



DIVERSIDADE GENÉTICA EM *VITIS LABRUSCA* E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS USANDO PADRÕES DE ISOESTERASES

Gleice Ribeiro Orasmo¹, Sandra A. de Oliveira Collet², Maria de Fátima P. S. Machado³

RESUMO: Padrões das isoenzimas α e β -esterases em gel de poliacrilamida foram empregados na análise da diversidade genética de espécies americanas (*Vitis labrusca*) e cultivares híbridas de uva. Foram utilizadas 19 plantas da cultivar Niágara Rosada, 97 Bordô, 22 Concord, 49 Rúbea e 39 Isabel, coletadas em parreirais de pequenos e médios produtores do município de Marialva, noroeste do Estado do Paraná. Foram evidenciadas onze isoesterases para a cultivar Isabel, dez para Concord, nove para Bordô e Rúbea e seis para Niágara Rosada. A relação entre as cinco cultivares das uvas americanas usando o padrão eletroforético de α e β -esterases foi estimada de acordo com o coeficiente de similaridade de Jaccard, no qual o dendrograma produzido pela análise de agrupamento mostrou que a similaridade entre as cultivares variou de 45,5% (Niágara Rosada x Concord) a 90,9% (Isabel x Concord). O dendrograma apontou a cultivar Niágara Rosada como a mais divergente. A cultivar Rúbea, resultado do cruzamento entre as cultivares Niágara Rosada e Bordô mostrou um coeficiente de similaridade em torno de 80% com Bordô e 50% com Niágara Rosada. A técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida, sistema PAGE, foi consistente para análise da diversidade entre as uvas americanas. Os coeficientes de similaridade dentre as cultivares, usando o perfil eletroforético das α e β -esterases em gel de poliacrilamida apontam a cultivar Niágara Rosada como promissora para programas de Melhoramento Genético na espécie, por apresentar os menores coeficientes de identidade com as cultivares Concord, Bordô, Rúbea e Isabel.

Palavras-chave: diversidade; esterase; sistema PAGE; *Vitis* spp.; uvas rústicas.

INTRODUÇÃO

A região noroeste do Estado do Paraná, município de Marialva, se destaca, principalmente, na produção de uvas finas de mesa, espécie *V. vinifera*, mas também são produzidas uvas comuns, ou rústicas, de origem americana, como a Bordô e Concord, da espécie *V. labrusca*, e as cultivares Niágara Rosada, Rúbea e Isabel, cultivares híbridas.

As uvas americanas apresentam menor custo com mão-de-obra e menor suscetibilidade às doenças fúngicas, bem como se caracterizam pelo sabor e aroma aframboesado e pela polpa mucilaginoso que se desprende facilmente da película, sendo, por isso, conhecidas como “uvas de chupar” (Camargo e Oliveira, 2001).

A produção destas uvas é destinada, principalmente, à elaboração de sucos, vinhos e frutas desidratadas, mas também possuem boa aceitação para o consumo *in natura*. Frente à importância das uvas americanas, existe o interesse em analisar a

¹ Docente do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-PI. gleice@ufpi.edu.br

² Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR. saocollet@uem.br

³ Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR. mfpmachado@uem.br

diversidade genética para estas cultivares, visando recomendar genótipos de interesse em programas de melhoramento genético de uvas.

As isoenzimas esterases são adequadas e preferenciais para estudos de diversidade genética em plantas (Pereira et al., 2001; Orasmo e Machado, 2003; Orasmo et al., 2007; Carvalho et al., 2003; Oliveira-Collet et al., 2005), uma vez que os polimorfismos gerados por esterases revelam vários *loci* que podem ser usados para a identificação da variação genética

Assim, o presente estudo teve como objetivo utilizar os padrões das isoenzimas α e β -esterases para estimar a diversidade genética existente nas uvas americanas, cultivares Bordô e Concord, da espécie *Vitis labrusca* e as cultivares híbridas: Niágara Rosada, Isabel e Rúbea, cultivadas no município de Marialva, noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 226 uvas rústicas, sendo 19 da cultivar Niágara Rosada, 97 Bordô, 22 Concord, 49 Rúbea e 39 Isabel, coletadas em parreirais de pequenos e médios produtores do município de Marialva, noroeste do Estado do Paraná-BR, foram utilizados para análise de isoenzimas α e β -esterases no sistema PAGE, seguindo protocolo descrito por Orasmo et al., 2007. Ápices de brotos foliares foram individualmente homogenizados em microtúbulos usando bastão de vidro e tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contendo PVP-40 6,0%, EDTA 0,2%, β -mercaptoetanol 0,5% e ácido ascórbico 0,1%.

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 25.000 rpm, por 30 min, a 4°C, em uma centrífuga Sorval 3K-30. Em torno de 30 μ l do sobrenadante de cada amostra, foram aplicados no gel de poliacrilamida a 14%, sendo o gel de visualização elaborado com 7,23 ml de solução de acrilamida (10%) / bisacrilamida (0,5%), dissolvido em 2,66 ml de Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 7,5, 6,01 ml de água bidestilada, 320 μ l de persulfato de amônia 2% e 16 μ l de TEMED. O gel de empilhamento foi confeccionado com 3,0 ml da solução de acrilamida (10%) / bisacrilamida (5%), dissolvido em 3,0 ml do tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8m, 30 μ l de água bidestilada, 250 μ l de persulfato de amônia 2% e 3 μ l de TEMED. A eletroforese foi conduzida durante 10-13 h, em 4°C, com voltagem constante de 200 V. Nos eletrodos foi usado o tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3. Para a cultivar Niágara Rosada foi utilizado para confecção do gel 4,0 ml do tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e 4,67 ml de água bidestilada e a corrida durou de 5–7 horas.

Para a identificação das isoesterases o gel foi embebido em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2, em temperatura ambiente e após 30 min. foi colocado na solução preparada com 50 ml do mesmo tampão, 30 mg de β -naftil acetato, 30 mg de α -naftil acetato, 60 mg de Fast Blue RR Salt e 5,0 ml de N-Propanol. O gel foi fixado por 1 h em uma mistura de 7,5% de ácido acético e 10% de glicerol. Para secagem, foi banhado em solução de gelatina 5%, prensados em um bastidor entre duas folhas de papel celofane, à temperatura ambiente por 3-4 dias. O zimograma formado pelo conjunto de bandas foi analisado utilizando o programa NTSYS-pc.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 01 mostra os géis das cinco cultivares americanas de uva, Bordô e Concord, espécie *V. labrusca*, Niágara Rosada, Rúbea e Isabel, cultivares híbridas, evidenciando isoenzimas α -, β - e α/β esterases no sistema PAGE.

Para a cultivar Niágara Rosada a eletroforese foi conduzida com menor duração e revelou menor número de bandas, evidenciando 06 isoesterases, das quais: EST-2 e EST-3 foram consideradas como sendo α -esterases, EST-4 e EST-5, β -esterases e as

isoenzimas EST-9 e EST-10 como sendo α/β -esterases. Para as demais cultivares analisadas no presente estudo, a corrida eletroforética teve duração de 10-13 h e foi detectado um maior número de bandas, num total de 11 isoesterases (Figura 01).

Em *Vitis vinifera* o sistema esterase revelou 16 isoesterases sobre o mesmo protocolo e tempo de corrida eletroforética (Orasmo et. al. 2007). Por outro lado, usando eletroforese em gel de amido foram detectados apenas 7 isoesterases (Oliveira-Colletet al. 2005). Em diferentes cultivares de mandioca (Pereira et al., 2001) e peroba (Carvalho et al., 2003) foram detectadas 14 isoesterases por PAGE. Estes dados indicam que o sistema esterase em gel de poliacrilamida é capaz de revelar maior número de *loci* para isoenzimas.

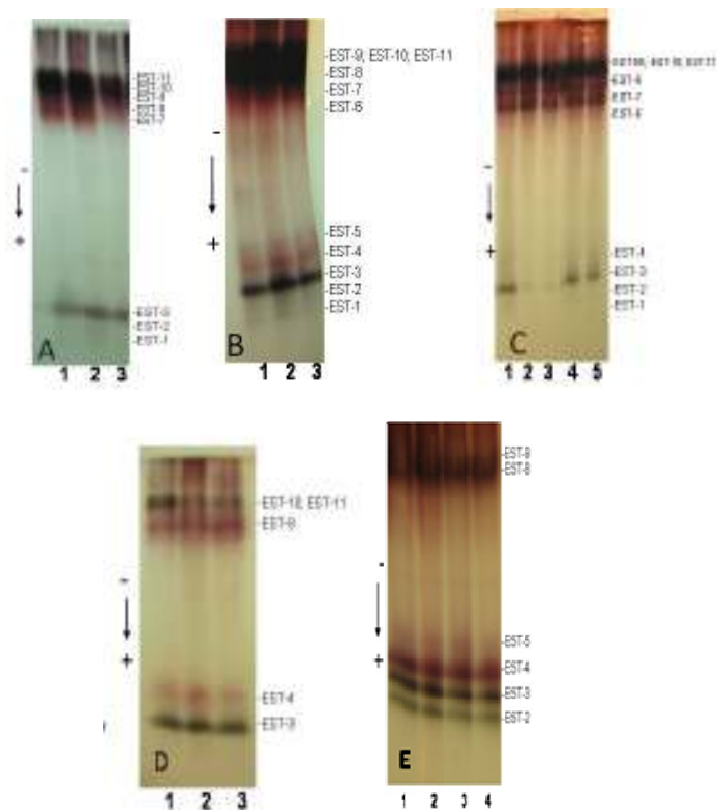


Figura 01. Isoesterases de brotos foliares das cultivares Rúbea (A), Isabel (B); Concord (C), Bordô (D) e Niágara Rosada (E) de *Vitis labrusca* e híbridas, evidenciadas com α - e β -naftil acetato.

Para as cultivares Bordô e Rúbea foram detectadas um total de 9 isoenzimas esterases, sendo para Bordô a EST-1, EST-2 e EST-3 caracterizadas como α -esterases, EST- 4, EST-5 e EST-7 como β -esterases e EST-8, EST-10 e EST-11 como α/β -esterases (Figura 01); e para Rúbea, as isoesterases EST-1, EST-2 e EST-3 foram classificadas como α -esterases, EST-4 e EST-7 como β -esterases e EST-8, EST-9, EST-10 e EST-11 como α/β -esterases. Para a cultivar Concord foram reveladas 10 isoesterases, das quais EST-1, EST-2, EST-3 e EST-6 consideradas α -esterases, EST-4 como β -esterase e EST-7, EST-8, EST-9, EST-10 e EST-11 como α/β -esterases. Para a cultivar Isabel foram evidenciadas 11 isoesterases, sendo EST-1, EST-2 e EST-3 consideradas α -esterases, EST-4, EST-5 e EST-6 como β -esterases e EST-7, EST-8, EST-9, EST-10 e EST-11 como α/β -esterases (Figura 01).

O polimorfismo de α - e β -esterases das cultivares de uvas americanas está representado no Quadro 01. A relação entre as cinco cultivares Concord, Bordô, Rúbea,

Isabel e Niágara Rosada usando o padrão eletroforético de α e β -esterases foi estimada de acordo com o coeficiente de similaridade de Jaccard (Quadro 02), no qual o dendrograma produzido pela análise de agrupamento, utilizando o programa NTSYS-pc, mostrou que a similaridade entre as cultivares variou de 45,5% (Niágara Rosada x Concord) a 90,9% (Isabel x Concord). O dendrograma apontou a cultivar Niágara Rosada como a mais divergente (Figura 02).

Quadro 01. Polimorfismos de α e β -esterases detectadas em brotos foliares das cultivares americanas da espécie *Vitis labrusca* e cultivares híbridas.

Esterases	Concord	Bordô	Rúbea	Isabel	Niágara R.
EST-1	+	+	+	+	-
EST-2	+	+	+	+	+
EST-3	+	+	+	+	+
EST-4	+	+	+	+	+
EST-5	-	+	-	+	+
EST-6	+	-	-	+	-
EST-7	+	+	+	+	-
EST-8	+	+	+	+	-
EST-9	+	-	+	+	+
EST-10	+	+	+	+	+
EST-11	+	+	+	+	-

Legenda: (+) presença da isoesterase (-) ausência da isoesterase

Quadro 02. Coeficientes de similaridade de Jaccard, verificados entre as cultivares Concord, Bordô, Rúbea, Isabel e Niágara Rosada (*Vitis labrusca* e cultivares híbridas). Estes coeficientes foram calculados a partir da análise comparativa de 11 isoesterases detectadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

	Concord	Bordô	Rúbea	Isabel	Niágara
Concord	1,000	-----			
Bordô	0,727	1,000			
Rúbea	0,900	0,800	1,000		
Isabel	0,909	0,818	0,818	1,000	
Niágara	0,455	0,500	0,500	0,545	1,000

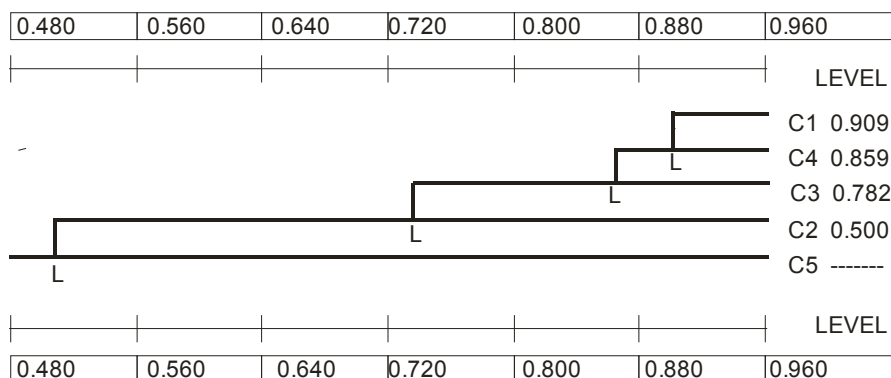


Figura 02. Dendrograma representando a relação entre as cultivares americanas de uva (*Vitis labrusca* e híbridas): C1 - Concord, C2 - Bordô, C3 - Rúbea, C4 - Isabel e C5 - Niágara Rosada, baseado na análise de agrupamento UPGMA dos fenótipos eletroforéticos para as isoenzimas esterases, usando os coeficientes de similaridade de Jaccard.

Embora as cultivares Concord, Isabel e Niágara Rosada tenham uma origem comum por terem sido originadas naturalmente, a partir de cruzamentos entre *V. vinifera* x *V. labrusca*, a cultivar Niágara Rosada é considerada uma mutação da cultivar original Niágara Branca (Camargo, 1998). Assim, é possível que as mutações somáticas que ocorreram na cultivar N. Branca original, para a geração da cultivar Niágara Rosada, tenham determinado as diferenças detectadas no padrão das α e β -esterases entre a cultivar Niágara Rosada e as cultivares Concord e Isabel. A cultivar Rúbea, resultado do cruzamento entre as cultivares Niágara Rosada e Bordô (Camargo e Dias, 1999), mostrou um coeficiente de similaridade em torno de 80% com Bordô e 50% com Niágara Rosada (Quadro 02), estimado através do padrão de α e β -esterases.

CONCLUSÃO

De acordo com os coeficientes de similaridade entre as cinco cultivares americanas, usando o perfil eletroforético das α e β -esterases, a cultivar Niágara Rosada apresenta um potencial genético interessante para programas de melhoramento genético na espécie, por apresentar os menores coeficientes de identidade com as cultivares Concord, Isabel, Bordô e Rúbea.

REFERÊNCIAS

- CAMARGO, U. A.; DIAS, M. F. 'BRS - Rúbea'. **Comunicado Técnico**, v. 33, p. 1-4. Jul., 1999.
- CAMARGO, U. A.; OLIVEIRA, P. R. D. Melhoramento Genético. **Uvas de Mesa Produção: aspectos técnicos**, Brasília: EMBRAPA, p. 14-19, 2001.
- CAMARGO, U. A. Cultivares para a Viticultura Tropical no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 194, p. 15-19, 1998.
- CARVALHO, V.M., MARQUES, R.M., LAPENTA, A.S., AND MACHADO, M.F.P.S. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Genet. Mol. Biol.** **26**: 195-198. 2003.
- OLIVEIRA-COLLET SA, COLLET MA, MACHADO MFPS. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). **Biochem Syst Ecol.** 33:691–703. 2005.
- ORASMO, G. R.; MACHADO, M. F. P. S. Isozyme diversity in RB (Republic of Brazil) surgarcane (*Saccharum* spp.) varieties. **Acta Scientiarum**, v. 25, n. 1, p. 213-219, 2003.
- ORASMO, G.R., OLIVEIRA-COLLET, S.A., LAPENTA, A.S., MACHADO, M.F.P.S. Biochemical and Genetic Polymorphisms for Carboxylesterase and cetylesterase in Grape Clones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) Cultivars. **Biochem. Genet.** **45**: 663–670. 2007.
- PEREIRA, A. J.; LAPENTA, A. S.; VIDIGAL-FILHO, P. S.; MACHADO, M. F. P. S. Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta* Crantz infected by *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. **Biochim. Genet.** v. 39, p. 289-296, 2001.