

CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE VIDEIRA ATRAVÉS DE ESTP

ANA LUÍSA D. C. **TEIXEIRA**¹; HAIKO E. **SAWAZAKI**²; ADRIANA R. **VERDI**³;
CLAUDIO L. **MESSIAS**⁴; MARA F. **MOURA**⁵¹

Nº0900002

Resumo

Além da caracterização genética e avaliação serem importantes para conhecimento da qualidade e potencialidade do germoplasma de uma videira, para se patentear a criação de um vinho tipicamente paulista é necessário o fingerprinting do genoma da videira utilizada para a fabricação. Ou seja, para o estabelecimento de uma coleção genética com as principais variedades de uvas destinadas à produção de vinhos comuns, finos e derivados, a caracterização genética é importante para se criar o perfil genético-molecular característico da cultivar de videira. Principalmente para cultivares que não foram ainda caracterizadas geneticamente como a uva Máximo IAC 138 desenvolvida em 1946 pelo Dr. Santos Costa no instituto agrônomo através da hibridização entre uma Shiraz e Seibel (híbrido de V. vinifera desenvolvido na França para tolerância a doenças), assim como outros cultivares nacionais como Rainha, Madalena. Visando caracterizar os cultivares de videira, tentou-se estabelecer um fingerprinting específico para cada cultivar, através da metodologia molecular Expressed sequence tag polymorphism (ESTP), aliada à restrição de sítios específicos. Devido a dificuldade na amplificação dos fragmentos, sintetizou-se outros primers além dos originais e somente após a mudança de protocolo original obteve-se a amplificação dos fragmentos. Os melhores fragmentos amplificados foram seqüenciados, porém, ainda não foram encontrados sítios de restrição específicos para cada cultivar.

Abstract

Beyond the genetic characterization and evaluation to be important for knowledge of the quality and potentiality of a grapevine germoplasm, to patent the creation of a typically paulista wine is necessary fingerprinting the grapevine genome used for the manufacture. It means, for the establishment of a genetic collection with the main varieties of grapes destined to the production of common, fine and derivatives of wines,

¹1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUC-Campinas, Campinas-SP, ✉ aninha_dct@hotmail.com

2.Orientador: Pesquisador, IAC, Campinas-SP

3.Colaborador, Pesquisador, IEA, São Paulo-SP

4.Colaborador, Pesquisador, UNICAMP, Campinas-SP

5.Colaborador, Pesquisador, IAC, Jundiaí- SP.

the genetic characterization is important to create the specific genetic-molecular profile of the grape cultivars. Mainly to cultivars that are still not characterized genetically as the IAC 138 Maximo developed in 1946 by Dr. Santos Costa in the Instituto Agrônômico by hybridization between a Shiraz and Seibel (hybrid of vinifera developed in France for disease tolerance), as well others national cultivars as Rainha and Madalena. Aiming to characterize the grapevine cultivars, was tried to establish a specific fingerprinting for each cultivar, through the molecular methodology Expressed Sequence Tag Polymorphism (ESTP), allied to specific restriction sites. Because the difficulty in the amplification of the fragments, primers beyond the originals were made and only after changing the original protocol, the amplification was finally succeeded. The best amplified fragments were sequenced, however, specific restriction sites was not yet found for each cultivar.

Introdução

Para a manutenção de bancos de germoplasma para conservação ex situ de cultivares de videira que possam servir como base para programas de melhoramento é importante a caracterização genética por meio de descritores morfológicos ou marcadores moleculares. Os descritores morfológicos têm a desvantagem de serem modificados pelo ambiente e necessitarem de anos para o desenvolvimento da planta para a anotação. Marcadores moleculares baseados em DNA, principalmente do tipo microsatélite, também conhecidos como SSR (Single Sequence Repeat) têm sido utilizados para diferenciar, caracterizar e identificar cultivares de videira. A EMBRAPA Uva e vinho tem um banco de dados baseado em microsatélites e realiza teste de identificação varietal baseado em seis locos (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG 62 e VrZAG79) conforme This et al. (2004). Apesar do banco de referência de dados da Embrapa Uva e Vinho ser bastante completo e de ser possível o acesso aos bancos de dados e à literatura internacionais, estas bases de dados não possuem todas as cultivares conhecidas. Esta tecnologia também não tem o poder de distinguir variantes de uma cultivar de videira. Perfis genético-moleculares de variantes referidas comumente como mutações somáticas, propagadas de forma clonal, serão idênticos, apesar das diferenças observadas na planta e frutos serem significantes, ou seja, clones intravarietais podem diferir consideravelmente no fenótipo, mesmo que tenham perfis de DNA praticamente idênticos (Vignani et al., 1996; Franks et al., 2002). Os marcadores genéticos como os derivados de EST, principalmente de genes candidatos de características economicamente importantes, permite a obtenção de informação para estudos de associação e mutações potencialmente funcionais e

podem ser encontradas rapidamente quando alinhadas com sequências já caracterizadas. Variação interespecífica pode ser identificada quando realizada para mais do que uma espécie através de BLAST das seqüências alinhadas (Temesgen et al, 2001). Marcadores ESTP (Expressed sequence tag polymorphism) podem ser facilmente testados por PCR (polymerase chain reaction) e são conhecidos ser mais conservados que os microsátélites, sendo, portanto, mais facilmente transferidos entre espécies do que os microsátélites (Echt & May-Marquardt, 1997). O polimorfismo detectado em ESTPs pode corresponder a ou inserção-deleção (Indel) ou single nucleotide polymorphism (SNP). Uma série de dados de anotação de SNP já estão disponíveis em vitis (Owens& Baldo, 2006), inclusive, vários primers derivados de EST testados para a anotação de SNP podem ser encontrados no IASMA Genomics (<http://genomics.research.iasma.it/iasma/>). Estes dados foram introduzidos por Salmaso et al (2004) de um estudo realizado para avaliar o uso potencial da detecção de SNP para o desenvolvimento de marcador molecular em genoma de videira utilizando a técnica de EST derivado de gene candidato. Foram estudados sete cultivares de *Vitis vinifera* L. ('Regent', 'Lemberger', 'Moscato bianco', 'Teroldego rotaliano', 'Riesling □eqüenc', 'Pinot noir', 'Syrah') além de outras espécies para avaliar o grau de polimorfismo molecular, o que facilita os estudos de ESTP em videiras. Além da caracterização genética e avaliação serem importantes para conhecimento da qualidade e potencialidade do germoplasma de uma videira, para se patentear a criação de um vinho tipicamente paulista é necessário o fingerprinting do genoma da videira utilizada para a fabricação. Portanto, para o estabelecimento de uma coleção genética com as principais variedades de uvas destinadas à produção de vinhos comuns, finos e derivados, a caracterização genética é importante para se criar um perfil genético-molecular característico (assinatura molecular) de uma cultivar de videira para proteção intelectual. Principalmente para cultivares ainda não caracterizados geneticamente, como a uva Máximo IAC 138, desenvolvida em 1946 pelo Dr Santos Costa no instituto agrônomo (através da hibridização entre uma *Vitis vinifera* denominada Shiraz ou Syrah e um híbrido de *Vitis vinifera*, a Seibel, desenvolvida na França para tolerância a doenças), assim como outros cultivares conhecidos como Rainha, Madalena. Assim, para se caracterizar os cultivares de videira necessários ao projeto, tentou-se estabelecer o fingerprinting específico para cada cultivar através da metodologia molecular ESTP, aliada à restrição com sítios específicos.

Material e Métodos

Foram utilizadas folhas, de preferência novas, das videiras Máximo, Rainha e Madalena armazenadas a -80°C . A extração de DNA foi feita de acordo com a metodologia de CTAB. Cada 0.1 g tecido foliar moído com N2 líquido é colocado em tubo (2 mL), com 0,6 mL de solução 2 x CTAB [2% CTAB, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.1 M tris-HCl buffer, pH 8.0] e 0.2 mL de água e incubado por 30 min a 65°C . Adicionar 0,8 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v) (0.8 mL) e agitar gentilmente por 15 min. Centrifugar a 8000g/15 min e coletar o sobrenadante. Adicionar solução CTAB (10%, 0.08 mL) e cloroformio/álcool isoamílico (24:1, v/v), agitar gentilmente por 15 min e centrifugar (8000g, 15 min). Coletar o sobrenadante e adicionar 2.5 volume do tp precipitação (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% CTAB).e deixar por 5 min no freezer (-80°C). Coletar o precipitado por centrifugação (6000g, 15 min) e dissolver em 0.5 mL de TE. Reprecipitar com o mesmo volume de álcool isopropílico. Agitar gentilmente por 15 min e coletar o precipitado por centrifugação (6000g, 15 min). Dissolver o precipitado em 0.2 mL of TE e adicionar 1 μL de RNase (RNase A, bovine pancreas, 10 mg/mL) e incubar por 1 h at 37°C . Adicionar solução de fenol neutro, agitar gentilmente, centrifugar (8000g, 15 min) e coletar sobrenadante. Adicionar mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), centrifugar (8000g, 15 min), coletar o sobredanante. Adicionar 1/10 volume acetato de sódio 10M pH 5,2 e 2 volumes of álcool isopropílico, dissolver o pelete em 30 μL de 0.1 volume de TE. A reação de PCR foi realizada com 20-50ng de DNA consistindo em 2.5 μL tampão PCR 10X; 1.0 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0.2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl_2 ; 0.4 μM de cada primer. As condições foram uma etapa de ativação de 5 min a 94°C , seguido inicialmente por 9 ciclos de 30 s a 94°C , 1 minuto de 62 a 54°C e 1 minuto a 72°C , e a seguir 30 ciclo s de 30 segundos a 94°C , 1 minuto a 54°C e 1 minuto a 72°C e um alongamento final de 10 min a 72°C . Foram feitas inicialmente análises de PCR para testes de 11 primers de Salmaso et al (2004) (IB02; IIB05; IIB09; IIC08; IIC12; ID04; IE04; IIE02; IF01; IH09; UFGT) e a seguir de mais 13 primers (6; 11; 28; 75; 126; 136; 373; 391; 403; 521; 811; 850 e 1412) de acordo com Salmazo et al (2008). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5%. A purificação do fragmento de DNA amplificado foi feita pelo sistema EXO-SAP (Applied Biosystems). O sequenciamento através do sistema Big Dye v. 3.0 (Applied Biosystems) e seqüenciador ABI PRISM 377 de acordo com procedimento do laboratório. As análises das seqüências foram realizadas com o auxílio do Bioedit v.7.05 (Hall, 1999). Para escolha do tipo de restrição específica, foi realizada análise “in silico” (<http://www.restrictionmapper.org/>).

Resultados e Discussão

Inicialmente testou-se métodos de extração do DNA de folhas de videiras, preferindo-se o método com CTAB. A seguir tentou-se realizar o PCR de acordo com Salmazo et al (2004, 2008), que utiliza cerca de 0,2mM de cada primer por reação. Como a amplificação dos 11 primers iniciais não estavam dando resultado, providenciou-se a síntese de novos 13 primers. Somente após a Mudança da enzima Taq para a Platinum Taq polimerase (Invitrogen) e a mudança das condições da reação de PCR para as condições de Trogio et al (2007) que utiliza 0,4μM de cada primer é que obteve-se a amplificação de fragmentos. Destes 13 primers testados, os melhores foram os primers 28; 75; 126; 136; 373; 521; 811; 850 e 1412 (Figura 1).

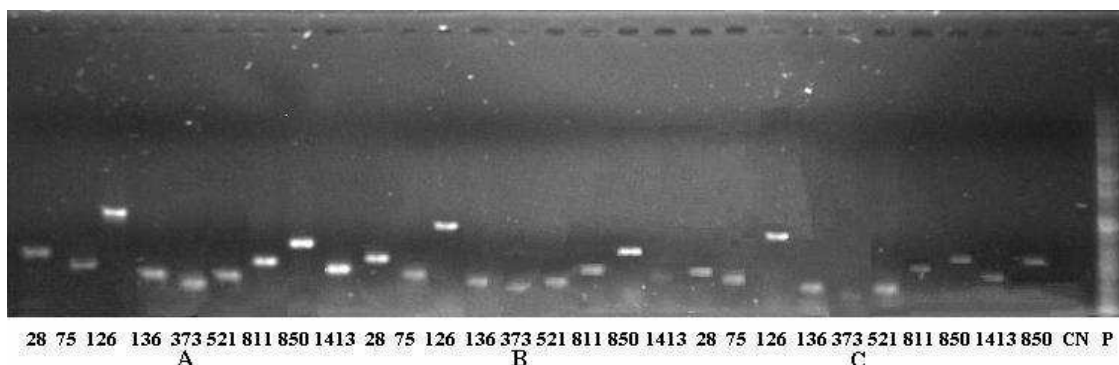


Figura 1. Perfil PCR de plantas das cultivares de uva A: Máximo; B: Madalena; C: Rainha, usando os primers 28, 75, 126, 136, 373, 521, 811, 850, 1413 (Salmazo et al, 2008); CN= controle negativo; P= padrão (1kb plus DNA Ladder).

Inicialmente, tentou-se fazer a purificação com o sistema QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN) como previsto, porém, devido a necessidade de muita quantidade de fragmento para a purificação funcionar, testou-se o sistema EXO-SAP (exonuclease I e shrimp alkaline phosphatase), que provou ser mais funcional. Analisando-se as seqüências dos fragmentos amplificados pelos primers 28, 75, 126, 136, 811, 850 e 1412 verificou-se que não ocorreram sítios de restrição específicos para as cultivares, denotando a necessidade da análises de mais primers.

Conclusão

Com a análise das seqüências amplificadas pelos primers deste estudo não foi possível detectar seqüência com sítio de restrição específico dos cultivares, denotando a necessidade da continuidade da análise de mais primers.

Agradecimentos

A FAPESP pela ajuda financeira

Referências Bibliográficas

FRANKS, T.; BOTTA, R.; THOMAS, M. R.; FRANKS, J. Chimerism in grapevines: implication for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics, Heidelberg**, v.104, n.2-3, p.192-199. 2002.

OWENS, C.L.; BALDO, A.M. Plant and Animal Genome VX Conference. Abstracts Proceedings/Symposium, v., p.152, 2004.

SALMASO, M.; et al. Genome diversity and gene haplotypes in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) as revealed by single nucleotide polymorphism. **Molecular Breeding**, v.14, p. 385-395, 2004.

SALMASO, M.; et al. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic map integrating the position of 139 expressed genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.116, p.1129-1143, 2008.

TEMESGEN B.; et al. Genetic mapping of expressed sequence tag polymorphism (ESTP) markers in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.664–675, 2001.

THIS, P.; et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics, Heidelberg**, v.109, p.1448-1458, 2004.

TROGGIO, M.; et al. A dense SNP-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. **Genetics**, v.1176, n.4, p.2637-2650, 2007.

VIGNANI, R.; BOWERS, J. E.; MEREDITH, C. P. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* Sangiovese'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.65, n.2-3, p.163-169, 1996.