al. M. Localization of potato leafroll virus in leaves of secondarily-infected potato plants. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 101, n. 5, p. 567-571, Feb. 1995.

HEUVEL, J. F. J. M. van den; VERBEEK, M.; WILK, F. van der. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. **Journal of General Virology**, London, v. 75, n.10, p. 2559-2565, Oct. 1994.

HOOKE, W. J. **Compendium of potato diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1981. 125 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Dados meteorológicos**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

JEFFRIES, C. S. **Technical guidelines for the safe movement of germplasm**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations /International Plant Genetics Resources Institute, 1998. n. 19, 177 p.

JELLIS, G. J. Multiple resistance to diseases and pests in potatoes. **Euphytica**, Wageningen, v. 63, n. 1-2, p. 51-58, Jan. 1992.

LOPES, C. A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Manejo integrado das doenças da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 56-71, mar./abr. 1999.

LOWERY, D. T.; BOITEAU, G. Effects of five insecticides on the probing, walking, and settling behavior of the green peach aphid and the buckthorn aphid (Homoptera: Aphididae) on potato. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v. 81, n. 1, p. 208-214, Feb. 1988.

MALLOZI, P. R. Certificação de batata semente em relação às viroses. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 453-455, 1982.

MARCZEWSKI, W. et al. A major quantitative trait locus for resistance to *Potato leafroll virus* is located in a resistance hotspot of potato chromosome XI and is tightly linked to N-gene-like markers. **Molecular Plant Microbe Interact**, St. Paul, v. 14, n. 12, p.1420-1425, Dec. 2001.

MARCZEWSKI, W. et al. Two allelic or tightly linked genetic factors at the PLRV.4 locus on potato chromosome XI control to resistance to *Potato leafroll virus* is located virus accumulation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, n. 8, p. 1604-1609, Nov. 2004.

MENDOZA, H. A. Mejoramiento de papa para resistencia a los virus Y, X, así como el enrollamiento de las hojas: estrategia de investigación para procedimientos de selección. In: HIDALGO, O. A.; RINCON, H. **Avances em el mejoramiento genético de la papa em los Países del ConoSur**. Lima, Peru: CIP, 1990. p. 133-147.

MENEZES, C. B.; PINTO, C. A. B. P.; LAMBERT, E. S. Combining ability of potato genotypes for cool and warm season in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 2, p. 145-157, June 2001.

MIHOVILOVICH, E. J. Combatiendo las enfermedades de la papa: desarrollo de clones parentales inmunes a los virus X y Y de la papa. In: HOOKER, W. J. **Compendio de enfermedades de la papa**. Lima: Centro Internacional de la Papa, 1996. v. 22, n. 2, p. 6-9.

MIHOVILOVICH, E. J. et al. An RGA-derived SCAR marker linked to PLRV resistance from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 32, n. 1, p. 117-128, Feb. 2014.

MIHOVILOVICH, E. J. et al. High levels of heritable resistance to *Potato leafroll virus* (PLRV) in *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. 3, p. 1091-1103, May/June 2007.

NEDER, D. G. et al. Seleção de clones de batata com resistência múltipla à pinta preta e aos vírus X e Y. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1702-1708, ago. 2010.

PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 567 p.

POWER, A. G.; GRAY, S. M. Aphid transmission of barley yellow dwarf viruses: interactions between viruses, vectors and host plants. In: D'ARCY, C. J.; BURNETT, P. A. **Barley yellow dwarf 40 years of progress**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1995. p. 259-289.

RAGSDALE, D. W.; RADCLIFFE, E. B.; DIFONZO, C. D. Epidemiology and field control of PVY and PLRV. In: LOEBENSTEIN, G. et al. **Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes**. Dordrecht: Klumer Academic, 2001. p. 237-270.

RESENDE, L. M. A.; MASCARENHAS, M. H. T.; PAIVA, B. M. Aspectos econômicos da produção e comercialização da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 9-19, mar./abr. 1999 .

RIBEIRO, A. M. et al. SCAR marker for the selection of Ry-duplex potato clones immune to potato virus Y. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 6, n.1, p. 1-8, mar. 2006.

ROBERT, Y.; BOURDIN, D. Transmission of viruses. In: LOEBENSTEIN, G. et al. **Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes**. Dordrecht: Klumer Academic, 2001. p. 195-225.

ROSS, H. **Potato breeding**: problems and perspectives. Berlin: Paul Parey Verlag, 1986. 132 p.

SALAS, F. J. S. **Comportamento de *Myzus persicae* (sulzer) (Hemiptera: Aphididae) e transmissão de estirpes de Potato virus Y(PVY) em diferentes cultivares de batata**. 2004. p. 119-130. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004.

SALAZAR, L. F. **Enfermedades virosas de la papa**. Lima: Centro Internacional de la Papa, 1982. 111 p.

SALAZAR, L. F. **Potato virus e sandtheir control**. Lima: InternationalPotato Center, 1996. 214 p.

SILVA, O. A.; PINTO, C.A.B.P.; FIGUEIRA, A.R. Identificação de clones de batata imunes aos vírus X (PVX) e Y (PVY), adaptados à região Sul de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 26, n. 4, p. 385-390, out./dez. 2000.

SOLOMON-BLACKBURN, R. M.; BARKER, H. Resistance to potato leafroll luteovirus can be greatly improved by combining two independent types of heritable resistance. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 329-336, Apr. 1993.

SOLOMON-BLACKBURN, R. M. et al. Evidence that resistance to potato leafroll virus accumulation in tetraploid *Solanum tuberosum* L. is controlled by one or few major genes that are not complementary. **Potato Research**, Wageningen, v. 46, n. 3-4, p. 137-145, Sept. 2003.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; NARDIN, A. M. Potato leafroll virus in solanaceous weeds in Brazil explains severe outbreaks of the disease in absence of known potato donor sources. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 80-85, 1993.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; RAMOS, V. J. Enrolamento da folha é também praticamente o único fator de degenerescência da batata-semente no período 1980 – 84 na estação experimental de Itararé – SP. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 2, p. 405, 1984.

SOUZA DIAS, J. A. C.; IAMAUTI, M. T. Doenças da batateira (*Solanum tuberosum* L.). In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 119-142.

SOUZA DIAS, J. A. C. **The relationship of potato leafroll virus concentration in the host and vector to disease spread**. 1988. 678 p. Ph.D. (Phitopatology) – University of Wisconsin, Madison, 1988.

SOUZA DIAS, J. A. C. Víroses da batata e a tecnologia do “broto/batata-semente”. Novo sistema de produção de batata-semente livre de vírus e outros patógenos. **Revista Agrogeo ambiental**, v. 1, n. 1, p. 105-113, Apr. 2009.

SOUZA-DIAS, J. A. C. et al. Voo perverso: crescem evidências de que mosca branca podem ser vetoras de importantes vírus como PLRV, na cultura da batata. **Cultivar H. F.**, v. 10, p. 21-23, 2011.

SYLLER, J. The effects of temperature on the availability and acquisition of potato leaf roll luteovirus by *Myzus persicae*. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 125, p. 141-145, 1994.

TANAKA, S.; SHIOTA, H. Latent period of potato leafroll virus in the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer). **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 36, p. 106-111, 1970.

THOMAS, P. E. First report of *Solanum sarrachoides* (Hairy Nightshade) as an important host of potato leafroll virus. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 86, n. 5, p. 559, May 2002.

ZAAG, D. E. van der. Yield reduction in relation to virus infection. *In*: BOKX, J. A. **Viruses of potatoes and seed-potato production**. Pudoc: Wageningen, 1987. p. 146–150.

VELÁSQUEZ, A. C.; MIHOVILOVICH, E.; BONIERBALE, M. Genetic characterization and mapping of major gene resistance to potato leafroll virus in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 6, p. 1051-1058, Apr. 2007.

WETTER, C. **Description of plant viruses**: Potato virus S. Surrey. London: Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists, 1971. 60 p.

YUKI, V. A. Afídeos vetores de vírus da batata. **Correio Agrícola Bayer**, São Paulo, n. 3, p. 460-463, 1982.