

SELEÇÃO DE *PRIMERS* PARA ANÁLISE DE *INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS*
NA CULTIVAR 'ITÁLIA' DE *Vitis vinifera* L.

TECHNICAL NOTE

SELECTION OF PRIMERS FOR ANALYSIS OF INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS IN THE
'ITALIA' CV. (*Vitis vinifera* L.)

Afonso Carrasco Pepinelli¹, Danuza Kelly Strioto², Giovana Carniatto Marinelli³, Claudete Aparecida Mangolin⁴, Maria de Fátima Pires da Silva Machado^{4*}

¹Graduando do curso de Tecnologia em Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá. Email: afonsopepinelli@hotmail.com

²Graduada em Ciências Biológicas, Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá. Email: danuzak_s@hotmail.com

³Graduanda do curso de Tecnologia em Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá. Email: Giovana_agm@hotmail.com

⁴Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá. Email: camangolim@uem.br

*Corresponding author: Tel: +55 44 3011 4681, Fax: +55 44 3011 4893, e-mail: mfpsmachado@uem.br

(Received 08.03.2014. Accepted 12.12.2014)

RESUMO

No presente estudo o objetivo foi selecionar *primers* ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*), adequados para futuros estudos de variabilidade genética em plantas da cultivar 'Itália' (*Vitis vinifera* L.). Além disso, padronizar o método de quantificação de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) e a reação de PCR para os *primers* selecionados. Para extração do ADN foram utilizadas amostras de folhas jovens de videira coletadas na região de Marialva, PR, e o método de quantificação do ADN escolhido foi o espectrofotômetro Picodrop®. Os *primers* selecionados por apresentarem um número satisfatório de bandas nítidas (106 no total) em gel de agarose 2% quando submetidos à eletroforese, foram: ISSR-1, ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-13, ISSR-14 e ISSR-15, usando uma temperatura para ligação dos *primers* de 50 °C na PCR. O número médio de bandas por *primer* foi de 8,84, sendo o ISSR-5 o que gerou uma maior quantidade (13) de regiões ISSR amplificadas.

SUMMARY

The objective of present study was to select ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) primers suitable for future genetic variability studies of the grape cultivar 'Itália' (*Vitis vinifera* L.) plants. Besides, it is aimed to standardize the method for quantifying DNA and PCR reaction for the selected primers. For DNA extraction, samples from young vine leaves collected in the region of Marialva-PR were used, and the chosen DNA quantification method was Picodrop® spectrophotometer. The primers selected for presenting a satisfactory number of sharp bands (106 in total) in 2% agarose gel when subjected to electrophoresis were: ISSR-1, ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-13, ISSR-14 and ISSR-15 using an annealing temperature of 50°C at the PCR. The average number of bands per primer was 8.84, whereas ISSR-5 primer produced the highest number (13) of amplified ISSR regions.

Palavras-chave: eletroforese, biologia vegetal, ISSR, uva.

Key words: electrophoresis, plant biology, ISSR, grape.

INTRODUÇÃO

A cultura da videira começou há cerca de quatro mil anos, no período Terciário, nos territórios hoje correspondentes à Geórgia, Armênia e Azerbaijão, e a partir desse ponto as videiras primitivas dispersaram-se para duas direções, uma Américo-Asiática e outra Euroasiática (Sousa, 1996). Segundo Sousa (1996),

no final do século XIX a produção de uva de mesa tornou-se de grande importância. De acordo com Janick e Moore (1975) e Sousa (1996) a videira *Vitis vinifera* L., assim como outras espécies do gênero, encontram-se distribuídas pelas regiões temperadas e subtropicais do mundo, exibindo variações no que se refere a: qualidade dos frutos, resistência a patógenos, e produtividade, o que garante um elevado potencial

de variabilidade genética que pode ser usado através de estratégias de melhoramento, por reprodução sexuada.

A videira está classificada no Grupo Cormófitas, da Divisão Spermatophyta, da Subdivisão Angiospermae, da Classe Dicotyledoneae, da Ordem Rhamnales, da Família Vitaceae, do Gênero *Vitis* (Souza e Lorenzi, 2005). Segundo Sousa (1996) dentro da família Vitaceae o gênero *Vitis* é o único de importância econômica, social e histórica, e a ele pertencem todas as videiras terrestres selvagens ou cultivadas.

A cultivar 'Itália' (VIVC nº 5582 - <http://www.vivc.de/>) tem sido considerada como produtora de uvas finas do Brasil. Sousa (1996) relata que esta cultivar foi obtida por Ângelo Pirovano, na Itália, por meio do cruzamento entre 'Bicane' (VIVC nº 1341 - <http://www.vivc.de/>) e 'Moscatel de Hamburgo' (VIVC nº 8226 - <http://www.vivc.de/>), realizado em 1911, e foi introduzida no Brasil na década de 20. Nos anos 50, passou a ser cultivada comercialmente no Estado de São Paulo, e na década de 60 foi difundida para o norte do Estado do Paraná e outras regiões desse estado. O cultivo da uva 'Itália' no noroeste do Paraná foi iniciado pela colônia japonesa. Os primeiros parreirais plantados no município de Marialva (PR) estavam nas propriedades de Yamanaka e Wakita, no ano de 1962, com material propagativo oriundo do município de Ferraz de Vasconcelos (SP) (Oliveira-Collet, 2003).

O Brasil ficou em 11º lugar em produção de uva no cenário mundial, no ano de 2011 (FAO, 2012). Segundo o IBGE (2012) a área colhida no Brasil em 2011 foi de 80.003 ha., com rendimento médio de 18.293 Kg/ha. A viticultura é uma atividade importante para a manutenção da pequena propriedade no Brasil, porque gera empregos, tanto nos grandes empreendimentos como nas pequenas propriedades. Os pólos produtores de uvas finas de mesa no Estado do Paraná estão nas regiões de Maringá, Cornélio Procopio e Londrina, destacando-se os municípios de Marialva, Mandaguari, Uraí e Assaí como os principais produtores (Kishino *et al.*, 2007). No Paraná, as uvas de mesa e para transformação agroindustrial - representaram 6,2% do volume de frutas produzidas, com os parreirais distribuídos em 6,1 mil hectares. As colheitas proporcionaram 105,0 mil toneladas de uvas (DERAL-SEAB, 2012).

A propagação da videira ocorre de duas formas: sexuada (por semente) ou assexuada (por via vegetativa). As sementes são úteis para o melhoramento genético, para a obtenção de novas variedades (Hidalgo, 1993), mas, a propagação de videiras através de sementes tem sido desvantajosa para o produtor, pois as novas plantas apresentam vigor, produtividade e qualidade dos frutos inferiores aos da planta-mãe; outro fator desvantajoso é a demora na formação do fruto, para colheita. Já a propagação vegetativa baseia-se na facilidade que os

ramos têm de emitir brotos e raízes. Nesse tipo de propagação, as plantas filhas têm as mesmas características da planta-mãe, a não ser que ocorra alguma mutação (Hidalgo, 1993).

Nas regiões Norte e Noroeste do Paraná são cultivadas quatro variedades de uvas finas de mesa, sendo elas: 'Itália' - coloração verde, e as de cor: 'Rubi' - coloração rosada (VIVC nº 22689 - <http://www.vivc.de/>), 'Benitaka' - coloração rosada intensa (VIVC nº 19816 -- <http://www.vivc.de/>), e Brasil - coloração preta (VIVC nº 19817 - <http://www.vivc.de/>). Nestas regiões, o surgimento de cultivares de cor a partir da cultivar 'Itália', é explicado pela ocorrência de mutação somática (Camargo, 1998). A uva 'Itália' vem sendo mantida por propagação vegetativa, sendo a ocorrência de mutações somáticas um evento frequente. A cultivar Rubi foi descrita como originária de mutação somática espontânea da cultivar 'Itália', que ocorreu em um parreiral do produtor Kotaro Okuyama, no município de Santa Mariana, no Estado do Paraná, em 1972 (Kishino e Mashima, 1980). A cultivar 'Benitaka' também foi descrita como originária de uma mutação somática espontânea, sendo encontrada pela primeira vez num parreiral de 'Itália', do viticultor Sadao Takakura, em Floráí, no Paraná, em 1988 (Sousa, 1996), e a cultivar 'Brasil' não foi derivada da 'Itália' como as demais, e sim por mutação somática espontânea da cultivar 'Benitaka', na propriedade de Hideo Takakura, também em Floráí, no ano de 1991 (Gonçalves, 1995). Mais recentemente foram descritas duas novas variedades: a variedade 'Redmeire' (ainda não catalogada), apresentando bagas com formato longo-ovalado, coloração roxa e delicado, sabor moscatel (Pires *et al.*, 2003), derivada de mutação somática da cultivar 'Itália', e a variedade 'Black Star' (ainda não catalogada), apresentando bagas com formato elipsoide alongado e coloração vermelho-escura (Roberto *et al.*, 2012), derivada de mutação somática da cultivar 'Brasil'.

Algumas das mutações existentes são mantidas em um estado quimérico, afetando apenas algumas camadas de células individuais (Franks *et al.*, 2002), e o fenótipo da planta é o resultado da combinação em diferentes células com genótipos diferentes. Elementos transponíveis (TES) são relatados como os maiores contribuintes para estimular a variabilidade do genoma e, em particular, para promover mutações somáticas (Collier e Largaespada, 2007; Deragon *et al.*, 2008). Benjak *et al.* (2009) descreveram um alto número de elementos transponíveis, e estes possuem sequências genômicas transduplicadas e amplificadas, incluindo sequências de genes e fragmentos de outros elementos móveis. Os resultados destes autores mostram também que embora algumas famílias de transposons já estivessem presentes nos genótipos das espécies de videiras selvagens européias e americanas, eles tem sido amplificados e tem sido ativamente transpostos acompanhando a domesticação e o melhoramento deste grupo. Ainda

tem sido considerado que a exposição das folhas da cultivar 'Itália' a determinados fungicidas, agrotóxicos frequentemente aplicados para o controle de doenças comuns em parreiras da região (Collet, informação pessoal), possa estar induzindo mutações de ponto e/ou quebras cromossômicas, contribuindo ainda mais, para promover a instabilidade genética nas parreiras de uvas do grupo 'Itália'.

Nas cultivares 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka', e 'Brasil', a análise de isozimas indicou uniformidade genética (Oliveira-Collet *et al.*, 2005), mas a análise de fragmentos aleatórios de ADN amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) mostrou um polimorfismo de ADN alto (Maia *et al.*, 2008), indicando que mutações somáticas ocorrem com frequência alta. Outras indicações também contrariam a uniformidade genética nas cultivares de 'Itália': a alta proporção de alelos nulos (53,2%) descrito por Orasmo *et al.* (2007) no *locus Est-3* de uma carboxilesterase, e a alta proporção de plantas com quimeras com potencial para disseminar, por propagação vegetativa, são cultivares geneticamente divergentes (Maia, 2009).

A confiabilidade da técnica utilizando marcadores RAPD, usada por Maia *et al.* (2008), que indicou um polimorfismo alto em clones das cultivares 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil', tem sido questionada (Harris, 1999), principalmente devido à baixa especificidade dos *primers* e à repetibilidade dos resultados obtidos. Harris (1999) sugere também que dados obtidos por RAPD, podem ser inexatos devido ao uso de protocolos diferenciados nos estudos. Além disso, comparações entre diferentes estudos com RAPD são difíceis, uma vez que a seleção de *primers* é diferente, além da quantidade e da análise de dados obtidos, a não ser que as análises sejam feitas pelo mesmo investigador e sob as mesmas condições.

Por isso, a proposta no presente estudo foi selecionar *primers*, ISSR (*Inter Simple Sequences Repeats*) em plantas da cultivar 'Itália', para avaliar a progressão de mutações somáticas no decorrer de propagações vegetativas. As ISSRs são sequências de ADN de 100 a 3.000 pb amplificados via PCR usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de sequências de microssatélites. As etapas de obtenção desses marcadores são a extração e amplificação via PCR do ADN, eletroforese em géis de poliacrilamida ou agarose e visualização do polimorfismo por autoradiografia, coloração com prata ou fluorescência (géis de poliacrilamida) ou por coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta (géis de agarose). As principais vantagens dos ISSRs são a geração de grande número de sequências informativas por reação (sequências polimórficas), e o fato dos *primers* serem específicos para sequências simples repetitivas (SSR) do genoma; os *primers* ISSR são maiores (formados por mais de 10 pb) apresentando maior superfície de ancoragem do que os *primers* para RAPD, e possuem temperaturas de ligação dos *primers* mais altas, aumentando a reprodutibilidade

dos produtos de ISSR (Tsumura *et al.*, 1996). Em videira os marcadores ISSR foram previamente utilizados por Herrera *et al.* (2002) que conseguiram discriminar 7 cultivares com 11 *primers* ISSR. Argade *et al.* (2009) utilizando 14 *primers* ISSR conseguiram um total de 119 bandas em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, dos quais 79% eram polimórficos.

A seleção de *primers* específicos para sequências internas de *locus* SSR em plantas da cultivar 'Itália' será importante para estudar a diversidade genética destas plantas coletadas no ano de 2012, e em anos subsequentes. Os *primers* ISSR, considerados como estáveis e reproduzíveis, serão importantes para avaliar a evolução de possíveis mutações somáticas durante o progresso dos ciclos de propagação. No presente estudo, os objetivos foram: a) estabelecer os procedimentos adequados para extrair e quantificar o ADN das plantas da cultivar 'Itália' que foram coletadas em cinco propriedades rurais de Marialva (PR); b) selecionar *primers* ISSR-PCR, a partir de testes realizados com 15 dos 30 *primers* que compõe o banco disponível no laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais; c) padronizar as reações de quantificação de ADN e de ISSR-PCR para a obtenção de melhores resultados quanto a avaliação das plantas da cultivar 'Itália'.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material utilizado

As amostras (folhas jovens) da cultivar 'Itália' de *Vitis vinifera*, foram coletadas em 4 propriedades rurais do município de Marialva localizado na região noroeste do Paraná; foram coletadas 15 amostras por sítio: 1) Sítio Humberto Feltrin. Localização: Estrada Caraná, km 3, município de Marialva. Coordenadas geográficas: 23°30'56" sul, 51°47'57" oeste; 2) Sítio José Carlos Rolla. Localização: Estrada Marialva, km 3, município de Marialva. Coordenadas geográficas: 23°30'32" sul, 51°49'01" oeste; 3) Sítio Paulo Cezar Antunes da Silva. Localização: Estrada Uvarana, km 1, município de Sarandi. Coordenadas geográficas: 23°24'49" sul, 51°48'54" oeste; 4) Sítio Nei Cazelo. Localização: Estrada Professor Paulinho, município de Marialva. Coordenadas geográficas: 23°27'37" sul, 51°46'28" oeste.

As amostras de folhas jovens de cada planta (15 plantas por sítio) foram acondicionadas em sacos de papel alumínio e mantidas no gelo em caixa de isopor. No laboratório estas folhas foram congeladas rapidamente com nitrogênio líquido e guardadas na câmara a -80 °C, até o momento da extração do ADN.

Extração de ADN

Para a extração do ADN das folhas, foi utilizado a metodologia descrita por Thomas e Scott (1993) com algumas modificações, para facilitar o processo de extração; o protocolo foi dividido em três etapas:

Primeira etapa - 100 mg de folhas de cada amostra foi pulverizada com nitrogênio líquido e o pó obtido foi distribuído em 4 microtubos de 2 mL e homogeneizado com 1500 µL de tampão de extração 'A' (Quadro I). Após a homogeneização, foi realizada a centrifugação a 4 °C, durante 10 minutos, com 4.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e em cada tubo foi adicionado 750 µL do tampão 'B' (Quadro I). Após a homogeneização, os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C, durante 30 minutos, sendo levemente agitados a cada 5 minutos. Após este período, os tubos foram retirados do banho-maria e mantidos em temperatura ambiente.

QUADRO I

Composição dos tampões 'A' e 'B' utilizados para extração de ADN de folhas de uva

Buffers 'A' and 'B' used for DNA extraction of grape leaves

Reagentes	Tampão de extração 'A'	Tampão de extração 'B'
PVP-40	2,5%	2,5%
NaCl	0,25 M	0,5 M
Tris HCl pH 7,0	-	0,2 M
Tris HCl pH 8,0	0,25 M	-
EDTA	50 mM	50 mM
β-mercaptoetanol	0,1%	1%
Sarcosil	-	3%
Etanol	-	20%
H ₂ O MiliQ	q.s.p.	q.s.p.

Em seguida, foi adicionado 750 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (preparado na proporção de 24:1) e os tubos foram agitados durante 3 minutos. Em seguida foram centrifugados à temperatura ambiente por 12 minutos com 16.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e a este foi adicionado 0,54 vezes o volume de isopropanol. Após algumas inversões, os tubos foram novamente centrifugados como anteriormente, obtendo-se o *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e a este foi adicionado 200 µL de TE (Tris/HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0). O ADN foi ressuscitado e armazenado no frigorífico a 4 °C.

Segunda etapa - Em cada tubo, foi adicionado 2 µL de RNAse (20 ng/µL), e estes foram mantidos por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foi acrescentado 100 µL de acetato de amônio 7,5 M e, após algumas inversões, os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente por 12 minutos com 16.000 x g. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos novos e a eles foi adicionado 0,54 vezes o volume de isopropanol. Os tubos foram armazenados *over night* na câmara frigorífica a -20 °C.

Terceira etapa - Em seguida, foi realizada uma centrifugação à temperatura ambiente por 12 minutos

com 16.000 x g obtendo-se o *pellet*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 300 µL de etanol 70 % gelado. Após a lavagem, realizou-se uma centrifugação a 4 °C, por 12 minutos, com 16.000 x g. O sobrenadante foi vertido delicadamente e os tubos foram colocados na estufa a 37 °C até que todo o etanol fosse evaporado. O *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de TE e os tubos vedados com *parafilm*, e armazenados em frigorífico a 4 °C.

Quantificação das amostras

Após a extração do ADN das amostras, foi realizada a quantificação. Para quantificar o ADN das amostras foram usados 3 métodos. No espectrofotômetro Picodrop®, as amostras foram pipetadas e colocadas no aparelho, que através da absorbância de luz que as mesmas apresentavam, mediu a quantidade de ADN presente em cada amostra. Outro método testado foi a quantificação por eletroforese no gel de agarose a 0,8% e ainda pelo Fluorímetro Qubit® que capta a fluorescência emitida pela amostra tratada com fluoróforos e faz a quantificação.

Seleção de primers ISSR

Foram testados 15 *primers* ISSR (Quadro II) para amplificar as amostras de ADN por PCR, utilizando-se 2 µL de ADN purificado, 0,2 µL de *Taq-DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen), 0,4 µL de cada *primer*, 0,8 µL de dNTP, 1,6 µL de MgCl₂, 2 µL de tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,8) e água mili-Q para um volume final de 20 µL de solução.

QUADRO II

Primers ISSR testados para amplificar ADN de folhas da cultivar 'Itália', suas respectivas sequências de nucleotídeos, e o número de bandas obtidas em cada um dos *primers*, para as diferentes amostras de ADN da cultivar 'Itália' usando uma temperatura de anelamento de 50 °C

ISSR primers to amplify DNA from leaves of the 'Itália' cultivar, their nucleotide sequences, and the number of bands observed with each primer for the different DNA samples of the 'Itália' cultivar using an annealing temperature of 50 °C

<i>Primers</i> ISSR	Sequência de Nucleotídeos	Número de Bandas Obtidas
ISSR-1	(AC) ₈ TT	8
ISSR-2	(AC) ₈ AG	7
ISSR-3	(AC) ₈ TG	nd
ISSR-4	(GACA) ₄	nd
ISSR-5	(AC) ₈ AA	13
ISSR-6	(AG) ₈ TA	7
ISSR-7	(AG) ₈ GA	6
ISSR-8	(ACTC) ₄	10
ISSR-9	(TG) ₈ GG	7
ISSR-10	(CTC) ₆	nd
ISSR-11	(AC) ₈ CA	12
ISSR-12	(AG) ₈ GCT	9
ISSR-13	(AC) ₈ CC	9
ISSR-14	(AC) ₈ CT	10
ISSR-15	(AC) ₈ GA	8
Total		106

Segundo a literatura a temperatura de ligação dos *primers* para os ISSR em videira ronda os 50 °C, Alizadeh *et al.* (2008) consideraram variações entre os 44,6 °C e os 55 °C, enquanto Moreno *et al.* (1998) e Nookaraju e Agrawal (2012) consideraram 52 °C. Por isso, primeiramente foram testados todos os *primers* à temperatura de anelamento de 50 °C, e posteriormente a temperatura foi modificada para valores entre os 48 °C e 51 °C.

Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese utilizando gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizado com luz ultravioleta, utilizando o equipamento *Ultraviolet Transilluminador High Performance - Edas 290* com o programa Kodak 1D 3.5. Para cada *primer* foi utilizado o ADN de 3 plantas diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coleta das folhas jovens da cultivar 'Itália' de *V. vinifera* e a extração do ADN das mesmas foram bem

sucedidas, e o método de quantificação escolhido foi o espectrofotômetro para microvolumes Picodrop®, que conseguiu quantificar todas as amostras. O Picodrop® é um espectrofotômetro UV-Visível para a área de biociências; ideal para medir poucos microlitros de amostra, dispensa diluição, permite realizar leituras em apenas 2 µL de ADN, ARN (Ácido Ribonucleico) e proteínas com excelente exatidão e precisão em uma faixa de leitura que vai de 230 a 850 nm. O Picodrop® permite ainda realizar ensaios de cinética simples; este aparelho permite que a amostra seja integralmente recuperada, após a leitura, sem contaminação ou evaporação, e o tempo de manipulação é de 3 segundos (Analytica, 2011). A quantificação por eletroforese no gel de agarose a 0,8% mostra a integridade do ADN genômico das amostras (Figura 1). As concentrações de ADN variaram de 50 a 400 ng/µL⁻¹. Para as reações de amplificação, o ADN de cada amostra foi diluído para a concentração de 10 ng µL⁻¹, e foi usado 2 µL (20 ng) de ADN de cada amostra.

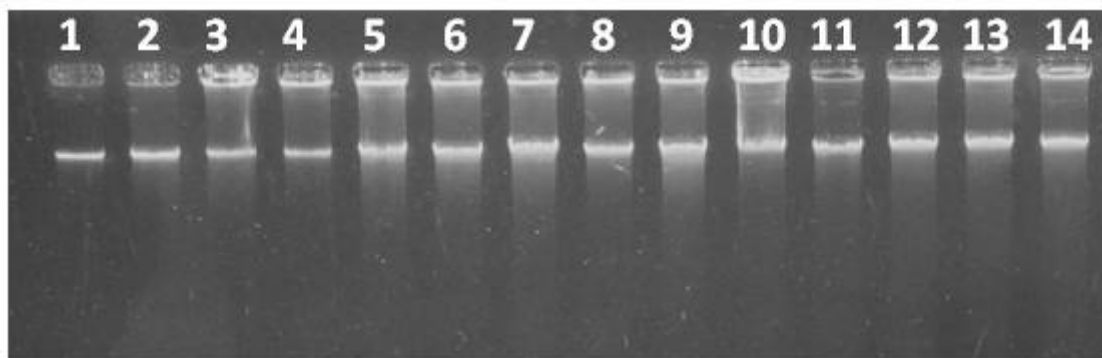


Figura 1. Gel de agarose 0,8% utilizado para quantificação das amostras de ADN da cultivar 'Itália'. As amostras 1 e 2 são ADN de fago λ utilizadas como padrão de concentração com 50 e 100 ng, respectivamente. As demais amostras (3 – 14) são ADN de plantas diferentes.

Agarose gel (0.8%) used for quantification of the DNA samples of the cultivar 'Itália'. Samples 1 and 2 are λ phage DNA used as standard concentrations of 50 and 100 ng, respectively. The samples 3-14 are DNA from different plants.

A temperatura considerada como mais adequada para realizar a ligação dos *primers* durante a amplificação foi 50 °C. Usando a temperatura de 50 °C foi possível selecionar os *primers* ISSR-1, ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-13, ISSR-14 e ISSR-15, que amplificaram seqüências de ADN nítidas e bem definidas no gel de agarose 2%, nas amostras da cultivar 'Itália' (Figura 2). Usando as temperaturas de 48, 49, e 51 °C não foi possível identificar bandas nítidas no gel de agarose, embora outras temperaturas de ligação dos *primers* tenham sido descritas como adequadas para amplificar ISSRs em genótipos de videiras. Herrera *et al.* (2002) descreveram a temperatura de 55 °C, e Jing e Wang (2013) descreveram temperaturas entre 52 a 58 °C como adequadas para amplificar ISSR em diferentes cultivares de *V. vinifera*.

A Figura 2 mostra exemplos de *primers* ISSR (ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-8) no gel de agarose, que apresentaram bandas nítidas à temperatura de

anelamento de 50 °C; foram observadas várias bandas em cada um dos quatro *primers*. O *primer* ISSR-5 foi o que gerou um número maior de regiões ISSR amplificadas (Quadro II). O total de bandas distintas obtidas foi de 106, média de 8,84 bandas por *primer*. Várias regiões ISSR amplificadas, que são geralmente apontadas como bandas, tem sido evidenciadas para outras espécies de plantas por Tsumura *et al.* (1996). Para plantas do gênero *Vitis* (*V. vinifera*, *V. labrusca*, e *V. rotundifolia*) cultivadas na Índia, Dhanorkar *et al.* (2005) identificaram 139 segmentos usando 13 *primers* ISSR. Jing e Wang (2013) conseguiram um total de 119 bandas, variando de 100 a 2.000 bp com uma média de 11,9 bandas por *primer*, das quais 118 (99,16%) são polimórficas. Nookaraju e Agrawal (2012) utilizando também marcadores ISSR em videiras da cultivar 'Crimson Seedless', obtiveram 134 bandas distintas, um número de 2 a 16 bandas por *primer*, com uma média de 6,01 e com tamanhos das bandas variando de 350 pb a 4.005 pb.

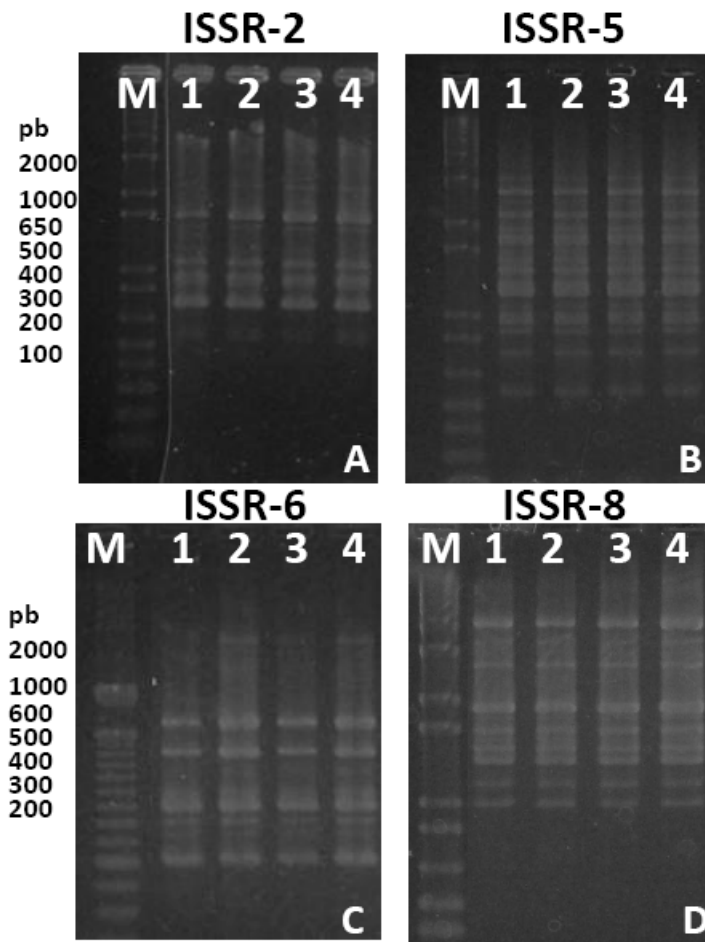


Figura 2. Visualização em gel de agarose dos *primers* ISSR (ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, e ISSR-8) usando a temperatura de anelamento de 50 °C. Para cada *primer* foi utilizado o ADN de quatro amostras diferentes. A primeira amostra (M) de cada gel indica o ADN *ladder* de 1Kb.

ISSR primers (ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6 and ISSR-8) in the agarose gel using a temperature of 50 ° C for annealing. DNA from four different plants was used for each primer. The first sample (M) in each gel indicates a 1kb DNA ladder.

Desta forma, os *primers* selecionados no presente estudo (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-13, ISSR-14 e ISSR-15) poderão ser utilizados para conferir a estabilidade genética dos clones da cultivar ‘Itália’ em diferentes ciclos vegetativos, assim como para comparar a estabilidade genética de cultivares mantidas em regiões geográficas diferentes. Jing e Wang (2013) utilizaram *primers* ISSRs para analisar a diversidade genética entre 70 acessos de uvas, dividindo-os em dois grandes grupos, o grupo de videira selvagem chinesa, e o grupo de cultivares americana e europeia.

A alta diversidade genética na cultivar ‘Itália’ proferida por Maia *et al.* (2008) usando RAPD, poderá ser comparada usando os 12 marcadores de ISSR selecionados no presente estudo, e estes poderão ser usados para monitorizar a estabilidade genética da cultivar ‘Itália’. Os marcadores ISSR foram considerados por Zeinali *et al.* (2012) como adequados para diferenciar clones de uma cultivar, e inclusive para diferenciar plantas com variações de forma e cor de frutos, resultantes de mutações somáticas, utilizando apenas 10 *primers* ISSR.

Portanto, há também uma expectativa de que os *primers* ISSR selecionados no presente estudo possam ser usados para discriminar as variedades de cor (‘Rubi’, ‘Benitaka’, ‘Brasil’) e de forma de baga (‘Redmeire’) derivadas da cultivar ‘Itália’, e a ‘Black Star’, originada da ‘Brasil’.

CONCLUSÕES

Os *primers* ISSR-1, ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-13, ISSR-14 e ISSR-15 conseguiram anelar de maneira efetiva no ADN das amostras de folhas jovens da cultivar ‘Itália’ de *Vitis vinifera* através da reação de PCR, produzindo assim um número satisfatório de bandas nítidas em gel de agarose 2%, com total de 106 bandas e média de 8,84 por *primer*; o *primer* ISSR-05 foi o que apresentou um maior número de bandas (13). Estes *primers* serão utilizados no futuro para análise de variabilidade genética na cultivar ‘Itália’ de *V. vinifera*, bem como nos mutantes somáticos desta cultivar.

AGRADECIMENTOS

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UEM/FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA concedida aos alunos de Graduação e a **CAPEs** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Mestrado concedida e financiamento parcial (PROAP) do projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Alizadeh M., Singhi S.K., Jhang T., Sharma T.R., 2008. Inter Simple Sequence Repeat analysis to confirm genetic stability of micropropagated plantlets in three grape (*Vitis* spp) rootstock genotypes. *J. Plant Biochem. Biot.*, **17**, 77-80.
- ANALYTICA. São Paulo: Eskalab, 10, n. 54, set. 2011. Disponível em: http://www.revistaanalytica.com.br/ed_antiores/54/analytica.pdf. [acesso em: 9 julho 2013].
- Argade N.C., Tamhankar S.A., Karibasappa G.S., Patil S.G., Rao V.S., 2009. DNA profiling and assessment of genetic relationships among important seedless grape (*Vitis vinifera*) varieties in India using ISSR markers. *J. Plant Biochem. Biot.*, **18**, 45-51.
- Benjak A., Boué S., Forneck A., Casacuberta J.M., 2009. Recent amplification and impact of MITEs on the genome of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Genome Biol. Evol.*, **1**, 75-84.
- Camargo U.A., 1998. Cultivares para a viticultura tropical no Brasil. *Informe Agropecuário – EPAMIG*, **19**, 15-19.
- Collier L., Largaespada D., 2007. Transposable elements and the dynamic somatic genome. *Genome Biol.*, **8**, S5.
- Deragon J., Casacuberta J.M., Panaud O., 2008. *Plant transposable elements*. In: *Genome Dyn.* 69-82. Volff J.N. (ed.), Karger Publishers, Basel.
- Dhanorkar V.M., Tamhankar S.A., Patil S.G., Rao V.S., 2005. ISSR-PCR for assessment of genetic relationships among grape varieties cultivated in India. *Vitis*, **44**, 127-131.
- FAO. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. [acesso em dezembro de 2013].
- Franks T., Botta R., Thomas M.R., Franks J., 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.*, **104**, 192-199.
- DERAL-SEAB, 2012. Fruticultura - Análise da Conjuntura Agropecuária. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia.
- Gonçalves J.A., 1995. *Paraná descobre nova variedade de uva*. Folha de São Paulo, São Paulo. Agrofolha, 1.
- Harris J., 1999. RAPDs in systematic: a useful methodology? In: *Molecular Systematics and Plant Evolution*. 221-228. Hollingsworth P.M., Bateman R.M., Gornall, R.J. (eds.). Taylor and Francis, London.
- Herrera R., Cares V., Wilkinson M.J., Caligari P.D.S., 2002. Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. *Euphytica*, **124**, 139-145.
- Hidalgo L., 1993. *Tratado de viticultura general*. 983p. Mundi-Prensa, Madrid.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012. *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Rio de Janeiro.
- Janick J.J., Moore J.N., 1975. *Advances in fruit breeding*. 632 p. Purdue University Press, West Lafayette.
- Jing Z., Wang X., 2013. Genetic relationship between Chinese wild *Vitis* species and American and European cultivars based on ISSR markers. *Biochem. Sys. Ecol.*, **46**, 120-126.
- Kishino A.Y., Genta W., Roberto S.R., 2007. Introdução. In: *Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná*. 35-58. Kishino A.Y., Carvalho S.L.C., Roberto S.R. (Org.), IAPAR, Londrina.
- Kishino A.Y., Mashima M., 1980. Uva: *Vitis vinifera* L. In: *Manual agropecuário do Paraná*. 138-177. IAPAR, Londrina.
- Maia S.H.Z., 2009. *Diversidade genética na videira itália (Vitis vinifera L.), utilizando marcadores microssatélites*. 46p. Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.
- Maia S.H.Z., Mangolin C.A., Oliveira-Collet S.A., Machado M.F.P.S., 2008. Genetic diversity in somatic mutants of grape (*Vitis vinifera* L.). cultivar Itália based on random amplified polymorphic DNA. *Genet. Mol. Res.*, **8**, 28-38.
- Moreno S., Martín J.P., Ortiz J.M., 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica*, **101**, 117-125.
- Nookaraju A., Agrawal D.C., 2012. Genetic homogeneity of in vitro raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. *S. Afr. J. Bot.*, **78**, 302-306.
- Oliveira-Collet S.A., 2003. *Caracterização isoenzimática de cultivares de uva de mesa Vitis vinifera L. (Vitaceae)*. 84p. Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.
- Oliveira-Collet S.A., Collet M.A., Machado M.F.P.S., 2005. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). *Biochem. Sys. Ecol.*, **33**, 691-703.
- Orasmo G.R., Oliveira-Collet S.A., Lapenta A.S., Machado M.F.P.S., 2007. Biochemical and genetic polymorphism for carboxylesterase and acetyesterase in grape clones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) cultivars. *Biochem. Genet.*, **45**, 663-670.
- Pires E.J.P., Sawazaki H.E., Terra M.M., Botelho R.V., Conagim A., Nogueira N.A.M., 2003. Redmeire: a natural mutation of cv. Itália in Brazil. *Vitis*, **42**, 55-56.
- Roberto S.R., Assis A.M., Genta W., Yamamoto L.Y., Sato A.J., 2012. 'Black Star': uma mutação somática natural da uva fina de mesa cv. Brasil. *Rev. Bras. Fruticultura*, **34**, 947-950.
- Sousa J.S.I., 1996. *Uvas para o Brasil*. 791p. FEALQ, Piracicaba.
- Souza V.C., Lorenzi H., 2005. Botânica sistemática - guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa.
- Thomas M.R., Scott N.S., 1993. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites, STSs. *Theor. Appl. Genet.*, **86**, 985-990.
- Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H., 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.*, **92**, 40-45.
- Zeinali R., Rahmani F., Abaspour N., Baneh H.D., 2012. Molecular and morphological diversity among grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars in Iran. *Intl. J. Agric. Res. & Rev.*, **2**, 735-743.

de variabilidade genética que pode ser usado através de estratégias de melhoramento, por reprodução sexuada.

A videira está classificada no Grupo Cormófitas, da Divisão Spermatophyta, da Subdivisão Angiospermae, da Classe Dicotyledoneae, da Ordem Rhamnales, da Família Vitaceae, do Gênero *Vitis* (Souza e Lorenzi, 2005). Segundo Sousa (1996) dentro da família Vitaceae o gênero *Vitis* é o único de importância econômica, social e histórica, e a ele pertencem todas as videiras terrestres selvagens ou cultivadas.

A cultivar 'Itália' (VIVC nº 5582 - <http://www.vivc.de/>) tem sido considerada como produtora de uvas finas do Brasil. Sousa (1996) relata que esta cultivar foi obtida por Ângelo Pirovano, na Itália, por meio do cruzamento entre 'Bicane' (VIVC nº 1341 - <http://www.vivc.de/>) e 'Moscatel de Hamburgo' (VIVC nº 8226 - <http://www.vivc.de/>), realizado em 1911, e foi introduzida no Brasil na década de 20. Nos anos 50, passou a ser cultivada comercialmente no Estado de São Paulo, e na década de 60 foi difundida para o norte do Estado do Paraná e outras regiões desse estado. O cultivo da uva 'Itália' no noroeste do Paraná foi iniciado pela colônia japonesa. Os primeiros parreirais plantados no município de Marialva (PR) estavam nas propriedades de Yamanaka e Wakita, no ano de 1962, com material propagativo oriundo do município de Ferraz de Vasconcelos (SP) (Oliveira-Collet, 2003).

O Brasil ficou em 11º lugar em produção de uva no cenário mundial, no ano de 2011 (FAO, 2012). Segundo o IBGE (2012) a área colhida no Brasil em 2011 foi de 80.003 ha., com rendimento médio de 18.293 Kg/ha. A viticultura é uma atividade importante para a manutenção da pequena propriedade no Brasil, porque gera empregos, tanto nos grandes empreendimentos como nas pequenas propriedades. Os pólos produtores de uvas finas de mesa no Estado do Paraná estão nas regiões de Maringá, Cornélio Procopio e Londrina, destacando-se os municípios de Marialva, Mandaguari, Uraí e Assaí como os principais produtores (Kishino *et al.*, 2007). No Paraná, as uvas de mesa e para transformação agroindustrial - representaram 6,2% do volume de frutas produzidas, com os parreirais distribuídos em 6,1 mil hectares. As colheitas proporcionaram 105,0 mil toneladas de uvas (DERAL-SEAB, 2012).

A propagação da videira ocorre de duas formas: sexuada (por semente) ou assexuada (por via vegetativa). As sementes são úteis para o melhoramento genético, para a obtenção de novas variedades (Hidalgo, 1993), mas, a propagação de videiras através de sementes tem sido desvantajosa para o produtor, pois as novas plantas apresentam vigor, produtividade e qualidade dos frutos inferiores aos da planta-mãe; outro fator desvantajoso é a demora na formação do fruto, para colheita. Já a propagação vegetativa baseia-se na facilidade que os

ramos têm de emitir brotos e raízes. Nesse tipo de propagação, as plantas filhas têm as mesmas características da planta-mãe, a não ser que ocorra alguma mutação (Hidalgo, 1993).

Nas regiões Norte e Noroeste do Paraná são cultivadas quatro variedades de uvas finas de mesa, sendo elas: 'Itália' - coloração verde, e as de cor: 'Rubi' - coloração rosada (VIVC nº 22689 - <http://www.vivc.de/>), 'Benitaka' - coloração rosada intensa (VIVC nº 19816 -- <http://www.vivc.de/>), e Brasil - coloração preta (VIVC nº 19817 - <http://www.vivc.de/>). Nestas regiões, o surgimento de cultivares de cor a partir da cultivar 'Itália', é explicado pela ocorrência de mutação somática (Camargo, 1998). A uva 'Itália' vem sendo mantida por propagação vegetativa, sendo a ocorrência de mutações somáticas um evento frequente. A cultivar Rubi foi descrita como originária de mutação somática espontânea da cultivar 'Itália', que ocorreu em um parreiral do produtor Kotaro Okuyama, no município de Santa Mariana, no Estado do Paraná, em 1972 (Kishino e Mashima, 1980). A cultivar 'Benitaka' também foi descrita como originária de uma mutação somática espontânea, sendo encontrada pela primeira vez num parreiral de 'Itália', do viticultor Sadao Takakura, em Floraí, no Paraná, em 1988 (Sousa, 1996), e a cultivar 'Brasil' não foi derivada da 'Itália' como as demais, e sim por mutação somática espontânea da cultivar 'Benitaka', na propriedade de Hideo Takakura, também em Floraí, no ano de 1991 (Gonçalves, 1995). Mais recentemente foram descritas duas novas variedades: a variedade 'Redmeire' (ainda não catalogada), apresentando bagas com formato longo-ovalado, coloração roxa e delicado, sabor moscatel (Pires *et al.*, 2003), derivada de mutação somática da cultivar 'Itália', e a variedade 'Black Star' (ainda não catalogada), apresentando bagas com formato elipsoide alongado e coloração vermelho-escura (Roberto *et al.*, 2012), derivada de mutação somática da cultivar 'Brasil'.

Algumas das mutações existentes são mantidas em um estado quimérico, afetando apenas algumas camadas de células individuais (Franks *et al.*, 2002), e o fenótipo da planta é o resultado da combinação em diferentes células com genótipos diferentes. Elementos transponíveis (TES) são relatados como os maiores contribuintes para estimular a variabilidade do genoma e, em particular, para promover mutações somáticas (Collier e Largaespada, 2007; Deragon *et al.*, 2008). Benjak *et al.* (2009) descreveram um alto número de elementos transponíveis, e estes possuem sequências genômicas transduplicadas e amplificadas, incluindo sequências de genes e fragmentos de outros elementos móveis. Os resultados destes autores mostram também que embora algumas famílias de transposons já estivessem presentes nos genótipos das espécies de videiras selvagens européias e americanas, eles tem sido amplificados e tem sido ativamente transpostos acompanhando a domesticação e o melhoramento deste grupo. Ainda

tem sido considerado que a exposição das folhas da cultivar 'Itália' a determinados fungicidas, agrotóxicos frequentemente aplicados para o controle de doenças comuns em parreiras da região (Collet, informação pessoal), possa estar induzindo mutações de ponto e/ou quebras cromossômicas, contribuindo ainda mais, para promover a instabilidade genética nas parreiras de uvas do grupo 'Itália'.

Nas cultivares 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka', e 'Brasil', a análise de isozimas indicou uniformidade genética (Oliveira-Collet *et al.*, 2005), mas a análise de fragmentos aleatórios de ADN amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) mostrou um polimorfismo de ADN alto (Maia *et al.*, 2008), indicando que mutações somáticas ocorrem com frequência alta. Outras indicações também contrariam a uniformidade genética nas cultivares de 'Itália': a alta proporção de alelos nulos (53,2%) descrito por Orasmo *et al.* (2007) no *locus Est-3* de uma carboxilesterase, e a alta proporção de plantas com quimeras com potencial para disseminar, por propagação vegetativa, são cultivares geneticamente divergentes (Maia, 2009).

A confiabilidade da técnica utilizando marcadores RAPD, usada por Maia *et al.* (2008), que indicou um polimorfismo alto em clones das cultivares 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil', tem sido questionada (Harris, 1999), principalmente devido à baixa especificidade dos *primers* e à repetibilidade dos resultados obtidos. Harris (1999) sugere também que dados obtidos por RAPD, podem ser inexatos devido ao uso de protocolos diferenciados nos estudos. Além disso, comparações entre diferentes estudos com RAPD são difíceis, uma vez que a seleção de *primers* é diferente, além da quantidade e da análise de dados obtidos, a não ser que as análises sejam feitas pelo mesmo investigador e sob as mesmas condições.

Por isso, a proposta no presente estudo foi selecionar *primers*, ISSR (*Inter Simple Sequences Repeats*) em plantas da cultivar 'Itália', para avaliar a progressão de mutações somáticas no decorrer de propagações vegetativas. As ISSRs são sequências de ADN de 100 a 3.000 pb amplificados via PCR usando um único *primer* (16-20 pb) construído a partir de sequências de microssatélites. As etapas de obtenção desses marcadores são a extração e amplificação via PCR do ADN, eletroforese em géis de poliacrilamida ou agarose e visualização do polimorfismo por autoradiografia, coloração com prata ou fluorescência (géis de poliacrilamida) ou por coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta (géis de agarose). As principais vantagens dos ISSRs são a geração de grande número de sequências informativas por reação (sequências polimórficas), e o fato dos *primers* serem específicos para sequências simples repetitivas (SSR) do genoma; os *primers* ISSR são maiores (formados por mais de 10 pb) apresentando maior superfície de ancoragem do que os *primers* para RAPD, e possuem temperaturas de ligação dos *primers* mais altas, aumentando a reprodutibilidade

dos produtos de ISSR (Tsumura *et al.*, 1996). Em videira os marcadores ISSR foram previamente utilizados por Herrera *et al.* (2002) que conseguiram discriminar 7 cultivares com 11 *primers* ISSR. Argade *et al.* (2009) utilizando 14 *primers* ISSR conseguiram um total de 119 bandas em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, dos quais 79% eram polimórficos.

A seleção de *primers* específicos para sequências internas de *locus* SSR em plantas da cultivar 'Itália' será importante para estudar a diversidade genética destas plantas coletadas no ano de 2012, e em anos subsequentes. Os *primers* ISSR, considerados como estáveis e reproduzíveis, serão importantes para avaliar a evolução de possíveis mutações somáticas durante o progresso dos ciclos de propagação. No presente estudo, os objetivos foram: a) estabelecer os procedimentos adequados para extrair e quantificar o ADN das plantas da cultivar 'Itália' que foram coletadas em cinco propriedades rurais de Marialva (PR); b) selecionar *primers* ISSR-PCR, a partir de testes realizados com 15 dos 30 *primers* que compõe o banco disponível no laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais; c) padronizar as reações de quantificação de ADN e de ISSR-PCR para a obtenção de melhores resultados quanto a avaliação das plantas da cultivar 'Itália'.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material utilizado

As amostras (folhas jovens) da cultivar 'Itália' de *Vitis vinifera*, foram coletadas em 4 propriedades rurais do município de Marialva localizado na região noroeste do Paraná; foram coletadas 15 amostras por sítio: 1) Sítio Humberto Feltrin. Localização: Estrada Caraná, km 3, município de Marialva. Coordenadas geográficas: 23°30'56" sul, 51°47'57" oeste; 2) Sítio José Carlos Rolla. Localização: Estrada Marialva, km 3, município de Marialva. Coordenadas geográficas: 23°30'32" sul, 51°49'01" oeste; 3) Sítio Paulo Cezar Antunes da Silva. Localização: Estrada Uvarana, km 1, município de Sarandi. Coordenadas geográficas: 23°24'49" sul, 51°48'54" oeste; 4) Sítio Nei Cazellato. Localização: Estrada Professor Paulinho, município de Marialva. Coordenadas geográficas: 23°27'37" sul, 51°46'28" oeste.

As amostras de folhas jovens de cada planta (15 plantas por sítio) foram acondicionadas em sacos de papel alumínio e mantidas no gelo em caixa de isopor. No laboratório estas folhas foram congeladas rapidamente com nitrogênio líquido e guardadas na câmara a -80 °C, até o momento da extração do ADN.

Extração de ADN

Para a extração do ADN das folhas, foi utilizado a metodologia descrita por Thomas e Scott (1993) com algumas modificações, para facilitar o processo de extração; o protocolo foi dividido em três etapas:

Primeira etapa - 100 mg de folhas de cada amostra foi pulverizada com nitrogênio líquido e o pó obtido foi distribuído em 4 microtubos de 2 mL e homogeneizado com 1500 µL de tampão de extração 'A' (Quadro I). Após a homogeneização, foi realizada a centrifugação a 4 °C, durante 10 minutos, com 4.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e em cada tubo foi adicionado 750 µL do tampão 'B' (Quadro I). Após a homogeneização, os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C, durante 30 minutos, sendo levemente agitados a cada 5 minutos. Após este período, os tubos foram retirados do banho-maria e mantidos em temperatura ambiente.

QUADRO I

Composição dos tampões 'A' e 'B' utilizados para extração de ADN de folhas de uva

Buffers 'A' and 'B' used for DNA extraction of grape leaves

Reagentes	Tampão de extração 'A'	Tampão de extração 'B'
PVP-40	2,5%	2,5%
NaCl	0,25 M	0,5 M
Tris HCl pH 7,0	-	0,2 M
Tris HCl pH 8,0	0,25 M	-
EDTA	50 mM	50 mM
β-mercaptoetanol	0,1%	1%
Sarcosil	-	3%
Etanol	-	20%
H ₂ O MiliQ	q.s.p.	q.s.p.

Em seguida, foi adicionado 750 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (preparado na proporção de 24:1) e os tubos foram agitados durante 3 minutos. Em seguida foram centrifugados à temperatura ambiente por 12 minutos com 16.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e a este foi adicionado 0,54 vezes o volume de isopropanol. Após algumas inversões, os tubos foram novamente centrifugados como anteriormente, obtendo-se o *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e a este foi adicionado 200 µL de TE (Tris/HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0). O ADN foi ressuscitado e armazenado no frigorífico a 4 °C.

Segunda etapa - Em cada tubo, foi adicionado 2 µL de RNAse (20 ng/µL), e estes foram mantidos por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foi acrescentado 100 µL de acetato de amônio 7,5 M e, após algumas inversões, os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente por 12 minutos com 16.000 x g. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos novos e a eles foi adicionado 0,54 vezes o volume de isopropanol. Os tubos foram armazenados *over night* na câmara frigorífica a -20 °C.

Terceira etapa - Em seguida, foi realizada uma centrifugação à temperatura ambiente por 12 minutos

com 16.000 x g obtendo-se o *pellet*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 300 µL de etanol 70 % gelado. Após a lavagem, realizou-se uma centrifugação a 4 °C, por 12 minutos, com 16.000 x g. O sobrenadante foi vertido delicadamente e os tubos foram colocados na estufa a 37 °C até que todo o etanol fosse evaporado. O *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de TE e os tubos vedados com *parafilm*, e armazenados em frigorífico a 4 °C.

Quantificação das amostras

Após a extração do ADN das amostras, foi realizada a quantificação. Para quantificar o ADN das amostras foram usados 3 métodos. No espectrofotômetro Picodrop®, as amostras foram pipetadas e colocadas no aparelho, que através da absorbância de luz que as mesmas apresentavam, mediu a quantidade de ADN presente em cada amostra. Outro método testado foi a quantificação por eletroforese no gel de agarose a 0,8% e ainda pelo Fluorímetro Qubit® que capta a fluorescência emitida pela amostra tratada com fluoróforos e faz a quantificação.

Seleção de primers ISSR

Foram testados 15 *primers* ISSR (Quadro II) para amplificar as amostras de ADN por PCR, utilizando-se 2 µL de ADN purificado, 0,2 µL de *Taq-DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen), 0,4 µL de cada *primer*, 0,8 µL de dNTP, 1,6 µL de MgCl₂, 2 µL de tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,8) e água mili-Q para um volume final de 20 µL de solução.

QUADRO II

Primers ISSR testados para amplificar ADN de folhas da cultivar 'Itália', suas respectivas sequências de nucleotídeos, e o número de bandas obtidas em cada um dos *primers*, para as diferentes amostras de ADN da cultivar 'Itália' usando uma temperatura de anelamento de 50 °C

ISSR primers to amplify DNA from leaves of the 'Itália' cultivar, their nucleotide sequences, and the number of bands observed with each primer for the different DNA samples of the 'Itália' cultivar using an annealing temperature of 50 °C

<i>Primers</i> ISSR	Sequência de Nucleotídeos	Número de Bandas Obtidas
ISSR-1	(AC) ₈ TT	8
ISSR-2	(AC) ₈ AG	7
ISSR-3	(AC) ₈ TG	nd
ISSR-4	(GACA) ₄	nd
ISSR-5	(AC) ₈ AA	13
ISSR-6	(AG) ₈ TA	7
ISSR-7	(AG) ₈ GA	6
ISSR-8	(ACTC) ₄	10
ISSR-9	(TG) ₈ GG	7
ISSR-10	(CTC) ₆	nd
ISSR-11	(AC) ₈ CA	12
ISSR-12	(AG) ₈ GCT	9
ISSR-13	(AC) ₈ CC	9
ISSR-14	(AC) ₈ CT	10
ISSR-15	(AC) ₈ GA	8
Total		106

Segundo a literatura a temperatura de ligação dos *primers* para os ISSR em videira ronda os 50 °C, Alizadeh *et al.* (2008) consideraram variações entre os 44,6 °C e os 55 °C, enquanto Moreno *et al.* (1998) e Nookaraju e Agrawal (2012) consideraram 52 °C. Por isso, primeiramente foram testados todos os *primers* à temperatura de anelamento de 50 °C, e posteriormente a temperatura foi modificada para valores entre os 48 °C e 51 °C.

Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese utilizando gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizado com luz ultravioleta, utilizando o equipamento *Ultraviolet Transilluminador High Performance - Edas 290* com o programa Kodak 1D 3.5. Para cada *primer* foi utilizado o ADN de 3 plantas diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coleta das folhas jovens da cultivar 'Itália' de *V. vinifera* e a extração do ADN das mesmas foram bem

sucedidas, e o método de quantificação escolhido foi o espectrofotômetro para microvolumes Picodrop®, que conseguiu quantificar todas as amostras. O Picodrop® é um espectrofotômetro UV-Visível para a área de biociências; ideal para medir poucos microlitros de amostra, dispensa diluição, permite realizar leituras em apenas 2 µL de ADN, ARN (Ácido Ribonucleico) e proteínas com excelente exatidão e precisão em uma faixa de leitura que vai de 230 a 850 nm. O Picodrop® permite ainda realizar ensaios de cinética simples; este aparelho permite que a amostra seja integralmente recuperada, após a leitura, sem contaminação ou evaporação, e o tempo de manipulação é de 3 segundos (Analytica, 2011). A quantificação por eletroforese no gel de agarose a 0,8% mostra a integridade do ADN genômico das amostras (Figura 1). As concentrações de ADN variaram de 50 a 400 ng/µL⁻¹. Para as reações de amplificação, o ADN de cada amostra foi diluído para a concentração de 10 ng µL⁻¹, e foi usado 2 µL (20 ng) de ADN de cada amostra.

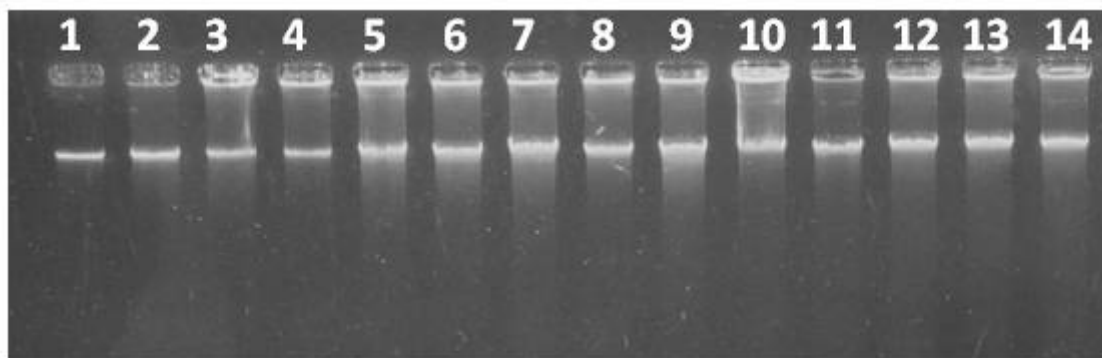


Figura 1. Gel de agarose 0,8% utilizado para quantificação das amostras de ADN da cultivar 'Itália'. As amostras 1 e 2 são ADN de fago λ utilizadas como padrão de concentração com 50 e 100 ng, respectivamente. As demais amostras (3 – 14) são ADN de plantas diferentes.

Agarose gel (0.8%) used for quantification of the DNA samples of the cultivar 'Itália'. Samples 1 and 2 are λ phage DNA used as standard concentrations of 50 and 100 ng, respectively. The samples 3-14 are DNA from different plants.

A temperatura considerada como mais adequada para realizar a ligação dos *primers* durante a amplificação foi 50 °C. Usando a temperatura de 50 °C foi possível selecionar os *primers* ISSR-1, ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-13, ISSR-14 e ISSR-15, que amplificaram seqüências de ADN nítidas e bem definidas no gel de agarose 2%, nas amostras da cultivar 'Itália' (Figura 2). Usando as temperaturas de 48, 49, e 51 °C não foi possível identificar bandas nítidas no gel de agarose, embora outras temperaturas de ligação dos *primers* tenham sido descritas como adequadas para amplificar ISSRs em genótipos de videiras. Herrera *et al.* (2002) descreveram a temperatura de 55 °C, e Jing e Wang (2013) descreveram temperaturas entre 52 a 58 °C como adequadas para amplificar ISSR em diferentes cultivares de *V. vinifera*.

A Figura 2 mostra exemplos de *primers* ISSR (ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-8) no gel de agarose, que apresentaram bandas nítidas à temperatura de

anelamento de 50 °C; foram observadas várias bandas em cada um dos quatro *primers*. O *primer* ISSR-5 foi o que gerou um número maior de regiões ISSR amplificadas (Quadro II). O total de bandas distintas obtidas foi de 106, média de 8,84 bandas por *primer*. Várias regiões ISSR amplificadas, que são geralmente apontadas como bandas, tem sido evidenciadas para outras espécies de plantas por Tsumura *et al.* (1996). Para plantas do gênero *Vitis* (*V. vinifera*, *V. labrusca*, e *V. rotundifolia*) cultivadas na Índia, Dhanorkar *et al.* (2005) identificaram 139 segmentos usando 13 *primers* ISSR. Jing e Wang (2013) conseguiram um total de 119 bandas, variando de 100 a 2.000 bp com uma média de 11,9 bandas por *primer*, das quais 118 (99,16%) são polimórficas. Nookaraju e Agrawal (2012) utilizando também marcadores ISSR em videiras da cultivar 'Crimson Seedless', obtiveram 134 bandas distintas, um número de 2 a 16 bandas por *primer*, com uma média de 6,01 e com tamanhos das bandas variando de 350 pb a 4.005 pb.

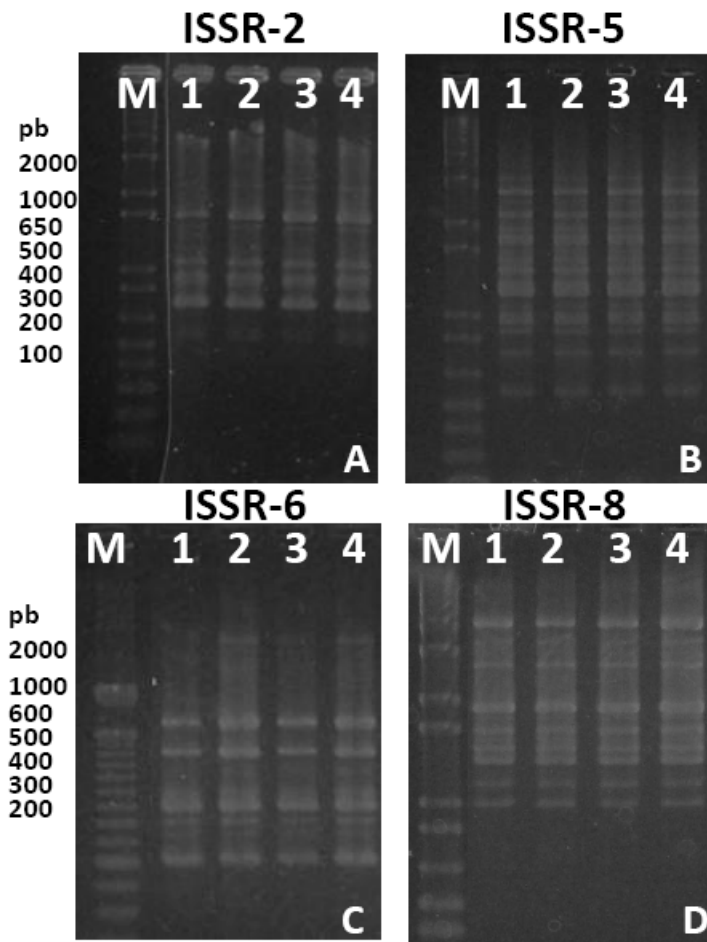


Figura 2. Visualização em gel de agarose dos *primers* ISSR (ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, e ISSR-8) usando a temperatura de anelamento de 50 °C. Para cada *primer* foi utilizado o ADN de quatro amostras diferentes. A primeira amostra (M) de cada gel indica o ADN *ladder* de 1Kb.

ISSR primers (ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6 and ISSR-8) in the agarose gel using a temperature of 50 ° C for annealing. DNA from four different plants was used for each primer. The first sample (M) in each gel indicates a 1kb DNA ladder.

Desta forma, os *primers* selecionados no presente estudo (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-13, ISSR-14 e ISSR-15) poderão ser utilizados para conferir a estabilidade genética dos clones da cultivar ‘Itália’ em diferentes ciclos vegetativos, assim como para comparar a estabilidade genética de cultivares mantidas em regiões geográficas diferentes. Jing e Wang (2013) utilizaram *primers* ISSRs para analisar a diversidade genética entre 70 acessos de uvas, dividindo-os em dois grandes grupos, o grupo de videira selvagem chinesa, e o grupo de cultivares americana e europeia.

A alta diversidade genética na cultivar ‘Itália’ proferida por Maia *et al.* (2008) usando RAPD, poderá ser comparada usando os 12 marcadores de ISSR selecionados no presente estudo, e estes poderão ser usados para monitorizar a estabilidade genética da cultivar ‘Itália’. Os marcadores ISSR foram considerados por Zeinali *et al.* (2012) como adequados para diferenciar clones de uma cultivar, e inclusive para diferenciar plantas com variações de forma e cor de frutos, resultantes de mutações somáticas, utilizando apenas 10 *primers* ISSR.

Portanto, há também uma expectativa de que os *primers* ISSR selecionados no presente estudo possam ser usados para discriminar as variedades de cor (‘Rubi’, ‘Benitaka’, ‘Brasil’) e de forma de baga (‘Redmeire’) derivadas da cultivar ‘Itália’, e a ‘Black Star’, originada da ‘Brasil’.

CONCLUSÕES

Os *primers* ISSR-1, ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-13, ISSR-14 e ISSR-15 conseguiram anelar de maneira efetiva no ADN das amostras de folhas jovens da cultivar ‘Itália’ de *Vitis vinifera* através da reação de PCR, produzindo assim um número satisfatório de bandas nítidas em gel de agarose 2%, com total de 106 bandas e média de 8,84 por *primer*; o *primer* ISSR-05 foi o que apresentou um maior número de bandas (13). Estes *primers* serão utilizados no futuro para análise de variabilidade genética na cultivar ‘Itália’ de *V. vinifera*, bem como nos mutantes somáticos desta cultivar.

AGRADECIMENTOS

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UEM/FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA concedida aos alunos de Graduação e a **CAPEs** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Mestrado concedida e financiamento parcial (PROAP) do projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Alizadeh M., Singhi S.K., Jhang T., Sharma T.R., 2008. Inter Simple Sequence Repeat analysis to confirm genetic stability of micropropagated plantlets in three grape (*Vitis* spp) rootstock genotypes. *J. Plant Biochem. Biot.*, **17**, 77-80.
- ANALYTICA. São Paulo: Eskalab, 10, n. 54, set. 2011. Disponível em: http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/54/analytica.pdf. [acesso em: 9 julho 2013].
- Argade N.C., Tamhankar S.A., Karibasappa G.S., Patil S.G., Rao V.S., 2009. DNA profiling and assessment of genetic relationships among important seedless grape (*Vitis vinifera*) varieties in India using ISSR markers. *J. Plant Biochem. Biot.*, **18**, 45-51.
- Benjak A., Boué S., Forneck A., Casacuberta J.M., 2009. Recent amplification and impact of MITEs on the genome of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Genome Biol. Evol.*, **1**, 75-84.
- Camargo U.A., 1998. Cultivares para a viticultura tropical no Brasil. *Informe Agropecuário – EPAMIG*, **19**, 15-19.
- Collier L., Largaespada D., 2007. Transposable elements and the dynamic somatic genome. *Genome Biol.*, **8**, S5.
- Deragon J., Casacuberta J.M., Panaud O., 2008. *Plant transposable elements*. In: *Genome Dyn.* 69-82. Volff J.N. (ed.), Karger Publishers, Basel.
- Dhanorkar V.M., Tamhankar S.A., Patil S.G., Rao V.S., 2005. ISSR-PCR for assessment of genetic relationships among grape varieties cultivated in India. *Vitis*, **44**, 127-131.
- FAO. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. [acesso em dezembro de 2013].
- Franks T., Botta R., Thomas M.R., Franks J., 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.*, **104**, 192-199.
- DERAL-SEAB, 2012. Fruticultura - Análise da Conjuntura Agropecuária. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia.
- Gonçalves J.A., 1995. *Paraná descobre nova variedade de uva*. Folha de São Paulo, São Paulo. Agrofolha, 1.
- Harris J., 1999. RAPDs in systematic: a useful methodology? *In: Molecular Systematics and Plant Evolution*. 221-228. Hollingsworth P.M., Bateman R.M., Gornall, R.J. (eds.). Taylor and Francis, London.
- Herrera R., Cares V., Wilkinson M.J., Caligari P.D.S., 2002. Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. *Euphytica*, **124**, 139-145.
- Hidalgo L., 1993. *Tratado de viticultura general*. 983p. Mundi-Prensa, Madrid.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012. *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Rio de Janeiro.
- Janick J.J., Moore J.N., 1975. *Advances in fruit breeding*. 632 p. Purdue University Press, West Lafayette.
- Jing Z., Wang X., 2013. Genetic relationship between Chinese wild *Vitis* species and American and European cultivars based on ISSR markers. *Biochem. Sys. Ecol.*, **46**, 120-126.
- Kishino A.Y., Genta W., Roberto S.R., 2007. Introdução. *In: Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná*. 35-58. Kishino A.Y., Carvalho S.L.C., Roberto S.R. (Org.), IAPAR, Londrina.
- Kishino A.Y., Mashima M., 1980. Uva: *Vitis vinifera* L. *In: Manual agropecuário do Paraná*. 138-177. IAPAR, Londrina.
- Maia S.H.Z., 2009. *Diversidade genética na videira itália (Vitis vinifera L.), utilizando marcadores microssatélites*. 46p. Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.
- Maia S.H.Z., Mangolin C.A., Oliveira-Collet S.A., Machado M.F.P.S., 2008. Genetic diversity in somatic mutants of grape (*Vitis vinifera* L.). cultivar Itália based on random amplified polymorphic DNA. *Genet. Mol. Res.*, **8**, 28-38.
- Moreno S., Martín J.P., Ortiz J.M., 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica*, **101**, 117-125.
- Nookaraju A., Agrawal D.C., 2012. Genetic homogeneity of in vitro raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. *S. Afr. J. Bot.*, **78**, 302-306.
- Oliveira-Collet S.A., 2003. *Caracterização isoenzimática de cultivares de uva de mesa Vitis vinifera L. (Vitaceae)*. 84p. Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.
- Oliveira-Collet S.A., Collet M.A., Machado M.F.P.S., 2005. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). *Biochem. Sys. Ecol.*, **33**, 691-703.
- Orasmo G.R., Oliveira-Collet S.A., Lapenta A.S., Machado M.F.P.S., 2007. Biochemical and genetic polymorphism for carboxylesterase and acetyesterase in grape clones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) cultivars. *Biochem. Genet.*, **45**, 663-670.
- Pires E.J.P., Sawazaki H.E., Terra M.M., Botelho R.V., Conagim A., Nogueira N.A.M., 2003. Redmeire: a natural mutation of cv. Itália in Brazil. *Vitis*, **42**, 55-56.
- Roberto S.R., Assis A.M., Genta W., Yamamoto L.Y., Sato A.J., 2012. 'Black Star': uma mutação somática natural da uva fina de mesa cv. Brasil. *Rev. Bras. Fruticultura*, **34**, 947-950.
- Sousa J.S.I., 1996. *Uvas para o Brasil*. 791p. FEALQ, Piracicaba.
- Souza V.C., Lorenzi H., 2005. Botânica sistemática - guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa.
- Thomas M.R., Scott N.S., 1993. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites, STSs. *Theor. Appl. Genet.*, **86**, 985-990.
- Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H., 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.*, **92**, 40-45.
- Zeinali R., Rahmani F., Abaspour N., Baneh H.D., 2012. Molecular and morphological diversity among grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars in Iran. *Intl. J. Agric. Res. & Rev.*, **2**, 735-743.