



ESTUDO DE SEQUÊNCIAS SIMPLES REPETIDAS DO GENOMA DE UVAS FINAS DE MESA (*Vitis vinifera* L.)

Mayara Destro Passere (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Danuza Kelly Strioto (Orientadores), e-mail: mfpsmachado@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Maringá, PR.

Área: Genética / Subárea: Genética Vegetal

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, microssatélites, uvas de cor

Resumo

Entre as plantas mais antigas cultivadas pelo homem encontra-se a videira que desde os primórdios de sua existência, já se alimentava dos frutos desta planta. No Brasil, nas regiões Norte e Noroeste do Paraná, são plantadas cinco cultivares de uvas finas de mesa: Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star. A variação da coloração dos frutos é importante para a distinção de uvas cultivadas, mas as análises moleculares de DNA são essenciais para a identificação de variações e para investigar diferenças genéticas entre clones e cultivares de *Vitis vinifera* L. Nesse sentido, a proposta no presente estudo foi analisar o polimorfismo em locos SSR (microssatélites) para detectar a variabilidade genética nas uvas finas de mesa, Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star da região de Marialva, PR.

Introdução

A uva é uma das plantas mais antigas cultivada pelo homem que desde os primórdios de sua existência já se alimentava dos seus frutos. A cultivar Itália foi desenvolvida na Itália, a partir do cruzamento das variedades Bicané com Moscatel de Hamburgo (em 1911). Nos anos 50, passou a ser cultivada comercialmente no Estado de São Paulo, e na década de 60 foi difundida para o norte do Estado do Paraná e outras regiões desse estado. O cultivo da uva Itália no noroeste do Paraná foi iniciado com material propagativo oriundo do município de Ferraz de Vasconcelos (SP). A uva Itália vem sendo mantida por propagação





vegetativa, mas a ocorrência de mutações somáticas parece ser um evento frequente. A partir destas mutações foram descritas a cultivar Rubi e a Benitaka. A ocorrência de mutação somática também foi verificada em plantas da cultivar Benitaka, que originou a cultivar Brasil, e em 2006 surgiu a uva Black Star em um parreiral comercial de uva Brasil. A variação da coloração dos frutos é importante para a distinção de uvas cultivadas, mas de acordo com Meneghetti et al. (2009), as análises moleculares de DNA são essenciais para investigar diferenças genéticas entre clones e cultivares de uvas. Os marcadores SSR foram considerados como universalmente utilizados para a identificação das cultivares de videiras (THIS et al., 2004). Nesse sentido, a proposta no presente estudo é analisar o polimorfismo em locos SSR para avaliar a variabilidade genética em nível de DNA na cultivar Itália e seus mutantes somáticos (Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star).

Materiais e Métodos

As amostras (folhas jovens) de nove plantas de cada uma das cultivares Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star foram coletadas em uma propriedade rural do município de Marialva; estas foram acondicionadas em sacos de papel alumínio e mantidas em gelo. No laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV/UEM) as folhas das 45 plantas foram congeladas rapidamente com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer com -80°C , até o momento da extração do DNA. As amostras foram preparadas individualmente e o DNA foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Thomas et al. (1993). O DNA extraído foi quantificado utilizando um PicoDrop. Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e utilizadas para amplificar as sequências de microssatélites. Para a escolha dos marcadores microssatélites polimórficos foram testados 38 pares de *primers* previamente mapeados para uva e que fazem parte do banco de *primers* do LGBV. Dos 38 pares testados foram escolhidos aqueles que amplificaram regiões específicas e com indícios de polimorfismo entre as diferentes cultivares. A PCR foi preparada em microtubos de 0,2 mL, para cada reação foi utilizado 25 ng de DNA, tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl), 2 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de cada dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 0,3 μM de cada um dos *primers* Forward e Reverse específicos e água miliQ para um volume final de 20 μL de solução. Para a amplificação dos microssatélites foi usado o programa *Touchdown PCR* (DON et al., 1991) utilizando o termociclador Techne TC512. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose





comum 4% usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Os géis foram expostos a um campo elétrico de 60 Volts por 4 horas e corados em solução de brometo de etídio 0,5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$; a imagem foi capturada em transluminador LPIX HE, Loccus biotecnologia.

Resultados e Discussão

Dos 38 pares de *primers* testados, foram selecionados 13 que amplificaram regiões específicas e com indícios de polimorfismo. Destes, utilizamos 10 para amplificar o genoma das 45 amostras. O maior número de alelos foi observado na região amplificada pelo *primer* Udv-032 (5 alelos). Os *primers* Udv-011, Udv-074, Vvmd6 e Scuvv-14 amplificaram um só alelo e foram caracterizados como monomórficos. Estes *primers*, suas sequências e o número de alelos amplificados por eles estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* de microssatélites, sequências de nucleotídeos dos *primers* microssatélite F e R e o número de alelos detectados para cada *primer* usado nas amostras das cinco cultivares de uvas de cor.

Primer	Sequência de nucleotídeos	N. de alelos	Mono/polimórfico
Udv-032	CATGCGTATGTGTTAGAGAGCA ^(F) CATGGCATGTGCTTTGTTAT ^(R)	5	polimórfico
Vvmd5	CTAGAGCTACGCCAATCCAA ^(F) TATACCAAAAATCATATTCCTAAA ^(R)	2	polimórfico
Udv-034	AAGAGACCAAGGATAGATCAAACA ^(F) AAATGCAACGGGAGATGGTA ^(R)	2	polimórfico
Udv-011	TTTATGGCAACCCTCCAATC ^(F) TTGATGGTCCACTGGAACGTG ^(R)	1	monomórfico
Vvmd7	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT ^(F) CGAACCTTCACACGCTTGAT ^(R)	3	polimórfico
Vvmd6	ATCTCTAACCCCTAAAACCAT ^(F) CTGTGCTAAGACGAAGAAGA ^(R)	1	monomórfico
Scu14vv	CTGCACTTGAATACGAGCAGGT ^(F) TGTTATATGATCCTCCCCCTCT ^(R)	1	monomórfico
Vvmd28	AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGAGA ^(F) TCATCAATTTCTGATCTCTATTTGCTG ^(R)	2	polimórfico
Vvmd8	TAACAAACAAGAAGAGGAAT ^(F) AGCACATCCACAACATAATG ^(R)	2	polimórfico
Udv-074	GCCAGGGAAGTTGGTTCTCT ^(F) TGCATGTGTGTTTGCACAAG ^(R)	1	monomórfico





Conclusões

A proporção de locos microssatélites polimórficos avaliados no genoma das cultivares de uvas Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star foi alta, corresponde a 60%, mas a despeito da divergência de coloração dos frutos, há evidências de uma similaridade genética alta, e indicações de baixa divergência molecular entre as cinco cultivares nos 10 locos microssatélites analisados no presente estudo.

Agradecimentos

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

Referências citadas

DON, R.H., COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J., BAKER, K. & MATTICK, J.S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 4008, 1991.

MENEGHETTI, S.; COSTACURTA, A.; CRESPIAN, M.; MAUL, E.; HACK, R.; REGNER, F. Deepening inside the homonyms of Wild bacher by means of SSR markers. *Vitis*, v. 48, p. 123–129, 2009.

THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, R.; CONSTANTINI, L.; CRESPIAN, M.; GANGL, G.S.; EISENHEILD, C.; FERRIEIRAMONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBANEZ, J.; LACOMBE, T.; LAUCOU, V.; MAGALHÃES, R.; MEREDITH, C.P.; MILANI, N.; PETERLUNGER, E.; REGNER, F.; ZULINI, L.; MAUL, E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 1448-1458, 2004.

THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites, STSs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 985-990, 1993.

