

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES PARA *Vitis vinifera* L.

William Seiji Lemes Nagata (PIBIC/CNPq/Uem), Claudete Aparecida Mangolin e Danuza Kelly Strioto (Orientadoras),
e-mail:mangolimca@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá /Departamento de biotecnologia, genética e biologia celular, PR.

Área: 2.02.03.00-4 Genética Vegetal

Palavras-chave: *Vitis vinifera* L., *Primers*, Retrotransposons

Resumo:

A variabilidade genética em uvas de cor (*Vitis vinifera* L.) mantidas em Marialva (PR) e outras regiões do Brasil é considerada alta, esta consideração é relevante, pois esta espécie é mantida por propagação vegetativa. No genoma de uva existe uma grande variedade de famílias de transposons, e estes são importantes para a formação do genoma da videira. A proposta do presente trabalho foi desenhar *primers* de LTR a partir de famílias de retrotransposons para uva. A partir de informações de sequencias depositadas no GenBank para o genoma de uva foram desenhados 24 *primers* denominados de dks de 001 a 024. Estes foram utilizados para amplificar o DNA de quatro amostras de DNA das diferentes cultivares de uva de cor cultivares de uva de cor (Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star). Dos 24 *primers* para transposons desenhados e testados quatro foram selecionados para futuros experimentos: dks001, dks002; dks003 e dks007. Com estes quatro *primers* foram amplificados 26 segmentos do genoma de uva.

Introdução

A uva é uma das plantas mais antigas cultivada pelo homem e os seus frutos já são usados como alimento desde os primórdios de sua existência. A cultivar Itália foi desenvolvida na Itália pelo melhorista Ângelo Pirovano, como resultado do cruzamento das variedades Bicane com Moscatel de Hamburgo. Desde o seu desenvolvimento ela vem sendo mantida por propagação vegetativa. Nos anos 50, passou a ser cultivada comercialmente no Estado de São Paulo, e na década de 60 foi difundida para o Estado do Paraná. A uva Itália vem sendo mantida por propagação vegetativa, mas a ocorrência de mutações somáticas parece ser um evento frequente e tem levado à produção de novas cultivares. A Rubi foi descrita como originária de mutação somática espontânea na cultivar Itália, ocorrida em um parreiral comercial do produtor Kotaro Okuyama, no município de Santa Mariana, no Norte do Estado do Paraná. A cultivar Benitaka também foi descrita como

originária de uma mutação somática espontânea encontrada em parreiral de Itália, do viticultor Sadao Takakura, em Floraí, no noroeste do Estado do Paraná (SOUSA, 1996). A ocorrência de mutação somática também foi verificada em plantas da cultivar Benitaka, que originou a cultivar Brasil, encontrada na propriedade de Hideo Takakura, também em Floraí, no Paraná (GONÇALVES, 1995). E recentemente no ano de 2006 surgiu a uva Black Star, a partir de uma mutação somática, em um parreiral comercial de uva Brasil, no Sítio Esperança, no município de Marialva-PR (ROBERTO et al., 2012). A análise de sete sistemas enzimáticos indicou uniformidade genética para a cultivar Itália, bem como para as cultivares Rubi, Benitaka e Brasil (OLIVEIRA-COLLET e MACHADO, 2005), mas a análise de RAPD indicou um alto polimorfismo. A similaridade genética nas 4 cultivares variou de 61,3% a 95,2% mostrando que mutações somáticas ocorrem em alta frequência (MAIA et al., 2008). Outras indicações contrariam a uniformidade genética para os clones de Itália: a alta proporção de alelos nulos (53,2%) descrito por Orasmo et al. (2007) no *locus Est-3* de uma carboxilesterase, e a alta proporção de plantas quimeras com potencial para disseminar por propagação vegetativa clones geneticamente divergentes (MAIA, 2009). Elementos Transponíveis apresentam um importante papel na domesticação e melhoramento genético da videira aumentando a diversidade genética. Segundo Benjak et al. (2008; 2009) existe uma grande variedade de famílias de transposons, e estes são importantes para a formação do genoma da videira. Inserções de elementos transponíveis são altamente polimórficas entre as cultivares de videira, e frequentemente geram variabilidade transcricional, contribuindo grandemente para o aumento da diversidade genética em videira, elemento importante para os processos de domesticação e melhoramento. A proposta do presente trabalho foi desenhar *primers* de LTR a partir de famílias de retrotransposons para uva, esses *primers* serão utilizados em trabalhos futuros para avaliar a diversidade genética nas cultivares de uva fina de mesa (*Vitis vinífera* L.), e inferir se tais variações estão associadas com as alterações de cores observadas para as cultivares Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star.

Materiais e métodos

Os *primers* para as sequências LTR foram desenhados com base nas sequências dos retrotransposons para uva que estão disponíveis no GenBank. Cada sequência obtida no GenBank foi copiada e inserida no banco de dados Phytozome Blast acessado pelo endereço eletrônico <http://www.phytozome.net/> para localizar as sequências dos retrotransposons. Estas sequências foram comparadas com os genomas disponíveis da uva para seleção de uma sequência com 100kb. As sequências selecionadas no banco de dados Phytozome (sequências adjacentes ao retrotransposons) foram introduzidas no programa LTR-Finder (http://tlife.fudan.edu.cn/ltr_finder/). Neste programa foi realizada uma busca de sequências LTR, que são sequências repetitivas e apresentam região de restrição 5´TG e 3´CA. As sequências LTR obtidas foram alinhadas com programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). Os *primers* foram desenhados considerando as regiões com as sequências mais

conservadas e também considerando a composição de CG.entre 40 a 60%. Os *primers* desenhados apresentaram entre 20 a 25 bases. A partir das sequências obtidas e das considerações apresentadas foram desenhados e sintetizados 24 *primers* que serão utilizados em projetos futuros para estudar as diferentes cultivares de cor de uva fina de mesa. Folhas de 15 plantas das 5 cultivares de uva de cor (Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star) foram coletadas em propriedades rurais de Marialva-PR. O DNA foi extraído utilizando o protocolo descrito por Thomas et al. (1993), com modificações que foram implementadas por Maia (2009). O DNA extraído de cada amostra foi quantificado utilizando o equipamento Picodrop. Para avaliar a eficiência dos *primers* desenhados foram utilizadas quatro amostras de DNA (uma de Rubi, uma de Benitaka, uma de Brasil e uma de Black Star). A avaliação inicial seguiu o protocolo desenvolvido por Kalendar et al., (1999). As reações de PCR foram preparadas em 25 µL de uma mistura contendo 20 ng de DNA, Tampão de PCR 1X, 0,5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTP, 0,5 µM de cada *primer* para LTR e 1 unidade de Taq DNA polimerase. O volume foi acertado para 25 µL com água ultrapura. As amplificações foram realizadas utilizando o seguinte programa: um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 2 min; 30 ciclos constituídos de três passos. O primeiro passo de desnaturação a 94 °C durante 30 s, no segundo passo para o anelamento dos *primers* foram testadas as temperaturas de 55 °C e 53 °C por 30 s, no passo de extensão manteve-se a 72 °C durante 2 min. Após os 30 ciclos, fez-se uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose de média resolução a 2%. Foram selecionados os *primers* que geraram fragmentos com boa resolução.

Resultados e Discussão

A partir das buscas e as comparações nos programas acima citados foi possível o desenho de 24 *primers* de LTR, estes foram baseados nas sequências de retrotransposons para uva e foram denominados dks001 a dks024. Estes 24 *primers* foram utilizados para amplificar os DNAs das quatro amostras de uva. Para a temperatura de anelamento de 55 °C os *primers* dks001 e dks002 apresentaram boa amplificação e serão utilizados nesta condição nos trabalhos posteriores. Para o primeiro *primer* foram amplificados 8 regiões e para o segundo 6 regiões. Quando a temperatura de 53 °C foi utilizada os *primers* dks003 e dks007 foram selecionados amplificando 4 e 8 fragmentos respectivamente. Os produtos das amplificações para os quatro *primers* selecionados estão apresentados na Figura 01.

Conclusões

Os 24 *primers* foram desenhados como proposto, os DNAs das cinco cultivares de uvas de cor foram extraídos e quantificados. Os 24 *primers* desenhados apresentam potencial para serem utilizados para futuros

estudos de diversidade genética em cultivares de uvas de cor, quatro deles foram selecionados e amplificaram 26 regiões no genoma das variedades de uvas de cor.

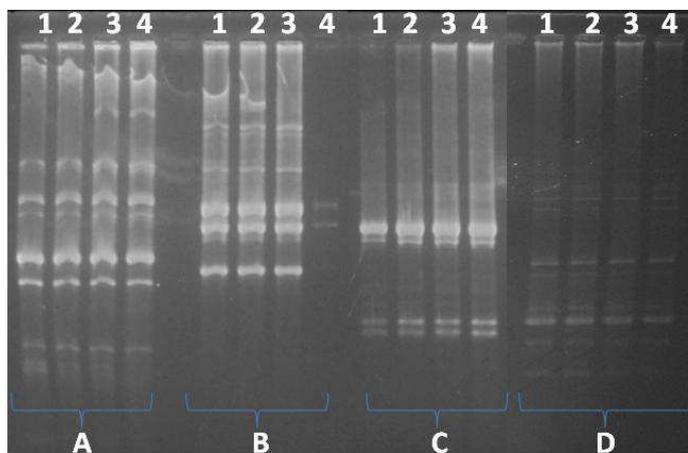


Figura 01. Gel de agarose 2% usado para separar o produto da amplificação do DNA das quatro amostras de uva (1-4), (A) primer dks001; (B) dks002; (C) dks003 e (D) dks007

Agradecimentos

Agradeço a UEM pela oportunidade e ao CNPq pela bolsa concedida.

Referências

GONÇALVES, J.A. **Paraná descobre nova variedade de uva.** Folha de São Paulo, São Paulo: 12 dez. Agrofolha1, 1995.

MAIA, S.H.Z. **Diversidade genética na videira Itália (*Vitis vinifera* L.), utilizando marcadores microssatélites.** 2009. 46f. Tese (Doutorado)-Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

OLIVEIRA-COLLET, S.A.; COLLET, M.A.; MACHADO, M.F.P.S. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). **Biochemical Systematics Ecology.** v. 33, n. 7, p. 691-703, 2005.

ORASMO, G.R.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Biochemical and genetic polymorphism for carboxylesterase and acetyesterase in grape clones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) cultivars. **Biochemical Genetic.** v. 45, n. 9-10, p. 663-670, 2007.

ROBERTO, S.R; ASSIS, A.M; GENTA, W; YAMAMOTO, L.Y; SATO, L.J. "Black Star": Uma mutação somática natural da uva fina de mesa cv. Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura.** v. 34, n. 3, p. 947-950, 2012.

SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil.** Piracicaba: FEALQ, 1996. p. 791.