

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**Identificação e dosagem alélica de marcadores
moleculares associados a resistência ao vírus PVY em
batata.**

Raquel Bartz Kneib

Pelotas, 2014

Raquel Bartz Kneib

**Identificação e dosagem alélica de marcadores
moleculares associados a resistência ao vírus Y em batata.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientadora: Dr^a Caroline Marques Castro – Embrapa Clima Temperado

Co-Orientador: Dr. Arione da Silva Pereira – Embrapa Clima Temperado

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

K68i Kneib, Raquel Bartz

Identificação e dosagem alélica de marcadores
moleculares associados a resistência ao vírus Y em batata. /
Raquel Bartz Kneib ; Caroline Marques Castro, orientadora ;
Arione da Silva Pereira, coorientador. — Pelotas, 2014.
45 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,
Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Dosagem alélica. 2. SCAR. 3. Vírus Y. 4. Solanum
tuberosum. I. Castro, Caroline Marques, orient. II. Pereira,
Arione da Silva, coorient. III. Título.

CDD : 633.491

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora:

Dr^a. Caroline Marques Castro – Embrapa Clima Temperado (presidente)

Dr. Antonio Costa de Oliveira – Departamento de Fitotecnia - FAEM/UFPeI

Dr. Luciano Carlos da Maia - Departamento de Fitotecnia - FAEM/UFPeI

Dr. Sandro Bonow - Embrapa Clima Temperado

A Deus
À minha família

Dedico

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com inúmeras colaborações, por isso não posso deixar de agradecer a todos aqueles que me apoiaram e de alguma forma contribuíram para a concretização deste projeto.

Agradeço a Deus, pela proteção, durante esta caminhada sempre dando forças para nunca desistir.

A minha família que é base de tudo. Meus pais, Rui e Vivânia pelo exemplo de vida, apoio e incentivo.

À minha orientadora Caroline Castro, pela confiança na realização deste trabalho. Pela amizade, incentivo e conhecimento transmitido meu muito obrigado.

Ao meu co-orientador Arione da Silva Pereira pelos ensinamentos transmitidos e auxílio para que tudo ocorresse da melhor forma possível.

À Embrapa Clima Temperado pela oportunidade e infraestrutura disponibilizada ao desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos durante o período de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas pelas disciplinas e oportunidade da realização do curso.

Aos professores que contribuíram para minha formação.

Ao professor Luciano Maia pelos ensinamentos e auxílio nos programas estatísticos.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Biologia Molecular e Recursos Genético da Embrapa Clima Temperado pelos momentos vividos e pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

A equipe de apoio ao programa de melhoramento da batata, pela amizade e pela colaboração prestada.

A todos os colegas e amigos do Fitomelhoramento pelo apoio.

Aos meus irmãos Ricardo e Roberta, pelo incentivo e apoio durante essa etapa da minha formação.

Ao meu noivo, Marcio pela compreensão.

As minhas amigas Sabrina Farias, Médelin Marques, Mariane Schüller e Tamara Felipim, pelos agradáveis momentos de convivência e amizade. Agradeço a Deus por ter amigas tão especiais.

Aos meus familiares, avós, tios e tias, primos e primas, pelo incentivo.

Enfim, a todos que de uma maneira ou outra contribuíram para a realização deste trabalho muito obrigada.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”

Winston Churchill

Resumo

KNEIB, Raquel Bartz. **Identificação e dosagem alélica de marcadores moleculares associados a resistência ao vírus Y em batata**. 2014. 45f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A batata é o terceiro principal alimento produzido no mundo, e é um dos cultivos mais promissores para suprimir a fome em países em desenvolvimento. Cerca de 40 viroses infectam a cultura da batata, entre estas, o *Potato virus Y* (PVY) é, atualmente, o que causa maior impacto negativo na cultura. O PVY é transmitido de diversas formas, todas com controle e manejo deficitários, tornando a resistência genética a medida de controle mais eficaz. Esta resistência é controlada pelos genes *Ry* encontrados em espécies silvestres de batata. Marcadores do tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), os quais amplificam a região que contém o gene *Ry*, foram desenvolvidos e estão disponíveis para uso pelos programas de melhoramento de batata. Este trabalho foi realizado com o objetivo de aumentar a eficiência dos programas de melhoramento de batata em relação à resistência ao PVY fazendo uso da seleção assistida por marcadores moleculares. A dissertação foi dividida em dois capítulos. No primeiro, visando estimar a dosagem alélica do gene *Ry* e selecionar clones com múltiplas cópias do gene *Ry* para serem usados como genitores no programa de melhoramento de batata, foram genotipadas sete famílias clonais, envolvendo cinco genitores com resistência ao PVY, utilizando os marcadores SCAR RYSC3 e M45. Para o gene *Ry_{adg}*, com base no marcador RYSC 3, dos cinco genitores resistentes ao PVY avaliados, quatro, C1883-22-97, C2372-02-02, C2388-01-02, e MB9846-1, são simplex, e o genitor C2389-01-02 é duplex. Para o gene *Ry_{sto}*, com base no marcador M45, dois genitores, C2388-01-02 e MB9846-1, são simplex, e o genitor C2389-01-02 é duplex. Para os genitores C1883-22-97 e C2372-02-02, as frequências observadas de presença do gene *Ry_{sto}*, nas progêneses avaliadas, não se adequaram estatisticamente a nenhuma das constituições genóticas propostas. No segundo capítulo, com objetivo de identificar germoplasma de batata com resistência extrema ao vírus Y associada aos componentes da aparência e do rendimento de tubérculos, além verificar as associações entre esses caracteres, foram avaliados clones portadores do gene *Ry*, oriundos de oito combinações genéticas distintas. As combinações genéticas C2389-01-02 x Asterix, e, BRS Ana x C1883-22-97, mostraram maior potencial para serem exploradas visando agregar a resistência ao vírus Y aos caracteres desejáveis de rendimento e de aparência de tubérculo. O grau de correlação entre caracteres indica fortíssima e direta associação entre aparência geral e aspereza de tubérculo; forte e direta associação da intensidade da cor de película com aspereza e aparência geral de tubérculo, entre número e massa média de tubérculo, entre massa média e cor da película, e entre massa total e número total de tubérculos; e forte e inversa associação de formato com cor da polpa, cor da película e massa média de tubérculos. Os resultados encontrados no nosso estudo mostraram que os marcadores moleculares RYSC3 e M45 são uma importante ferramenta para ser usada pelos programas de melhoramento de batata visando acelerar o processo de desenvolvimento de cultivares com resistência ao PVY.

Palavras chave: dosagem alélica; SCAR; vírus Y; *Solanum tuberosum*.

Abstract

KNEIB, Raquel Bartz. **Identification and allelic dosage of molecular markers linked to resistance to potato virus Y**. 2014. 45f. Master's thesis – Graduate Program of Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas – Brazil

Potato is the third main food crop in the world, and is one of the most promising crop to suppress hunger in developing countries. From the 40 viruses which infect potato growing fields, Potato virus Y (PVY) is currently considered the most important one. PVY is transmitted by several ways, all of them with limited control, begin genetic resistance the main way to control this important disease controlled by *Ry* genes. Molecular markers, which amplify the region containing *Ry* gene have been developed and are available to be used by potato breeding. This work was developed with the aim of increasing the efficiency of potato breeding programs for resistance to PVY making use of molecular assisted selection. The dissertation is divided into two chapters. In the first chapter, in order to estimate allelic dosage of *Ry* genes in clones used as genitors in the breeding program, progenies from seven families were genotyped with the markers RYSC3 and M45. For *Ry_{adg}* gene, based on the marker RYSC, from the five PVY resistant parents analysed, four are simplex, C1883-22-97, C2372-02-02, C2388-01-02 and MB9846-1, and one is duplex, C2389-01-02. For *Ry_{sto}* gene, based on the marker M45, both parents, C2388-01-02 and MB9846-1, are simplex, and the parent C2389-01-02 is duplex. For the C1883-22-97 and C2372-02-02, it was not possible to estimate the allelic dosage of the *Ry_{sto}* gene. In the second chapter, in order to identify germplasm with extreme resistance to PVY associated to desirable agronomic traits, clones carrying the *Ry* gene, belonging from eight different genetic combinations, were evaluated for caracteres related to tuber appearance and yield. The genetic combinations C2389-01-02 x Asterix and BRS Ana x C1883-22-97 showed good potential to be exploited in order to add resistance to virus Y to traits related to yield and tuber appearance. The correlation between traits indicates very strong and direct association between tuber general appearance and roughness of tuber; strong and direct association of the intensity of the periderm color and tuber general appearance; between number of tubers per plant and average tuber weight; between average tuber weight and intensity of the periderm color and between the total mass of tubers per plant and total number of tubers per plant. Also, strong and inverse associations between tuber shape and flesh color and between periderm color and average tuber weight were detected. The results of our study showed that the molecular markers RYSC3 and M45 are important tools to be used by potato breeding programs to accelerate the development of cultivars with resistance to PVY.

Keywords: allelic dosage; SCAR; PVY; *Solanum tuberosum*

Lista de figuras

CAPÍTULO I – Dosagem alélica do gene de resistência ao PVY utilizando marcadores moleculares RYSC3 e M45.

Figura 1	Perfil molecular dos genitores e testemunhas para os marcadores RYSC3 (Gel 1) e M45 (Gel 2) em gel de agarose 1%.....	22
-----------------	---	----

CAPÍTULO II – Avaliação de clones de batata com resistência ao vírus Y quanto a caracteres de interesse agrônômico.

Figura 1	Dispersão dos 213 clones, pertencentes a oito famílias clonais de batata pela análise de componentes principais com base em sete variáveis relacionadas com os componentes de aparência do tubérculo e três relacionadas com rendimento.....	32
-----------------	--	----

Lista de tabelas

CAPÍTULO I – Dosagem alélica do gene de resistência ao PVY utilizando marcadores moleculares RYSC3 e M45.

Tabela 1	Identificação das famílias clonais avaliadas.....	19
Tabela 2	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para genotipagem das progênes.....	20
Tabela 3	Número total de genótipos analisados por família, número de genótipos com presença (+) ou ausência (-) da banda de 321pb para o marcador SCAR RYSC3 e da banda de 500pb para o marcador SCAR M45 e percentual de clones com a presença dos genes <i>Ry_{adg}</i> e <i>Ry_{sto}</i> por família.....	22
Tabela 4	Valores de significância do teste χ^2 para as constituições genéticas nuliplex (ryryryry), simplex (Ryryryry), duplex (RyRyryry), triplex (RyRyRyry) e quadriplex (RyRyRyRy) na avaliação de sete famílias clonais de batata para o gene <i>Ry_{adg}</i>	24
Tabela 5	Valores de significância do teste χ^2 para as constituições genéticas nuliplex (ryryryry), simplex (Ryryryry), duplex (RyRyryry), triplex (RyRyRyry) e quadriplex (RyRyRyRy) na avaliação de sete famílias clonais de batata para o gene <i>Ry_{sto}</i>	25

CAPÍTULO II – Avaliação de clones de batata com resistência ao vírus Y quanto a caracteres de interesse agrônômico.

Tabela 1	Genealogia das oito famílias que originaram os clones com resistência ao PVY avaliados neste estudo e número de clones avaliados/família.....	30
Tabela 2	Escore obtidos na análise de componentes principais para sete caracteres de aparência de tubérculo e três de rendimento.....	33
Tabela 3	Coeficientes de correlação fenotípica entre caracteres da primeira geração clonal para componentes de aparência e rendimento de tubérculos com base nas avaliações de 216 clones de batata.....	34

Sumário

1. Introdução geral.....	12
2. CAPÍTULO I - Dosagem alélica do gene de resistência ao PVY utilizando marcadores moleculares RYSC3 e M45.	16
2.1 Introdução	16
2.2 Material e Métodos.....	19
2.3 Resultados e Discussão	22
2.4 Conclusões.....	27
3. CAPÍTULO II - Avaliação de clones de batata com resistência ao vírus Y quanto a caracteres de interesse agrônômico	28
3.1 Introdução	28
3.2 Material e Métodos.....	30
3.3 Resultados e Discussão	32
3.4 Conclusões.....	37
4. Considerações Finais.....	38
Referências	39

1. Introdução geral

A batata (*Solanum tuberosum* L.) pertence à família Solanaceae, gênero *Solanum*, que contém mais de 2.000 espécies, das quais 200 e 20 são conhecidas e cultivadas, respectivamente (FORTES; PEREIRA, 2003). A espécie tetraploide *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* é a mais importante e apresenta adaptação para dias longos sendo cultivada em regiões de climas tropicais e subtropicais (BISOGNIN, 2003).

De acordo com IBGE (2014) a área cultivada com batata no Brasil foi de aproximadamente 128 mil hectares com produção de 3,5 milhões de toneladas, correspondente a menos de 1% da produção mundial que é em torno de 360 milhões de toneladas. A China é o principal produtor mundial de batata, seguida de Rússia, Índia, Ucrânia e Estados Unidos, enquanto que o Brasil ocupa a 20ª colocação (FAOSTAT, 2014).

Atualmente, a batata é o terceiro principal alimento produzido no mundo, sendo superado apenas pelo arroz e pelo trigo, e é um dos cultivos mais promissores para suprimir a fome em países em desenvolvimento. Isso se deve a suas qualidades nutricionais, sendo fonte de carboidratos, vitaminas, fibras entre outros, aliado ao elevado potencial produtivo (TÖFOLI et al., 2013).

Espécies silvestres de batata ocorrem exclusivamente nas Américas, desde o sudeste dos Estados Unidos até o centro da Argentina e Chile, esta amplitude de ambientes em que ocorrem sugere que estes recursos sejam importantes fontes de resistência a estresses abióticos e bióticos (CASTRO, 2008). No processo de domesticação da batata, foram selecionadas plantas com menores teores de glicoalcalóides, pois conferiam sabor amargo e toxidez em determinadas concentrações, porém estes compostos funcionam como mecanismo de defesa da planta contra ação de insetos e microrganismos (MACHADO; TOLEDO, 2004; SIMMONDS, 1995).

Entre os patógenos que causam doenças na cultura da batata, os principais são o fungo *Phytophthora infestans*, agente causal da requeima, e as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Streptomyces scabies* causadoras da murcha bacteriana e da sarna, respectivamente. Com relação aos vírus há cerca de 40 viroses que infectam a cultura da batata a campo (VALKONEN, 2007). Os mais importantes

economicamente são *Potato Leafroll virus* (PLRV), *Potato virus Y* (PVY) e *Potato virus X* (PVX). O PLRV era considerado até então o principal causador de perdas, porém o PVY tem superado PLRV, causando perdas de até 80% (DANIELS; PEREIRA, 2004; VALKONEN, 2007).

O PVY pertence ao gênero *Potyvirus*, e são reconhecidas três estirpes, PVY^O, PVY^N e PVY^C. Dentro do grupo da estirpe PVY^N existem ainda o subgrupo PVY^{NTN} (SALAZAR, 1996; SINGH et al., 2008). As estirpes PVY^O, ou comuns, estão mundialmente disseminadas e causam mosaico, necrose das nervuras, senescência e queda das folhas infectadas. As estirpes PVY^C, causam necrose sistêmica, ocorrem com maior frequência na Austrália e algumas regiões da Europa, Equador, América do Norte, África do Sul e Nova Zelândia. Já as estirpes PVY^N, ou necróticas, causam leve mosqueado que muitas vezes passam despercebidas por erradicadores e certificadores de batata semente, porém o subgrupo PVY^{NTN} pode causar necrose em forma de anéis em tubérculos e, entre as estirpes existentes, é a mais prejudicial, pois afeta tanto a produtividade, como a qualidade do tubérculo produzido (ANDRADE et al., 2009; DANIELS; SCHONS, 2003)

Assim como outras viroses, o PVY é transmitido por afídeos, que estão presentes durante todo ano em condições tropicais e subtropicais (FONTES; MELO, 1999). O principal vetor é o pulgão *Mysus persicae*, que possui modo de transmissão não persistente, sendo necessários apenas poucos minutos para aquisição e inoculação do vírus (VALKONEN, 2007). Além dos afídeos, a disseminação do vírus ocorre também pelo uso de tubérculos-semente contaminados e contato mecânico, forçando o produtor a renovar a semente, a qual representa aumento no custo de produção (AGRINUAL, 2014; TERRES et al., 2012).

Devido às diversas formas de disseminação, à medida de controle mais eficaz é a resistência genética. Esta resistência pode ser dada na forma de hipersensibilidade, tolerância ou resistência extrema. A última é a mais promissora, uma vez que a replicação do vírus no hospedeiro é impossibilitada ou ocorre em um nível muito baixo (SOLOMON-BLACBURN; BARKER, 2001).

Genes de resistência extrema ao PVY foram identificados em *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* (Juz. & Bukasov) Hawkes (*Ry_{adg}*), *S. stoloniferum* Schltdl. & Bouché (*Ry_{sto}*), *S. chacoense* Bitter (*Ry_{chc}*), *S. hougasii* Correll (*Ry_{hou}*) (TIWARI et al., 2012). Estes genes asseguram a plena proteção contra todas as estirpes de

PVY. O melhoramento para resistência ao PVY é facilitado pelo fato de ser um caráter monogênico, portanto de alta herdabilidade e durável (SONG et al., 2005). Estas características possibilitam a utilização da seleção assistida por marcadores, assim como tem sido aplicada para resistência ao nematoide de cisto da raiz, ao *Potato Virus X* (PVX), a ferrugem tardia (BORMANN et al., 2004; COLTON et al., 2006) e verruga da batata (GEBHARDT et al., 2006), bem como ao PVY (HÄMÄLÄINEN et al., 1997; KASAI et al., 2000).

Para seleção assistida por marcadores moleculares são descritos na literatura dois marcadores moleculares do tipo SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), RYSC3, para os genes oriundos de *S.tuberosum* subsp. *andigena* (KASAI et al., 2000) e M45, para os derivados da subespécie *stoloniferum* (BRIGNETTI et al., 1997). Com esses marcadores pode-se selecionar precocemente os genótipos que herdaram os genes de resistência ao PVY sem sofrer influência do ambiente (DALLA RIZZA et al., 2006).

O fato da batata ser tetraploide faz com que diferentes constituições genéticas sejam possíveis. Desta forma, ainda que a resistência de um genótipo duplex (RyRyryry), triplex (RyRyRyry) ou quadruplex (RyRyRyRy) seja tão eficiente quanto a de um genótipo simplex (Ryryryry), a sua grande vantagem está relacionada com a maior proporção de genótipos resistentes nas progênies. Assim, enquanto no cruzamento entre um genótipo simplex e um nuliplex (ryryryry) resulta em apenas 50% de genótipos resistentes na população, a progênie de um cruzamento entre clones triplex ou quadruplex com um nuliplex é praticamente toda resistente. O conhecimento da dosagem alélica dos genitores permite prever a segregação do cruzamento e estimar com maior precisão o tamanho da população necessária para identificação de clones resistentes (ANDRADE et al., 2009; DE KOEYER et al., 2011).

No processo de seleção de clones de batata o melhorista deve considerar várias características, visando atender tanto o consumidor que busca tubérculos com boa aparência e aptidão culinária, a indústria que exige qualidade para o processamento e o produtor que prioriza o rendimento (SILVA et al., 2007; NEY, 2012). No entanto esta não é uma tarefa fácil, devido principalmente ao estreitamento da base genética da cultura, que faz com que as diferenças observadas sejam cada vez menores necessitando de maiores populações para efetuar a seleção (HAWKES, 1978).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo geral aumentar a eficiência dos programas de melhoramento de batata em relação à resistência ao PVY. Para tanto, serão apresentados a seguir dois capítulos, cujos objetivos são estimar a dosagem alélica do gene *Ry* no germoplasma utilizado no programa de melhoramento de batata da Embrapa, selecionar clones com múltiplas cópias do gene *Ry* para serem usados como genitores no programa de melhoramento de batata e identificar germoplasma de batata com resistência extrema ao vírus Y associada a características comerciais desejáveis.

2. CAPÍTULO I

Dosagem alélica do gene de resistência ao PVY utilizando marcadores moleculares RYSC3 e M45.

2.1 Introdução

A batata cultivada, *Solanum tuberosum* L., é o terceiro alimento mais produzido no mundo, após o arroz e o trigo, com uma produção anual superior a 370 milhões de toneladas. No Brasil, a batata é cultivada nas regiões centro-oeste, nordeste, sudeste e sul com produção anual acima de três milhões de toneladas (IBGE, 2014).

Dentre os patógenos que afetam a cultura da batata, o *Potato virus Y* (PVY) tem sido um dos mais importantes (VALKONEN, 2007). Nos principais Estados produtores de batata do Brasil, foi verificada a ocorrência do PVY com incidência superior ao *Potato leafroll vírus* (PLRV) que era, até então, considerado o principal vírus na cultura (ÁVILA et al., 2009). Isso se deve principalmente ao surgimento de novas estirpes, como PVY^{NTN}, que apresentam rápida disseminação no campo e causam perdas econômicas mais significativas (GALVINO, 2011).

O sintoma característico do PVY é denominado de mosaico, por apresentar diferentes tonalidades de verde nas folhas das plantas infectadas. Além do mosaico, de acordo com a estirpe do vírus, interação com outros vírus, e a cultivar de batata infectada, as plantas podem apresentar outros sintomas, como rugosidade, encrespamento, necrose ou ainda ser assintomática, ocasionando prejuízos por servir como fonte de inóculo a campo (RAMALHO, 2012).

A principal forma de disseminação do PVY é pelo uso de tubérculos-sementes infectados na propagação vegetativa. Mais de 20 espécies de afídeos possuem capacidade de adquirir o vírus e o disseminar pela lavoura. Além da batata, o PVY possui um círculo de plantas hospedeiras relativamente grande, que servem como

forma de sobrevivência para o vírus, favorecendo a disseminação e o estabelecimento de viroses nas áreas de produção (COSTA et al., 2010).

A propagação vegetativa, utilizada comercialmente por produtores de batata, pode perpetuar o vírus de uma geração para outra, via tubérculos contaminados, levando a degenerescência, e faz com que seja necessária a utilização de tubérculos-sementes de alta qualidade e sua constante renovação para evitar ocorrência de PVY (ÁVILA et al., 2009).

Os gastos com a compra de tubérculos-sementes representam o mais alto custo dentro do sistema de produção da batata, porém este valor poderia ser diluído caso houvesse a possibilidade do produtor utilizar tubérculos colhidos em seu próprio cultivo por duas ou mais safras, após instalarem um campo com tubérculos-sementes livres de vírus (BRUNE; MELO, 2002). Devido à inexistência de controle curativo para fitovírus, associado ao fato do controle de insetos vetores não ser considerado eficiente, a resistência genética é a melhor forma de evitar a ocorrência de viroses (COSTA et al., 2010).

Algumas espécies silvestres de batatas foram identificadas como resistentes a viroses e vêm sendo utilizadas em programas de melhoramento a mais de 80 anos. Esta resistência é controlada por dois tipos de genes de efeito maior e de caráter dominante, os genes *N*, que conferem resistência por hipersensibilidade (HR), limitando a expansão do vírus pela morte do tecido infectado, variando a lesão no tecido de acordo com a estirpe do vírus, e os genes *R*, que conferem extrema resistência (ER) a todas as estirpes de PVY (TIWARI et al., 2012).

Os genes *R*, de extrema resistência ao PVY, foram identificados em *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* (Juz. & Bukasov) Hawkes (*Ry_{adg}*) no cromossomo XI, *S. stoloniferum* Schltdl. & Bouché (*Ry_{sto}*) no cromossomo XI e *S. chacoense* Bitter (*Ry_{chc}*) no cromossomo IX (COCKERHAM, 1970; VALKONEN et al., 1994; TIWARI et al., 2012).

O uso de marcadores moleculares é uma importante ferramenta para aumentar a eficiência do processo de seleção de genótipos de interesse, diminuindo o tempo necessário para o desenvolvimento de novas cultivares (KOEYER et al., 2010). O mapeamento de genes de interesse em espécies silvestres permitiu o desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), os quais amplificam a região que contém o gene

de interesse através do anelamento de *primers* específicos, adjacentes a esta região (PARAN; MICHELMORE, 1993).

Hämäläinen et al. (1998) clonaram e sequenciaram a região no genoma da batata ligada ao gene *Ry_{adg}* e Kasai et al. (2000) desenvolveram o marcador do tipo SCAR, denominado de RYSC3, que amplifica essa região. Da mesma forma, Brigneti et al. (1997), desenvolveram o marcador SCAR que amplifica a região ligada ao gene *Ry_{sto}*, denominado de M45,

A batata cultivada, em geral, é uma espécie tetraploide. O gene *Ry* confere extrema resistência ou imunidade já na forma simplex (*Ryryryry*). Portanto, considerando segregação cromossômica, em um cruzamento de genitor simplex com genitor suscetível é esperada uma relação 1 resistente : 1 suscetível na progênie. Entretanto, se for utilizado genitor duplex (*RyRyryry*) ou tríplex (*RyRyRyry*) a relação aumenta para 5 resistente : 1 suscetível e 1 resistente : 0 suscetível, na progênie, respectivamente, aumentando desta forma a probabilidade de se obter clones com imunidade ao PVY associada a outros caracteres de interesse (SOLOMON-BLACKBURN; BARKER, 2001). Portanto, para utilização mais eficiente do gene *Ry* no melhoramento genético de batata, é importante que se conheça a dosagem alélica desse gene nos genitores disponíveis no programa de melhoramento (KOEYER et al., 2010). Uma das formas de se estimar a dosagem alélica de um gene em um determinado genótipo é através da análise da segregação desse gene na progênie (RIBEIRO et al., 2006; HELDÁK et al., 2007; ORTEGA; LOPEZ-VIZCON, 2012; JOHN et al., 2013).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a eficiência do uso dos marcadores RYSC3 e M45 na seleção assistida para resistência ao PVY e estimar a dosagem alélica dos genes *Ry* em genitores do programa de melhoramento genético de batata da Embrapa.

2.2 Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas - RS. Foram avaliadas progênies de sete cruzamentos, envolvendo cinco genitores resistentes ao PVY, os quais foram escolhidos por apresentarem na sua constituição os genes de resistência ao PVY, *Ry_{adg}* e *Ry_{sto}* (Tabela 1).

Tabela 1- Identificação das famílias clonais avaliadas. Pelotas, 2014.

Família	Mãe	Pai
C-1	BRS Clara	C1883-22-97*
C-2	BRS Ana	C1883-22-97*
C-3	BRS Ana	C2372-02-02*
C-4	Caesar	C2372-02-02*
C-5	C2388-01-02*	Asterix
C-6	C2389-01-02*	Asterix
C-7	MB9846-1*	5897-1

*genitor resistente ao PVY, portador dos genes *Ry_{adg}* e *Ry_{sto}* (TERRES et al., 2012).

As sementes sexuais obtidas a partir dos cruzamentos foram tratadas com uma solução de ácido giberélico a 1500ppm por 24 horas, a fim de quebrar a dormência e semeadas em sementeiras em agosto de 2012. Cerca de 30 dias após a semeadura, aproximadamente 120 *seedlings* de cada cruzamento foram transplantados para sacos plásticos contendo 250mL de substrato organo-mineral, permanecendo em casa de vegetação durante todo ciclo de desenvolvimento vegetativo.

A coleta de folhas jovens de cada clone para extração de DNA iniciaram aproximadamente um mês após o transplante, e a extração foi realizada de acordo com protocolo descrito por DarT[®] (DART, 2010). A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1%, e sua concentração foi quantificada em fluorômetro.

Após o ajuste de concentração do DNA, foi utilizado o marcador microssatélite STI0003, o qual é amplamente utilizado na caracterização de genótipos de batata, a fim de confirmar a qualidade do DNA e evitar a ocorrência de falsos negativos nas reações de PCR, seguindo protocolo descrito por Ghislain et al. (2009).

A genotipagem das progênies foi realizada com base no marcador SCAR RYSC3 para detecção do gene *Ry_{adg}* e M45, para o *Ry_{sto}* (Tabela 2). Para ambos os marcadores as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 9,0µL, contendo 20ng de DNA genômico, 0,25µM de cada *primer*, 0,125mM de dNTPs, 2mM de MgCl₂ e 1U de *Taq*DNA polimerase.

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados para genotipagem das progênies. Pelotas, 2014.

Marcador SCAR	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	Fonte
RYSC3	F:ATACACTCATCTAAATTTGATGG R:AGGATATACGGCATCATTTTTCCGA	Kasai et al. (2000)
M45	F: CCTAGTTTCTGAGCATGTAATTC R: TGCAGCTATTCAAACACATAAGG	Brigneti et al. (1997)

O programa de amplificação foi executado de acordo com as seguintes condições para o marcador RYSC3: ciclo inicial de desnaturação a 93°C por 9min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 45s, 55°C por 45s para o anelamento do *primer* e extensão a 72°C por 1min, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 5min. Para o marcador M45, as condições de PCR foram: 94°C por 1min, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 20s, 58°C por 20s e 72°C por 20s, com uma extensão final a 72°C por 20min.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados em fotodocumentador. As imagens foram armazenadas em computador para avaliação dos produtos da amplificação. O marcador de peso molecular de 1 Kb Plus (Invitrogen) foi utilizado como referência para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados usando programa computacional Bio - 1D versão 12.14. As variedades de batata Chieftain e Iporá foram utilizadas respectivamente como controle negativo e positivo nas reações de PCR, seguindo metodologia proposta por Rizza et al., 2006.

Os clones de cada cruzamento foram avaliados quanto a presença ou ausência da banda de 321pb para o gene de resistência *Ry_{adg}* e de 500pb para o gene de resistência *Ry_{sto}* de acordo com Kasai et al. (2000) e Brigneti et al. (1997), respectivamente.

Para estimar a dosagem alélica dos genitores foi considerada a frequência de redução $\alpha=0,1566$ para determinação das hipóteses de constituições genotípicas (MENDOZA et al., 1996), as quais foram testadas pelo teste de χ^2 utilizando a seguinte formula:

$$\chi^2 = \sum [(O-E)^2/E]$$

Onde 'O' representa a frequência observada para cada uma das classes, resistente ou suscetível, e 'E' é a frequência esperada para cada classe.

Foram testadas as seguintes hipóteses quanto as possíveis constituições genotípicas dos genitores quanto à dosagem alélica dos genes *Ry*:

- 1-) Nuliplex (*ryryryry*): H_0 - o alelo dominante do gene *Ry* segrega na proporção de 0 resistente: 1 suscetível;
- 2-) Simplex (*Ryryryry*): H_0 - o alelo dominante do gene *Ry* segrega na proporção de 1 resistente: 1,17 suscetível;
- 3-) Duplex (*RyRyryry*): H_0 - o alelo dominante do gene *Ry* segrega na proporção de 3,56 resistentes: 1 suscetível;
- 4-) Triplex (*RyRyRyry*): H_0 - o alelo dominante do gene *Ry* segrega na proporção de 24,5 resistentes: 1 suscetível;
- 5-) Quadriplex (*RyRyRyRy*): H_0 - o alelo dominante do gene *Ry* segrega na proporção de 1 resistente: 0 suscetível.

2.3 Resultados e Discussão

No total, nos sete cruzamentos realizados foram obtidos 711 genótipos, os quais foram analisados quanto à presença ou ausência dos genes *Ry* utilizando os marcadores SCAR RYSC3 e M45 (Figura 1; Tabela 3).

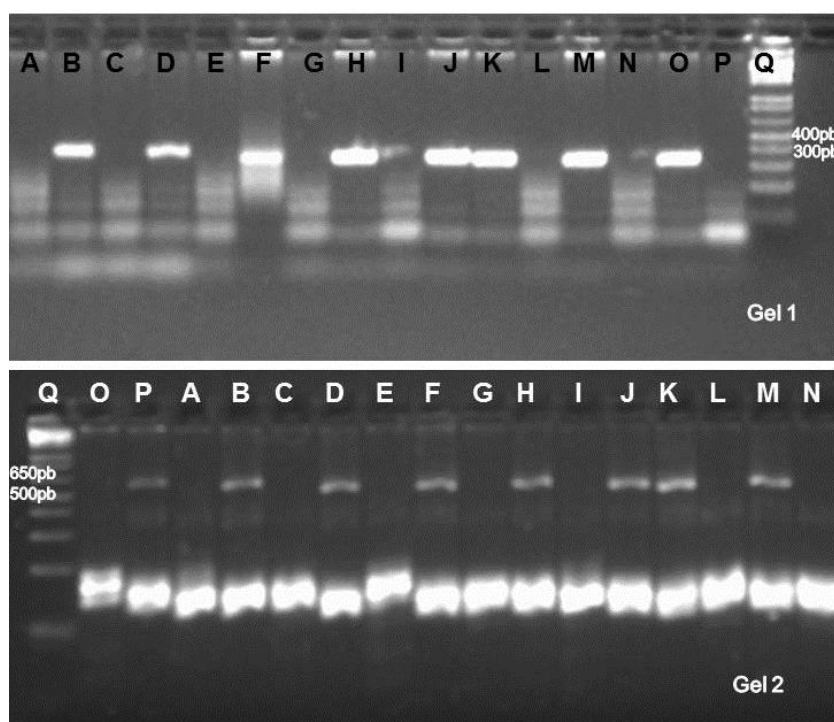


Figura 1 – Perfil molecular dos genitores e testemunhas para os marcadores RYSC3 (Gel 1) e M45 (Gel 2) em gel de agarose 1%. Identificação: A) Chieftain; B) Iporá; C) BRS Clara; D) C1883-22-97; E) BRS Ana; F) C1883-22-97; G) BRS Ana; H) C2372-02-02; I) Caesar; J) C2372-02-02; K) C2388-01-02; L) Asterix; M) C2389-01-02; N) Asterix; O) MB 9846-1; P) 5897-1; Q) 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Pelotas, 2014

Tabela 3 – Número total de genótipos analisados por família, número de genótipos com presença (+) ou ausência (-) da banda de 321pb para o marcador SCAR RYSC3 e da banda de 500pb para o marcador SCAR M45 e percentual de clones com a presença dos genes *Ry_{adg}* e *Ry_{sto}* por família. Pelotas, 2014.

Família	Total de genótipos	RYSC3		Clones com presença do gene <i>Ry_{adg}</i> (%)	M45		Clones com presença do gene <i>Ry_{sto}</i> (%)
		+	-		+	-	
C-1	105	36	69	34	29	76	28
C-2	111	38	73	34	36	75	32
C-3	114	39	75	34	27	87	24
C-4	104	40	64	38	34	70	33
C-5	68	35	33	51	33	35	49
C-6	100	74	26	74	71	29	71
C-7	109	47	62	43	49	60	45
Total	711	309	402	49	279	432	39

Com o uso dos marcadores moleculares foi possível identificar que 309 clones, (43,46%), possuem o gene *Ry_{adg}* sugerindo que sejam resistentes ao PVY, e 279 clones, (39,24%), possuem o gene de resistência *Ry_{sto}*. Estes resultados mostram que com o uso da seleção assistida pelos marcadores SCAR RYSC3 e M45 é possível eliminar precocemente mais de 50% da população avaliada, a qual é composta por clones suscetíveis ao PVY.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos na validação do marcador RYSC3 por grupos de pesquisa no Chile, Espanha e Estados Unidos, demonstrando a eficiência desse marcador na seleção de clones com resistência ao PVY (SAGREDO et al., 2009; OTTOMAN et al., 2009; KASAI et al., 2000; LOPEZ-PARDO et al., 2013).

Sagredo et al. (2009) obteve uma eficácia próxima a 100%, utilizando o marcador RYSC3 ao avaliar progênies de três famílias clonais, enquanto que em ensaios biológicos a eficácia foi inferior a 90%, devido principalmente a problemas como mutações na região de reconhecimento dos anti-soros e ineficiência na inoculação, o que resultou em falsos negativos. A inoculação mecânica das plantas com o PVY, seguida da detecção da presença do vírus por teste ELISA é uma das formas utilizadas para validar os marcadores SCAR (WHITWORTH et al., 2009). Quando comparados o teste ELISA e o marcador SCAR RYSC3, houve uma alta coincidência, superior a 95%, entre os resultados positivos para resistência ao PVY (OTTOMAN et al., 2009). Estes resultados evidenciam a importância da descoberta, validação e uso dos marcadores moleculares como um instrumento para tornar mais eficiente os programas de melhoramento genético.

Entre as famílias avaliadas, C-6 (C2389-01-02 x Asterix), foi a que se destacou por apresentar o maior número de clones com o gene resistência ao PVY, 74% devido à presença do *Ry_{adg}* e 71% com o gene *Ry_{sto}* (Tabela 3).

No melhoramento genético de batata, mais de 40 caracteres estão envolvidos no processo de seleção (GEBHARDT et al., 2007). Na família C-6, dado o alto percentual de clones portadores dos genes de resistência ao PVY, a probabilidade de se encontrar um clone com resistência ao PVY associada a características comerciais de interesse é maior do que nas demais famílias.

Em função do grande número de características agronômicas que precisam ser contempladas no processo de desenvolvimento de uma nova cultivar de batata, associada à natureza autotetraplóide da espécie, fazer uso do conhecimento da

dosagem alélica de um determinado gene de interesse nos genótipos que compõem o germoplasma disponível ao programa de melhoramento é de grande importância para direcionar os cruzamentos de forma a maximizar a eficiência na transmissão desse caráter.

A análise da segregação dos genes Ry_{adg} e Ry_{sto} foi utilizada para estimar as dosagens alélicas do gene Ry nos genitores resistentes ao PVY avaliados nesse estudo. Os resultados do teste de χ^2 para cada hipótese de constituição genotípica testada para os genes Ry_{adg} e Ry_{sto} encontram-se respectivamente nas tabelas 4 e 5.

Para o gene Ry_{adg} , com base no marcador RYSC3, dos cinco genitores resistentes ao PVY avaliados, quatro, C1883-22-97 (famílias C-1 e C-2), C2372-02-02 (famílias C-3 e C-4), C2388-01-02 (família C-5), e MB9846-1 (família C-7), são simplex, com uma cópia do gene Ry_{adg} , enquanto que o genitor C2389-01-02 (família C-6), é duplex (Tabela 4).

Assim como nos resultados obtidos por Andrade et al. (2009), onde o marcador RYSC3 permitiu selecionar clones com múltiplas doses do alelo Ry_{adg} a partir do cruzamento de clones duplex ($RyRyryry$) e posterior cruzamento-teste dos clones com cultivar suscetível, no presente trabalho o marcador demonstrou ser eficiente na identificação de genótipos resistentes ao PVY permitindo a estimativa de dosagem alélica dos genitores.

Tabela 4 – Valores de significância do teste χ^2 para as constituições genéticas nuliplex ($ryryryry$), simplex ($Ryryryry$), duplex ($RyRyryry$), triplex ($RyRyRyry$) e quadriplex ($RyRyRyRy$) na avaliação de sete famílias clonais de batata para o gene Ry_{adg} . Pelotas, 2014.

Famílias	Constituição genética				
	Nuliplex	Simplex	Duplex	Triplex	Quadriplex
C-1	129552,69*	5,88ns	117,57*	1064,09*	476052,69*
C-2	144350,02*	6,27ns	124,58*	1246,58*	532850,02*
C-3	152048,69*	6,47ns	128,09*	1158,11*	56244,69*
C-4	159950,77*	2,43ns	95,30*	916,32*	409550,77*
C-5	122466,03*	0,79ns	28,10*	359,13*	108866,03*
C-6	547561,52*	31,37*	0,97ns	129,38*	67561,53*
C-7	220846,54*	0,39ns	77,77*	811,38*	384346,53*

ns: não significativo; * significativo a 1% de probabilidade

Tabela 5 – Valores de significância do teste χ^2 para as constituições genéticas nuliplex (ryryryry), simplex (Ryryryry), duplex (RyRyryry), triplex (RyRyRyry) e quadriplex (RyRyRyRy) na avaliação de sete famílias clonais de batata para o gene *Ry_{sto}*. Pelotas, 2014.

Famílias	Constituição genética				
	Nuliplex	Simplex	Duplex	Triplex	Quadriplex
C-1	84058,02*	14,41*	156,1*	1306,08*	577558,02*
C-2	129551,36*	8,32*	135,04*	1320,03*	562451,35*
C-3	72858,80*	23,02*	196,95*	1585,72*	756858,79*
C-4	115554,24*	7,51*	125,08*	1109,01*	489954,23*
C-5	108866,03*	0,16ns	34,66*	408,04*	122466,03*
C-6	504058,82*	24,99*	2,92ns	166,92*	84058,83*
C-7	240046,06*	0,06ns	69,82*	838,61*	359946,06*

ns: não significativo; *significativo a 1% de probabilidade

Para o gene *Ry_{sto}*, com base no marcador M45, dos cinco genitores resistentes ao PVY que foram avaliados, dois, C2388-01-02 (família C-5) e MB9846-1 (família C-7), são simplex, com uma cópia do gene *Ry_{sto}*, enquanto que o genitor C2389-01-02 (família C-6), é duplex (Tabela 5), concordando com os resultados obtidos para o gene *Ry_{adg}*, com base no marcador RYSC 3. Por outro lado, para os genitores C1883-22-97 (famílias C-1 e C-2) e C2372-02-02 (famílias C-3 e C-4), apesar das famílias descendentes de ambos os genitores amplificarem o fragmento de 500pb, assim como os próprios genitores em questão, mostrando que esses possuem o gene *Ry_{sto}* em sua constituição, as frequências observadas de presença do gene *Ry_{sto}* nas quatro progênes avaliadas, com valores entre 0,24 e 0,33 (Tabela 3), não se adequaram estatisticamente a nenhuma das constituições genotípicas propostas.

Tal fato pode ser justificado em função do tamanho da população amostrada, concordando com os resultados obtidos por Andrade et al. (2009), que também, estatisticamente, não encontrou ajuste entre as proporções esperadas e observadas. Outra hipótese que pode ser levantada para este fato é de que a região adjacente ao gene *Ry_{sto}*, na qual ocorre o anelamento dos *primers* específicos do marcador M45, pode ser mais suscetível à ocorrência de mutações, ou até mesmo ao fato desta região estar a uma maior distância do gene, permitindo a ocorrência de recombinação, resultando, em ambas as situações, na não amplificação do fragmento esperado, levando a ocorrência de falsos negativos.

Dos clones avaliados, e que apresentaram a presença do gene *Ry*, 75,37% amplificaram para ambos os marcadores, RYSC3 e M45. Escudero (2010) e Rizza et

al. (2006) também encontraram em seus estudos resultados semelhantes. Uma das hipóteses para as coincidências de amplificações utilizando o marcador desenvolvido por Brigneti et al. (1997) para o gene *Ry_{sto}*, com os resultados obtidos com o marcador RYSC3 para gene *Ry_{adg}*, é em função de que ambos os marcadores estão ligados ao mesmo gene, o *Ry* (SONG, 2005; FLIS et al., 2005; ESCUDERO, 2010).

Alguns estudos mostram que os genes *Ry_{adg}* e *Ry_{sto}* estão localizados no mesmo cromossomo, o XI, e que, devido à proximidade entre eles, segregam juntos. Esse fato justificaria o uso de apenas um dos marcadores na seleção assistida (RIZZA et al., 2006; TIWARI et al., 2012).

Há também a hipótese de que durante o desenvolvimento de *S. tuberosum* spp. *andigena*, espécie onde foi identificado o gene *Ry_{adg}*, tenham ocorrido introgressões de *S. stoloniferum*, espécie portadora do gene *Ry_{sto}* (RIZZA et al., 2006). Os resultados obtidos por Escudero (2010) contribuem para esta hipótese, uma vez que foram avaliados apenas clones de *S. tuberosum* spp. *andigena* e os clones amplificaram para ambos os marcadores, RYSC3 e M45.

No presente trabalho também foram identificados clones que amplificaram apenas para um dos marcadores, 54 para o RYSC3 e 29 para o M45, concordando com resultados encontrados por Rizza et al. (2006), que esse fato ocorra em função de eventos de recombinação genética ou de mutações na região adjacente aos genes *Ry_{adg}* e, ou, *Ry_{sto}*, impossibilitando o anelamento dos *primers*.

Os resultados encontrados no nesse trabalho sugerem que é importante usar ambos os marcadores na seleção assistida para resistência ao PVY com o intuito de diminuir o erro de descarte de clones em decorrência de falsos negativos. Os genitores avaliados mostraram diferenças nas dosagens alélicas dos genes de resistência ao PVY, *Ry_{adg}* e *Ry_{sto}*. Os cruzamentos direcionados para resistência ao vírus Y devem ser priorizados com o genitor C2389-01-02, que possui duas cópias do gene *Ry*.

2.4 Conclusões

Ambos os marcadores, RYSC3 e M45, devem ser usados na seleção assistida para resistência ao PVY com o intuito de diminuir o erro de descarte de clones em decorrência de falsos negativos.

Os genitores com portadores do gene *Ry*, possuem dosagens alélicas distintas, sendo C1883-22-97, C2372-02-02, C2388-01-02 e MB9846-1, simplex e C2389-01-02 duplex.

3. CAPÍTULO II

Avaliação de clones de batata com resistência ao vírus Y quanto a caracteres de interesse agrônômico

3.1 Introdução

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é um importante alimento, por ser fonte de energia e conter elevados teores de proteínas, vitaminas e minerais (QUADROS et al., 2009). É o terceiro principal alimento produzido no mundo (FAOSTAT, 2012).

A comercialização de batata se dá tanto na forma *in natura*, quanto industrializada, e muitos caracteres devem ser considerados pelo melhorista no processo de seleção. Além das exigências dos consumidores, atacadistas e varejistas, que consideram a aparência do tubérculo uma das características mais importantes para a aceitação de uma cultivar, e da indústria, com uma gama de caracteres envolvidos na qualidade industrial, os genótipos devem ter alto rendimento de tubérculos, característica priorizada pelos produtores (SILVA et al., 2007).

Atender todas essas exigências, ou pelo menos grande parte delas, em um único genótipo, é um grande desafio devido, principalmente, ao estreitamento da base genética da cultura (HAWKES, 1978). Entre as plantas cultivadas de maior relevância para alimentação humana, provavelmente nenhuma outra espécie tenha tantos parentes silvestres como a batata (HAWKES, 1994). Devido à ampla diversidade de habitat em que estas espécies estão distribuídas, esses recursos genéticos são fonte de resistência a diversos estresses bióticos e abióticos (HAJJAR; HODGKIN, 2007).

A cultura da batata é acometida por diversas doenças, e dentre as viroses, o *Potato virus Y* (PVY) vem se destacando nos últimos anos em função, principalmente, do surgimento de novas estirpes, que apresentam rápida disseminação no campo e causam grandes perdas em produtividade (GALVINO,

2011). O fato de a batata ser propagada vegetativamente favorece a disseminação de doenças viróticas, tornando a resistência genética à melhor forma de controle. Nesse sentido, o desenvolvimento de cultivares com resistência a doenças viróticas é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético de batata (ANDRADE et al., 2009).

Genes que conferem resistência extrema ao vírus Y foram identificados e mapeados nas espécies silvestres *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, *Ry_{adg}* (KASAI et al., 2000) e em *Solanum tuberosum* subsp. *stoloniferum*, *Ry_{sto}* (BRIGNETI et al., 1997). Os programas de melhoramento vêm fazendo uso desse valioso germoplasma com o intuito de incorporar estes genes de resistência no processo de desenvolvimento de uma nova cultivar. Para tal finalidade, é importante aliar a resistência ao PVY com características que atendam as exigências dos consumidores (SAGREDO, 2009).

Entre os caracteres mais importantes em um programa de melhoramento genético de batata destaca-se a aparência geral do tubérculo, a qual, em contrapartida, apresenta baixa herdabilidade dificultando sua seleção (TAI, 1975; MARIS, 1988). Por outro lado, resultados de pesquisas vêm mostrando que alguns componentes individuais da aparência, como formato, profundidade dos olhos, textura da película e massa média do tubérculo, possuem maior herdabilidade, possibilitando eliminar grande parte dos clones indesejáveis já nas gerações iniciais, reduzindo custo e tempo no desenvolvimento de novas cultivares (LOVE et. al., 1997; XIONG et al., 2002; VERISSIMO et al., 2012).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi verificar as associações entre caracteres de rendimento e de aparência de tubérculo e avaliar o desempenho de clones de batata com resistência extrema ao PVY quanto aos componentes da aparência e do rendimento de tubérculos a fim de identificar germoplasma de batata com resistência extrema ao PVY associada a características comerciais desejáveis.

3.2 Material e Métodos

Foram avaliados 213 clones (Tabela 1), oriundos de oito famílias clonais de batata e selecionados quanto à presença dos genes de resistência ao PVY, *Ry_{adg}* e *Ry_{sto}*, identificados com o uso dos marcadores moleculares RYSC3 e M45 (BRIGNETI et al., 1997; KASAI et al., 2000).

Tabela 1 – Genealogia das oito famílias que originaram os clones com resistência ao PVY avaliados neste estudo e número de clones avaliados/família. Embrapa, Pelotas 2014.

Família	Nº de clones/família	Mãe	Pai
A	12	BRS Clara	C1883-22-97*
B	19	MB9846-1*	5897-1
C	37	Shepody	C2080-02-00*
D	39	C2389-01-02*	Asterix
E	29	BRS Ana	C1883-22-97*
F	21	BRS Ana	C2372-02-02*
G	32	Caesar	C2372-02-02*
H	24	C2388-01-02*	Asterix

*genitor resistente ao PVY, portador dos genes *Ry_{adg}* e *Ry_{sto}* (TERRES et al., 2012).

O experimento foi realizado na sede da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, (31°S, 52°W e 50m a.n.m.). Na safra de primavera de 2013, os clones resistentes ao PVY foram cultivados a campo dando origem a primeira geração clonal. O delineamento experimental adotado foi de famílias com testemunhas intercalares (CRUZ, 2006).

A parcela experimental foi composta por duas plantas/parcela. As testemunhas utilizadas foram as cultivares BRS Ana, Asterix e BRS Bel, com cinco repetições, distribuídas aleatoriamente. O espaçamento utilizado foi de 0,30m entre plantas e 0,80m entre linhas. Os tratos culturais e fitossanitários utilizados foram como recomendado para cultivos comerciais na região conforme descrito por Pereira e Daniels (2003).

Após a senescência das folhas e hastes, aos 90 dias após o plantio, os tubérculos foram colhidos por parcela, transportados até o galpão de cura onde foram realizadas as seguintes avaliações:

Caracteres qualitativos relacionados aos componentes da aparência:

- Cor de polpa: (1) branca; (2) creme; (3) amarelo claro; (4) amarelo escuro.

- Cor de película: (1) amarela; (2) rosa.
- Intensidade da cor da película:
 - Tubérculos com película rosa: (1) claro; (9) intenso.
 - Tubérculos com película amarela: (1) escuro; (9) claro.
- Aspereza de tubérculo: (1) película reticulada; (9) película lisa.
- Profundidade da gema: (1) profunda; (9) superficial.
- Formato de tubérculo: (1) redondo; (9) alongado.
- Aparência geral dos tubérculos: (1) péssima; (9) ótima.

Caracteres quantitativos relacionados aos componentes de rendimento:

- Número total de tubérculos por planta.
- Massa total de tubérculos por planta (g.planta^{-1}).
- Massa média de tubérculos (g).

Na análise estatística foi utilizada a moda para as variáveis qualitativas. Para as testemunhas, por possuírem repetições, foi utilizada a moda para as variáveis qualitativas e a média das cinco repetições para os caracteres quantitativos. As variáveis qualitativas foram transformadas de acordo com método de pontuação ótima de Fisher (1938) utilizando a transformação OPSCORE do procedimento PRINQUAL do SAS (SAS Institute, 2009). As análises foram realizadas com auxílio do programa computacional SAS 9.2 (Statistical Analysis System, 2002).

As magnitudes dos coeficientes de correlação foram classificadas conforme Carvalho *et al.* (2004): $r = 0$ (nula); $0 < |r| \leq 0,30$ (fraca); $0,30 < |r| \leq 0,60$ (média); $0,60 < |r| \leq 0,90$ (forte); $0,90 < |r| \leq 1$ (fortíssima) e $|r| = 1$ (perfeita).

3.3 Resultados e Discussão

Na análise de componentes principais, com base em sete variáveis relacionadas com os componentes de aparência do tubérculo e três relacionadas com rendimento, os três primeiros componentes explicaram 73,84% da variação total encontrada entre os 213 clones resistentes ao PVY avaliados (Figura 1).

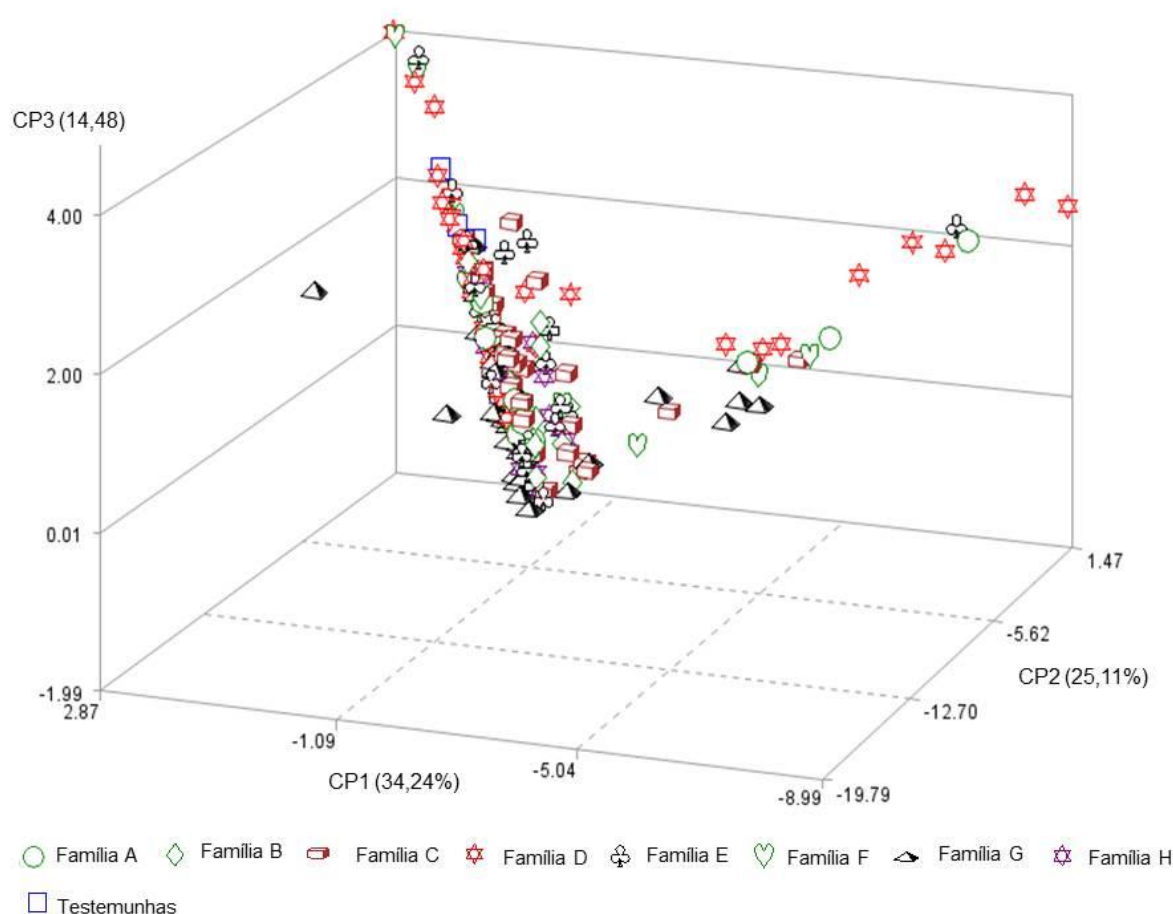


Figura 1 - Dispersão dos 213 clones, pertencentes a oito famílias clonais de batata pela análise de componentes principais com base em sete variáveis relacionadas com os componentes de aparência do tubérculo e três relacionadas com rendimento. Pelotas, 2014.

No primeiro componente, os caracteres que mais influenciaram na separação dos clones foram o formato de tubérculo, a cor de película e a massa média de tubérculos, sendo que os dois últimos contribuíram em sentido oposto ao formato de tubérculo. No segundo componente, a aspereza de tubérculo, a intensidade da cor de película e aparência geral de tubérculos foram as variáveis com maior

contribuição. Já no terceiro componente, o número total de tubérculos por planta e a massa total de tubérculos foram os caracteres que mais contribuíram na dispersão dos clones (Tabela 2).

Tabela 2 - Escores obtidos na análise de componentes principais para sete caracteres de aparência de tubérculo e três de rendimento. Pelotas, 2014.

Caráter	Componente		
	CP1	CP2	CP3
Cor de película	-0,428	0,096	0,245
Cor de polpa	-0,367	0,049	0,122
Formato	0,475	-0,067	-0,128
Profundidade da gema	0,316	0,039	-0,074
Aspereza	0,033	0,589	-0,124
Intensidade da cor de película	0,012	0,499	-0,179
Aparência geral	0,030	0,584	-0,109
Número total de tubérculos por planta	0,240	0,142	0,673
Massa total de tubérculos por planta	0,334	0,125	0,572
Massa média de tubérculo	-0,430	0,094	0,254

Com base no gráfico de dispersão (Figura 1), é possível observar que a família “D” (C2389-01-02 x Asterix) possui clones dispersos por todo gráfico, demonstrando que há uma grande variabilidade nesta família. A família “E” (BRS Ana x C1883-22-97) apesar de muitos clones estarem agrupados com a maioria dos clones, alguns deles se distanciaram dos demais, demonstrando que também há variabilidade dentro da família. Entre as oito combinações genéticas avaliadas, a C2389-01-02 x Asterix e BRS Ana x C1883-22-97 mostram maior potencial para serem exploradas, visando agregar a resistência ao vírus Y a outros caracteres em um mesmo genótipo.

A variabilidade destacada nas famílias “D” e “E” é muito importante para o melhoramento genético da batata, visando desenvolver cultivares adaptadas aos sistemas de produção e com aceitação no mercado.

O sucesso dos programas no desenvolvimento de cultivares de batata a condições adversas é totalmente dependente da diversidade genética do germoplasma disponível (ORTOMAN; PETERS, 1980). O agrupamento das cultivares testemunhas na porção superior e lado esquerdo mostrado no gráfico (Figura 1) evidenciam base genética estreita desse germoplasma.

As testemunhas avaliadas, Asterix, BRS Ana e BRS Bel apresentaram boas notas para os caracteres relacionadas com os componentes de aparência do tubérculo e de rendimento. Alguns clones agruparam-se com as testemunhas, na sua maioria das famílias “D” e “E”, mostrando uma agregação de caracteres de interesse agrônômico associados à resistência ao vírus Y (Figura 1).

É possível observar também na figura 1, que existem clones acima das testemunhas para o terceiro componente principal, sendo três da família “D”, dois da “F” (BRS Ana x C2372-02-02) e um da “E”. Considerando que neste componente as variáveis número total de tubérculos por planta e massa total de tubérculos foram as que mais contribuíram na dispersão dos genótipos, esses clones mostram um potencial de serem altamente produtivos. Segundo Ney (2012), o rendimento de tubérculos é uma das características mais importantes a serem consideradas pelo melhorista.

Com relação aos coeficientes de correlação entre as 10 variáveis analisadas (Tabela 3), o caráter cor de película apresentou correlação positiva com outros dois caracteres, sendo uma correlação média com a cor da polpa ($r = 0,39$) e uma correlação forte com massa média de tubérculos ($r = 0,72$). A cor de película apresentou forte correlação negativa com formato de tubérculo ($r = -0,71$), média com profundidade de gema ($r = -0,43$) e fraca com massa total de tubérculos por planta ($r = -0,27$).

Tabela 3– Coeficientes de correlação fenotípica entre caracteres da primeira geração clonal para componentes de aparência e de rendimento de tubérculos com base nas avaliações de 216 clones de batata. Pelotas-RS, 2014.

Caráter ¹	Cpel	Cpol	Form	PrG	Asp	InCpel	AG	NTT	MTT
Cpol	0,39**								
Form	-0,71**	-0,62**							
PrG	-0,43**	-0,27**	0,41**						
Asp	0,02	0,02	-0,02	0,04					
InCpel	0,06	0,02	-0,04	0,13	0,64**				
AG	0,06	-0,01	-0,015	0,05	0,91**	0,60**			
NTT	-0,10	-0,16*	0,22**	0,16*	0,13	0,01	0,13		
MTT	-0,27**	-0,28**	0,43**	0,29**	0,11	0,06	0,11	0,79**	
MMT	0,72**	0,50**	-0,70**	-0,34**	0,02	0,05	0,05	-0,13	-0,24**

Significativamente diferente de zero, a 1% (**) e 5% (*) pelo teste t.

¹Cpel = Cor de película; Cpol = Cor de polpa; For = Formato de tubérculo; PrG = Profundidade de gema; Asp = Espereza; InCpel = Intensidade da cor de película; AG = Aparência geral; NTT = Número total de tubérculos por planta; MTT = Massa total de tubérculos por planta; MMT = Massa média de tubérculo.

A cor de polpa, além da associação positiva com cor de película, apresentou uma correlação média com massa média de tubérculos ($r = 0,50$), e uma correlação negativa forte com formato de tubérculo ($r = -0,62$) e fraca com profundidade de gema ($r = -0,27$), número total de tubérculos ($r = -0,16$) e massa total de tubérculos ($r = -0,28$).

Diferentemente do que foi encontrado por Silva et al. (2008) e Cerioli (2013), onde o formato de tubérculo esteve correlacionado positivamente com a aparência geral, no presente trabalho esta característica não foi fixada como condição para uma boa aparência geral. Assim, além das correlações já citadas, cor de película e cor de polpa, o formato esteve correlacionado positivamente com profundidade de gema ($r = 0,41$) e massa total de tubérculos ($r = 0,43$), apresentando uma correlação média, e com o número total de tubérculos, com uma correlação fraca ($r = 0,22$). Houve também uma forte correlação negativa entre o formato de tubérculo e a massa média de tubérculo ($r = -0,70$), ou seja, quanto mais alongado o tubérculo, menor a massa média. Essa é uma informação importante, uma vez que o mercado de batata para indústria de batata-palito pré-frita congelada exige tubérculos de formato alongado (PINTO et al., 2010).

A profundidade de gema mostrou uma correlação positiva, mas fraca com os componentes de rendimento número total de tubérculos ($r = 0,16$) e massa total de tubérculos ($r = 0,29$) e uma correlação negativa média com a massa média de tubérculos ($r = -0,34$).

Para aspereza de tubérculo e intensidade da cor de película, a correlação foi positiva e forte ($r = 0,64$) e estes foram os únicos caracteres com correlação positiva com aparência geral. Com intensidade de cor de película, a aparência geral teve média correlação ($r = 0,60$), e com aspereza da película teve uma fortíssima correção ($r = 0,91$). Isto se deve ao fato destes caracteres serem os fatores que mais se destacam na aceitação de uma nova cultivar, principalmente quando destinada ao mercado *in natura*, sendo a preferência do consumidor por tubérculos com película lisa e tonalidade clara, no caso de película amarela, e coloração intensa para tubérculos de película vermelha (PEREIRA, 2003).

A importância destes caracteres também foi destacada no trabalho de Silva et al. (2008), onde relataram a correlação genética da textura da periderme com a aparência geral e com a intensidade da cor do tubérculo. Esta correlação possibilita

a seleção indireta de caracteres complexos, como a aparência externa de tubérculos de batata, governada por vários genes, que pode ser melhorada através da seleção de caracteres menos complexos, ou de mais fácil medição ou identificação (GOLDENBERG, 1968).

Quanto à massa total de tubérculos, foi observada uma forte correlação positiva com o número total de tubérculos ($r = 0,79$), e correlação negativa fraca com massa média de tubérculos ($r = -0,24$). Esses resultados mostram uma leve tendência dos clones avaliados de produzirem tubérculos pequenos. Ney (2012) obteve resultados semelhantes e afirma que é necessário realizar seleção com cautela em relação a estes caracteres buscando um equilíbrio entre massa total de tubérculos e tamanho de tubérculos.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram grande variabilidade de caracteres de rendimento e aparência de tubérculos no germoplasma com resistência ao vírus Y, indicando potencial de selecionar clones e desenvolver cultivares com resistência extrema ao PVY associada a caracteres de boa aparência de tubérculo e alto rendimento.

3.4 Conclusões

O germoplasma com resistência extrema ao vírus Y avaliado apresenta grande variabilidade de caracteres de rendimento e de aparência de tubérculos.

Clones com resistência extrema ao vírus Y associada a caracteres de interesse foram identificados.

O grau de correlação entre caracteres indica fortíssima e direta associação entre aparência geral e aspereza de tubérculo; forte e direta associação da intensidade da cor de película com aspereza e aparência geral de tubérculo, entre número e massa média de tubérculo, entre massa média e cor da película, e entre massa total e número total de tubérculos; e forte e inversa associação de formato com cor da polpa, cor da película e massa média de tubérculos.

4. Considerações Finais

Diante das perdas devido à ocorrência do PVY, o trabalho desenvolvido contribui, através da geração de conhecimento acerca do germoplasma que está sendo usado pelo programa de melhoramento da Embrapa. O trabalho evidenciou que há variabilidade no germoplasma de batata com fonte de resistência ao vírus Y e os marcadores utilizados são eficientes para detectar a presença dos genes de resistência ao PVY. Também foi demonstrada a importância da utilização da seleção assistida pelos programas de melhoramento de batata visando acelerar o processo de desenvolvimento de cultivares com resistência ao PVY, direcionando hibridações que venham a gerar um maior número de clones resistentes ampliando assim a possibilidade de seleção para caracteres de interesse.

Referências

- AGRIANUAL 2014: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2014. 482 p.
- ANDRADE, C. M.; PINTO, C. A. B. P.; RIBEIRO, S. R. R. de P.; PEIXOUTO, L. S.; VILELA, X. M. de S. Potato clones with multiple copies of the *Ry^{adg}* allele conferring resistance to *Potato virus Y*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Lodrina, v. 9, p. 286–292, 2009.
- ÁVILA, A. C. de; MELO, P. E. de; LEITE, L. R.; INOUE-NAGATA, A. K. Ocorrência de vírus em batata em sete estados do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 490–497, 2009.
- BISOGNIN, D. A. Melhoramento da batata para resistência às doenças. In: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Embrapa Clima Temperado. – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p.125-142, 2003.
- BORMANN, C.; RICKTER, A. M.; RUIZ, R. A.; PAAL, J.; LUBECK, J.; STRAHWALD, J.; BUHR, K.; GEBHARDT, C. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.17, p.1126–1138, 2004.
- BRIGNETI, G.; GARCIA-MAS, J.; BAULCOMBE, C. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry^{sto}* in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 198–203, 1997.
- BRUNE, S.; MELO, P. E. de. Produção comprometida. **Cultivar: Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 13, 2002.
- CASTRO, C. M. Batata. In: BARBIERI, R. L.; STUMPPF, E. R. T.; **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Embrapa Clima Temperado. – Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, p.221–234, 2008.
- CERIOLO, M. F. **Seleção e expressão de caracteres componentes da aparência e rendimento de tubérculos na geração de plântulas de batata**, 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.
- COCKERHAM, G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. **Heredity**, Edinburgh, v. 25, p. 309–348, 1970.
- COLTON, L. M.; GROZA, H. I.; WIELGUS, S. M.; JIANG, J. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene *RB* derived from a wild potato species. **Crop Science**, Madison, v.46, p.589–594, 2006.

COSTA, R. R. da; FIGUEIRA, A. dos R.; RABELO FILHO, F. de A. C.; ALMEIDA, J. E. M. de; CARVALHO FILHO, J. L. S. de; OLIVEIRA, C. Controle da disseminação de vírus por meio de vetores na cultura da batata. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 591–596, 2010.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Estatística experimental e matrizes**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 285p.

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*, Orono, v.83, p.297-304, 2006.

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, p.521-524, 2004.

DANIELS, J.; SCHONS, J. Viroses. In: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Embrapa Clima Temperado. – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 300-320, 2003.

DART. Diversity Arrays Technology Pty. Ltd. Disponível em: <<http://www.diversityarrays.com/samplesub.html>>. Acesso em: 19 ago. 2012.

ESCUADERO, F. L. G. **Caracterización molecular y genética de los marcadores ligados al gen Ryadg del cromosoma XI de *Solanum tuberosum* ssp andigena y su aplicación en la identificación de nuevas fuentes de resistencia al virus PVY**. 2010. 57 f. Tese (Magíster en Biología Molecular) - Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2010.

FAOSTAT. **The agricultural production domain covers**. Disponível em: <<http://www.fao.org/crop/statistics.html>>. Acesso: 2 jul. 2014.

FLIS, B.; HENNIG, J.; STRZELCZYK-ZYTA, D.; GEBHARDT, C.; MARCZEWSKI, W. The *Ry-f_{sto}* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122 718 in PVY resistant potato cultivars. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 15, p. 95–101, 2005.

FONTES, E. G.; MELO, P. E. de. Avaliação de riscos na introdução no meio 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, p.815-843, 1999.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Classificação e Descrição Botânica. In: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Embrapa Clima Temperado. – Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p.69-79, 2003.

GALVINO, S. B. F. **Genome studies of Brazilian isolates of *Potato virus Y* (PVY).** 2011. 95 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

GEBHARDT, C.; LI, L.; PAJEROWSKA-MUKTHAR, K.; et al. Candidate Gene Approach to Identify Genes Underlying Quantitative Traits and Develop Diagnostic Markers in Potato. **Crop Sci**, Madison, v. 47, p. 106–111, 2007.

GEBHARDT, C.; BELLIN, D.; HENSELEWSKI, H.; LEHMANN, W.; SCHWARZFISCHER, J.; VALKONEN, J. P. T. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.112, p.1458–1464, 2006.

GHISLAIN, M.; NÚÑEZ, J.; HERRERA, M. D. R.; PIGNATARO, J.; GUZMAN, F.; BONIERBALE, M.; SPOONE, D. M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 23, p. 377-388, 2009.

GOLDENBERG, J. B. El empleo de la correlación en el mejoramiento genético de las plantas. **Fitotecnica Latinoamericana**, Caracas, v. 5, p. 1-8, 1968.

HAJJAR, R.; HODGKIN, T. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. **Euphytica**, v. 156, p. 1-13, 2007.

HÄMÄLÄINEN, J. H.; WATANABE, K. N.; VALKONEN, J. P. T.; ARIHARA, A.; PLAISTED, R. L.; PEHU, E.; MILLER, L.; SLACK, S. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.94, p.192–197, 1997.

HÄMÄLÄINEN, J. H.; SORRI, V. A.; WATANABE, K. N.; GEBHARDT, C.; VALKONEN, J. P. T. Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyviruses in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 1036–1043, 1998.

HAWKES, J. G. History of the potato. In: Harris, P. M. **The potato crop: The scientific basis for improvement**, London: Chapman & Hall, p. 1-14, 1978.

HAWKES, J.G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: BRADSHAW, J.E.; MACKAY, G.R. (Ed.). **Potato genetics**. Cambridge: CAB International, p. 3- 42, 1994.

HELDÁK, J.; BEŽO, M.; ŠTEFÚNOVÁ, V.; GALLIOVÁ, A. Selection of DNA Markers for Detection of Extreme Resistance to Potato Virus Y in Tetraploid Potato (*Solanum tuberosum* L.) F1 Progenies. **Czech Journal Genet Plant Breed**, Slezská, v. 43, n. 4, p. 125–134, 2007.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201405_5.shtm>. Acesso em: 19 maio 2014.

JOHN, O.; KIARIE, N.; SOLOMON, S.; CHARLES, L.; NYONGESA, M.; MUTHONI, J.; OTIENO, S.; MBIYU, M.; OYOO, J. Potato virus Y (PVY) and potato virus X (PVX) resistance breeding in Kenya: applicability of conventional approaches. **Agriculture and Biology Journal of North America**, Milford, v. 4, n. 4, p. 398–405, 2013.

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

KOEYER, D. DE; DOUGLASS, K.; MURPHY, A.; WHITNEY, S.; NOLAN, L.; SONG, Y.; JONG, W. D. Application of high-resolution DNA melting for genotyping and variant scanning of diploid and autotetraploid potato. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, p. 67–90, 2010.

LOVE, S. L.; WERNER, B. K.; PAVEK, J. J. Selection for individual traits in the early generations of a potato breeding program dedicated to producing cultivars with tubers having long shape and russet skin. **American Potato Journal**, Orono, v. 74, n. 3, p. 199–213, 1997.

LOPEZ-PARDO, R.; BARANDALLA, L.; RITTER, E.; GALARRETA, J. I. R. de. Validation of molecular markers for pathogen resistance in potato. **Plant Breeding**, Berlin, v. 132, p. 246–251, 2013.

MACHADO, R. M.; TOLEDO, M. C. Determinação de glicoalcalóides em batata *in natura* (*Solanum Tuberosum* L.) comercializadas na cidade de Campinas, Estado de São Paulo. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 47–52, 2004.

MARIS, B. Correlations within and between characters between and within generations as a measure for the early generation selection in potato breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 37, p. 205–209, 1988.

MENDOZA, H. A.; MIHOVILOVICH, E. J.; SAGUMA, F. Identification of triplex (YYYy) potato virus Y (PVY) immune progenitors derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. **American Potato Journal**, Orono, v. 73, p. 13–19, 1996.

NEY, V. G. **Estimativa de parâmetros genéticos de caracteres de produção e de aparência de tubérculo de batata (*Solanum tuberosum* L.)**, 2012. 47 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

ORTEGA, F.; LOPEZ-VIZCON, C. Application of Molecular Marker-Assisted Selection (MAS) for Disease Resistance in a Practical Potato Breeding Programme. **Potato Research**, Wagenigen, v. 55, p. 1–13, 2012.

ORTMAN, E. E.; PETERS, D. C. **Introduction to breeding plants resistant to insects**. In.: Maxwell, F. G.; Jennings, P. R. (eds.). Breeding plants resistant to insects. John Wiley Inc., p. 3–14. 1980.

- OTTOMAN, R. J.; HANE, D. C.; BROWN, C. R.; YILMA, S.; JAMES, S. R.; MOSLEY, A. R.; CROSSLIN, J. M.; VALES, M. I. Validation and Implementation of Marker-Assisted Selection (MAS) for PVY Resistance (*Ry_{adg}* gene) in a Tetraploid Potato Breeding Program. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 86, n. 4, p. 304–314, 2009.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical Applied Genetic**, New York, v. 85, p. 985-993, 1993.
- PEREIRA, A. da S. Melhoramento genético. In: PEREIRA, A. da S.; DANIELS, J. O **Cultivo da batata na região sul do Brasil**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; 2003. p. 105-153.
- PEREIRA, A. da S.; DANIELS J. (Ed.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Clima Temperado. 2003. 567 p.
- PINTO, C. A.; TEIXEIRA, A. L.; NEDER, D. G.; et al. Potencial de clones elite de batata como novas cultivares para Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 399–405, 2010.
- QUADROS, D. A.; IUNG, M. C.; FERREIRA, S. M. R.; FREITAS, J. R. S. DE. Composição química de tubérculos de batata para processamento , cultivados sob diferentes doses e fontes de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 316–323, 2009.
- RAMALHO, T. O. **Caracterização genômica de isolados de *Potato virus Y* (PVY) e determinação do seu efeito em plantas de batata cv. Ágata**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- RIBEIRO, A. M.; AUGUSTO, C.; PEREIRA, B.; ANDRADE, C. M.; BOSCO, J. SCAR marker for the selection of *Ry*-duplex potato clones immune to potato virus Y. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 6, p. 1–8, 2006.
- RIZZA, M. D.; VILAR, F. L.; TORRES, D. G.; MAESO, D. Detection of PVY extreme resistance gene in potato germplasms from Uruguayan breeding program. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 83, p. 297–304, 2006.
- SAGREDO, B.; MATHIAS, M; BARRIENTOS, C.; ACUÑA, I.; KALAZICH, J.; ROJAS, J. S. Evaluation of a SCAR RYSC3 marker of the *Ry_{adg}* gene to select resistant genotypes to *Potato virus Y* (PVY) in the Inia potato breeding program. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 69, p. 305–315, 2009.
- SALAZAR, L. F. **Potato viruses and their control**. Peru: CIP. p. 214, 1996.
- SAS LEARNING EDITION. **Getting started with the SAS learning edition**. Cary: SAS Institute, 2002. 81p.

SILVA, G. O.; PEREIRA, A. DA S.; SOUZA, V. Q.; CARVALHO, F. I. F.; NETO, R. F. Correlações entre caracteres de aparência e rendimento e análise de trilha para aparência de batata. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 381–388, 2007.

SILVA, G. O. DA; PEREIRA, A. S.; SOUZA, V. Q. DE; et al. Seleção para caracteres componentes de aparência e rendimento de turbérculo em plântulas de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.26, p. 325–329, 2008.

SIMMONDS, N.W. Potatoes. In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N.W. (Ed.) **Evolution of crop plants**. Essex: Logman, p.466-471, 1995.

SINGH R. P.; VALKONEN J. P. T.; GRAY S. M.; BOONHAM N; JONES R. A. C.; KERLAN C.; SCHUBERT J.. Discussion paper: the naming of Potato Virus Y strains infecting potato. **Archives of Virology**, Wien, v.153, p.1-13, 2008.

SOLOMON-BLACKBURN, R.M.; BARKER, H. A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. **Heredity**, Edinburgh, v.86, p.8–16, 2001.

SONG, Y.S.; HEPTIN, G. L.; SCHWEIZER, G.; HARTL, L.; WENZEL, G.; SCHWARZFISCHER, A. Mapping of extreme resistance to PVY (*Ry_{sto}*) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. **Theoretical Applied Genetics**, New York v.111, p.879-887, 2005.

TAI, G.C.C. Effectiveness of visual selection for early clonal generation seedlings of potato. **Crop Science**, Madison, v. 15, p. 15-18, 1975.

TERRES, L.R.; ROHR, A.; CERIOLI, M.F.; ROCHA, D. A.; LIMA, N.L.P.; CASTRO, C.M.; PEREIRA, A.S. Caracterização de genótipos de batata quanto à presença de genes de resistência ao vírus Y da batata (PVY). In: CONGRESSO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE LA PAPA, 25.; ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE BATATA, 14., 2012, **Anais...** Uberlândia: Asociación Latinoamericana de la Papa, 2012.

TIWARI, J. K.; GOPAL, J.; SINGH, J. B. Marker-Assisted Selection for virus resistance in potato: Options and challenges. **Potato Journal**, Shimla, v. 39, n. 2, p. 101–117, 2012.

TÖFOLI, J. G.; MELO, P. C. T.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. Requeima e pinta preta na cultura da batata: importância, características e manejo sustentável. **Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 33–40, 2013.

VALKONEN, J.P.T. Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.). **Plant Breeding**, Berlin, v. 112, p. 1–16, 1994.

VALKONEN, J. Viruses: economical losses and biotechnical potential. In: VREUGDENHIL, D. **Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives**. Amsterdam: Elsevier, p. 619-641, 2007.

VERISSIMO, M. A. A.; PEREIRA, A. D. S.; SILVA, S. D. D. A. E.; et al. Expressão de caracteres de tubérculos em função do tamanho de recipiente usado no cultivo de batata na geração de plântulas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 6, p. 787–793, 2012.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J. Cell Signaling during Cold , Drought , and Salt Stress. **The Plant Cell**, Waterbury v. 14, p. 165–184, 2002.

WHITWORTH, J. L.; NOVY, R. G.; HALL, D. G.; CROSSLIN, J. M.; BROWN, C. R. Characterization of Broad Spectrum Potato Virus Y Resistance in a *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* - Derived Population and Select Breeding Clones Using Molecular Markers, Grafting, and Field Inoculations. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 86, n. 4, p. 286–296, 2009.