

Identificação varietal e genotipagem – serviços oferecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Uva e Vinho

Luis Fernando Revers¹
Carlos Alberto Ely Machado¹

Introdução

A identificação de cultivares de uva é tradicionalmente baseada na ampelografia, através da análise e comparação de características morfológicas de folhas, tipo de brotos, cachos e tipo de baga (GALET, 1991; BOURSIQUOT; THIS, 1996; IPGRI, 1997; GALET, 2000). No entanto, a perícia em ampelografia é restrita a um número pequeno e cada vez menor de especialistas. Além disso, a expressão das características morfológicas é influenciada por fatores ambientais, biologia, histórico da planta; e plantas jovens são praticamente impossíveis de se identificar, porque com 4 ou 5 anos, ainda não exibem características morfológicas típicas de plantas adultas.

Algumas cultivares geneticamente próximas são morfológicamente muito similares e difíceis de diferenciar mediante comparação botânica (ARADHYA et al., 2003). Por outro lado, clones intravarietais podem diferir consideravelmente no fenótipo, mesmo que tenham perfis de DNA praticamente idênticos (VIGNANI et al., 1996; FRANKS et al., 2002; RIAZ et al., 2002). Para superar estas limitações da ampelografia, marcadores moleculares baseados em DNA têm sido utilizados para diferenciar, caracterizar e identificar as cultivares de videira existentes mais cultivadas. Os marcadores moleculares do tipo microssatélite, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeat*), são marcadores moleculares baseados na amplificação de seqüências repetidas (1 a 6

pares de base) originalmente desenvolvidos para marcação do genoma humano (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989), mas abundantemente encontrados no genoma de eucariotos (LAGERCRANTZ et al. 1993; WANG et al. 1994). Devido à distribuição regular no genoma de eucariotos, multialelismo (alto nível de polimorfismo), padrão de segregação codominante e reprodutibilidade, este tipo de marcador tornou-se amplamente utilizado e adequado para muitas aplicações genéticas. Entre elas destacam-se os testes de identidade genética, onde há necessidade de discriminação de indivíduos e identificação de parentesco, além de serem utilizados nos trabalhos de mapeamento genético (SEFC et al., 2001).

A utilização de marcadores microssatélites para a construção de bancos de dados e identificação de cultivares de videira pode simplificar a identificação de erros e sinonímias no vasto número de cultivares utilizado na viticultura brasileira. As principais aplicações da metodologia estão na identificação precisa de cultivares de videira, recuperação de genealogias e genotipagem de novas cultivares (proteção intelectual). Conseqüentemente, estas práticas podem também ser utilizadas em procedimentos modernos de controle nas cadeias produtivas como: rastreabilidade, certificação de mudas por viveristas e de vinhedos visando atender requisitos de denominações de origem e indicações de procedência controladas.

¹ Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, SP, Brasil. E-mail: luis@cnpuv.embrapa.br; carlos@cnpuv.embrapa.br.

O serviço de identificação varietal da Embrapa Uva e Vinho utiliza um banco de dados especializado, denominado BanVitis, desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal (LBMV) contendo mais de 2.000 perfis genético-moleculares compilados de coleções de dados de videira internacionais (França, Itália, Estados Unidos, Grécia etc.), da literatura internacional especializada sobre videira e gerados pelas atividades de pesquisa do LBMV. Cultivares de videira podem ser identificadas comparando-se o perfil de testes de DNA de uma amostra desconhecida de videira com perfis conhecidos no banco de dados. A identificação pode ser realizada para cultivares de uva viníferas, cultivares de uvas de mesa, cultivares híbridas, cultivares de uva americanas e porta-enxertos (este último em menor número).

Descrição dos serviços

Identificação genética (DNA) de cultivares de videira

Este teste é utilizado para determinar ou confirmar a identidade de uma amostra particular de videira. Para este propósito, a amostra da videira em questão será testada utilizando-se um número cientificamente relevante de marcadores microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*), e o perfil do teste de DNA resultante é comparado com um banco de dados de cultivares conhecido, permitindo a identificação da cultivar correspondente à amostra testada. Neste teste, serão utilizados como padrão, seis *loci* de marcadores microssatélites suficientemente capazes distinguir um número elevado de cultivares de videira (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG 62 e VrZAG79, This et al. 2004). Adicionalmente, conforme avaliação caso a caso, 3 a 4 *loci* de marcadores SSR adicionais poderão ser utilizados, visando elevar o grau de confiabilidade do teste. Padrões de perfis genéticos previamente conhecidos serão utilizados como referência para a realização do teste de identificação genética. A Figura 1 mostra um exemplo de teste de identificação genética realizado. Neste exemplo o produtor possuía dúvidas se a cultivar de seus vinhedos correspondia à cultivar Carménère ou à Cabernet Franc. Após a realização do teste, a estimativa da probabilidade de identidade calculada da amostra da cultivar fornecida ao LBMV ser idêntica à cultivar Carménère do banco ativo de germoplasma da Embrapa Uva e Vinho foi de 99,99986%, permitindo a identificação precisa da cultivar correspondente à amostra fornecida.

Limitações relacionadas com o teste de DNA para identificação de videiras

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. Não existindo perfil genético-molecular de referência para comparação com a amostra submetida, não será possível realizar a identificação.

A tecnologia utilizada 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.

Designações numéricas utilizadas para definir o tamanho dos alelos de microssatélites podem diferir sensivelmente entre laboratórios devido à diferenças metodológicas. Ajustamentos para diferenças observadas entre laboratórios poderão ser realizadas referenciando-se cultivares comuns que possuam os mesmos alelos dos das amostras analisadas.

Genótipos ambíguos para um determinado marcador SSR podem ser observados ocasionalmente. Estas ambigüidades, consequência normal da metodologia, podem ser solucionadas se os genitores da cultivar forem incluídos nas análises. Estas ambigüidades não constituem um problema na geração de um perfil único para a cultivar testada, uma vez que os resultados para outros marcadores SSR são geralmente corretos, e estes podem sozinho caracterizar uma cultivar de videira unicamente.

Genotipagem de novas cultivares de videira

Esta caracterização é utilizada para criar um perfil genético-molecular característico (assinatura molecular) de uma cultivar de videira para proteção intelectual. Para este propósito, duas amostras separadas de uma cultivar são genotipadas para um número cientificamente relevante de marcadores microssatélites (SSR) e uma assinatura genético-molecular única é gerada. De 10-12 marcadores SSR serão utilizados, um

número suficiente para identificar unicamente qualquer cultivar de videira com grau de confiabilidade extremamente alto. O processo é realizado duas vezes para cada cultivar antes da emissão do laudo técnico. A Tabela 1 mostra a assinatura genético molecular obtida para a cultivar BRS Linda, comparada com o perfil genético de uma cultivar tradicional de uva sem sementes (Superior Seedless). Este perfil genético molecular foi anexado como descritor molecular ao processo de registro da cultivar no Ministério da Agricultura.

Laudo Técnico

Todos os testes são realizados por pessoal técnico qualificado seguindo os conceitos de boas práticas laboratoriais e os resultados são revisados pela equipe do LBMV antes da emissão do laudo técnico. O laudo técnico a ser emitido por ocasião da finalização do teste de DNA descreverá em detalhes os procedimentos realizados, expressando a probabilidade de identidade da amostra fornecida com amostras padrão. As estimativas de probabilidade de identidade genética são obtidas explorando as frequências de distribuição alélicas conforme descrito por Paetkau *et al.* (1995), utilizando-se o software **Identity** (WAGNER; SEFC, 1999). O programa Identity foi originalmente desenvolvido por Wagner e Sefc (1999) para realização de estudos com dados de microssatélites e identificação de sinônimas no gerenciamento de bancos de germoplasma de videira. Utilizando este princípio, o programa procura nos perfis de dados de microssatélites fornecidos por genótipos idênticos, permitindo-se então, identificar-se cultivares iguais.

Coleta, preparo e fornecimento de amostras

As melhores amostras para fazer o teste de DNA correspondem à folhas jovens coletadas de brotos em crescimento, embora outros tecidos possam também ser utilizados, incluindo folhas adultas verdes, raízes, frutos e estacas contendo gemas dormentes (30 a 40cm). Para preservar o DNA e assegurar a estabilidade da amostra, as mesmas devem permanecer resfriadas e levemente umedecidas, porém não em contato direto com gelo. Quando possível, coletar ramos contendo de 4-5 folhas jovens (4 a 8 cm de diâmetro), proteger com papel alumínio, acondicionar em sacos plásticos limpos e transportar em caixa de isopor contendo gelo. Juntamente com o fornecimento das amostras o usuário dos serviços deverá informar o nome das cultivares que podem corresponder à amostra fornecida, procedência,

o porta-enxerto utilizado e endereço para contato (contendo telefone e e-mail). Forma de submissão: a amostra deverá ser entregue (preferencialmente) no setor de recebimento de amostras da Embrapa Uva e Vinho.

Acordo para provisão de serviços de identificação baseados em testes de DNA

Para utilizar o serviço de identificação varietal de videiras utilizando testes baseados em marcadores de DNA, deverá ser realizado um acordo entre o usuário e a Embrapa Uva e Vinho, no qual será discriminado o tipo do serviço a ser realizado, além de conter a identificação e o número de amostras submetidas (o formulário está disponível no setor de recebimento de amostras da Embrapa Uva e Vinho). Em virtude do custo de elevado, o serviço somente será iniciado após concordância de ambas as partes. Os custos dos serviços, tempo para execução e liberação de resultados podem ser consultados diretamente no setor de recebimento de amostras da Embrapa Uva e Vinho.

Referências Bibliográficas

ARADHYAM, K.; DANGL, G. S.; PRINS, B. H.; BOURSQUOT, J. M.; WALKER, A. M.; MEREDITH, C. P.; SIMON, C. J. Genetic structure and differentiation in cultivated grape *Vitis vinifera* L. **Genetical Research**, Cambridge, v. 81, n. 3, p. 179-192, 2003.

BOURSIQUOT, J. M.; THIS, P. Les nouvelles techniques utilisees en ampélographie: informatique et marquage. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, v. 30, p.13-23, 1996. Número especial. La viticulture à l'aube du III^{ème} Millénaire.

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.

GALET, P. **Précis d'ampelographie pratique**. 6. éd. Montpellier: Dehan, 1991. 256 p.

_____. **Dictionnaire encyclopédique des cépages**. Paris: Hachette, 2000. 1024 p.

IPGRI. **Descripteurs de la vigne** (*Vitis* spp.). Roma: IPGRI: UPOV: OIV, 1997. 62 p.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The Abundance of Various Polymorphic Microsatellite Motifs Differs Between Plants and Vertebrates. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1111-1115, 1993.

LITT, M.; LUTY, J. A. A Hypervariable Microsatellite Revealed by Invitro Amplification of A Dinucleotide Repeat Within the Cardiac-Muscle Actin Gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, Edmonton, v. 4, n. 3, p. 347-354, 1995.

RIAZ, S.; DANGL, G. S.; EDWARDS, K. J.; MEREDITH, C. P. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 127, n. 4, p. 508-514, 2002.

SEFC, K. M.; LEFORT, F.; GRANDO, M. S.; SCOTT, K. D.; STEINKELLNER, H.; THOMAS, M. R. Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. (Ed.). **Molecular biology and biotechnology of grapevine**. Amsterdam: Kluwer, p. 433-463, 2001.

THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, J.; 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.; MILANI, N.; PETERLUNGER, E.; REGNER, F.; ZULINI, L.; MAUL, E. 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.

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

WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. **IDENTITY, 1.0**. Wienn: Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, 1999.

WANG, Z.; WEBER, J. L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S. D. Survey of Plant Short Tandem Dna Repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 1, p. 1-6, 1994.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant Class of Human Dna Polymorphisms Which Can be Typed Using the Polymerase Chain-Reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 388-396, 1989.

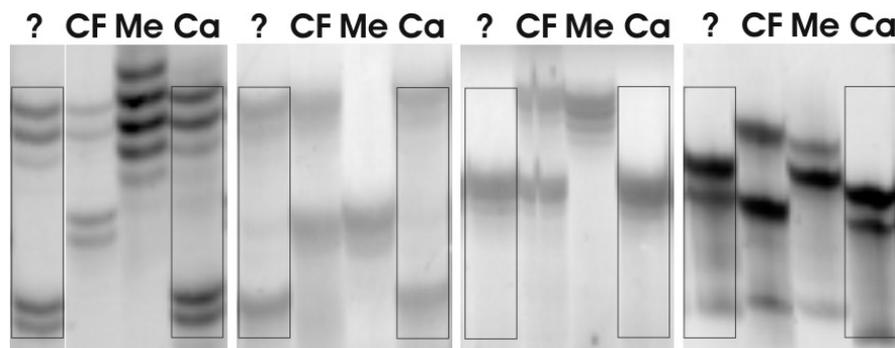


Fig. 1. Comparação de 4 loci de microssatélites, com padrão de amplificação distintos para a amostra fornecida pelo cliente (?), cultivar Cabernet Franc (CF), Merlot (Me) e cultivar Carménère (Ca). Os retângulos identificam o perfil de DNA idêntico entre (?) e (Ca), resultando na identificação da cultivar desconhecida (?) como Carménère (ca).

Tabela 1. Perfil genético molecular de alelos amplificados (em pares de base) para a cultivar BRS Linda comparando-se com a cultivar morfológicamente semelhante Superior Seedless, utilizando 15 *loci* de marcadores microssatélites.

Locus SSR	BRS Linda		Superior Seedless*	
	Alelos em pares de base		Alelos em pares de base	
VVMD5	234	236	236	226
VVMD21	245	245	nd	nd
VVMD25	250	256	259	257
VVMD27	194	194	181	181
VVMD32	270	270	279	258
VVMD36	240	250	nd	nd
VVS1	180	180	nd	nd
VRZAG64	140	140	nd	nd
VVMD6	210	210	210	210
VVMD7	238	250	248	238
VVS29	270	270	177	169
VRZAG62	188	197	nd	nd
VRZAG79	249	257	nd	nd
VRZAG93	189	195	nd	nd
VRZAG112	231	242	nd	nd

Nd = alelos não determinados.

- Os dados para os alelos correspondentes aos *loci* VVMD5, VVMD25 e VVMD27 da cultivar Superior foram obtidos junto ao Centro Regional de Investigación La Platina (INIA), Santiago, Chile.

Comunicado Técnico, 64

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho
 Rua Livramento, 515 – Caixa Postal 130
 95700-000 Bento Gonçalves, RS
Fone: (0xx)54 3455-8000
Fax: (0xx)54 4451-2792
[http:// www.cnpuv.embrapa.br](http://www.cnpuv.embrapa.br)

Ministério da Agricultura,
 Pecuária e Abastecimento



1ª edição
 1ª impressão (2005): on-line

Comitê de Publicações

Presidente: Lucas da Ressurreição Garrido
Secretária-Executivo: Sandra de Souza Sebben
Membros: Jair Costa Nachtigal, Kátia Midori Hiwatashi,
 Osmar Nickel, Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Expediente

Revisão do texto: Kátia Midori Hiwatashi
Normalização bibliográfica: Kátia Midori Hiwatashi