

## ESTUDO DO GENE *VvmybA1* EM CULTIVARES DE UVAS FINAS DE MESA

Mariana Fernandes Rocha (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Danuza Kelly Strioto e Claudete Aparecida Mangolin (Orientadoras), e-mail: mangolimca@gmail.com

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

2.00.00.00-6 Ciências Biológicas 2.02.03.00-4 Genética Vegetal

**Palavras-chave:** Videira, Antocianina, Gret1

### Resumo:

A videira (*Vitis vinifera* L.) é a mais antiga das plantas cultivadas e domesticada, ela é economicamente a mais importante frutífera cultivada no mundo. Várias características morfológicas e bioquímicas que são importantes para esta cultura foram selecionadas durante a domesticação, entre elas podemos citar o hermafroditismo, maior uniformidade na maturação das bagas dentro do cacho, maior teor de açúcar e a seleção de uma vasta gama de cores dos frutos. As uvas cultivadas atualmente apresentam uma maior diversidade na cor do fruto, incluindo várias tonalidades de preto, vermelho, rosa, cinza, branco e cultivares com a polpa da baga pigmentada. Existem mutantes de cor para uma grande variedade de cultivares possibilitando o desenvolvimento de diferentes classes de vinhos, sucos e cultivares de uvas de mesa. Uma hipótese para a origem destas diferentes colorações, pode estar associada com o papel funcional do locus *VvmybA1*. O objetivo deste trabalho foi genotipar o locus *VvmybA1* utilizando diferentes conjuntos de *primers* e associar os diferentes alelos com variações de cores das bagas das cultivares de uvas finas de mesa, Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star cultivadas em Marialva-PR.

### Introdução

Os pigmentos antocianinas são responsáveis por uma grande gama de cores exibidas por diferentes órgãos das plantas. Os genes reguladores principais que atuam na via de controle e biossíntese de antocianina em plantas, têm sido identificados como pertencentes a dois grandes grupos de fatores de transcrição, as famílias *MYB* e *bHLH* (KOBAYASHI et al. 2002). A videira (*Vitis vinifera* L.) é a frutífera cultivada economicamente mais importante no mundo. Como resultado da hibridação natural e seleção humana ao longo dos séculos, a cor da casca da baga das uvas tornou-se muito diversificada. Existem mutantes de cor para uma grande variedade de cultivares, possibilitando o desenvolvimento de diferentes classes de vinhos, sucos, e cultivares de uvas de mesa, este desenvolvimento possui grande significado cultural que se estende a milhares de anos na história humana.

Através da análise de segregação para cor das bagas identificaram a presença de um único *locus* responsável pela presença ou ausência de cor da casca da uva, este gene está no grupo de ligação 2 (LG2) (ADAM-BLONDON et al. 2004), e os frutos brancos apresentam um caráter recessivo. Esta observação é suportada por trabalhos que demonstraram que cruzamentos controlados entre as videiras de frutos brancos resultam sempre em progenies de frutos brancos. Tem sido mostrado que a presença do Gret1, um retrotransposon do tipo Gypsy-tipo Ty3, na região promotora do gene *VvMybA1*, está associada com as cultivares de bagas brancas, quando presente em homozigose (KOBAYASHI et al. 2004).

Como até o momento não há informação disponível para explicar a origem das diferentes colorações nas cultivares de uvas finas de mesa, Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star, existe a necessidade de estudos que possam levar a compreensão de como estas diferentes cultivares foram originadas. O objetivo do presente estudo foi genotipar o *locus VvmybA1* e investigar a associação dos diferentes alelos com as variações de cores das bagas das cultivares de uvas finas de mesa, Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star cultivadas em Marialva-PR.

## **Materiais e métodos**

### ***Material Biológico, Extração e quantificação do DNA***

As folhas jovens de quatro plantas das cultivares Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Black Star de *Vitis vinifera* L. foram coletadas em propriedade rural de Marialva, estas foram acondicionadas em papel alumínio e mantidas em gelo. No laboratório as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C. O DNA das 20 plantas das cinco cultivares de uvas foi extraído seguindo método descrito por Thomas et al. (1993). O DNA de cada amostra foi quantificado utilizando o equipamento Picodrop. Após a quantificação, as amostras foram diluídas para a concentração de 10 ng/μL e utilizadas para amplificar as sequências específicas.

### ***Amplificação e estudo do gene VvmybA1***

As regiões do gene *VvmybA1* e do promotor foram amplificadas para as 20 plantas das cinco cultivares de uvas de cor, utilizando combinações de *primers* já desenhados para estas regiões, sendo elas: *VvmybA1a*; *VvmybA1d3*; *VvmybA1b*; *VvmybA1e1*; *VvmybA1c*; *VvmybA1d*. As combinações utilizadas foram entre os *primers a e d3*; *b e d3*; *b e e1*; *a e c*; *b e c*; *b e d*. A reação de PCR foi preparada em microtubos de 0,2 mL, utilizando para a reação 20 ng de DNA, tampão de reação 1X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de Taq-DNA Polimerase e 0,3 μM dos *primers* específicos e água mili-Q para um volume final de 20 μL.

Aos produtos das amplificações foram acrescentados 2μL de tampão Loading e separados em gel de agarose 1,2%, usando tampão TBE 0,5X. Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de 100pb DNA Ladder. Realizou-se eletroforese a 60 Volts, por 4 horas, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL. A imagem foi capturada em transluminador L-PIX HE, Loccus biotecnologia.

## Resultados e Discussão

O DNA das amostras das cinco cultivares de uvas de cor (Itália, Rubi, Brasil, Benitaka e Black Star) foram amplificadas utilizando as diferentes combinações de *primers* do gene *VvmybA1* e do promotor. Os produto da amplificação para a combinação dos *primers a* e **d3** está apresentado na figura 01A, para as cultivares Itália e Rubi encontramos o alelo 1200 pb e para as demais cultivares (Brasil, Benitaka e Black Star) além deste alelo observou-se também o alelo 1500pb. Na figura 01B estão apresentados os resultados da amplificação do DNA das cinco diferentes cultivares utilizando a combinação dos *primers b* e **d3** para o gene *VvmybA1*. Observa-se um alelo comum para todas as cultivares (600 pb) e para as quatro amostras da cultivar Rubi observa-se a presença de um segundo alelo (1200 pb) caracterizando esta cultivar como heterozigota.

Na figura 01C estão apresentados os resultados da amplificação do DNA das cinco diferentes cultivares utilizando a combinação dos *primers b* e **e1** para o gene *VvmybA1*. Para esta região amplificada observa-se um alelo comum (1200 pb) para todas as cultivares avaliadas.

Na figura 01D estão apresentados os resultados da amplificação do DNA das cinco diferentes cultivares utilizando a combinação dos *primers a* e **c** para o gene *VvmybA1*. Observa-se um alelo comum para todas as cultivares (1500 pb) e para as amostras das cultivares Brasil, Benitaka e Black Star observa-se a presença de um segundo alelo (2000 pb) caracterizando estas cultivares como heterozigotas.

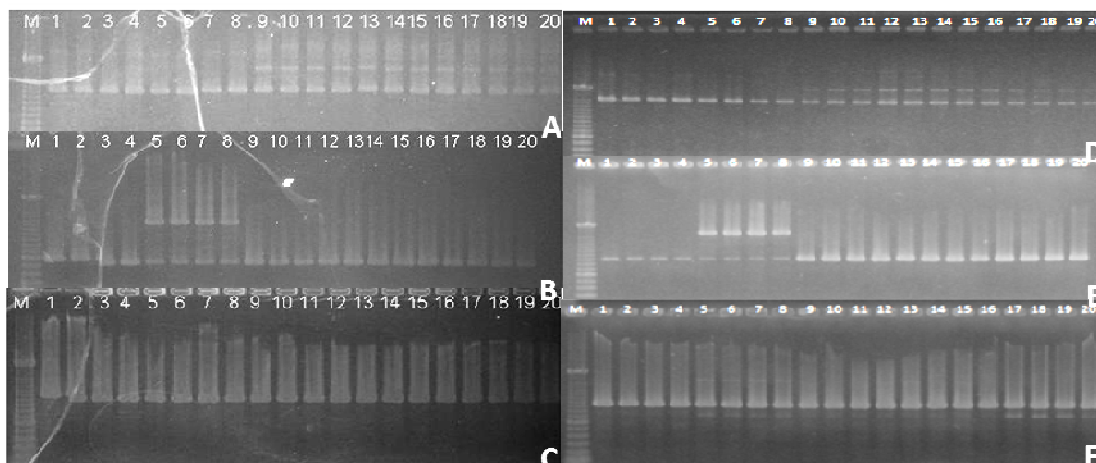


Figura 01. **A.** Produto da amplificação para a combinação dos primers **a** e **d3** para o gene *VvmybA1*; **B.** Produto da amplificação para a combinação dos primers **b** e **d3** para o gene *VvmybA1*; **C.** Produto da amplificação para a combinação dos primers **b** e **e1** para o gene *VvmybA1*; **D.** Produto da amplificação para a combinação dos primers **a** e **c** para o gene *VvmybA1*; **E.** Produto da amplificação para a combinação dos primer **b** e **c** para o gene *VvmybA1*; **F.** Produto da amplificação para a combinação dos primers **b** e **d** para o gene *VvmybA1*. Amostras de 1 a 4 cultivar Itália, de 5 a 8 cultivar Rubi, 9 a 12 cultivar Brasil, 13 a 16 cultivar Benitaka e de 17 a 20 da cultivar Black Star e M marcador molecular de 100pb.

Na figura 01E estão apresentados os resultados da amplificação do DNA das cinco diferentes cultivares utilizando a combinação dos *primers b* e *c* para o gene *VvmybA1*. Observa-se um alelo de 900 pb que é comum para todas as cultivares, para as quatro amostras da cultivar Rubi além deste alelo observa-se também a presença de um segundo alelo de 1500 pb. Na figura 01F estão apresentados os resultados da amplificação do DNA das cinco diferentes cultivares utilizando a combinação dos *primers b* e *d* para o gene *VvmybA1*. Observa-se um alelo de 900 pb comum para todas as cinco cultivares e para as quatro amostras da cultivar Rubi e para as quatro amostras da Black Star observa-se a presença de um segundo alelo (700 pb).

### Conclusões

A inserção ou não do retrotransposon Gret1 no gene *VvmybA1* resulta em diferentes fragmentos amplificados (alelos) quando diferentes *primers* são utilizados na PCR. Observa-se que as diferentes cultivares podem apresentar o mesmo fragmento amplificado quando os *primers b* e *e1* são utilizados, ou observa-se diferentes fenótipos (demais *primers*), que estão associados com as diferentes cores. O mecanismo de associação da posição de inserção do retrotransposon Gret1 no gene *VvmybA1* produzindo diferentes alelos como produto da PCR e a coloração da baga está sendo estudado.

### Agradecimentos

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

### Referências

ADAM-BLONDON, A. F.; ROUX, C.; CLAUX, D.; BUTTERLIN, G.; MERDINOGLU, D.; THIS, P. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 5, p. 1017-1027, 2004.

KOBAYASHI, S.; ISHIMARU, M.; HIRAOKA, K.; HONDA, K. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labrusca*) regulate anthocyanin biosynthesis. **Planta**, v. 215, n. 6, p. 924-933, 2002.

KOBAYASHI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HIROCHIKA, H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. **Science**, v. 304, n. 5673, p. 982-982, 2004.

THOMAS, M. R.; MATSUMOTO, S.; CAIN, P.; SCOTT, N. S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, n. 2, p. 173-180, 1993.