

MELHORAMENTO GENÉTICO DA VIDEIRA NA EMBRAPA UVA E VINHO: UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA PROTEÇÃO INTELECTUAL E AFERIÇÃO DA IDENTIDADE GENOTÍPICA

Danielle C. S. Serafim¹, Philipe B. Irala¹, Vanessa S. Lampe², Caroline Moor Wagner¹, Luis Fernando Revers³✉, Umberto Almeida Camargo³, Paulo Ricardo Dias de Oliveira³, Lucas da Ressurreição Garrido³, Carlos Alberto Ely Machado³

Introdução

Microssatélites são seqüências de 1 a 4 pares de bases repetidas e adjacentes e cuja presença no genoma vegetal foi demonstrada em 1983 por Delseny et al. O que distingue os microssatélites é a sua natureza multi-alélica, codominante, abundância e ampla distribuição no genoma. Estas seqüências apresentam alto grau de polimorfismo no número de vezes que repetem, gerando polimorfismo dos tamanhos de fragmentos amplificados por *primers* específicos para as regiões que flanqueiam estas repetições.

Devido a estas características, em revisão realizada por Sefc et al. (2001), os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são os mais utilizados para a identificação de cultivares de videira, permitindo também a reconstrução de pedigrees, construção de mapas genéticos, identificação de sinônimos e *fingerprintings*.

A descrição de uma cultivar pode ser feita a partir de descritores fenotípicos, entretanto estes estão sujeitos a limitações, entre elas a interação genótipo X ambiente no caso de características quantitativas e a dificuldade de distinguir espécies de base genética estreita. A utilização de técnicas moleculares na obtenção de *fingerprintings* para a caracterização de cultivares, oferecem uma elevada precisão pois acessam a variabilidade diretamente ao nível do DNA e permitem a obtenção de grande número de descritores não influenciados pelo ambiente e estágio de desenvolvimento da planta.

Marcadores SSR vem sendo amplamente utilizados no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal da Embrapa Uva e Vinho (LBMV) como ferramentas auxiliares ao programa de melhoramento genético de videiras (PMGV). Permitindo exames de similaridade (identificação de sinônimos, isto é, genótipos iguais conhecidos por nomes diferentes), a recuperação de genealogias e também a proteção intelectual de materiais desenvolvidos na Embrapa Uva e Vinho.

Neste trabalho, a equipe do LBMV da Embrapa Uva e Vinho apresenta resultados referentes à utilização de SSRs para: exame de similaridade, recuperação de genealogias e *fingerprintings* de cvs., a fim de realizar o registro de propriedade intelectual.

¹ Bolsista DTI / CNPq

² Bolsista IC / Embrapa Uva e Vinho

³ Pesquisador Embrapa Uva e Vinho

✉ Embrapa Uva e Vinho, C.P. 130, 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail: luis@cnpuv.embrapa.br

Materiais e Métodos

A extração de DNA de folhas de videira foi realizada conforme Lodhi et al. (1994). Para a PCR utilizou-se: 9 ng de DNA, 250 µM de dNTPs, DMSO 5%, 20 pMoles de *primers*, 0,4 U de *Tth* DNA polimerase (Biotools), tampão da enzima e 2 mM MgCl₂ em um volume final de 20 µl.

A amplificação foi realizada com temperaturas de pareamento variando entre 62 a 47°C dependendo do *primer* utilizado, sendo reduzida em 1 °C por ciclo nos primeiros 5 ciclos. A desnaturação inicial foi feita a 94 °C por 5 min e as subsequentes por 1 min. A extensão foi realizada a 72 °C por 1 min. Ao total foram realizados 35 ciclos de amplificação.

No teste de similaridade, as estimativas dos coeficientes das distâncias genéticas foram obtidas conforme Bowcock et al. (1994). O dendograma foi gerado pelo método de Agrupamento hierárquico UPGMA. A estimativa da probabilidade das cvs. Catalunha e Thompson Seedless (Sds.) serem idênticas foi obtida conforme Paetkau et al. (1995). Os cálculos foram realizados utilizando os programas de análise de dados Identity (Wagner & Sefc, 1999; www.boku.ac.at/zag/identity.htm), NTSYS e Excel.

Os fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de poliacrilamida 6%, 7 M de uréia, utilizando-se 80W de potência por 2,5h em cuba de eletroforese vertical. E a coloração foi realizada com nitrato de prata conforme Creste et al. (2001).

Resultados e discussão

Exame de similaridade

Um teste de similaridade entre as cultivares Catalunha e Thompson Sds. foi realizado no LBMV, devido a demanda indicada por produtores, de verificar a possibilidade de padronizar a nomenclatura dessas cultivares. Catalunha é uma cultivar de uva sem semente, introduzida no Vale do Submédio São Francisco, entre 1980 e 1990, misturada à lotes de mudas de Red Globe, importadas da Califórnia - EUA. Não tendo sido identificada, foi regionalmente denominada com o nome da Fazenda Catalunha, onde fora plantada inicialmente. Mais tarde verificou-se sua semelhança ampelográfica com Thompson Sds.

Amostras de DNA das cvs. Catalunha, Thompson Sds. e outras 14 cvs. de uva sem semente foram extraídas. Um *screening* de *primers* polimórficos foi realizado com 18 locus SSR (VVMD 6, 7, 17, 19, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36 e 37; VVS 3, 4, 29) para Catalunha, Thompson e Centennial. Para 5 locus de SSR polimórficos (VVMD 6, 7, 31, 32 e VVS29) todas as 16 cvs. foram testadas. O teste de similaridade detectou sempre marcas de mesmo padrão nas cvs. Catalunha e Thompson Sds. As estimativas da diversidade genética entre as 16 cultivares (Figura 1) indicam que Catalunha e Thompson Sds. são iguais. Esse resultado é confirmado pela estimativa da probabilidade de identidade, no qual obteve-se 99,9% de probabilidade de Catalunha e Thompson Sds. serem idênticas.

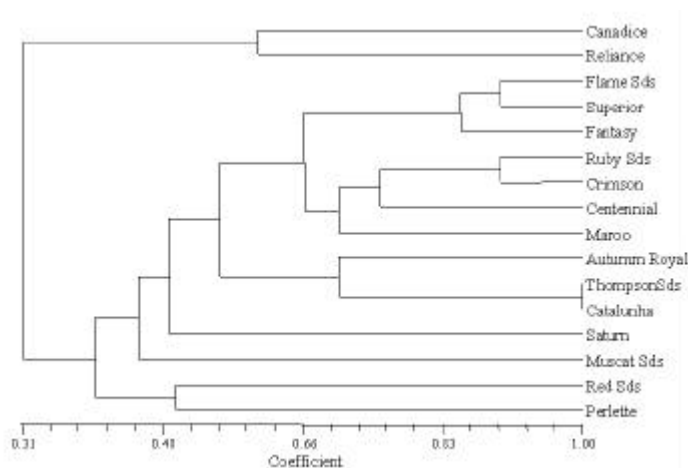


Figura 1. Dendrograma das distâncias genéticas (Bowcock et al., 1994) de 16 cvs. de uva sem semente obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA. Embrapa Uva e Vinho, 2003.

Exame de paternidade e recuperação da genealogia da cultivar BRS Clara

Esta demanda surgiu da necessidade de se recuperar a genealogia da cultivar elite denominada BRS Clara. O teste de paternidade iniciou com 18 supostos genitores e 13 *loci* SSR foram utilizados (VVMD 6, 7, 13, 19, 21, 25, 26, 29, 32, 34; VVS 3, 4 e 29). Após análise dos padrões de amplificação, foram inicialmente excluídos 11 indivíduos. Dentre os sete restantes, seis eram irmão completos, fato que inviabiliza o cruzamento entre esses devido a depressão endogâmica e o outro Centennial. Assumindo-se, pela razão referida, Centennial como um dos genitores foi possível excluir mais 4 indivíduos. Restaram desta forma duas possibilidades de cruzamento: Centennial x CNPUV 154-147 ou Centennial x CNPUV 154-90. A dificuldade em distinguir CNPUV 154-147 de CNPUV 154-90 ocorre devido a estreita base genética entre eles. Para diferenciação molecular entre esses dois indivíduos seriam necessários um número maior de *loci* SSR. Com base na experiência do melhorista do PMGV da Embrapa Uva e Vinho, detectou-se que os genitores da BRS-Clara são CNPUV 154-147 e Centennial. Chegou-se a essa conclusão, pois Centennial e CNPUV 154-90 não possuem sabor moscatel característico da BRS-Clara e presente em CNPUV 154-147. Na figura 2 a BRS-Clara está ao lado de seus genitores sendo possível visualizar os alelos herdados de cada um deles.

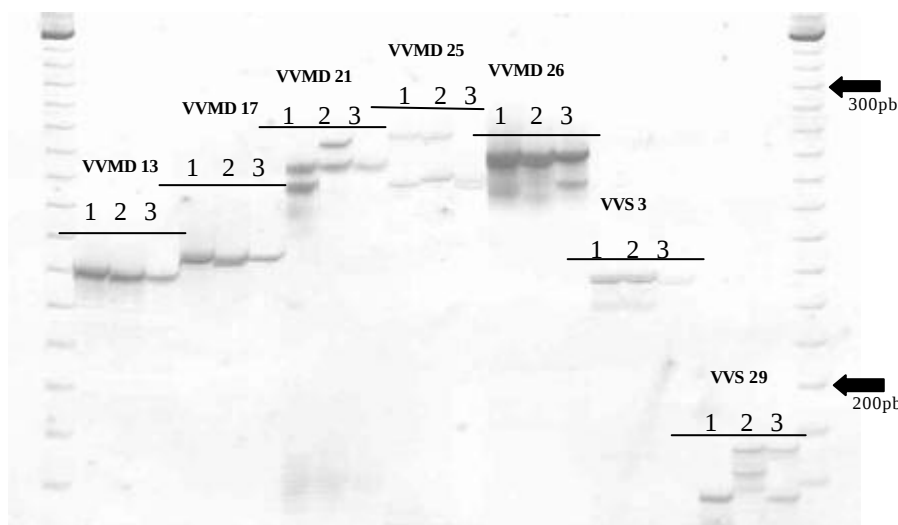


Figura 2. Amplificações obtidas para sete locus microssatélites. 1) Centennial, 2) CNPUV 154-147, 3) BRS-Clara. Lado a lado pais e filho tornando possível identificar qual o pai doador de cada alelo presente no perfil da progênie.

Estabelecimento de perfil genético molecular da Cultivar BRS-Cora.

Um perfil genético-molecular foi gerado para ser utilizado como descritor molecular da cultivar de uva para processamento BRS Cora, utilizando-se 20 *loci* SSR. O perfil genético-molecular obtido para a cultivar BRS Cora, comparado com os perfis de outras duas cultivares de uva para processamento, está apresentado na Tabela 1 e na Figura 3.

Tabela 1. Perfil de alelos amplificados para a cultivar BRS Cora, utilizando 20 *loci* de marcadores microssatélites (SSR). As cultivares Isabel Precoce e BRS Rúbea foram utilizadas como padrão para comparação em virtude da semelhança fenotípica de ambas, com a nova cultivar (alelos em pares de base).

Locus SSR	BRS Cora		I. Precoce		BRS Rúbea	
VRZAG 12	151	151	177	177	141	141
VRZAG 14	138	138	138	138	138	138
VRZAG 15	166	166	166	183	166	183
VRZAG 21	199	202	202	208	202	208
VRZAG 25	237	238	237	238	237	237
VRZAG 62	188	203	203	206	203	206
VRZAG 79	236	258	235	246	246	258
VRZAG 83	188	200	188	190	188	188
VRZAG 93	185	187	187	203	185	187
VVMD 5	234	236	236	236	234	234
VVMD 7	238	246	231	246	238	246
VVMD 8	160	160	139	164	164	164
VVMD 13	215	218	205	215	215	218
VVMD 21	246	246	246	246	246	246
VVMD 24	209	209	208	208	208	217
VVMD 25	238	240	240	249	240	240
VVMD 29	203	203	203	203	203	203
VVMD 32	248	248	248	248	248	248
VVMD 34	239	239	239	239	239	239
VVMD 36	265	265	262	269	255	265

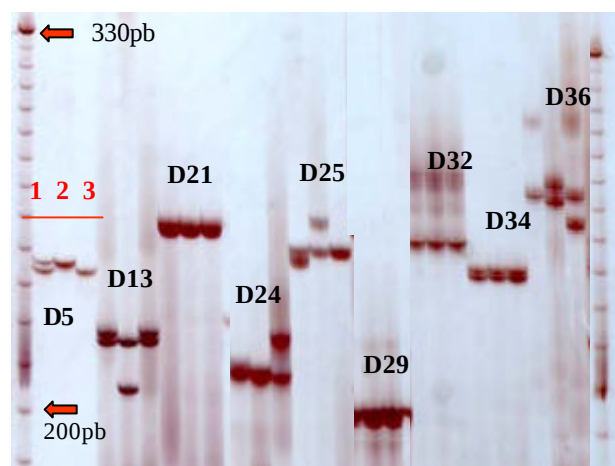


Figura 3. Perfil genético-molecular da cultivar BRS Cora comparado com as cultivares Isabel Precoce e BRS Rúbea. Amostras: 1 - BRS Cora, 2 - Isabel Precoce e 3 - BRS Rúbea. Setas indicam tamanho em pares de base do fragmento de DNA no marcador de peso molecular 10pb Invitrogen. D = Abreviatura de VVMD.

Conclusão

O teste de similaridade realizado com marcadores SSR confirmou a identidade genotípica entre as cvs. Catalunha e Thompson Sds., sendo possível padronizar a nomenclatura das mesmas. Da mesma forma foi possível recuperar a genealogia da cultivar BRS Clara, material que devido a suas características favoráveis tornou-se importante no programa de melhoramento. Um perfil molecular para a cv. BRS Cora foi criado permitindo distingui-la de outros materiais, complementando o seu registro junto ao INPI e permitindo assim, rastrear a identidade genética desta cultivar, certificar mudas e garantir a propriedade intelectual do material. O mesmo trabalho foi realizado para outras três cvs. de uvas de mesa apirênicas (dados não mostrados), entre elas a BRS Clara. A utilização de descritores moleculares são uma novidade na área registro de propriedade intelectual de cvs. no Brasil.

Referências Bibliográficas

- BOWCOCK, A. M., RUIZ-LINARES, A., TOMFOHRDE, J., MINCH, E., KIDD, J.R., CAVALLI-SFORZA, L. L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, v.368, p. 455-457, 1994.
- CRESTE, S., TULMANN NETO, A., FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter** v.19, p.299–306, 2001.
- DELSENY, M., LAROCHE, M., P. PENON. Detection of sequences with ZDNA forming potential in higher plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.116, p.113-120, 1983.
- LODHI M. A, GUANG NING YE, NORMAN F. WEEDEN , BRUCE I. REISCH. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, vitis species and ampelopsis. **Plant Molecular Biology**, v.12(1), p.6-13, 1994.
- PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v4, p.347-354, 1995.
- SEFC, K. M.; LEFORD, F.; GRANDO, M. S.; SCOTT, K. D.; STEINKELLNER, H.; THOMAS, M. R. Microsatellites markers for grapevine: a state of the art, In: **Molecular Biology & Biotechnology Of The Grape**. Kluwer Academic Publishers. p.433-463, 2001.
- WAGNER, H. W. & SEFC, K. M. Identity 1.0. Center for applied genetics, University of agriculture Sciences, Vienna.