



ESTUDO DE RETROTRANSPONSOS EM CULTIVARES DE UVAS FINAS DE MESA (*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: 2.02.00.00-5 Genética / Subárea: 2.02.03.00-4 Genética Vegetal

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

Resumo

A cultivar Itália foi desenvolvida pelo melhorista Ângelo Pirovano, na Itália, através do cruzamento de Bicané com Moscatel de Hamburgo, realizado em 1911. Nos parreirais desta uva tem se observado a ocorrência de mutações somáticas. Mutações somáticas em plantas de Itália originaram as cv. Rubi e Benitaka, a cv. Brasil surgiu através de mutações nas parreiras da cv. Benitaka e a cv. Black Star surgiu nos parreirais da cv. Brasil. Elementos transponíveis (TES) são descritos como os maiores contribuintes para propulsionar a variabilidade do genoma e, com isso, promover mutações somáticas. Nesse sentido, a proposta do presente trabalho foi analisar a diversidade genética em 5 cultivares de uva fina de mesa (*Vitis vinifera* L.), da região de Marialva, PR, em nível de DNA utilizando o marcador IRAP, baseado em polimorfismo de sequências de retrotransposons.

Introdução

Sousa, (1996) relata que entre as plantas mais antigas cultivadas pelo homem encontra-se a videira. No Brasil, nas regiões Norte e Noroeste do Paraná são cultivadas cinco uvas finas de mesa, sendo elas: Itália – de coloração verde, e as variedades de cor: Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star. O surgimento das cultivares de cor a partir da cultivar Itália, foram explicados pela ocorrência de mutações somáticas (CAMARGO, 1998). A uva Itália vem sendo mantida por propagação vegetativa, mas a ocorrência de mutações





somáticas parece ser um evento frequente, onde mutações somáticas em plantas de Itália geraram as cultivares Rubi e Benitaka. A ocorrência de mutação somática também foi verificada em plantas da cultivar Benitaka, que originou a cultivar Brasil. E recentemente no ano de 2006 surgiu a uva Black Star, a partir de uma mutação somática natural, em um parreiral comercial de uva Brasil, em Marialva (PR). Tendo em vista que, elementos transponíveis (TES) são descritos como os maiores contribuintes para propulsionar a variabilidade do genoma e, com isso, promover mutações somáticas, a proposta do presente trabalho foi analisar a diversidade genética em 5 cultivares de uva fina de mesa (*Vitis vinífera* L.) em nível de DNA utilizando a técnica IRAP (*Interretrotransposon Amplified Polimorphism*), marcador baseado em polimorfismo de sequências de retrotransposons.

Materiais e métodos

As amostras (folhas jovens) de 18 plantas das cultivares Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star de *Vitis vinífera* L. foram coletadas em propriedade rural do município de Marialva, e armazenadas em freezer a -80°C , até o momento da extração do DNA. As 90 amostras foram preparadas individualmente e o DNA foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Thomas et al. (1993). O DNA extraído de cada amostra foi quantificado utilizando o equipamento Picodrop. Para a escolha dos marcadores baseados nas sequências de retrotransposons polimórficos foram testados 24 *primers* LTR para uva e que fazem parte do banco de *primers* do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (DBC/UEM). A análise do IRAP foi realizada seguindo o método descrito por Kalendar et al., (1999). As amplificações foram realizadas utilizando o seguinte programa: um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 2 min; 30 ciclos com 94°C durante 30 s, 40 a 55°C durante 45 s, 72°C durante 1 min e 30 s; a extensão final foi 72°C durante 10 minutos, manutenção a 4°C . Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Resultados e Discussão

Dos 24 *primers* testados, foram selecionados 14, pois estes amplificaram regiões específicas e com indícios de polimorfismo. Dos 14 *primers* selecionados, 10 apresentaram regiões polimórficas, um total de (71,43%). Para estes *primers* selecionados foram amplificados 192





fragmentos (Tabela1). Para a análise das cinco cultivares de uva fina de mesa com o marcador IRAP, foram utilizadas 8 combinações entre os 14 *primers* LTR, dois a dois. As combinações foram realizadas desde que os *primers* apresentaram a mesma temperatura de anelamento. Estes *primers*, suas seqüências e o número de fragmentos amplificados por eles estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. *Primers*, seqüências de nucleotídeos dos *primers* LTR, temperatura de anelamento (T A) e número de fragmentos (N F) detectados para cada *primer* usado nas amostras das cinco cultivares de uva fina de mesa.

Primer	Seqüência	T A	N F	Mono/ Polimórfico
DKS 001	CCACGTCGTTGCCATTTGCCACC	55°C	12	Polimórfico
DKS002	GTGCCGCACGAGCTTAGTGAACGAC	55°C	7	Polimórfico
DKS003	GTTAGAATTCATGAGAGTTTGCC	40°C	16	Monomórfico
DKS004	TGTTGGGCTTTGTGGAGCCTAG	53°C	9	Polimórfico
DKS007	GAAGACAGAATAGAAGGGCACCCGC	53°C	16	Monomórfico
DKS011	GGGAAGTAAACAGAGGATGCTGGC	50°C	14	Monomórfico
DKS012	GCTAAGCTACCATGAGTCG	50°C	10	Polimórfico
DKS014	GTGGGTGGCCCACTAACCTCTGG	50°C	21	Polimórfico
DKS015	CACGGCCAGTGTGGTTATGCAG	50°C	14	Polimórfico
DKS016	GCCCAAGGGTTCTCCTAATCGGG	45°C	13	Polimórfico
DKS019	GGCCAAGGTATTCGGTCATTAC	45°C	19	Monomórfico
DKS020	GTGGAGGAAAGCCCAAAGCCGGG	50°C	11	Polimórfico
DKS022	CAAAGGTATTTCTCAATTCCC	42°C	13	Polimórfico
DKS024	GATCGCTCGGATTTTTGTGC	45°C	22	Polimórfico
Total			192	

Conclusões

Dos 24 *primers* LTR desenhados em nosso laboratório, quando testados, foram selecionados 14, sendo que estes amplificaram regiões específicas e com indícios de polimorfismo. Apesar dos 14 *primers* amplificados individualmente apresentarem-se com 71,43% de polimorfismo, e nas 8 combinações dos *primers* 37,5% serem polimórficos, os 192 fragmentos amplificados com os *primers* LTR e os 118 amplificados com a combinação dos *primers* LTR (IRAP) não parecem estar associados diretamente com





regiões que determinam a coloração das uvas finas de mesa, isto é com a produção do pigmento antocianina.

Tabela 2. Combinação dos *primers* LTR, caracterizando o marcador IRAP, temperatura de anelamento e o número de fragmentos detectados para cada *primer* usado nas amostras das cinco cultivares de uva fina de mesa.

Primer	T A	N F	Mono/Polimórfico
DKS001 e 002	55°C	9	Monomórfico
DKS004 e 007	53°C	10	Monomórfico
DKS011 e 015	50°C	13	Monomórfico
DKS011 e 012	50°C	16	Polimórfico
DKS011 e 020	50°C	17	Polimórfico
DKS016 e 019	45°C	13	Monomórfico
DKS003 e 022	42°C	13	Polimórfico
DKS011 e 014	49°C	17	Monomórfico
Total		118	

Agradecimentos

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

Referências

CAMARGO, U.A. Cultivares para a Viticultura Tropical no Brasil. **Informe Agropecuário – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**, v.19, n.194, p.15-19, 1998.

OLIVEIRA-COLLET, S.A., MACHADO, M.F.P.S. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). **Biochemical Systematic Ecology**, v. 33, n. 07, p. 691-703, 2005.

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. 03, p. 947-950, 2012.

SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 791p, 1996.

