

MELHORAMENTO GENÉTICO DE UVAS DE MESA NA EMBRAPA UVA E VINHO: AVALIAÇÃO DA HERANÇA DA APIRENIA VISANDO A IMPLEMENTAÇÃO DA SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

Luis Fernando Revers^{2✉}, Vanessa Sawatzky Lampe¹, Júlio César de Lima³ Paulo Ricardo Dias de Oliveira², Umberto Almeida Camargo² e Lucas da Ressurreição Garrido²

Introdução

A falta de cultivares apirênicas (uvas sem sementes) adaptadas às condições ambientais do Brasil, além de limitar a capacidade de exportação, afeta a competitividade da uva brasileira também no mercado interno, aberto à comercialização de uvas importadas (Protas et al., 2003). Ao lançar as três primeiras cultivares brasileiras de uva sem semente, a Embrapa Uva e Vinho iniciou, deu um passo importante para assegurar a competitividade, a sustentabilidade e a independência tecnológica da viticultura de mesa nas regiões tropicais e subtropicais do Brasil. No entanto, a busca de novas cultivares com características de produção melhores permanece como um desafio constante (Camargo et al., 2003a, 2003b, 2003c).

Na videira, a ausência de sementes é resultante de dois processos biologicamente distintos: partenocarpia ou estenoespermocarpia (Pratt, 1971). No processo de estenoespermocarpia, conforme a definição de Stout (1936), o desenvolvimento do óvulo e do endosperma iniciado após a fertilização, resulta em degeneração prematura do endosperma e consequente morte do embrião, levando a produção de frutos contendo traços de sementes não esclerificados. Estudos com o objetivo de estabelecer uma hipótese sustentada para a herdabilidade da apirenia estenoespermocárpica remontam há vários anos (revisão em Stout, 1936; Bouquet & Danglot, 1996). No entanto, apesar de inúmeros esforços dos melhoristas nos últimos 70 anos, a herança da estenoespermocarpia na videira ainda permanece pouco compreendida. Atualmente, a hipótese melhor sustentada para explicar a genética complexa da estenoespermocarpia foi proposta por Bouquet & Danglot (1996). Neste estudo, estes autores sugerem que a expressão da estenoespermocarpia é controlada por três genes recessivos independentemente herdados e controlados por um gene regulador dominante. Lahogue et al. (1998), aplicando a metodologia de BSA (Bulk Segregant Analysis) identificaram um marcador RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) intimamente ligado ao gene *sdl* (gene regulador dominante do fenótipo da apirenia); que foi utilizado para desenvolvimento de um SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) codominante denominado SCC8. Segundo estes autores, este marcador codominante pode identificar, em uma progênie, indivíduos com semente como também ser utilizado para selecionar indivíduos apirênicos.

Neste trabalho, a equipe do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal da EMBRAPA Uva e Vinho apresenta resultados que sustentam a hipótese de herança da apirenia estenoespermocárpica proposta por Bouquet & Danglot (1996) e avaliam o potencial da aplicação do marcador molecular SCAR SCC8 para seleção assistida do caráter da apirenia.

Material e Métodos

Material Vegetativo: os genótipos de videira utilizados neste trabalho são resultantes do cruzamento 154, entre as cultivares Seyve Villard 12327 e CG87746 (apirênica); do cruzamento 692, entre as cultivares Seyve Villard 12375 e Crimson Seedless P165 (apirênica); de seleções apirênicas do programa de melhoramento da Embrapa Uva e Vinho (Seleções 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8) e de cultivares de uva de mesa apirênicas (Canadice, Flame Sds., Reliance, Ruby Sds., Muscat Sds., Autumn Royal, Fantasy, Superior, Maroo, Saturn, Centennial e Thompson Sds.), totalizando 137 plantas. Os critérios descritos por Lahogue et

al. (1998) foram utilizados para definição das categorias fenotípicas de classificação da apirenia (% matéria seca $\geq 55\%$: classe 1 - semente normal; % matéria seca < 55 e $\geq 44\%$: classe 2 - traço de semente grande; % matéria seca < 45 e $\geq 35\%$: classe 3 - traço de semente perceptível; % matéria seca $< 35\%$: classe 4 - ausência de semente).

Extração de DNA: amostras de folhas expandidas jovens foram coletadas durante a estação de crescimento e armazenadas à -20°C para posterior extração de DNA; utilizando-se o método descrito por Lodhi et al (1994).

Reação da PCR: 9ng de DNA, 250 μM dNTPs, DMSO 5%, 10pMoles de cada *primer* (SCC8F 5'GGTGTCAAGTTGGAAGATGG3' e SCC8R 5'TATGCCAAAAACATCCCC3'), 0,5U de Tth DNA polimerase (Biotools), tampão e 2 μM de MgCl_2 . O volume final da reação (20 μl) foi ajustado com água ultrapura. O programa utilizado no termociclador foi: 94°C por 4min, 35 ciclos de amplificação (94°C por 1min, 60°C por 1min e 72°C por 1min) e extensão final a 72°C por 6min. Indivíduos que não apresentaram produto de amplificação na reação com SCC8, foram re-avaliados utilizando-se pelo menos outras duas amostras de DNA independentes para confirmar a presença de um alelo nulo no locus SCC8.

Digestão do produto de amplificação: os produtos de amplificação da reação com SCC8 (1018pb), foram digeridos em uma reação com volume final de 15 μl , utilizando-se 7 μl da reação de PCR e 2,5U da endonuclease de restrição BglII durante 3h a 37°C .

Eletroforese e Fotodocumentação: os produtos da amplificação foram resolvidos em gel de agarose 1,5 ou 2% contendo brometo de etídio e fotodocumentados com auxílio do sistema Eagle Eye II - Still Video System.

Resultados e Discussão

A característica codominante do marcador SCC8 permitiu a diagnose de 3 alelos no *locus* SCC8 (SCC8: 1020pb; scc8: 788pb+232pb após digestão com Bgl II e 0: alelo nulo) (Figura 1 e Tabelas 1) e 4 genótipos segregantes (SCC8/0; SCC8/scc8; scc8/0 e 0/0),. Indicando que ambos os genitores do cruzamento 692 (Crimson Seedless P165 e Seyve Villard 12375) são heterozigotos para o *locus* SCC8. O teste de independência χ^2 mostrou que a segregação genotípica observada para o *locus* SCC8 não desvia significativamente da segregação esperada 1:1:1:1 ($\chi^2_{\text{calc}} = 3,53$; $p = 0,05$). A análise de correlação entre as classes fenotípicas observadas e a presença do alelo SCC8 confirmou a associação entre esse alelo e a ausência de sementes ($r_{\text{calc}} = 0,66$; $p = 0,01$), confirmando os relatos de Lahogue et al. (1998) e Adam-Blondon et al (2001). Para ampliar o espectro do estudo e avaliar se a mesma associação entre a apirenia e a presença de SCC8 ocorre em outras populações, o mesmo procedimento foi aplicado para avaliar híbridos com e sem semente resultantes do cruzamento 154, seleções apirênicas e cultivares de uva sem semente já utilizadas comercialmente (Tabela 2). Após a diagnose dos alelos, observou-se que, entre os híbridos da população 154, a análise de correlação aplicada indicou associação entre a presença de SCC8 e a ausência de sementes ($r_{\text{calc}} = 0,74$; $p = 0,01$). Nos demais genótipos apirênicos, incluindo-se cultivares e seleções avançadas, a presença de SCC8 ocorreu em todos os casos, indicando o bom potencial de distinção fenotípica deste marcador. Adicionalmente, o teste de independência χ^2 mostrou que a distribuição fenotípica não desviou da segregação esperada de 1:1 (apirenia:pirenia) no *locus* SCC8 na população 692, sustentando a hipótese proposta por Bouquet e Danglot (1996) para herança da apirenia.

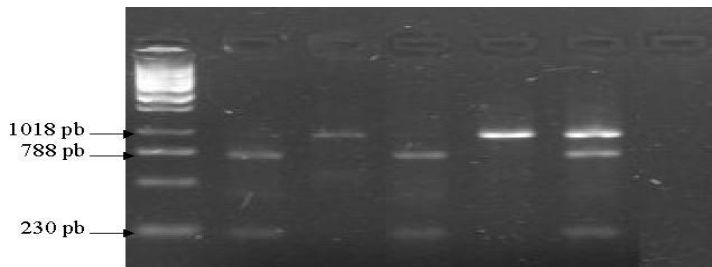


Figura 1: Possíveis genótipos resultantes no locus *SCC8* após digestão com *Bgl*II.. Onde: M= marcador 1kb, 1 e 2: genitores do cruzamento 692 (Seyve Villard 12375 e Crimson Seedless P165, respectivamente); 3, 4, 5 e 6: possíveis genótipos segregantes.

Conclusão

A utilização do marcador molecular *SCC8* para seleção assistida da ausência de sementes na videira é promissora, porém a eficiência de sua utilização em grande escala ainda necessita melhor avaliação, afim de que esta ferramenta se torne eficiente na identificação do caráter da apirenia e na economia de tempo e insumos no programa de melhoramento das cultivares de uva sem semente da Embrapa Uva e Vinho.

Tabela 1. Classificação fenotípica e segregação genotípica dos indivíduos da população 692. Crim. P165 e SV 12375 representam os genitores do cruzamento 692; %MS: porcentagem de matéria seca; CF: classe fenotípica e nd: valor não determinado.

Indivíduo	%MS	C.F.	Genótipos	Indivíduo	%M.S.	C.F.	Genótipos	Indivíduo	%M.S.	C.F.	Genótipos
Crim P165	<35,00	4	SCC8/O	142	nd		0/0	282	77,12	1	0/0
SV 12375	>55,00	1	SCC8/0	143	nd		SCC8/SCC8	287	46,45	2	SCC8/scc8
1	63,07	1	SCC8/scc8	145	nd		SCC8/scc8	291	66,19	1	scc8/0
2	nd		scc8/0	147	51,06	2	SCC8/scc8	300	69,56	1	0/0
4	nd		SCC8/scc8	157	45,71	2	SCC8/scc8	301	44,80	3	SCC8/0
5	66,82	1	0/0	162	65,30	1	SCC8/scc8	303	45,70	2	SCC8/0
13	45,85	2	SCC8/0	163	40,70	3	SCC8/0	304	52,73	2	SCC8/scc8
23	nd		SCC8/0	164	nd		nd	305	50,32	2	SCC8/scc8
24	68,82	1	0/0	170	48,22	2	SCC8/scc8	307	62,45	1	SCC8/scc8
30	nd		SCC8/0	178	nd		scc8/0	310	69,58	1	0/0
43	nd		scc8/0	187	59,48	1	SCC8/0	324	67,09	1	0/0
44	44,39	3	SCC8/scc8	189	67,33	1	scc8/0	325	49,14	2	SCC8/0
46	54,71	2	SCC8/scc8	199	nd		SCC8/0	329	67,17	1	scc8/0
60	70,52	1	0/0	200	52,27	2	SCC8/scc8	335	46,88	2	SCC8/scc8
62	66,10	1	SCC8/0	203	nd		SCC8/0	336	47,95	2	SCC8/0
64	nd		SCC8/0	204	62,85	1	scc8/0	348	44,13	3	SCC8/scc8
69	46,45	2	SCC8/scc8	206	nd		SCC8/scc8	349	nd		scc8/0
76	66,74	1	SCC8/scc8	209	46,93	2	SCC8/0	350	nd		0/0
80	nd		0/0	213	66,51	1	scc8/0	354	45,26	2	SCC8/scc8
85	46,35	2	SCC8/0	218	69,99	1	SCC8/0	357	nd		0/0
88	nd		SCC8/0	220	nd		SCC8/0	358	nd		0/0
96	64,91	1	0/0	221	nd		SCC8/0	360	nd		SCC8/scc8
98	72,67	1	scc8/0	224	77,69	1	SCC8/0	362	47,03	2	SCC8/scc8
100	64,70	1	scc8/0	228	nd		SCC8/0	363	53,51	2	SCC8/scc8
102	60,52	1	scc8/0	229	64,68	1	SCC8/0	366	49,39	2	SCC8/0
107	nd		SCC8/0	230	48,23	2	0/0	367	65,81	1	0/0
114	nd		scc8/0	244	64,03	1	0/0	374	47,18	2	SCC8/0
121	71,05	1	0/0	245	68,05	1	0/0	375	64,46	1	0/0
125	66,77	1	scc8/0	250	nd		0/0	381	71,16	1	0/0
129	nd		0/0	259	49,76	2	SCC8/0	389	71,57	1	scc8/0
130	68,22	1	0/0	270	67,10	1	scc8/0	397	nd		SCC8/scc8
141	45,87	2	SCC8/0	280	46,95	2	SCC8/0				

Tabela 2. Classificação fenotípica e genotípica de grupos de indivíduos do apirênicos (GA) e com semente (GS) da população 154, de cultivares de uva de mesa apirênicas e de seleções apirênicas. %MS: porcentagem de matéria seca; CF: classe fenotípica e nd= valor não determinado.

Indivíduo	%M.S.	CF	Genótipos	Indivíduo	%M.S.	CF	Genótipos
CG 87746	>35,00	4	SCC8/0	Canadice	>35,00	4	SCC8/scc8
SV 12327	<55,00	1	scc8/0	Flame Sds.	>35,00	4	SCC8/?
GA20	31,45	4	SCC8/scc8	Reliance	>35,00	4	SCC8/?
GA22	32,28	4	nd	Ruby Sds.	>35,00	4	SCC8/?
GA24	28,12	4	SCC8/scc8	Muscat Sds.	>35,00	4	SCC8/scc8
GA27	27,10	4	scc8/0	Autumm Royal	>35,00	4	SCC8/?
GA34	32,29	4	SCC8/scc8	Fantasy	>35,00	4	SCC8/?
GA43	29,60	4	SCC8/scc8	Superior	>35,00	4	SCC8/scc8
GA56	30,39	4	SCC8/scc8	Crimson Sds.	>35,00	4	SCC8/?
GA72	0,00	4	SCC8/scc8	Maroo	>35,00	4	SCC8/scc8
GA80	32,03	4	SCC8/scc8	Saturn	>35,00	4	SCC8/?
GA145	31,57	4	SCC8/scc8	Centennial	>35,00	4	SCC8/?
GA160	27,95	4	SCC8/scc8	Thompson Sds.	>35,00	4	SCC8/?

Tabela 2. Continuação...

GS19	60,70	1	scc8/0	Seleção 1	>35,00	4	SCC8/?
GS48	57,73	1	SCC8/scc8	Seleção 2	>35,00	4	SCC8/?
GS49	61,69	1	scc8/0	Seleção 3	>35,00	4	SCC8/?
GS69	57,95	1	scc8/0	Seleção 5	>35,00	4	SCC8/?
GS94	60,28	1	scc8/0	Seleção 6	>35,00	4	SCC8/?
GS112	64,20	1	scc8/0	Seleção 7	>35,00	4	SCC8/?

GS114	56,95	1	SCC8/scc8	Seleção 8	>35,00	4	SCC8/?
GS134	59,30	1	scc8/0				
GS149	57,02	1	scc8/0				

Referências Bibliográficas

- ADAM-BLONDON, A-F.; LAHOGUE-ESNAULT, F.; BOUQUET, A.; BOURSQUOT, J.M. & THIS, P. Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars. **Vitis**, v. 40, n. 3, p. 147-155, 2001.
- BOUQUET, A. & DANGLOT, Y. Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.) **Vitis**, v.35, n. 1, p. 35-42, 1996.
- CAMARGO, U.A.; NACHTIGAL, J.C.; MAIA, J.D.G.; OLIVEIRA, P.R.D.; PROTAS, J.F.S. BRS Clara - Nova cultivar de uva branca de mesa sem semente. **Embrapa Uva e Vinho**, Comunicado Técnico 46, 2003a.
- CAMARGO, U.A.; NACHTIGAL, J.C.; MAIA, J.D.G.; OLIVEIRA, P.R.D.; PROTAS, J.F.S. BRS Linda - Nova cultivar de uva branca de mesa sem semente. **Embrapa Uva e Vinho**, Comunicado Técnico 46, 2003b
- CAMARGO, U.A.; NACHTIGAL, J.C.; MAIA, J.D.G.; OLIVEIRA, P.R.D.; PROTAS, J.F.S. BRS Morena - Nova cultivar de uva preta de mesa sem semente. **Embrapa Uva e Vinho**, Comunicado Técnico 46, 2003c
- LAHOGUE, F.; THIS, P.; BOUQUET, A. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 950-959, 1998.
- LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F. & REISCH, B.I.; A simple and efficient method for DNA extractio from grapevine cultivars and Vitis species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, p. 6-13, 1994.
- PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A.; MELLO, L.M.R. A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. Disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/vitivini.html>, Acessado em 10/08/2004.
- PRATT, C. Reproductive anatomy in cultivated grapes- a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 22, p. 92-109, 1971.
- STOUT, A. B. Seedlessness in grapes. **New York Agricult. Exp. Sta. Tech. Bull.** V. 238, 1936.