

Caracterização do Banco de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido por meio de Marcadores Moleculares Microsatélites

Patrícia Coelho de Souza Leão¹; Summaira Riaz²; Rachel Graziani²; Gerald S. Dangl³; Sergio Yoshimitsu⁴ Motoike; M. Andrew Walker².

Resumo

Duzentos e vinte e dois acessos de videira (*Vitis* spp.) procedentes do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido foram genotipados por meio de sete marcadores moleculares microsatélites (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD31, VrZAG79 e VrZAG62). Foram obtidos perfis alélicos confiáveis e consistentes para 187 acessos de videira, os quais foram comparados com perfis alélicos publicados em bases de dados internacionais. Os resultados obtidos permitiram a classificação dos acessos de videira em três grupos distintos. O grupo 1 foi composto por 86 acessos cujos perfis moleculares corresponderam aos das mesmas cultivares nas bases de dados, demonstrando que elas estão corretamente identificadas no Banco de Germoplasma. O grupo 2 incluiu 30 acessos que apresentaram erros de denominação, pois os seus perfis moleculares corresponderam ao de diferentes cultivares nas bases de dados. O grupo 3 foi formado por 11 acessos que apresentaram perfis moleculares distintos aos das cultivares de mesmo nome nas bases de dados, como também por 60 acessos inéditos, cujos perfis moleculares ainda não foram publicados, incluindo neste grupo as cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento de videira no Brasil. A identidade genética de seis acessos neste grupo foram confirmados pela comparação dos perfis moleculares de seus parentais e poderão ser utilizados como referência para estas cultivares.

Introdução

O Banco de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido merece destaque por ser o único presente na região Nordeste do país, em condições semiáridas, constituindo um recurso estratégico para a sustentabilidade da vitivinicultura tropical. Foi implantado em 1963 e atualmente é composto por 227 acessos conservados, os quais incluem 134 cultivares de *Vitis vinifera* L. (59%), quatro cultivares de *Vitis labrusca* L., 64 híbridos interespecíficos, oito espécies silvestres americanas e 17 acessos para os quais não foram encontrados nenhuma informação sobre origem ou espécie na literatura. Desde a década de 1980, foram iniciados os trabalhos de avaliação morfoagronômica, os quais desde o ano 2002 têm sido realizado ininterruptamente até a data atual.

A identificação precisa dos acessos nas coleções e bancos de germoplasma é um requisito básico para o manejo racional das coleções e para sua utilização pelos programas de melhoramento. Por isso, é essencial identificar e corrigir erros relacionados a sinonímias, homonímias e erros na denominação de cultivares, possíveis de ocorrer durante a introdução e a propagação do material vegetal.

Marcadores moleculares microsatélites têm sido utilizados na videira, juntamente com a ampelografia tradicional para resolver as questões mencionadas acima, como o demonstram os estudos em coleções nacionais de diversos países (Fernández-González et al. 2007; Almadanim et al. 2007; Martínez et al. 2006; Constatini et al. 2005; Fatahi et al. 2003; Dangl et al. 2001). Por outro lado, no Brasil não existem informações sobre a utilização de marcadores microsatélites para o manejo de coleções de germoplasma de videira.

Os objetivos do presente estudo foram gerar perfis genético-moleculares baseados em marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) para um conjunto de 221 acessos de videira e comparar os perfis obtidos internamente, e junto às bases de dados públicas disponíveis permitindo identificar a existência de erros de denominação, homônimos e sinônimos entre os acessos de videira, visando assistir o manejo racional do Banco de germoplasma de videira da Embrapa Semiárido.

Material e Métodos

Os trabalhos de extração de DNA, realização de PCR e análises moleculares foram realizados no

¹ Embrapa Semi-Árido, BR 428 km 152, Zona Rural, Caixa Postal 23, Petrolina, PE, Brasil, CEP. 56.302-970, patricia@cpatsa.embrapa.br

² Department of Viticulture and Enology, University of California, Davis, CA 95616

³ Foundation Plant Services, University of California, Davis, CA 95616

⁴ Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG, Brasil, CEP. 36.570-000.

laboratório de genética e melhoramento de videira, no Departamento de Viticultura e Enologia da Universidade da Califórnia, Davis, Estados Unidos. Foram utilizados sete marcadores microsátélites considerados referência internacional para caracterização molecular de videira (This et al., 2004). Foram eles: VVS2 (Thomas e Scott, 1993), VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD31 (Bowers et al. 1996; Bowers et al. 1999), VrZAG79 e VrZAG62 (Sefc et al. 1999). Um dos *primers* de cada par foi marcado na extremidade 5' com um dos seguintes tampões fluorescentes: 6-FAM, HEX e NED. A extração de DNA e as reações de PCR foram realizadas conforme descrito por Leão et al. (2009). As amostras foram desnaturadas à 94°C por 2 minutos e aplicadas em um sequenciador de DNA modelo ABI 377 (PE/Applied Biosystems). Os fragmentos de DNA foram detectados utilizando-se o software GeneScan™ versão 3.1 e os alelos foram identificados pela análise dos fragmentos obtidos por meio do software Genotyper™ versão 2.5.2. (PE/Applied Biosystems). Os perfis genéticos obtidos foram comparados com aqueles disponíveis em três bases de dados internacionais: *Foundation Plant Service*, Universidade da Califórnia, Davis (G. Dangl, com. pessoal), *Greek Vitis database* (<http://gvd.biology.uoc.gr/gvd/contents/index.htm>), e *Swiss Vitis Microsatellite database* (<http://hydra.unine.ch/svmd/>).

Resultados e Discussão

Perfis alélicos consistentes e confiáveis foram obtidos para 187 acessos em todos os marcadores SSR. Os resultados permitiram a divisão dos acessos do Banco de Germoplasma em três grupos distintos: 1) acessos cujos perfis alélicos coincidiram com referências de mesmo nome; 2) acessos cujos perfis corresponderam ao de referências de nomes diferentes; e 3) acessos cujos perfis não corresponderam a nenhum perfil de referência publicado nas bases de dados.

O primeiro grupo foi composto por 86 acessos de videira cujos perfis moleculares SSR para todos os sete locos foram idênticos aos perfis de referências validadas de mesmo nome ou de sinônimas reconhecidas disponíveis nas bases de dados consultadas. Os resultados também confirmaram a correspondência entre os perfis de clones derivados de mutações somáticas. Foram identificados os seguintes casos de sinônimas neste grupo: 'Tinta Roriz' e 'Tempranillo' e 'Sultanina branca' e 'Thompson Seedless'. 'Catalunha' também foi confirmado como um sinônimo local de 'Thompson Seedless'.

O segundo grupo consistiu de 30 acessos de videira cujos perfis SSRs corresponderam ao de referências validadas, porém com nomes distintos, ou seja, os acessos não estão corretamente identificados no BAG Videira da Embrapa Semiárido e devem ser corrigidos.

O terceiro grupo foi composto por 71 acessos cujos perfis moleculares não encontraram correspondência com nenhum perfil de referência disponível nas bases de dados. Este grupo incluiu cultivares de programas de melhoramento no Brasil (Instituto Agrônomo de Campinas e Embrapa); Argentina (série Gargiulo-INTA); Estados Unidos (Arkansas, Florida e Nova York) e França (série Seyve Villard). O maior grupo de acessos são os dos programas de melhoramento do Instituto Agrônomo de Campinas-IAC ('A Dona', 'Aurora' ou 'IAC 77526', 'Isaura', 'Juliana', 'Patricia', 'Paulistinha' e os porta-enxertos 'IAC 313' e 'IAC 766') e da Embrapa Uva e Vinho ('Moscatel Embrapa', 'BRS Rubea', 'BRS Clara', 'BRS Linda', 'BRS Morena' e 'BRS Lorena'). Neste grupo foram identificados também onze acessos que não apresentaram perfis genéticos compatíveis com os de referências validadas internacionalmente com o mesmo nome e portanto, não estão corretamente identificados na coleção (Tabela 1). A Tabela 2 apresenta os 60 acessos que não possuem perfis moleculares de referência internacionais, e cujos perfis alélicos completos foram descritos por Leão et al. (2009). Os perfis moleculares das cultivares 'Marroo Seedless', 'Dona Maria' e 'Moscatel' ('CG 102295') estão de acordo com aqueles observados por Sanchez-Escribano et al. (1999) nos mesmos cultivares utilizando os marcadores SSR VVS2, VVMD5 e VVMD7, indicando que estes cultivares estão corretamente identificados. Os perfis alélicos dos acessos 'Baviera', 'Dacari', 'Damarim', 'Emperatriz' e 'Moscatel' confirmaram que eles são sinônimas das seleções 'CG26916', 'CG 102024', 'CG 40016', 'CG 28467' e 'CG 102295', respectivamente. Estes cultivares foram desenvolvidos por Gargiulo no INTA-Argentina. Os pedigrees de 'CG26916', 'CG28467' e 'CG87908' não estão disponíveis, mas eles apresentaram um alelo em comum em seis locos com a cv. Thompson Seedless, sugerindo que este cultivar está em seus pedigrees.

Os perfis alélicos de 19 acessos do grupo 3 foram comparados ao de um ou ambos parentais disponível em uma base de dados de referência. Doze acessos listados na Tabela 2 apresentaram perfis diferentes de um ou ambos parentais, sugerindo a necessidade de se repetir as análises para confirmação, pois eles podem não estar corretamente identificados na coleção. A observação de características morfológicas, como cor da uva, confirmou erros de denominação nas cultivares 'BRS Rubea' e 'Ferlongo'. Por outro lado, a comparação dos perfis alélicos dos acessos e de seus respectivos genitores confirmou a identidade de seis cultivares ('BRS Morena', 'CG26858', 'CG38049', 'Marroo Seedless', 'Moscatel Nazareno' e 'Reliance'), permitindo que os

perfis moleculares SSR apresentados neste trabalho possam ser utilizados como uma referência validada para estas cultivares (Tabela 2).

Neste estudo, foi desenvolvido uma base de dados de perfis moleculares SSRs para os acessos do Banco de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido. Os resultados obtidos permitem integrar os dados dos perfis moleculares às características morfo-agronômicas dos acessos, a fim de estabelecer a correta identificação das cultivares, reconhecer erros na denominação e identificar sinonímias. Obteve-se um grupo de acessos cujos perfis não apresentaram correspondência com nenhuma referência nas bases de dados internacionais, constituindo-se perfis SSRs inéditos que poderão ser validados e utilizados como referência na identificação de cultivares de videira. Os resultados obtidos podem ser utilizados para a certificação genética de mudas e de plantas, sendo, portanto um requerimento básico para viveiristas, viticultores, indústria vitivinícola e para a proteção legal de novas cultivares.

Agradecimentos

À equipe do laboratório de genética e melhoramento de videira da Universidade da Califórnia, Davis, especialmente nas pessoas do Prof. Andrew Walker e Summaira Riaz, pela colaboração e recursos financeiros para a execução do trabalho de pesquisa.

Referências Bibliográficas

ALMADANIM, M. C.; BALEIRAS-COUTO, M. M.; PEREIRA, H. S.; CARNEIRO, L. C.; FEVEREIRO, P.; EIRA-DIAS, J. E.; MORAIS-CECILIO, L.; VIEGAS, W.; VELOSO, M. M. 2007. Genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars most utilized for wine production in Portugal. **Vitis** 46:116-119.

BOWERS, J.; DANGL, G.S.; MEREDITH, C.P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. **American Journal of Enology and Viticulture** 50:243-246.

BOWERS, J.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome** 39: 628-633.

COSTANTINI, L., MONACO, A.; VOUILLAMOZ, J. F.; FORLANI, M.; GRANDO, M. S. 2005. Genetic relationships among local *Vitis vinifera* cultivars from Campania (Italy). **Vitis** 44:25-34.

DANGL, G. S.; MENDUM, M. L.; BERNARD, B. P.; WALKER, M. A.; MEREDITH, C. P.; SIMON, C. J. 2001. Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: a tool for managing a grape germplasm collection. **Genome** 44:432-438.

FATAHI, R.; EBADI, A.; BASSIL, N.; MEHLENBACHER, S. A.; ZAMANI, Z. 2003. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers. **Vitis** 42: 185-192.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; MENA, A.; IZQUIERDO, P.; MARTÍNEZ, J. 2007. Genetic characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from Castilla la Mancha (Spain) using microsatellite markers. **Vitis** 46:126-130.

LEAO, P. C. de S.; RIAZ, S.; GRAZIANI, R.; DANGL, G. S.; MOTOIKE, S. Y.; WALKER, M. A. Characterization of a brazilian grape germplasm collection using microsatellite markers. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 60, n. 4, p. 517-524, 2009.

MARTÍNEZ, L. E.; CAVAGNARO, P. F.; MASUELLI, R.W.; ZÚÑIGA, M. 2006. SSR-based

assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Sci.* 170:1036-1044.

SÁNCHEZ-ECRIBANO, E.M.; MARTÍN, J.P.; CARREÑO, J.; CENIS, J.L. 1999. Use of sequence-tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars. *Genome* 42:87-93.

SEFC, K.M.; REGNER, F.; TURETSCHKE, E.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42:367-373.

THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, P.; BOTTA, R.; COSTANTINI, L.; CRESPIAN, M.; DANGL, G.S.; EISENHELD, C.; FERREIRA-MONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBÁÑEZ, J.; LACOMBE, T.; LAUCOU, V.; MAGALHÃES, R.; MEREDITH, C.P.; MILANI, N.; PETERLUNGER, E.; REGNER, F.; ZULINI, L.; MAUL, E. 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 109:1448-1458.

THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. 1993. microsatellite repeats in grapevine reveal dna polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (stss). *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990.

Tabela 1 – Onze acessos do Banco de Germoplasma de videira cujos perfis alélicos não coincidiram com os perfis de referências validadas com o mesmo nome (Grupo 3). A correspondência interna refere-se a duplicidade de genótipos e/ou sinônias existentes no BAG.

Acesso	Correspondência interna
Mgt 41B	IAC 313
Colombard	
Dattier Saint Vallier	
Early Muscat	
Ferral	
Isabel Precoce	BRS Lorena
Mission	IAC 766
Muller Thurgau	
Orange Muscat	Aurora, IAC 77526
Petit Verdot	
SO4	

Tabela 2 - Sessenta acessos de videira cujos perfis moleculares SSR não encontraram correspondência com nenhuma referência disponível nas bases de dados (Grupo 3).

Acessos	Correspondência interna/Parentais confirmados	Acessos	Correspondência interna/Parentais confirmados
A 1105	A1581	Himoront	A Dona
A 1118		IAC 313	Mgt 41B
A 1581	A 1105	IAC 766	Mission
A Dona	Himoront	IAC 77526	
Ângelo Pirovano	Parentais não confirmados	Isaura	
Aurora	IAC77526	Juliana	Parentais não confirmados
Baviera		Júpiter	CG 26858
Beni Fugi		Lake Emerald	Parentais não confirmados
Blue Lake		Marengo Pirovano	
Bordo		Marroo Seedless	Parentais confirmados
BRS Clara		Mars	Parentais não confirmados

BRS Linda		Moscatel Nazareno	Parentais confirmados
BRS Lorena	Isabel Precoce	Moscato Embrapa	
BRS Morena	Parentais confirmados	Moscato Noir	
BRS Rubea	Parentais não confirmados	Moscatuel	
Califórnia		Muscat Saint Vallier	
CG 26858	Parentais confirmados	Neptune	
CG 28467	Emperatriz	Patricia	
CG 33716	Parentais não confirmados	Paulistinha	Parentais não confirmados
CG 351		Perlona	
CG 38049	Parentais confirmados	Regner	
CG 39915		Reliance	Parentais confirmados
CG 87908		Roni Redi	
Dacari		Saturn	
Damarim		Seyve Villard 12327	
Dominga		Seyve Villard 12375	
Dona Maria		Sovrano Pirovano	Parentais não confirmados
Emperatriz	CG 28467	Stover	
Feal	Parentais não confirmados	Tampa	Parentais não confirmados
Ferlongo	Moscatel Nazareno	Vênus	Parentais não confirmados