



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR

Perfil transcricional comparativo de genes associados ao desenvolvimento do fruto das cultivares de uva Isabel e Isabel Precoce (*Vitis labrusca* L.)

Gisele Passaia

Porto Alegre, Março de 2009

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular**

Perfil transcricional comparativo de genes associados ao desenvolvimento do fruto das cultivares de uva Isabel e Isabel Precoce (*Vitis labrusca* L.)

Gisele Passaia

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Margis-Pinheiro

Co-orientador: Dr. Luís Fernando Revers

Porto Alegre, Março de 2009

Instituição e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UFRGS e Laboratório de Biologia Molecular Vegetal da EMBRAPA Uva e Vinho.

As agências de financiamento do Projeto de Pesquisa em que se enquadra o presente trabalho de mestrado foram Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e EMBRAPA Uva e Vinho.

Agradecimentos

Ao Dr. Luís Fernando Revers, por ter sido meu mestre e mentor desde meu ingresso no laboratório de biologia molecular vegetal (LBMV) da EMBRAPA Uva e Vinho. Por todo o apoio, orientação, incentivo e imensa paciência durante os dois anos de iniciação científica e por ter aberto as portas para a pós-graduação.

À professora Márcia Margis-Pinheiro, pela sua orientação e acompanhamento ao longo do trabalho desenvolvido e pela acolhida no núcleo de genômica funcional de plantas de mais uma espécie vegetal.

Aos professores membros da Comissão de Acompanhamento, Dr. Arthur Germano Fett-Netto e Dr. Rogério Margis.

Aos professores do Programa de Pós-graduação e aos funcionários Sílvia e Luciano, secretários do PPGBCM.

A todos do LBMV da EMBRAPA que contribuíram para minha formação profissional e pessoal, especialmente aos amigos que fiz durante esse período, Danielle Costenaro, Fernanda Sbeghen, Vanessa Buffon, Fernanda Rech, Alessandra Russi, Adriana Crippa, Sabrina Becker, Pâmela Perini, Andréia Russi, Vanessa Lampe.

Aos pesquisadores da EMBRAPA Uva e Vinho Dr. Flávio Bello Fialho, Dr. Henrique Pessoa dos Santos e Dr. Celito Crivellaro Guerra.

A todo o pessoal de apoio técnico dos campos experimentais da EMBRAPA Uva e Vinho.

A todos os amigos que conquistei do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal da UFRGS, pela ajuda em minha adaptação a novos ares, sobretudo à Andréia Caverzan, Carolina Werner, Fernanda Lazarotto e Beatriz Wibke pelo companheirismo e momentos de descontração.

À minha família, agradeço por ter proporcionado a oportunidade de estudar. Por terem sido meu órgão financiador durante o primeiro ano de mestrado.

Agradeço acima de tudo a Deus, por ser presença real e amorosa em minha vida.

Resumo

A cultivar de videira Isabel Precoce é resultante de uma mutação somática espontânea de Isabel (*Vitis labrusca* L.) e se caracteriza pela antecipação em cerca de trinta e três dias na colheita. A cultivar Isabel Precoce possui maior uniformidade na maturação de seus frutos e, devido ao seu menor tempo de permanência no campo, está sujeita a menores riscos de ataque por patógenos ou intempéries que venham a assolar a produção. A utilização do modelo de estudo Isabel vs. Isabel Precoce na caracterização de genes associados ao processo de maturação poderá contribuir para a melhor compreensão do processo de amadurecimento do fruto, podendo gerar tecnologias para a obtenção de novas cultivares e/ou plantas transgênicas com características agrônômicas melhores. O presente trabalho objetiva avaliar a expressão de genes relacionados com a maturação do fruto da videira, relacionando seus níveis de expressão com a característica de maturação precoce da cultivar mutante, utilizando a técnica da reação em cadeia da DNA-polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). A partir de extensa revisão bibliográfica, foram projetados vinte e três pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que permitem amplificar genes envolvidos no desenvolvimento do fruto. Esses genes potencialmente codificam fatores de transcrição, proteínas estruturais e proteínas do metabolismo secundário. Os genes que mostraram expressão diferencial, pelo menos em um dos tempos amostrados entre as cultivares, foram VvMYBPA1, VvFT, VvCTG1027667 (expansina) e VvBURP. Os dois primeiros codificam fatores de transcrição, enquanto os dois últimos são genes estruturais que participam da expansão celular e, possivelmente, do estabelecimento da morfologia do fruto, respectivamente. Esses genes são induzidos significativamente na cultivar mutante durante o desenvolvimento do fruto em pelo menos um dos estádios avaliados. Os genes VvMYBPA1, VvFT e VvBURP1 mostraram maior expressão durante a chamada “fase verde” de desenvolvimento do fruto, a qual é caracterizada pelo acúmulo de substâncias para as fases seguintes do desenvolvimento. Por outro lado, a expressão do gene VvCTG1027667 em Isabel Precoce é preferencialmente induzida durante a fase

de maturação do fruto. Os demais genes não tiveram padrão de expressão conservado entre as safras analisadas, indicando que a modulação da sua expressão é fortemente afetada pelas condições ambientais e, portanto, parecem não participar da determinação do fenótipo de maturidade precoce da cultivar mutante. Este trabalho é o primeiro a descrever uma variante somática de videira com desenvolvimento precoce de frutos. Os resultados obtidos podem orientar estudos funcionais, oferecendo oportunidades para a investigação de diversos aspectos do desenvolvimento do fruto da videira.

Abstract

Grapevine cultivar *Isabel Precoce* is the result of a spontaneous somatic mutation of cultivar *Isabel* (*Vitis labrusca* L.) and is characterized by the thirty-three day anticipation in harvest. *Isabel Precoce* exhibits a more uniform berry ripening pattern and due to shorter life cycle the risks of pathogen attack and unfavorable weather conditions are reduced. The use *Isabel* vs. *Isabel Precoce* as a model system to characterize genes associated to the maturation process may contribute to a better understanding of fruit ripening process, as well as, to generate technologies to obtain new cultivars and/or transgenic plants with improved agronomic traits. This study aims to investigate the expression profile of genes associated to grapevine berry ripening, by comparing the precocious berry ripening mutant and its wild-type counterpart using quantitative real-time DNA polymerase chain reaction (qRT-PCR). After literature review, twenty-three pairs of primers were selected to amplify genes involved in fruit development. These genes putatively encode transcription factors, structural proteins and proteins of secondary metabolism. The genes that showed differential expression in at least one of the sampling dates between cultivars were VvMYBPA1, VvFT, VvCTG1027667 (expansin) and VvBURP. The first two encode transcription factors, while the latter two are structural genes involved in cell expansion and possibly, in establishing fruit morphology, respectively. These genes are significantly induced in the mutant, at least in one of the stages evaluated. Genes VvMYBPA1, VvFT and VvBURP1 showed higher expression during “green fruit” phase, which is characterized by the accumulation of substances for the following phases of development. Moreover, VvCTG1027667 expression is induced during fruit ripening. The expression pattern of the other genes were not maintained throughout seasons, indicating that it strongly affected by environmental conditions and, thus, do not appear to participate in determining the phenotype. This report is the first description of a grapevine somatic variant showing precocious berry development. The data obtained here will provide initial clues to guide further

functional studies on fruit development and it will provide opportunities to investigate various aspects of fruit development in grapevine.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 ORIGEM E DISPERSÃO DA VIDEIRA	14
1.2. CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA	15
1.3. O PROCESSO DE DOMESTICAÇÃO DA VIDEIRA.....	15
1.4. A VITIVINICULTURA ATUAL.....	18
1.4.1. A UVA ISABEL E SEU MUTANTE DE VELOCIDADE DE MATURAÇÃO: ISABEL PRECOCE	19
1.5. DESENVOLVIMENTO DO FRUTO DA VIDEIRA.....	21
1.5.1. CONTROLE HORMONAL DO AMADURECIMENTO DO FRUTO DA VIDEIRA	23
1.6. <i>STATUS</i> ATUAL DO GENOMA DA VIDEIRA.....	26
1.6.1. O PAPEL DOS MUTANTES NO ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA	26
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	34
3.2. EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE SSR.....	34
3.3. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DO CDNA	35
3.4. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	36
3.5. QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS	37
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
4. RESULTADOS	43
4.1. QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS ENTRE AS CULTIVARES ISABEL E ISABEL PRECOCE	43
4.2. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE GENES REGULADOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS ENTRE AS CULTIVARES ISABEL E ISABEL PRECOCE UTILIZANDO-SE CDNA-AFLP	44
4.3. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DAS CULTIVARES ISABEL E ISABEL PRECOCE	69
5. DISCUSSÃO	90
5.1. GENES COM PADRÃO DE EXPRESSÃO CONSERVADO ENTRE AS SAFRAS	91
5.1.1. VvFT	91
5.1.2. VvMYBPA1	92
5.1.3. VvCTG1027667	94
5.1.4. VvBURP1	95
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

Lista de Abreviaturas

A₅₂₀ – Absorbância a 520 nm

ABA – ácido abscísico

a.C. – antes de Cristo

AFLP – Polimorfismo de tamanhos de fragmentos amplificados (do inglês, *Amplified Fragment Length Polymorphism*)

°C – graus centígrados ou Celcius

cDNA – DNA complementar

DAEF – Dias após o estabelecimento do fruto

dNTPs – desoxirribonucleosídeos trifosfatados

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESTs – Seqüências de genes expressos (do inglês, *Expressed Sequence Tags*)

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

g - grama

GA – ácido giberélico

ha – hectare (100 x 100 m)

HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho (do inglês, *High Performance Liquid Chromotography*)

M – molaridade ou concentração molar

Mb – mega-pares-de-bases (1.000.000 pb)

mg - miligrama

mL - mililitro(s)

M-MLV - Vírus Moloney da leucemia de murinos (do inglês, *Moloney-Murine Leukemia Virus*)

mM - milimolar

mm – milímetro

mRNA – RNA mensageiro

µg - micrograma

µL - microlitro(s)

µM - micromolar

nm – nanômetro(s)

p (estatística) - probabilidade

pb – par(es) de bases

PCR - reação em cadeia da DNA-polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

pH - potencial hidrogeniônico

qRT-PCR - reação em cadeia da DNA-polimerase em tempo real (ou quantitativa) precedida de transcrição reversa (do inglês, *Quantitative (or real-time) Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*)

rpm - rotação(ões) por minuto

SSH – Hibridização subtrativa por supressão (do inglês, *Suppression Subtractive Hybridization*)

TDF – Fragmento derivado de transcrito (do inglês, *Transcript Derived Fragment*)

Tris - tri-hidroximetilaminometano

V – volume

xg- aceleração(ões) da gravidade

Lista de Figuras e Tabelas

FIGURA 1. <i>Vitis silvestris</i> observada em seu ambiente natural na região de Montpellier.....	16
FIGURA 2. Diferenças morfológicas entre uvas cultivadas e selvagens.	17
FIGURA 3. Fenologia das cultivares Isabel e Isabel Precoce. Período: início da brotação à colheita, em Bento Gonçalves-RS.....	21
FIGURA 4. Visão geral das mudanças do fruto da videira durante o desenvolvimento.	23
FIGURA 5. Regulação hormonal do fruto da videira durante seu desenvolvimento e amadurecimento.....	25
FIGURA 6. Plantas L1 produzem inflorescências ao invés de gavinhas.	28
FIGURA 7. Fenótipos das três variações somáticas descritas por CHATELET <i>et al.</i> (2007).....	31
FIGURA 8. Fenótipo das bagas das cultivares Isabel e Isabel Precoce durante as amostragens da safra de 2007/2008.....	42
FIGURA 9. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvFT	71
FIGURA 10. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvMYBPA1	72
FIGURA 11. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvCTG1027667	73
FIGURA 12. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvBURP1 ...	74
FIGURA 13. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvMADS1 ...	75
FIGURA 14. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvTT282A08	76
FIGURA 15. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvRB004G11	77

FIGURA 16 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvGRIP4	78
FIGURA 17 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvMSA	79
FIGURA 18 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvHB13	80
FIGURA 19 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvYAB2	81
FIGURA 20 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvSP2	82
FIGURA 21 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvCTG1028151	83
FIGURA 22 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvPAL.....	84
FIGURA 23 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VCHS.....	85
FIGURA 24 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VF3H	86
FIGURA 25 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VADH1.....	87
FIGURA 26 .Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VADH2.....	88
FIGURA 27 . Quantificação de antocianinas entre as cultivares Isabel e Isabel Precoce.....	89
Tabela 1 . Genes avaliados através de qRT-PCR entre as cultivares de uva Isabel e Isabel Precoce.....	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 Origem e Dispersão da Videira

Os fósseis mais antigos de plantas ancestrais das atuais videiras cultivadas datam do início do período Terciário e foram encontrados na atual Groelândia e outras regiões hiperbóreas. Do mencionado centro, as videiras primitivas foram pouco a pouco ganhando as terras meridionais, seguindo duas direções principais: uma américo-asiática, outra euro-asiática. Deste último percurso é que se originou a *Vitis sezannensis*, consagrada como a mais importante *Vitis* terciária, elo da evolução para a *Vitis vinifera*, a videira da atualidade (SOUZA, 1996).

Com o início das glaciações do período quaternário, as espécies de *Vitis* que estavam localizadas em regiões menos atingidas pelo frio, chamadas de refúgios, não foram alcançadas pelas geleiras. Foram três os principais centros de refúgio: um americano, um europeu e um asiático-ocidental. O centro de refúgio americano, localizado nas partes atlânticas dos Estados Unidos e México, expandiu-se até a Costa Rica, originando as atuais espécies americanas de *Vitis*: *labrusca*, *vulpina*, *rupestris*, *aestivalis*, *rotundifolia*, *tiliaefolia*, *smalliana*, *lincecumii*, *cordifolia*, *berlandieri* e *caribea*. O centro de refúgio europeu abrangia desde as áreas mediterrâneas francesas e italianas até a península balcânica de onde uma única espécie conseguiu sobreviver: *Vitis vinifera silvestris*. O centro de refúgio asiático-ocidental abrigou e preservou a espécie *Vitis vinifera caucásica* (SOUZA, 1996).

Após o período de degelo e com condições climáticas mais favoráveis, ocorreu uma nova expansão das formas de *V. vinifera*. Estima-se que o início da vinificação data de 3.500 a.C., segundo MANARESI (1946). Achados arqueológicos resultantes de escavações na Anatólia Central, na antiga cidade comercial de Kannisch, revelaram vestígios mais antigos da viticultura mundial (SOUZA, 1996).

1.2. Classificação Botânica

Na família Vitaceae, o gênero *Vitis* é o de maior importância agrônômica, consistindo de aproximadamente 60 espécies inter-cruzáveis que existem naturalmente quase que exclusivamente no Hemisfério Norte. Entre elas, *V. vinifera* é a única espécie usada na indústria mundial de vinhos. É, também a única espécie do gênero nativa na Eurásia. *V. labrusca* é outra espécie do gênero bastante plantada no Brasil, e destinada principalmente para a elaboração de sucos e para o consumo *in natura*. Esta espécie tem origem no leste dos Estados Unidos e foi introduzida no Brasil no final do século XIX, com a chegada dos imigrantes italianos no sul do Brasil (THIS *et al.*, 2006). O gênero *Vitis* é dividido em dois subgêneros: *Euvitis*, que contém espécies com 38 cromossomos ($2n=38$), e *Muscadinea*, com espécies cujo $2n=40$ cromossomos (WINKLER *et al.*, 1974, EINSET & PRATT, 1975). O número estimado de espécies do subgênero *Euvitis* varia de 28 a 43 e estas são separadas em grupos como o das Americanas, com 18 a 28 espécies, o das Asiáticas, com 10 a 15 espécies, e o das Européias ou da Ásia Central, com uma única espécie (*V. vinifera*). O subgênero *Muscadinia* contém três espécies: *V. munsoniana* e *V. rotundifolia*, nativas do sudeste dos Estados Unidos, e *V. popenoeii*, nativa da América Central.

1.3. O Processo de Domesticação da Videira

A forma selvagem da videira é rara e pode ser encontrada de Portugal ao Turcmenistão, das margens do Reno até as florestas do norte da Tunísia. Acredita-se que sejam os ancestrais das cultivares do presente e ainda podem ser observadas como vinhedos selvagens, crescendo na copa de árvores e encostas (**Figura 1**). A domesticação da videira parece estar ligada ao descobrimento do vinho, mesmo que não esteja claro quais dos dois processos seguiu o outro (THIS *et al.*, 2006). Durante o processo de domesticação, a biologia da videira passou por mudanças dramáticas, desde o aumento do

conteúdo de açúcar na baga para uma fermentação mais apropriada, maior produtividade até uma produção regular. Durante este processo, as mudanças no tamanho das bagas e dos cachos e a mudança de plantas selvagens dióicas para plantas cultivadas hermafroditas foram cruciais (THIS *et al.*, 2006). (**Figura 2**).



Figura 1. *Vitis silvestris* observada em seu ambiente natural na região de Montpellier, França. (Fotos cedida pelo Dr. Luís Fernando Revers).

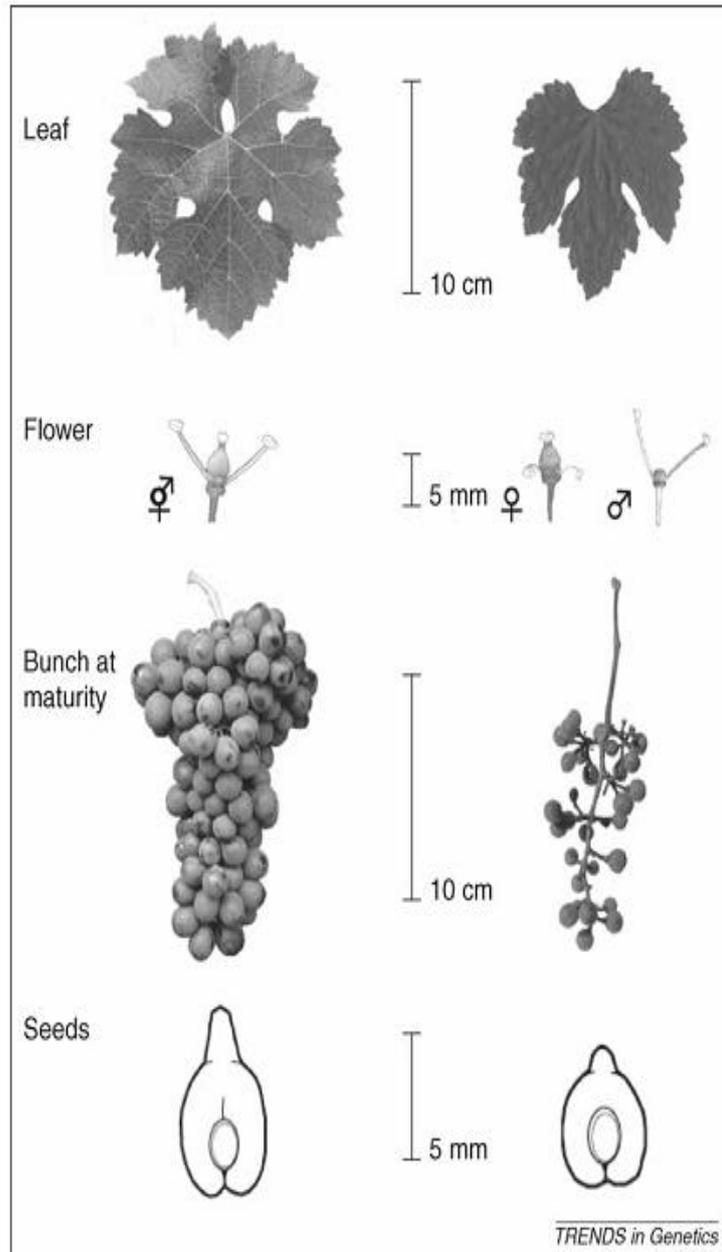


Figura 2. Diferenças em morfologias entre videiras (*Vitis*) cultivadas (espécie *vinifera* – à esquerda) e videiras selvagens (espécie *silvestris* – à direita). Diferenças nas folhas, flores, cacho maduro e sementes são mostrados. Imagem reproduzida de THIS *et al.* (2006).

Não é conhecido se as mudanças que ocorreram ao longo do tempo foram devidas a cruzamentos naturais, seleção natural ou artificial, ou rapidamente por meio de mutações, seleção e subsequente propagação vegetativa. Ainda permanece incerto o local e período de domesticação original e se houve domesticações secundárias independentes. Videiras selvagens provavelmente estiveram presentes em muitos lugares da Europa durante o período Neolítico. Porém, apesar disto, evidências arqueológicas e históricas sugerem que as primeiras domesticações ocorreram próximas ao oriente (THIS *et al*, 2006).

A partir dos primeiros sítios de domesticação, houve gradual dispersão para regiões adjacentes, como o Egito e a baixa Mesopotâmia (5.000 a 5.500 a.C.), e após dispersão em torno da Mesopotâmia, seguido pelas principais civilizações (Assírios, Fenícios, Gregos e Romanos, entre outros). Na Idade Média, a Igreja Católica favoreceu a expansão da videira para novas áreas de cultivo por intermédio das cruzadas. A expansão do Islamismo para o norte da África, Espanha e Oriente Médio também teve papel fundamental na dispersão da videira, particularmente das uvas de mesa (MCGOVERN, 2004).

Após o renascimento, a espécie *V. vinifera* colonizou os países do Novo Mundo. Os missionários introduziram a espécie na América primeiramente como sementes e depois por meio de estacas dos países de origem (França, Alemanha, Espanha, Itália e Europa Oriental). Estacas também foram introduzidas na Austrália, África do Sul e Nova Zelândia no século XIX e, mais tarde, introduzidas no norte da África.

1.4. A Vitivinicultura Atual

A videira é a fruta de maior importância econômica do mundo, sendo cultivada em aproximadamente oito milhões de hectares das terras aráveis do planeta (FAO, 2007). O fruto da videira é utilizado para muitas finalidades, incluindo produção de suco, consumo da fruta fresca ou desidratada, licores destilados e produção de vinhos finos a partir de cultivares da espécie *V. vinifera* (MULLINS *et al.*, 1992). A produção mundial de vinhos no ano de 2003 foi de

239.887.000 hectolitros. A França é o maior produtor mundial da bebida, com 46.360.000 hectolitros, seguido por Itália (44.086.000 hectolitros), Espanha (41.843.000 hectolitros) e Estados Unidos (24.156.000 hectolitros). O Brasil é o 15º maior produtor, com cerca de 2.620.000 hectolitros (<http://www.wineinstitute.org>). Além do aspecto econômico, há um crescente interesse na bebida derivada da uva como fonte de metabólitos secundários, potencialmente benéficos para a saúde humana (BAGCHI *et al.*, 2003; SPILLER *et al.*, 2003), como os polifenóis antioxidantes (FERGUSON, 2001; ALDINI *et al.*, 2003). Aproximadamente 71% da produção de uvas (66.901,419 toneladas) é utilizada para vinhos, 27% consumido *in natura* e 2% como fruta desidratada (CONDE *et al.*, 2007).

Mais de cinquenta espécies são reconhecidas como pertencentes ao gênero *Vitis*, mas as duas espécies de maior interesse econômico são *V. vinifera* e *V. labrusca*, sendo a primeira destinada à elaboração de vinhos finos e a segunda para consumo *in natura*, frutas desidratadas e para a elaboração de vinhos de mesa e sucos de uva (CONDE *et al.*, 2007).

1.4.1. A uva Isabel e seu mutante de velocidade de maturação: Isabel Precoce

As cultivares de videiras denominadas *Isabel* e *Isabel Precoce* pertencem à espécie *V. labrusca*, sendo consideradas, portanto, uvas americanas e híbridas. Estas representam mais de 80% do volume de uvas processadas no Brasil, com aproximadamente 400 mil toneladas/ano. A tradicional uva Isabel cobre mais de 1/4 da superfície vitícola do estado do Rio Grande do Sul, com 10.692,10 ha, em 2007 (CADASTRO VITICOLA, 2008). Esta cultivar tem triplo propósito, isto é, é utilizada para a produção de sucos, vinhos de mesa e é consumida *in natura*. A cultivar Isabel responde por cerca de 50% do volume dentre as uvas americanas processadas no Brasil, constituindo-se na matéria-prima básica para a elaboração de vinhos de mesa e sucos. O predomínio da uva Isabel nas regiões tradicionais (RS, SC e PR), assim como sua expansão em novos pólos, decorre de sua facilidade de adaptação às diferentes condições ambientais e à qualidade das

uvas. No entanto, o predomínio da cultivar Isabel acarreta uma concentração da colheita nas condições da vitivinicultura do sul do país (um ciclo por ano). Já na viticultura tropical, a realização de dois ciclos durante o período de estiagem é dificultada pelas condições ambientais e climáticas, onde o início do primeiro ciclo ou a colheita do segundo ocorrem em pleno período das águas, expondo a cultura às dificuldades de controle fitossanitário ou à perda de qualidade causada pelo excesso de chuvas (CAMARGO, 2004).

Dessa forma, a cultivar Isabel Precoce é uma alternativa para a vitivinicultura brasileira voltada à elaboração de vinhos de mesa e sucos de uva, seja para a ampliação do período de processamento na vitivinicultura tradicional, no sul, seja pela possibilidade de obtenção de duas colheitas durante o período de estiagem, nas regiões tropicais (CAMARGO, 2004).

A mutação somática espontânea da cultivar Isabel Precoce foi identificada em 1995 em um vinhedo do município de Farroupilha, Rio Grande do Sul (Brasil). Avaliações experimentais confirmaram as características gerais de comportamento agrônomo e de produção tradicional da cultivar Isabel, exceto pela maturação dos frutos ser antecipada em torno de 30 a 35 dias em relação à cultivar não-mutante. Com base nesses resultados, em 1995, foi propagada para avaliação em escala semi-comercial, em vinhedo instalado na EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. Nessa área, os resultados anteriormente obtidos foram confirmados nas colheitas de 1997 a 2001. Em 1995, esta cultivar foi enxertada em Jales, SP, onde foi avaliada durante cinco anos e apresentou boa adaptação e produtividade. Com base nesses resultados, em 2001, foi enxertada em Nova Mutum, MT, onde apresentou bom desempenho com duas colheitas ao ano, mantendo igualmente a relação de cerca de 30 dias de antecipação da colheita (CAMARGO, 2004). A redução do ciclo vegetativo ocorre entre a floração e a colheita, havendo uma aceleração no desenvolvimento de Isabel Precoce principalmente no sub-período floração-início de maturação (**Figura 3**).

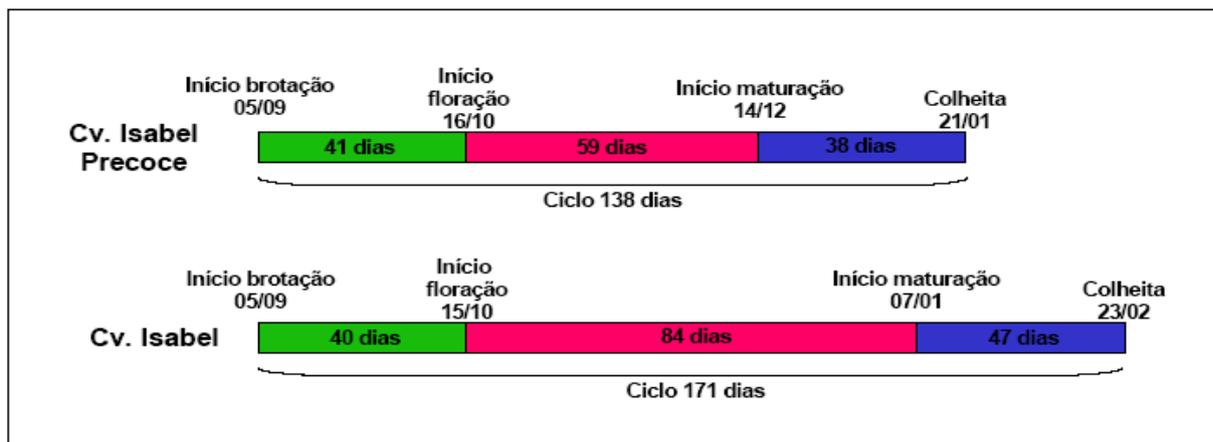


Figura 3: Fenologia das cultivares Isabel e Isabel Precoce. Período: início da brotação à colheita, em Bento Gonçalves-RS. Adaptado de CAMARGO (2004).

1.5. Desenvolvimento do Fruto da Videira

O desenvolvimento do fruto da videira inicia após a polinização e fecundação dos óvulos. Geralmente, apenas 20-30% das flores de um cacho desenvolvem-se até a maturação completa. Desta forma, polinização e fertilização dão início ao crescimento do fruto e ao desenvolvimento da semente. Este último parece estimular o crescimento do fruto, pois existe uma relação positiva entre o tamanho do fruto e o número de sementes (MULLINS *et al.*, 1992).

Os frutos da videira são não-climatéricos, isto é, não possuem a capacidade de amadurecer após a colheita (GIOVANNONI, 2001) e apresentam uma curva de crescimento do tipo duplo-sigmóide característica (**Figura 4**). A primeira fase dessa curva (Estádio I) representa o crescimento exponencial do fruto e a formação do embrião, durando aproximadamente sessenta dias, seguido por um curto período de crescimento lento (Estádio II). A duração do Estádio II é específica para cada cultivar e seu término corresponde ao final da fase herbácea do fruto, finalizando com outro período de crescimento rápido (Estádio III). O Estádio III coincide com o início da maturação dos frutos. A palavra francesa *véraison* é utilizada para descrever a mudança na cor das bagas. Em cada uma dessas três fases ocorrem variações morfológicas e mudanças específicas de

conteúdo metabólico. No Estádio I, ocorre o acúmulo de diversos solutos que contribuem para a expansão da baga. Os compostos predominantes são o ácido tartárico e o ácido málico. Estes ácidos conferem a acidez ao vinho e são críticos para a qualidade final do produto (CONDE *et al.*, 2007). Ácidos hidroxicinâmicos também são acumulados nesta etapa e são os precursores dos compostos fenólicos voláteis (ROMEYER *et al.*, 1983). Taninos, tais como as catequinas, minerais, aminoácidos, micronutrientes e compostos aromáticos também são acumulados durante esta primeira fase e afetam a qualidade do fruto. As mudanças mais dramáticas acontecem a partir do final dos Estádios II e III. Os frutos saem de um estado em que são pequenos, duros e ácidos, com pouco açúcar, para um estado onde se tornam maiores, macios, adocicados, menos ácidos e coloridos, de acordo com a cultivar. O desenvolvimento destas características são fatores determinantes para a qualidade final do produto (BOSS & DAVIES, 2001a). A maturação dura em torno de 45 dias, dependendo das condições ambientais e da cultivar.

A maturação (Estádio III) é caracterizada por inúmeros processos biológicos, incluindo divisão e expansão celular, manutenção do metabolismo primário e secundário e, ainda, resistência ou suscetibilidade a estresses bióticos e abióticos (GOES DA SILVA *et al.*, 2005). A passagem do Estádio II para o Estádio III é marcada pelo início do amadurecimento, e inclui mudanças significativas tais como: acúmulo de antocianinas, ácidos orgânicos e açúcares e, ainda, alterações quanto à suscetibilidade a patógenos tais como o oídio (*Oidium tuckerii*) e a podridão-do-cacho (*Botrytis cinerea*), os quais afetam as bagas nos Estádios I e III, respectivamente (OLLAT *et al.*, 2002).

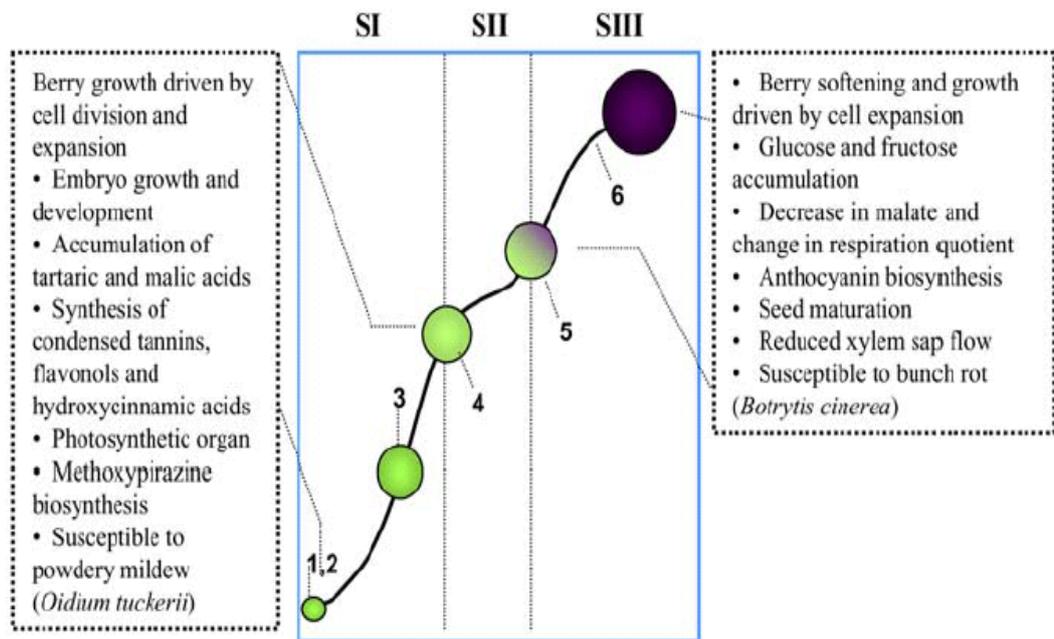


Figura 4: Visão geral das mudanças do fruto da videira durante o desenvolvimento. SI, Estádio I; SII, Estádio II; SIII, Estádio III; 1, Pré-floração; 2, Floração plena; 3, Bagas em Estádio I; 4, Bagas em Estádio II “Green hard”; 5, Bagas em Estádio II “Green soft”; 6, Bagas em Estádio III, 19 Brix. Brix é a medida de sólidos solúveis e corresponde a um padrão para medir amadurecimento. Imagem reproduzida de GOES DA SILVA *et al.*, 2005.

1.5.1. Controle hormonal do amadurecimento do fruto da videira

O amadurecimento do fruto é considerado um processo de senescência sob controle hormonal (MULLINS, 1992). A abundância de certos hormônios endógenos em relação a outros, em estádios específicos do desenvolvimento e amadurecimento do fruto indicam seu possível papel durante esse determinado estádio. Segundo CONDE *et al.* (2007), a primeira fase do desenvolvimento do fruto da videira está sob o controle de hormônios dos grupos das auxinas, citocininas e giberelinas, os quais promovem divisão e expansão celular. Estes hormônios são produzidos pelas sementes ou tecidos maternos, como óvulos não-fertilizados, nas espécies sem sementes. O controle hormonal do Estádio III não está ainda bem definido e pode ser resultado de uma combinação de sinais e não apenas o controle de um hormônio em particular. A atividade de giberelinas e citocininas são altas no início do Estádio I e decrescem para níveis mais baixos

antes do início do amadurecimento. Em cultivares sem sementes, a sensibilidade ao ácido giberélico (GA) sugere um papel para essa classe de fito-hormônios na regulação endógena do desenvolvimento do fruto. Apesar de cultivares com sementes responderem pouco ao GA, altas concentrações deste hormônio vegetal mais favorecem a formação de bagas grandes nestas cultivares do que em cultivares apirênicas (MULLINS *et al.*, 1992). SRINIVASAN & MULLINS (1978) demonstraram que as citocininas têm papel importante no desenvolvimento de flores durante a floração e o estabelecimento do fruto.

Três hormônios podem associar-se para regular os processos de maturação do fruto: ácido abscísico (ABA), etileno e brassinosteróides. A redução na concentração de auxinas e o aumento na concentração de ABA estão correlacionados com o início do amadurecimento dos frutos (MULLINS *et al.*, 1992). Há um acúmulo considerável de ABA após o *véraison*, o qual tem papel importante na maturação da semente, na aquisição da dormência da semente e na resistência ao estresse causado por deficiência hídrica (COOMBE & HALE, 1973). O declínio no acúmulo de ABA corresponde ao declínio de importação de hexoses, sugerindo a participação deste hormônio no acúmulo de açúcares (DAVIES *et al.*, 1997). Apesar de a uva ser considerada uma fruta não-climatérica, o hormônio etileno está envolvido na sinalização para o amadurecimento, possivelmente na redução da acidez da baga (WEAVER & MONTGOMERY, 1974; CHERVIN *et al.*, 2004). Além disso, EL-KEREAMY *et al.* (2003) verificaram que a aplicação de etileno exógeno aumentou o acúmulo de antocianinas nas bagas. Estudos recentes relataram papéis potenciais de sinalização por etileno durante o amadurecimento dos frutos da videira. No entanto, este hormônio é encontrado em níveis basais e relativamente constantes ao longo do desenvolvimento e do amadurecimento dos frutos. Como a percepção do etileno limita o aumento do diâmetro das bagas, esta seria uma prova inicial dos papéis potenciais da sinalização por etileno na regulação dos fluxos vasculares associados com o amadurecimento do fruto (MAILHAC & CHERVIN, 2006).

O envolvimento de brassinosteróides no desenvolvimento dos frutos da videira foi recentemente descrito por SYMONS *et al.* (2006). Estes hormônios

esteróides estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento da planta, e há um acúmulo nas bagas durante o amadurecimento. Estudos ao longo das duas últimas décadas revelaram a importância dos brassinosteróides em diversos processos, incluindo alongamento celular, divisão celular, diferenciação vascular, desenvolvimento reprodutivo, tolerância a patógenos e tolerância a estresses abióticos (CLOUSE, 2002). SYMONS *et al.* (2006) demonstraram mudanças na expressão de genes (brassinosteróide-6-oxidase, Dwarf1 e o receptor brassinosteróide-insensitivo 1) que controlam a síntese de brassinosteróides e seus níveis endógenos. Esses dois marcadores coincidem com o início do amadurecimento do fruto da videira, demonstrando a importância desses hormônios no possível controle do amadurecimento em uvas. Na **Figura 5** está resumida a atuação temporal dos hormônios citados no texto durante o desenvolvimento e a maturação dos frutos da videira. Estudos moleculares e bioquímicos também vêm sendo conduzidos a fim de elucidar os mecanismos genéticos e bioquímicos que regulam o desenvolvimento e amadurecimento do fruto da videira (CONDE *et al.*, 2007).

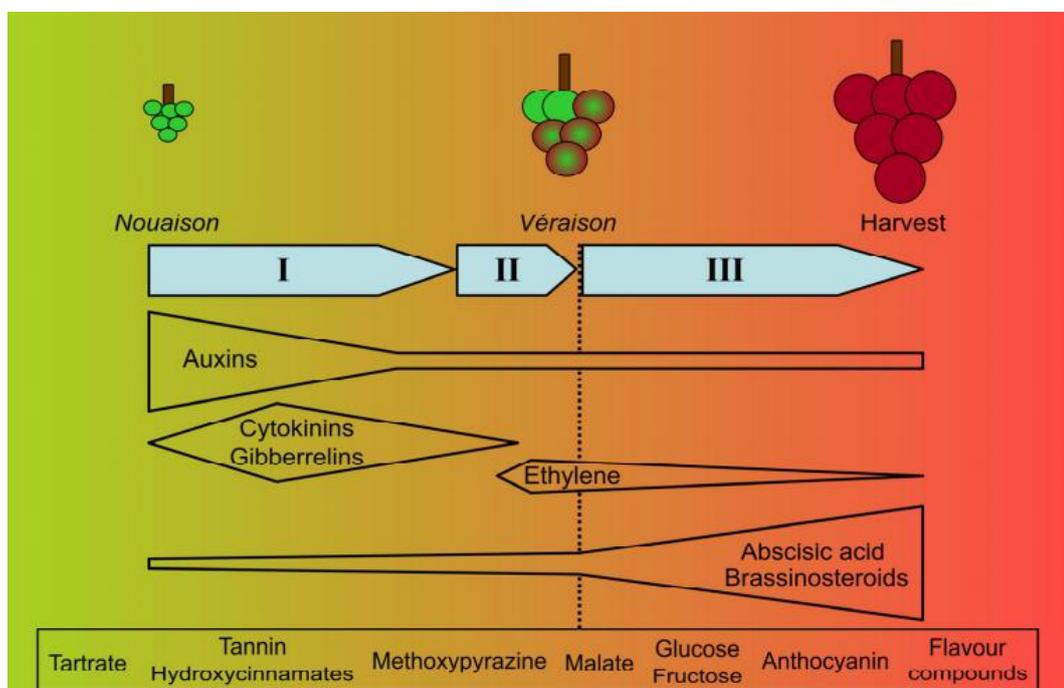


Figura 5: Regulação hormonal das uvas durante seu desenvolvimento e amadurecimento. O conteúdo das variações hormonais são indicados pela espessura das setas. Fase I: desenvolvimento inicial do fruto; Fase II: fase lag; Fase III: amadurecimento do fruto. Sobre as setas estão indicados os principais compostos acumulados. Imagem adaptada de CONDE *et al.* (2007).

1.6. Status Atual do Genoma da Videira

A videira é atrativa para estudos genômicos porque é uma espécie diplóide, possuindo 19 cromossomos. Os genótipos das variedades de videiras são altamente heterozigotos e aproximadamente todas as variedades modernas cultiváveis são hermafroditas, autofecundáveis e facilmente intercruzáveis (THIS *et al.*, 2006).

JAILLÓN *et al.* (2007) e VELASCO *et al.* (2007) publicaram os resultados do seqüenciamento do genoma da videira. JAILLÓN *et al.* (2007) obtiveram uma cobertura aproximada de 8,4X utilizando o genótipo do híbrido PN40024 de *V. vinifera*, linhagem originalmente derivada da cultivar vinífera Pinot Noir. Este genótipo foi gerado com homozigosidade próxima de 93%, permitindo alta qualidade de montagem das seqüências obtidas. O estudo demonstrou que o genoma apresenta um tamanho de 487 Mb, cerca de 30.434 genes que codificam proteínas, com média de 372 códons e 5 éxons por gene. Até o presente, *Vitis* possui o maior transcriptoma caracterizado entre as espécies frutíferas, com mais de 353.000 seqüências de genes expressos (ESTs, do inglês “*Expressed sequence tags*”), representando 23.116 unigenes em bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29760>), tornando a videira o principal modelo para frutíferas não-climatéricas.

1.6.1. O Papel dos mutantes no estudo da expressão gênica

O uso de variação genética natural e a indução artificial de mutações podem ser extremamente informativos para o estabelecimento da função de genes na ausência de transformação genética. Essas variações genéticas podem ser usadas em genética direta e reversa para apoiar seqüências gênicas e conseqüente fenótipo. Variações genéticas naturais estão sendo exploradas na identificação de regiões genômicas responsáveis por características específicas de qualidade agrônômica, por exemplo.

Uma alternativa interessante a ser considerada em videira e outras espécies perenes é a variação genética somática, a qual pode ser mantida através da

propagação vegetativa (CHATELET *et al.*, 2007). Em videira, variação genética somática vem sendo usada com sucesso na identificação de genes envolvidos na sinalização por GA (BOSS & THOMAS, 2002), produção de antocianinas (KOBAYASHI *et al.*, 2004; WALKER *et al.*, 2006) e formação inicial da baga (FERNANDEZ *et al.*, 2006).

CHATELET *et al.* (2007) descreve alguns requisitos na identificação de mutantes somáticos de videira:

- 1) A variação somática ocorre em uma única célula pertencente a uma camada de célula específica (as camadas L1 e L2 são diferenciadas nos meristemas apicais de videira). Para o fenótipo mutante ser observado, as células mutadas precisam colonizar a camada celular correspondente em pelo menos um meristema apical e órgãos derivados. Contudo, a menos que a camada celular mutante colonize a outra camada celular e esta situação é novamente estabilizada, a variação somática será uma quimera.
- 2) Mutações somáticas apenas serão efetivas em uma cópia do gene-alvo. A menos que a mutação ocorra em um alelo funcional do loco heterozigoto, situação pouco provável, o fenótipo resultante tem maior probabilidade de ser mutações de ganho-de-função resultando em uma mudança que pode ser observada.
- 3) Ainda não são conhecidos os mecanismos moleculares responsáveis pela geração desses fenótipos mutantes e a informação disponível sobre o tema ainda é escassa.

Algumas variações somáticas de videira já tiveram seus mecanismos moleculares identificados. Como é o caso do mutante nas células da camada L1 VvGAI1 descrito por BOSS & THOMAS (2002) da cultivar vinífera Pinot Meunier. O mutante é capaz de converter gavinhas em inflorescências, demonstrando dessa forma que gavinhas são inflorescências modificadas inibidas por ácido giberélico, já que uma das três cópias que codificam para o inibidor da biossíntese de giberelinas (VvGAI) possui uma mutação pontual no domínio DELLA da proteína. A mudança de um pequeno resíduo de leucina hidrofóbico para um resíduo de histidina básico e de maior tamanho

parece ter alterado as propriedades da proteína na resposta ao ácido giberélico, causando fenótipo anão além da conversão das gavinhas em inflorescências (**Figura 6**).



Figura 6: Plantas L1 produzem inflorescências ao invés de gavinhas. a) Ramo principal de uma planta L1. b) Ramo principal de uma planta L2. c) Ramo de uma gema latente de uma planta L1. d) Ramo de uma gema latente de uma planta L2.

KOBAYASHI *et al.* (2004) descreveram a inserção de um retrotransposon no promotor do gene *VvmybA1*, que codifica para um fator de transcrição que dirige a síntese de antocianinas e seu direcionamento para o vacúolo das células da epiderme da baga de cultivares de cor tinta. Indicando, dessa forma, que o alelo mutante, com a inserção do retrotransposon, expandiu-se entre muitas, senão todas, cultivares de uva branca do mundo.

Outro mutante estudado recentemente por FERNANDEZ *et al.* (2006, 2007), é o mutante para ausência de polpa ou *fleshless berry* (*Vitis vinifera* L. cv Ugni Blanc), o qual tem tamanho do fruto reduzido dramaticamente devido à ausência de desenvolvimento do pericarpo. Empregando SSH (Suppression Subtractive Hybridization), os autores identificaram cinco genes expressos diferencialmente em relação à cultivar tipo-selvagem, os quais codificam proteínas descritas previamente como sendo associadas com, ou envolvidas em, processos de desenvolvimento em outras espécies.

CHATELET *et al.* (2007) descreverem três variações somáticas de videira que exibiram padrões de desenvolvimento floral anormais:

- (1) *Reiterated reproductive meristemism* (RRM): variação caracterizada por uma alteração na arquitetura da inflorescência durante o início do desenvolvimento. Após os estádios iniciais do desenvolvimento da inflorescência, a diferenciação de meristemas florais é impedida e ocorre ramificação da inflorescência (**Figura 7A**). Observações histológicas feitas pelo grupo mostraram reinteração de meristemas adjacentes ao botão floral, com pelo menos dois meristemas sendo formados. Essas formações colapsam algumas semanas depois de seu início. Essa reinteração é provavelmente a origem do grande número de ramificações. Como resultado, flores maduras são férteis e alguns cachos desenvolvem-se normalmente até o amadurecimento, embora, com atraso acumulado dos estádios anteriores. No amadurecimento essas videiras mutantes apresentam cachos grandes com grande número de ramificações e bagas (**Figura 7B**).

- (2) *Multiple perianth whorls* (MPW): o número de verticilos florais produzidos por essa variação não é limitado a quatro, devido ao meristema floral continuar gerando verticilos adicionais aos órgãos do perianto (**Figura 7C**). Como resultado dessa alteração de padrão de desenvolvimento, ocorre a geração de estruturas florais consistindo de múltiplas reinterações dos verticilos de sépalas e pétalas sem órgãos reprodutivos (**Figura 7D**). As variantes MPW atingem o seu mais avançado estágio de desenvolvimento de inflorescência e flor no momento que corresponde à antese em plantas de tipo selvagem. Depois desse estágio, as inflorescências necrosam com poucas semanas, sem a formação de frutos.
- (3) *Abnormal reproductive whorl development variants* (ARWD): o desenvolvimento final das flores dessa variante é alterado, onde algumas flores apresentam sépalas ou pétalas duplas, sendo que todas tem anormalidades no desenvolvimento de estames e carpelos (**Figura 7E**). Além disso, o desenvolvimento dos ovários também se mostra comprometido e muitos exibem carpelos fusionados parcialmente. O fenótipo que pode ser observado é a abertura prematura das flores. A abertura prematura das flores evita a formação completa desse órgão e causa declínio do número de flores que conseguem ser fecundadas (**Figura 7F**).

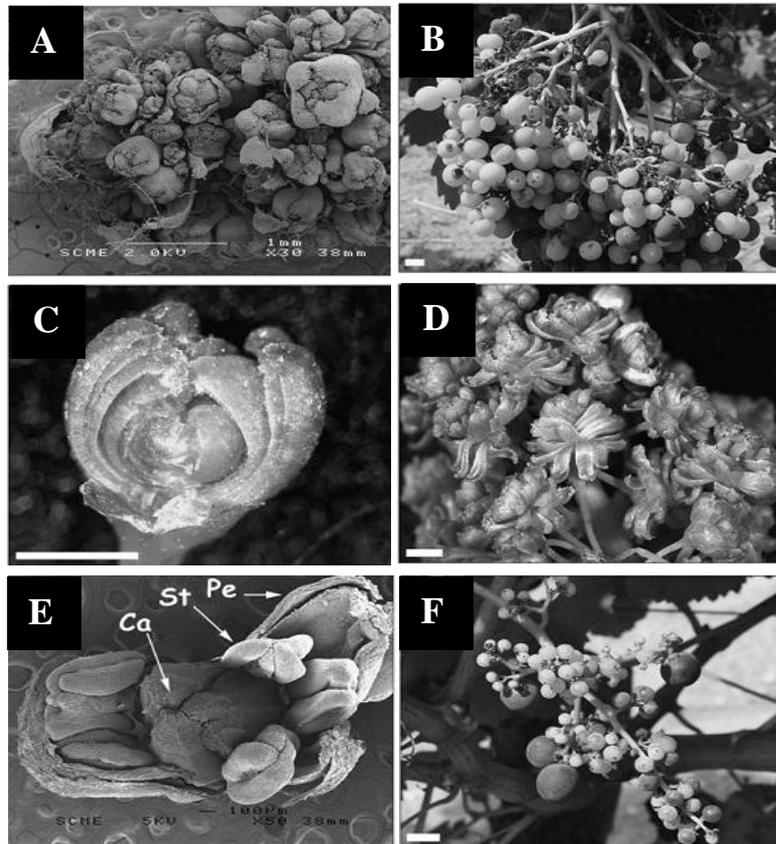


Figura 7: Fenótipos das três variações somáticas descritas por CHATELET *et al.* (2007). (A) Variação RRM, cluster com gemas múltiplas. (B) Fenótipo da variação RRM no véraison. (C) Variação MPW, flor mostrando múltiplas pétalas. (D) Variação MPW, com formação de pétalas exacerbada. (E) Variação ARWD, vista de uma gema aberta mostrando verticilos florais duplos (Pe, pétalas; St, estames; Ca, carpelos). (F) Cacho da variação ARDW mostrando bagas não desenvolvidas.

Tomando os exemplos de mutações de videira descritos anteriormente, podemos perceber que a natureza das mutações é diversa e cada caso precisa ser estudado à sua maneira. Embora um conjunto expressivo de informações venha sendo gerado pela comunidade científica dedicada à pesquisa com a videira, inclusive em escala genômica (DAVIES *et al.*, 1997; ABLETT *et al.*, 2000, VENTER *et al.*, 2001, OLLAT *et al.*, 2002; PACEY-MILLER *et al.*, 2003; BURGER E BOTHA, 2004; JEONG *et al.*, 2004; WATERS *et al.*, 2005), a maioria dos estudos sobre a biologia molecular do desenvolvimento do fruto tem relatado estudos descritivos de processos fisiológicos básicos, havendo poucos registros de investigação funcional comparativa buscando associar fenótipos de interesse agrônômico com expressão gênica diferencial.

Após revisão bibliográfica, não foram encontrados estudos similares para velocidade de desenvolvimento. Dessa forma, a mutante Isabel Precoce torna-se um modelo interessante para elucidar os mecanismos de velocidade e desenvolvimento do fruto da videira.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar os mecanismos que regulam o desenvolvimento do fruto da videira pela análise comparativa do perfil morfológico, transcricional e bioquímico entre as cultivares Isabel e seu mutante para velocidade de maturação Isabel Precoce. Assim, os objetivos específicos propostos para o desenvolvimento deste trabalho foram:

- 1) Quantificar as antocianinas produzidas pelas duas variedades utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, do inglês, "*high performance liquid chromatography*").
- 2) Caracterizar o aspecto morfológico dos frutos das cultivares Isabel e Isabel Precoce durante seu amadurecimento por meio de medidas de diâmetro, volume e massa das bagas;
- 3) Identificar genes diferencialmente expressos associados à maturação precoce e tardia nas cultivares Isabel e Isabel Precoce;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Videiras (*Vitis labrusca* L.) das cultivares Isabel e Isabel Precoce cultivadas em áreas experimentais da EMBRAPA Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS) foram empregadas neste estudo. O manejo das videiras, as podas para produção regular no período da safra (Outubro a Fevereiro) e os cuidados fitossanitários foram implementados para obtenção do número de cachos necessários para a execução da pesquisa. Cachos bem formados foram selecionados e marcados para as amostragens dos frutos. Frutas das cultivares Isabel e Isabel Precoce foram coletados a partir do estabelecimento do fruto, com frutos de aproximadamente 2 mm (estabelecimento do fruto) e 7 mm (15 dias após o estabelecimento do fruto, DAEF), 13 mm (30 DAEF), 15 mm (60 DAEF), 17 mm (90 DAEF) na safra de 2005/2006 e 2 mm (estabelecimento do fruto), 5 mm (10 DAEF), 9 mm (20 DAEF), 12 mm (40 DAEF), 15 mm de diâmetro (80 DAEF) da safra 2007/2008. Para as análises moleculares, foram utilizadas bagas de 2 mm, 7 mm, 13 mm e 17 mm da safra 2005/2006 e 2 mm, 5 mm, 12 mm e 15 mm da safra 2007/2008 (**Figura 8**). Nesta última safra, cachos de três plantas foram coletados. Nas datas programadas para coleta, o diâmetro das bagas foi monitorado com paquímetro digital. Dez bagas medianas (localizadas na porção equatorial do cacho) de cinco cachos coletados aleatoriamente na área com aproximadamente 20 plantas de cada cultivar foram monitoradas a cada 48 horas, aproximadamente, até a data da última coleta.

3.2. Extração de DNA e análise de SSR

Folhas jovens não expandidas de ambas as cultivares foram pulverizadas em nitrogênio líquido, e a cada tubo foi adicionado 0,6 mL de tampão de extração (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,1 M NaCl; 0,4 M LiCl; 1% CTAB; 2% PVP40, 0,5% Tween 20; 2 µl/ml β-Mercaptoetanol) e a mistura foi agitada em

vórtex durante 30 segundos. Em seguida, foi adicionado polivinilpolipirrolidona (PVPP) (100 mg/g de tecido macerado) e misturado por inversão. Após incubação a 60°C durante 25 minutos, foi adicionado 0,6 mL da mistura clorofórmio:isopropanol (1:1 v/v) e misturado por inversão durante 4 minutos. Após centrifugação a 10.600 xg durante 5 minutos em temperatura ambiente, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado 0,25 mL de NaCl a 5 M e 0,75 mL de isopropanol gelado. A solução foi mantida refrigerada (4 a 6 °C) por cerca de 20 minutos e submetida a centrifugação a 10.600 xg por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 1 mL de etanol a 76% gelado. O precipitado foi seco a 37°C durante 30 minutos aproximadamente e solubilizado em TE (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 0,1 mM EDTA pH 8,0) contendo RNase (20 µg/mL) e incubado a 50°C durante 15 minutos. O DNA purificado foi estocado a -20°C.

Para verificar a identidade clonal entre as cultivares, nove *locos* de microssatélites (SSR) (VVMD36, VVMD27, VVMD8, VVMD7, VVMD6, VVS2, VVS4, VRZAG62, VRZAG72) foram utilizados para genotipagem e geração do perfil de alelos, conforme metodologia descrita por THIS *et al.* (2004).

3.3. Extração de RNA total e síntese do cDNA

Bagas de ambas as cultivares coletadas nos estádios referidos anteriormente foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até a extração. A extração do RNA total foi realizada com o reagente PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

Para descartar contaminação com DNA genômico, foi realizado tratamento com RQ1 RNase-Free DNase (Promega) seguindo o seguinte protocolo: em um volume final de 10 µl, foi utilizado uma quantidade inicial de 2 µg de RNA total, 1 µl de 10X *Reaction Buffer*, 1 µl de DNase (1 u/µl) e 1 µl de RNasin^R Plus RNase Inhibitor (40 u/µl) (Promega). A mistura foi aquecida a 37°C durante 30 minutos. Após esse período, foi adicionado 1 µl de *DNase Stop Solution* e foi realizada nova incubação a 65 °C durante 10 minutos para inativar a

enzima. As amostras foram imediatamente submetidas à síntese da primeira fita de cDNA utilizando-se a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega), seguindo as instruções do fabricante com as seguintes adaptações: ao volume de 11 µl obtido a partir do tratamento com DNase, foram adicionados 50 pmol do oligonucleotídeo poli-VT (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT (30) VN-3', onde V indica A, C ou G). Para desnaturar o RNA, a solução foi aquecida a 70°C durante 5 minutos e permaneceu no gelo por igual período. A seguir, 5 µl de tampão 5x (*Reaction Buffer* 5x), 5 µl de dNTP's (10 mM), 1 µl de *M-MLV Reverse Transcriptase* (200 u/µl) foram adicionados à solução. A reação foi mantida a 37°C durante 1 hora. Todos os cDNAs foram testados por PCR usando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) constitutivos VvActina e/ou VvEF1-alfa, os quais permitem amplificar fragmentos dos genes em videira.

3.4. PCR quantitativo em tempo real

As análises por PCR quantitativa (qRT-PCR) foram realizadas no equipamento "*Applied Biosystems 7500 Real-Time System*". As qRT-PCRs foram compostas de um passo inicial de desnaturação de 5 min a 94 °C seguido de 40 ciclos de 10 s a 94 °C, 15 s a 60 °C e 15 s a 72 °C. As amostras foram mantidas por 2 min a 40 °C para reanelamento e, então, aquecidas de 55 para 99 °C para adquirir dados procedentes da curva de desnaturação do produto de amplificação. Os qRT-PCRs foram feitos usando 10 µL da amostra de cDNA diluído 100X em 2,0 µL tampão PCR a 10X, 1,2 µL de MgCl₂ a 50 mM, 0,1 µL de dNTPs a 5 mM, 0,2 µL de cada *primer* a 10 µM, 4,25 µL de H₂O, 2,0 µL de SYBR-GREEN (1:100,000), e 0,05 µL de *Platinum Taq DNA Polymerase* (5 U/µL; Invitrogen). O volume final da reação por tubo foi de 20 µL. Os *primers* utilizados nas reações estão listados na **Tabela 1**. Como normalizadores internos da reação, foram utilizados duas seqüências gênicas: actina (Act; código de acesso no GenBank EC969944); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase citosólica (GAPDH; código de acesso no GenBank CB973647) e utilizada a média dos dois para análises comparativas. Todas as reações foram realizadas com quatro repetições

experimentais e o cálculo foi feito utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

3.5. Quantificação de antocianinas

Bagas de três plantas independentes de ambas as cultivares em estudo foram coletadas nos mesmos estádios descritos acima no verão de 2007/2008 para quantificação de antocianinas. Cascas de bagas no início do pintor e final da maturação foram utilizadas para extração de compostos fenólicos em 4 volumes (peso/volume) de solução hidroalcolica (12 % etanol, 5,5 g de ácido tartárico, pH 3,2) durante 36 horas a 28 °C e 100 rpm, na ausência de luz. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 10.600 xg e uma alíquota de 2 ml do sobrenadante foi filtrada em papel Millipore HVLP 0,22 µm. Em todos os casos, 20µl de extrato foram utilizados para injeção. A quantificação de antocianinas foi realizada por HPLC utilizando-se um sistema binário de bombas Shimadzu modelo LC10-AD, um detector com arranjo de diodos UV-VIS modelo SPD-M10A e um injetor Rheodyne. O conjunto foi controlado por um *software* CLASS LC10 do mesmo fabricante. Uma coluna de fase reversa C-18 foi usada na fase estacionária e a fase móvel foi composta por um gradiente dos solventes A (água acidificada com 5 % de ácido fórmico v/v) e B (metanol acidificado com 5 % de ácido fórmico v/v). O fluxo dos solventes foi de 0,8 ml/min. A proporção do solvente B foi acrescida linearmente de 20 para 100 % em 50 minutos. As antocianinas foram identificadas através da comparação dos tempos de retenção e ordem de eluição tomando como referência o padrão cloreto de malvidina-3,5-diglicosídeo (Fluka). A quantificação desta antocianina foi determinada por comparação do tamanho das áreas dos picos e expressos como percentagem de área total para todos os picos.

3.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas relativas ao experimento de avaliação da expressão gênica foram feitas pelo teste *t* de Student com $p < 0,05$ de significância

usando o programa Excel (Microsoft Corporation). As análises estatísticas dos dados obtidos nas avaliações físicas foram realizadas utilizando-se o *software R* (www.r-project.br) e aplicando-se o modelo não linear da Função de Gompertz (Fialho, 1999). Esta função é comumente utilizada para descrever curvas de crescimento de animais e tecidos conforme descrito por Fialho (1999). Com base na função de Gompertz determinou-se a curva de crescimento de bagas para cada cultivar, em volume (mm^3) e diâmetro (mm), cujos coeficientes da equação foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$).

Tabela 1: Genes avaliados por qRT-PCR entre as cultivares de videira Isabel e Isabel Precoce.

Gene	Nome	Função predita do produto gênico	Classe	Primer direto	Primer reverso	Referência	
1	VvFT	<i>Flowering locus T</i> Fator de transcrição tipo Myb	Promove a expressão de genes de identidade do meristema floral	Fator de transcrição	ATTGTTTCGCCAACTG GGTA	GCCTTTGTAAGTTGC GAGGT	Skreekantan <i>et al.</i> , 2006
2	VvMYBA1	Fator de transcrição tipo Myb	Gene regulatório da síntese de antocianinas	Fator de transcrição	TAGTCACCACTTCAAA AAGG	GAATGTGTTTGGGGT TTATC	Jeong <i>et al.</i> , 2004
3	VvMYBPA1	Fator de transcrição tipo Myb	Controla a expressão de genes de síntese de proantocianidinas	Fator de transcrição	AGATCAACTGGTTATG CTTGCT	AACACAAATGTACAT CGCACAC	Bogs <i>et al.</i> , 2007
4	VvYAB2	Fator de transcrição do tipo YABBY2	Envolvido no crescimento da polpa do fruto	Fator de transcrição	CAATACGTCCCCAGA GAAA	ACTCACAAGGTAGGC ATCACTTTT	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
5	VvHB13	Proteína HDZip	Envolvido no crescimento da polpa do fruto relativo à polaridade e divisão celular	Fator de transcrição	GCAGAAAATGATGCA CTCCA	TGATGGAAATAGGGG TCTGC	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
6	VvMSA	Proteína induzida por ABA, estresse e amadurecimento	Atua como parte de um complexo regulador da transcrição envolvido na sinalização por açúcar e Ácido abscísico	Fator de transcrição	CCGAAACCACCGAAG TGTTA	GCATGCTCAGGGTCT TTCTC	Çakir <i>et al.</i> , 2003
7	VvMADS9	Genes MADS-box de <i>Vitis vinifera</i>	Envolvido na formação de pétalas e estames	Fator de transcrição	CAGCCAACTTACAG GAGAGG	CACAAACCAAGATCA CACACC	Sreekantan <i>et al.</i> , 2006
8	VvMADS1	Genes MADS-box de <i>Vitis vinifera</i>	Envolvido no crescimento e desenvolvimento do fruto	Fator de transcrição	TGCTGTTTGCTGAAAT CGAG	TGGTGATTAGGGTCC AGGAG	Boss <i>et al.</i> , 2001
9	VvCTG1027667	Expansina	Envolvido na expansão da parede celular durante o estágio de crescimento exponencial da baga	Estrutural	TCACAGTGGTGCAAG AAAGG	TCACAGTGGTGCAAG AAAGG	Goes da Silva <i>et al.</i> , 2005
10	VvCTG1028151	Expansina β	Envolvido na expansão da parede celular durante o estágio de crescimento exponencial da baga	Estrutural	ATGAAGCATGCTCAG GGTCT	GTACCCGGATACTCG CACTC	Goes da Silva <i>et al.</i> , 2005

11	VvRB004G11	Transportador de hexose Elemento responsivo ao etileno	Transportador de hexose	Estrutural	GCAGGTTACTGCAGC AAAGA	TGAAAATTGCTCGAC CATCA	Terrier <i>et al.</i> , 2005
12	VvTT282A08		Elemento responsivo ao etileno	Estrutural	TTCAAGTGGACAGCA ACACC	CATTATGGAGCCTGA GCAGAG	Terrier <i>et al.</i> , 2005
13	VvSP2	<i>Specific Tissue Protein 2</i>	Pode estar envolvido na morfogênese inicial do fruto	Possivelmente estrutural	TTGAAGCAGGTACAA GTGGTCT	CAATTCACACTCCAC ACTTCAA	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
14	VvBURP1	Proteína com domínio BURP	Pode estar envolvido na morfogênese inicial do fruto	Possivelmente estrutural	AAGGCCAAAACGGAG ATAGG	TTCAGAGTAGGCCTC GGAAC	Fernandez <i>et al.</i> , 2007
15	VvGRIP4	<i>Grape Ripening Induced Protein 4</i>	Confere maior resistência à parede celular durante a rápida expansão da célula e/ou limita a invasão de agentes patogênicos	Estrutural	ATGTATACCGACGCC ACAA	CTCATGGACTACAAG CAAAGAA	Tesniere <i>et al.</i> , 2006
16	VvCHS	Chalcona sintase	Enzima presente na via de biossíntese de antocianinas	Metabolismo secundário	TCGGCTGAGGAAGGG CTGAA	GGCAAGTAAAGTGGA AACAG	Jeon <i>et al.</i> , 2004
17	VvF3H	Flavonóide 3 Hidroxilase	Enzima presente na via de biossíntese de antocianinas	Metabolismo secundário	GGAGCTTGCTAGGCT CAAGA	AGCAGGAGGAGTGG ACAAAA	Ageorges <i>et al.</i> , 2006
18	VvUFGT	UDP-glicose 3-O-flavonóide glicosiltransferase	Enzima presente na via de biossíntese de antocianinas	Metabolismo secundário	GGGATGGTAATGGCT GTGG	ACATGGGTGGAGAG TGAGTT	Jeon <i>et al.</i> , 2004
19	VvPAL	Fenilalanina amônia liase	Enzima presente na via de biossíntese de antocianinas	Metabolismo secundário	TCTGGTGGAAGGAAT CCAAG	CAAAGTGCCACCAG GTAGGT	Ageorges <i>et al.</i> , 2006
20	VvADH1	Álcool desidrogenase 1	Envolvida no desenvolvimento da antera e maturação do fruto	Metabolismo secundário	TCCGTTCTCAGAGATC AACAA	ACTCTCTCATCTCAA GATATTCTATGG	Tesniere <i>et al.</i> , 2006
21	VvADH2	Álcool desidrogenase 2	Envolvida no desenvolvimento da antera e maturação do fruto	Metabolismo secundário	ATTCCAGTCGGCATAA GTGT	TTGCAACTGCATAGA CATTGTT	Tesniere <i>et al.</i> , 2006
22	VvADH3	Álcool desidrogenase 3	Envolvida no desenvolvimento da antera e maturação do fruto	Metabolismo secundário	TTCTCTCAGAGTTGTT AAAGC	AATTTCCACAAGCGA GTG	Tesniere <i>et al.</i> , 2000
23	VvAQUAPORIN	Aquaporina	Proteína intrínseca da membrana plasmática	Possivelmente constitutivo	TCCGCCAAGGACTAT CATGAC	CGCAATCAGAGCCCT GTAGAA	Reid <i>et al.</i> , 2006

24	VvTUBULINA α	α -Tubulina	Cadeia alfa Tubulina	Possivelmente constitutivo	CAGCCAGATCTTCAC GAGCTT	GTTCTCGCGCATTGA CCATA	Reid <i>et al.</i> , 2006
25	VvUBC	Ubiquitina	Ubiquitina enzima conjugada	Possivelmente constitutivo	GAGGGTCGTCAGGAT TTGGA	GCCCTGCACTTACCA TCTTTAAG	Reid <i>et al.</i> , 2006
26	VvACT	Actina	Actina 7 (ACT7)	Possivelmente constitutivo	CTTGCATCCCTCAGCA CCTT	TCCTGTGGACAATGG ATGGA	Reid <i>et al.</i> , 2006
27	VvGAPDH	Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Possivelmente constitutivo	TTCTCGTTGAGGGCTA TTCCA	CCACAGACTTCATCG GTGACA	Reid <i>et al.</i> , 2006
28	VvEF-1- α	Fator de alongação 1 alfa	Fator de alongação 1 alfa	Possivelmente constitutivo	GAACTGGGTGCTTGA TAGGC	AACCAAATATCCGG AGTAAAAGA	Reid <i>et al.</i> , 2006
29	VvSAND	Família protéica SAND	Família protéica SAND	Possivelmente constitutivo	CAACATCCTTTACCCA TTGACAGA	GCATTTGATCCACTT GCAGATAAG	Reid <i>et al.</i> , 2006

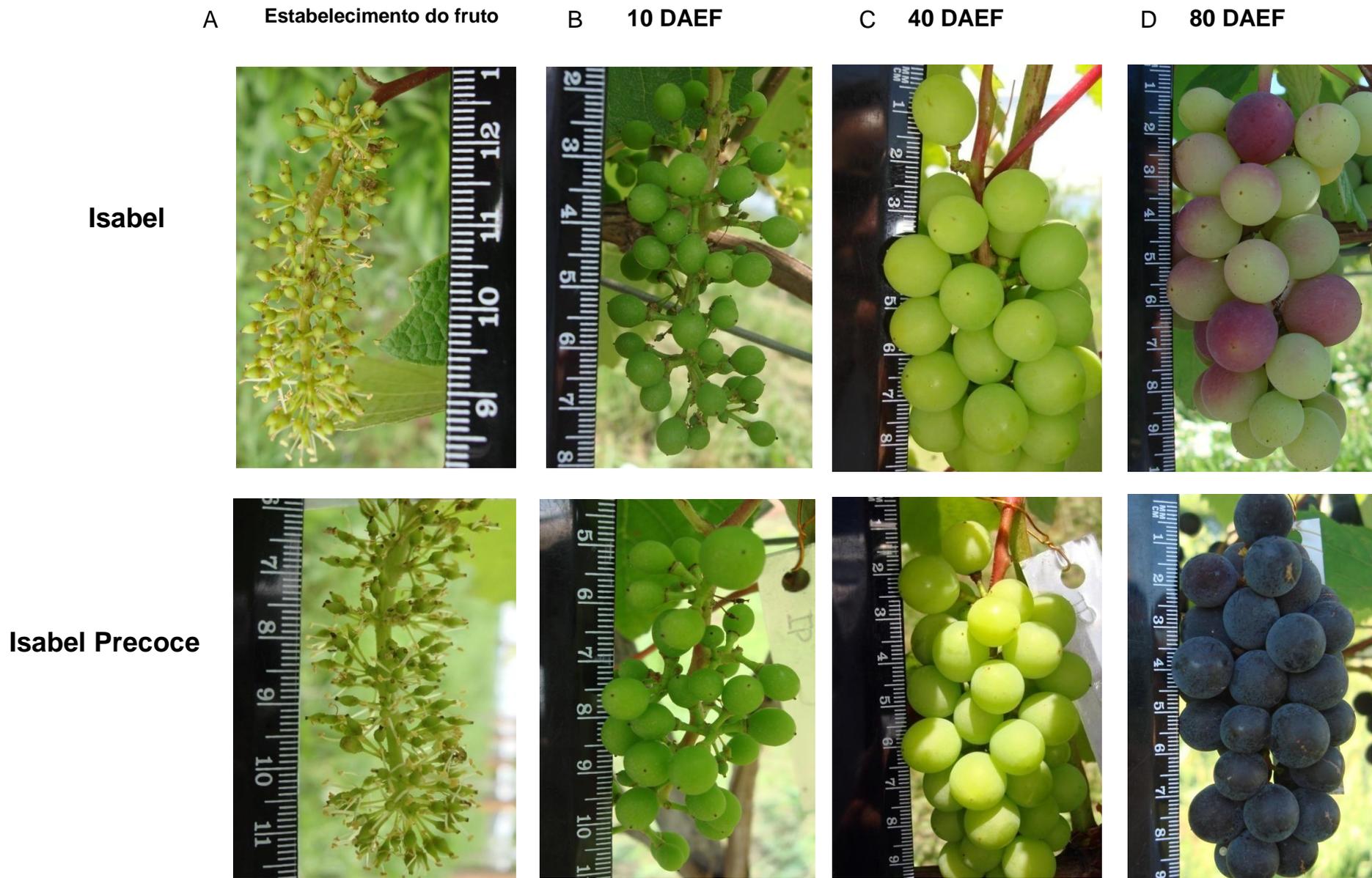


Figura 8. Fenótipo das bagas das cultivares Isabel e Isabel Precoce de videira durante as amostragens da safra de 2007/2008. (A) Estabelecimento do fruto, frutos com média de diâmetro de 2 mm. (B) Dez dias após o estabelecimento do fruto (DAEF), frutos com média de diâmetro de 5 mm. (C) Quarenta DAEF, frutos com média de diâmetro de 12 mm. (D) Oitenta DAEF, frutos com média de diâmetro de 15 mm.

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação de Antocianinas entre as Cultivares Isabel e Isabel

Precoce

Com a finalidade de determinar a antecipação por início do amadurecimento na cultivar Isabel Precoce, foi dosado utilizando HPLC o teor de antocianinas entre as cultivares aos 80 DAEF. As cascas de Isabel Precoce contêm, em média, dez vezes mais antocianinas ($A_{520} = 473,252$ mg/ml de peso fresco) do que as cascas da cultivar Isabel ($A_{520} = 45,304$ mg/ml de peso fresco) na data amostrada. O padrão de antocianinas totais extraídas das cascas das cultivares exibiu padrão similar ao de cultivares viníferas coloridas (Ageorges *et al.*, 2006) com a malvidina como forma predominante preferencial. As formas aciladas foram predominantes no extrato de cascas das duas cultivares.

As análises de HPLC das cascas de frutos coletados aos 80 DAEF, quando a cultivar Isabel está no período de desenvolvimento do fruto conhecido como *véraison* e a cultivar Isabel Precoce está pronta para a colheita, mostrou que esta última teve acúmulo de, em média, 57,269 mg/ml de antocianinas livres e de 415,983 mg/ml de antocianinas aciladas. Por sua vez, a cultivar Isabel acumulou, em média, 10,886 mg/ml de antocianinas livres e 68,836 mg/ml de antocianinas aciladas. Na **Figura 27** está representado o acúmulo de antocianinas totais entre as cultivares. Dentre as antocianinas livres, a malvidina-3,5-diglicosilada foi predominante no extrato de Isabel Precoce, representando cerca de 75% do total de antocianinas, enquanto que, na cultivar Isabel, a antocianina livre mais abundante foi cianidina (36,8%).

4.2. Caracterização do Perfil de Genes Regulados durante o Desenvolvimento de Frutos entre as Cultivares Isabel e Isabel Precoce Utilizando-se cDNA-AFLP

Os resultados obtidos a partir do estudo comparativo de genes entre as cultivares Isabel e Isabel Precoce utilizando-se a metodologia de cDNA-AFLP serão apresentados em forma de artigo científico a ser submetido ao periódico *Journal of Experimental Botany*.

MOLECULAR ANALYSIS OF GRAPEVINE (*Vitis labrusca* L. cv. Isabel Precoce) SPEEDY BERRY DEVELOPMENT MUTANT USING cDNA-AFLP

Gisele Passaia^{1,2}, Márcia Márgis-Pinheiro¹, Fernanda Sbeghen², Flavio Bello Fialho², Luís Fernando Revers²

¹Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, CP 15053, CEP 91501, Brazil

²Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, CP 130, CEP 95.700-000, Brazil

Abstract

Grape is a non-climacteric fruit and in spite of the advances in its genetics and genomics, little is known about development-related genes expression. In an attempt to identify genes associated to the developmental phase of berry growth stage (green phase), cDNA-AFLP analyses were employed. Isabel Precoce (*Vitis labrusca* L.) is a grapevine mutant, with berry growth phase 30-35 days shorter in comparison to the wild-type and, thus, constitutes an informative model to investigate many aspects of fruit growth and development. We demonstrate in the present work the usefulness of cDNA-AFLP to identify development-related genes during grape berry growth. Total RNA from berries at three stages of development (collected at 10, 40 and 83 days after fruit set) was used for synthesis of stage-specific cDNAs. Thirty primer combinations *Mse*I (+1, +3) and *Eco*RI (+1, +2) were used for the final amplification. Forty-six transcript-derived fragments (TDF's) were excised from dried polyacrilamide gels and re-amplified, cloned and sequenced. BLAST analysis against the Grape Genome Browser (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) resulted in 21 hits that did not show significant matches, ten clones and one contig (from twelve redundant sequences) that retrieved a specific match. The sequenced clones showed homology with putative AT-hook DNA-binding proteins, putative mature anther specific proteins, serine-threonine protein kinases, abscisic acid-inducible protein kinases, among others. In polyacrilamide gels, these genes presented an anticipated temporal expression profile in Isabel Precoce when compared to Isabel.

Key words: Fruit development; cDNA-AFLP; gene expression; *Vitis labrusca*

Introduction

Grapevine produces a fleshy fruit that develops from two carpels initially separated by a septum, which results from the fusion of the central tissue of the carpels. After fertilization, grapevine berry develops in two 30-50 day-long growth phases separated by a 10-20 day lag phase. The initial phase of growth during the first 15-30 days is characterized by intense cell division and enlargement associated with tartaric and malic acid accumulation. The second phase of growth results exclusively from cell enlargement associated to the accumulation of hexoses during ripening (Fernandez *et al.*, 2007). Grape is a non-climacteric fruit and in spite of the advances in grape genetics

and genomics little is known about the regulation of its ripening-related genes (Burger & Botha, 2004a, Goes da Silva *et al.*, 2005, Terrier *et al.*, 2005, Waters *et al.*, 2006). At the molecular level, significant advances have recently been made on the identification of genes involved in the grapevine fruit and flower development (Boss *et al.*, 2001; Boss *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2007; Chatelet *et al.*, 2007). Investigations using forward genetic approaches have been made. Boss *et al.* (2002) used this approach to link a phenotype of cv. Pinot Meunier to a mutation in the *V. vinifera* GA-insensitive (*VvGA1*) gene. Kobayashi *et al.* (2004) studied a white berry mutant with a *MYB* transcription factor loss of function. Fernandez *et al.* (2006, 2007) described a “fleshless berry” mutant and identified genes potentially involved with the phenotype. Finally, Chatelet *et al.* (2007) also characterized three somatic variants of abnormal grape flower formation/development, the first one being called Reiterated Reproductive Meristems (RRM), such a mutant is characterized by an alteration in early inflorescence architecture. After the early stages of inflorescence development, the differentiation of flower meristems is impaired and the primordia show reiterated development of inflorescence ramifications. The mature flowers eventually differentiate at the most distal inflorescence positions with regular mature fertile flowers and some berries develop normally up to the ripening stage, although with the delay accumulated in the previous development stages. The second mutant was called Multiple Perianth Whorls (MPW). In these variants, the number of whorls produced is not limited to four, as the flower meristem continues to generate additional whorls of perianth organs. As a result of this altered development pattern, the somatic variants generate flower structures consistent of multiple reiterations of sepal and petal whorls lacking reproductive organ whorls and after anthesis the variants inflorescences necrose within a few weeks impairing berry formation. The somatic variant called Abnormal Reproductive Whorl development variant has later flower development altered as some flowers, display a double sepal or petal whorl, while all of them show anomalies in the development of stamens and carpels which result in premature flower opening and thus preventing the complete development and decreases flower set. This study presents a grapevine mutant called “Speedy Berry Development” also known as cv. Isabel Precoce (“Precocious Isabel”), in which the time of fruit development is reduced in 30-35 days when compared to the wild-type and thus, is potentially informative to investigate many aspects of fruit growth and development. Isabel Precoce is commercially grown in wine-growing regions of Brazil and has

advantages over Isabel, such as shorter life cycle, reducing fungicide applications with fewer exposure to adverse weather conditions that may compromise yield and quality of the harvest. In an attempt to identify genes involved in berry development, gene expression profiles were investigated by comparing two cultivars of *V. labrusca* – Isabel and its precocious mutant Isabel Precoce.

Here, we demonstrate the usefulness of cDNA-AFLP to characterize development-related gene expression during grape berry ripening. In addition, our results suggested that gene expression in developing berries of Isabel and Isabel Precoce is remarkably similar, differing phenotypically only in the precocious berry maturation. Nevertheless, clear differences in gene expression of the two cultivars were identified.

Material and Methods

Plant material

The mutation Isabel Precoce mutation was identified in 1995 in a vineyard located at Farroupilha, Rio Grande do Sul (Brazil; latitude: 29° 13' 30" S, longitude: 51° 20' 52" W) on a grapevine (*Vitis labrusca* L., cv Isabel) plant later characterized as a genetic anticlinal chimera. The original plant was maintained *in situ* and propagated at EMBRAPA Uva e Vinho, located at Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, southern Brazil (latitude: 29° 09' 44" S, longitude: 51° 30' 50" W) during five years to verify its phenotype, morphological and biochemical characteristics. Isabel Precoce was also cultivated in tropical areas in Brazil and demonstrated the same characteristics that in the south where the climate is sub-tropical.

Isabel and Isabel Precoce grapevines growing in the field at the EMBRAPA Uva e Vinho were tagged at Fruit Set (Stage 71: young fruits beginning to swell, flower remains loose (Meier, 2001) to allow bunches of the same stage to be used for experimentations.

For the mutant (Isabel Precoce) and the wild type (Isabel) material, randomly selected bunches from stages 71 and 10, 40, 80 days after fruit set (DAFS) were sampled during the summer 2004-2005 in the vineyard.

For real-time PCR experiments Isabel Precoce and Isabel bunches were collected in triplicate at 10, 40 and 80 DAFS, three random bunches were sampled during summer 2007-2008 in the vineyard.

Plants were grown in the field and received, on average, two applications of fungicide per month. The average weather data of the berry growing season was as

follows: 921 hours of sun light, wind speed of 6.6 m/s, 75% air relative humidity, 52 days with precipitation, 588.8 mm of rainfall and air temperature ranging 16.8°C to 22.8°C.

DNA extraction and SSR analysis

Total genomic DNA was extracted from young leaves of Isabel and Isabel Precoce grape cultivars using a modified procedure adapted from Lodhi *et al.* (1994) and Lefort *et al.* (1999). The genetic identity between the original cultivar Isabel and its somatic variant Isabel Precoce was verified by genotyping 9 microsatellite loci: VVMD36, VVMD27, VVMD8, VVMD7, VVMD7, VVMD6, VVS2, VVS4, VRZAG62, VRZAG72 as described by This *et al.* (2004).

Physical and Biochemical aspects of Berry Growth

Berries from three plants of *V. labrusca* cultivars were harvested at the stages described above in the Summer 2007-2008 for physical and biochemical analysis. Ten berries from the middle of the bunches were weighted (mg), and measured for diameter (mm) and volume (mm³). Total soluble solids (SST) were also measured using a Palette Atago Pr-101 (0-45%) refractometer.

Statistical Analysis

Statistical analysis was done using the software R (www.r-project.br), applying the non-linear model of Gompertz Function. This function is commonly used to describe the growth of animal tissue, as described by Fialho (1999). Based on this function, the growth curve of berries for each cultivar, volume (mm³) and diameter (mm) were measured, and the values were submitted to the analysis of variance ($p \leq 0,05$).

Total RNA isolation and cDNA synthesis

Total grapevine RNA was isolated from 100-150mg of ground, frozen tissue from pooled berries with Purelink^R Plant RNA Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. The quality of RNA was verified by agarose gel electrophoresis and to the absorbance ratios ($A_{260/280}$) between 1.8 to 2.0.

Total RNA (0.5 µg) was treated with DNase I, immediately followed by double-strand cDNA synthesis using the SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech).

cDNA-AFLP analysis

cDNA-AFLP analysis was performed according to Venter *et al.* (2001). Thirty combinations of *Eco* RI and *Mse* I primers, containing up to three selective nucleotides each, were used for selective amplification (Table 1). Following visualization of the amplification products, the amplified cDNA fragments were visually scored. Differentially amplified fragments were excised from the dehydrated polyacrilamide gels and re-amplified as described by Simões-Araújo *et al.* (2002).

Table 1. Total combinations of *Mse*I and *Eco*RI with one, two or three selective bases

Combination	<i>Mse</i> I/ <i>Eco</i> RI	Combination	<i>Mse</i> I/ <i>Eco</i> RI
1	CAT+A	16	C+AT
2	CAG+A	17	C+TG
3	CAA+A	18	CAC+A
4	CCT+A	19	CCC+A
5	CTT+A	20	CGC+A
6	CTG+A	21	CAT+T
7	0+AGC	22	CAC+A
8	0+ATG	23	CCC+T
9	CTC+A	24	CGC+T
10	CCA+A	25	CCA+T
11	CCG+A	26	CCT+T
12	CTG+T	27	CAA+T
13	CTT+T	28	CAG+T
14	CAC+T	29	CCG+T
15	C+TA	30	CTC+T

Transcript Derived Fragments (TDF) cloning and sequencing

Reactions containing the reamplification of TDFs were eluted in TE (10 mM Tris pH 7.6, 0.1 mM EDTA). PCR products corresponding to each TDF identified were cloned using the TA Cloning Kit (Invitrogen) or pGEM-T Easy Vector System I (Promega). DNA plasmids were prepared using the boiling method as described in SAMBROOK *et al.* (1989). Samples containing the fragments of interest were digested with the restriction enzyme *Eco* RI (37 °C for 3 hours). Samples were sequenced and each TDF sequence was compared against the Grape Genome Browser using BLAST and the Blat-Search tool (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>).

Real-time PCR analysis

Primer 3 software (Rozen and Skaletsky 2000) was used to design specific primers ($T_m=60^\circ\text{C}$) to amplify 100-250 bp corresponding to Vv9N, Vv34N, Vv65N, Vv102N and Vv308P clones. Sequences of the primers used for real-time PCR experiments are given in Table 2.

cDNA Template (10 μl , 100X diluted) was added to each PCR reaction mix, containing in a final volume of 20 μl , 4 μM of each primer, 100,000 X SYBR Green, 0.5 mM dNTP, 20X Reaction buffer PCR, 60mM MgCl_2 , 0,25 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Thermocycling conditions were as follows: an initial enzyme activation of 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles of denaturation for 15 s at 94 °C, annealing for 10 s at 60 °C, and extension for 15 s at 72 °C. The samples were kept at 40 °C for 120 s, followed by a melting cycle from 55 °C to 99 °C. The real-time PCR reactions were carried out in Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time System. All templates were run in quadruplicate. Sample values were corrected using the corresponding expression level of actin (VvACT) and α -tubulin (Vv α TUBULINA) and expressed as the average standard deviation. Specificity of the PCR product generated for each set of primers was tested by the melt gradient in which fluorescence decreases at a single discrete temperature, indicating separation of the two strands of a single DNA species. The difference between the cycle threshold (Ct) of the target gene and the Ct of the constitutive genes established was used to obtain the normalized expression of target genes, which corresponds to $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak & Schmittgen, 2001). The statistical analysis were been made by *t* test Student with $P < 0, 05$ using Microsoft Excel.

Table 2. Primers used for qRT-PCR expression analysis.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Product length
Vv9N	AATGCTGGCGAGGATGTTAC	CTCCGCTTTCAGTAGGGACA	199 pb
Vv34N	TCTGCCTGCAGAAAGCAAT	GCTTGACGAAAAACCCTACG	183 pb
Vv65N	GGGGTTTTGGGTTTGTCT	GGCATCTGAATTTGGCTTGT	152 pb
Vv102N	CAGCTCCATCTTCCCCTACA	TCCCCTCCCAAGTGTAAGC	165 pb
Vv308P	ACGAAGGAGCTTGTTGCAGT	CAGCGTTGCATATCCTCTCA	202 pb

Results

Confirmation of cultivar clonal identities

The varietal identification exam based on DNA profiles was done with young leaf samples from Isabel and Isabel Precoce. The molecular profile of 9 microsatellite loci Simple Sequence Repeat (SSR) was compared with molecular profiles from Alba, Alexander, Champagne, Niagara Rosada, Vergennes, Concord and Concord Clone-30 from the germplasm bank at EMBRAPA Uva e Vinho. The estimate probability of identity between Isabel and Isabel Precoce is 99,80%. This estimate was obtained as described by Paetkau *et al.* (1995) using the Identity software (Wagner *et al.*, 1999).

Physical changes during fruit development

In order to monitor fruit development between Isabel and Isabel Precoce, the weight, diameter and volume of berries were tracked. There were no differences in these physical parameters. The data are reported in Figure 1. A typical double sigmoid pattern was observed for the variation of berry weight, mostly due to water storage in two phases. The cultivar Isabel showed slightly higher berry size than Isabel Precoce; data analysis showed that this difference was greater, but not significant ($p \leq 0.05$) at the end of the cycle, when the berries of both cultivars reached their maximum size.

The content of soluble solids (SST) was also monitored for both cultivars in the 2005-2006 season. The SST for Isabel Precoce was 17.5° at 90 days after the establishment of fruit (DAFS, ready for harvest). For the cultivar Isabel the content of soluble solids at 90 DAFS - 33 days before the harvest – was 14.9 ° SST. The change in the SST during ripening clearly indicated the anticipated increase of SST in Isabel Precoce compared with Isabel (Fig. 1C).

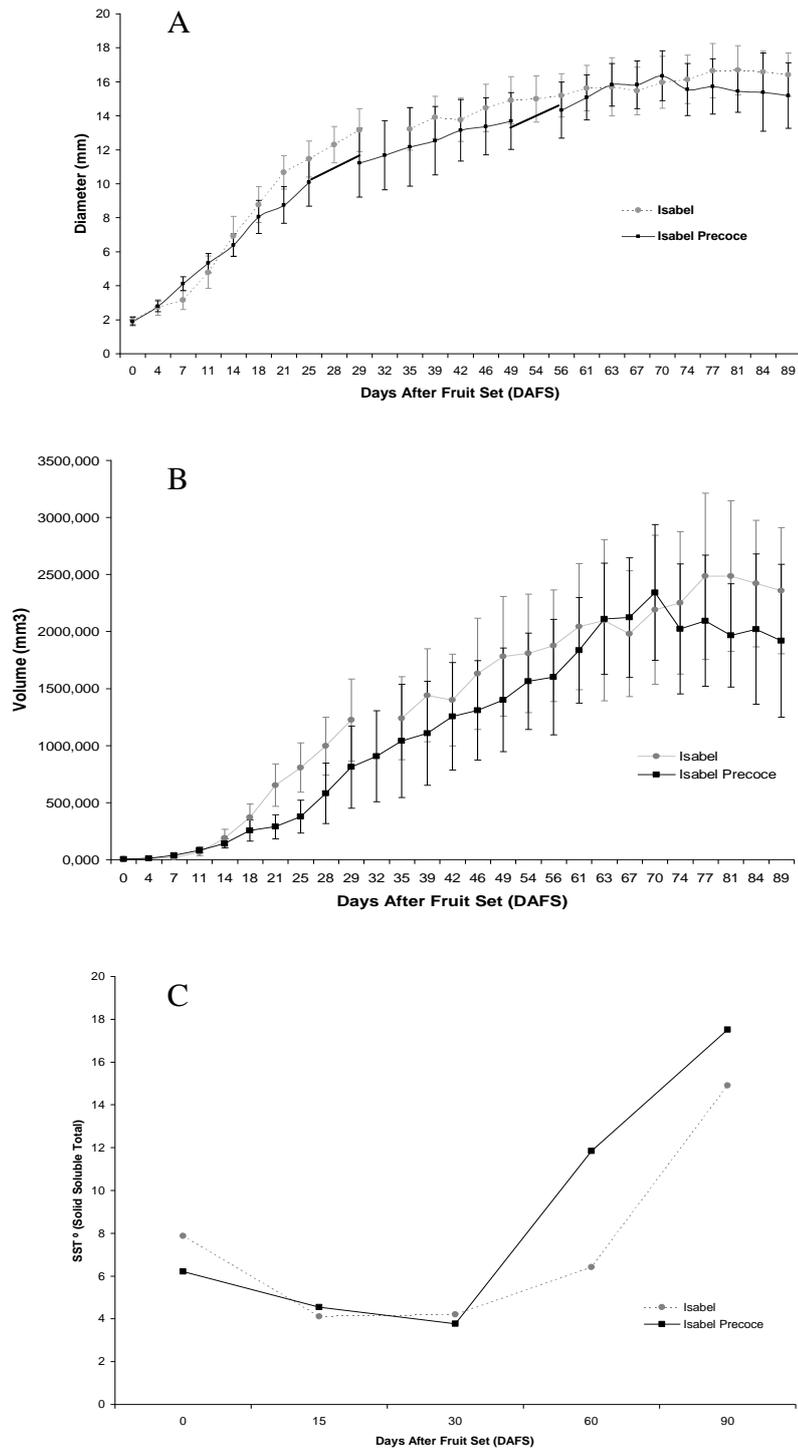


Fig.1. (A) Diameter (mm), (B) Volume (mm³) and (C) SST ° during 90 Days after fruit set between Isabel and Isabel Precoce.

cDNA-AFLP analysis

The cDNA-AFLP technique allowed us to compare the profiles of TDFs between cultivars Isabel and Isabel Precoce during fruit development. To do so we employed 30 combinations of *MseI* (+3 and +2) and *EcoRI* (+1 and +2) primers that allowed the identification of distinct transcripts. A detailed analysis of these profiles allowed the identification of at least 326 TDFs. Of these, 80 TDFs appeared to have increased expression and 202, decreased during the development of the fruit for the two cultivars. The remaining transcripts seemed unchanged. The size of TDFs ranged from 84 bp to approximately 2000 bp. Forty-six transcript-derived fragments (TDFs) were excised from dried polyacrilamide gels and re-amplified, cloned and sequenced. Figure 3 shows the result for three combinations after the final amplification, comparing cultivars Isabel and Isabel Precoce at 10, 40 and 80 days after the establishment of the fruit. This figure shows TDFs that apparently do not vary throughout the development of the fruit, that increase or decrease in expression, and cultivar-specific transcripts. A total number of 234 fragments were reamplified, with lengths ranging from 84 bp to 770 bp. *MseI* + CAT and *EcoRI* + A produced the greatest number of TDFs identified (41), followed by the combination *MseI* + CCC and *EcoRI* + A (36) (Table 3). For the first eleven combinations of Table 1, a reduction of 0.7 °C in the final amplification was used to allow a greater efficiency of the initiators. For the other combinations, this protocol of amplification was not implemented in order to increase the efficiency of the reaction.

BLAST analysis against the Grape Genome Browser (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) resulted in 21 clones that did not show significant matches and ten clones and one contig (from twelve redundant sequences) that yielded a specific match. The majority of the characterized TDF's showed a match with a known protein (Table 4). Vv9N showed homology to a class of DNA-binding proteins also described as putative AT-hook DNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* (AT2G33620, 58% identity), *Zea mays* (ACG36503, 53% identity), *Oryza sativa* (Os02g0125200, 50% identity), and a DNA-binding protein from *Ricinus communis* (EEF50395, 67% identity). Vv34N had a match with putative transport protein SEC61 from *R. communis* (EEF51775, 95% identity), *O. sativa* (Os06g0653900, 92% identity), *Z. mays* (ACG34327, 91% identity) and *A. thaliana* (AT4G24920, 89% identity). Vv65N was similar to oligouridylate binding protein from *Nicotiana plumbaginifolia* (CAB75429, 85% identity), *A. thaliana* (AT1G17370, 74%

identity), *O. sativa* (Os07g0615400, 67% identity) and *Z. mays* (ACG32707, 61% identity). Vv102N had homology to a DUF822 superfamily of plant proteins of unknown function with matches against mature anther-specific protein LAT61 from *O. sativa* (Os07g0580506, 67% identity) and *Solanum lycopersicum* (LOC544232, 63% identity) Vv308P had similarity to a putative serine/threonine-protein kinase SAPK3 from *R. communis*, (EEF45043, 88% identity), *Nicotiana tabacum* (AAC69450, 82% identity) and *O. sativa* (POC5D6, 80% identity). The 21 clones without a match after running BLAT and BLAST at GGB, may represent yet uncharacterized genes, but this result has to be carefully considered since the DNA fragment lengths are too short, which may limit the similarity search analysis.

Table 3: *Primer combinations and the number of fragments visualized by cDNA-AFLP during the development of Isabel and Isabel Precoce berries.*

Primer combination <i>Mse I + Eco RI</i>	Number of TDFs visualized in each combination
CTT+A	1
0+AGC	6
CAG+A	4
CCT+A	14
CTG+A	16
CTG+T	41
C+TA	3
C+AT	6
C+TG	16
CAT+A	41
CAC+A	11
CCC+A	36
CGC+A	20
CCA+A	1
CCT+A	16
CAT+T	19
CAC+T	4
CCC+T	13
CGC+T	2
CCT+T	25
CCG+A	9
CTC+A	4
CAG+A	11
CAA+A	7
TOTAL	326

Table 4. Analyses of TDF sequences using Blat-Search Genoscope.

	Clone	Cromossome	% match	pb align	Score	Genoscope Anotation
1	161_A12_38N5	Chr9	98.3%	57pb	55	Hypothetical protein <i>Nicotiana tomentosiformis</i>
2	161_C12_43N1	Chr19	97%	160pb	61	InterPro domain: IPR002048-Calcium Binding (EF hand)
3	161_G11_34N2	Chr14	100%	240pb	240	Hypothetical protein-expressed protein <i>Medicago truncatula</i> , <i>A.thaliana</i> , <i>O.sativa</i>
4	161_H11_34N4	Chr14	98.8%	3981pb	161	<i>O.sativa</i> : protein transport SEC61 subunit gama
5	162_F01_65N10*	Chr11	100%	255pb	150	RNA-binding region RNP-1- <i>M.truncatula</i> , <i>O.sativa</i> , <i>A.thaliana</i> , <i>Z.mays</i>
6	190_E04_102N8*	Chr4	100%	63pb	63	<i>O.sativa</i> : putative mature anther - specific protein LAT61, <i>A.thaliana</i> : BES/BZR1 homolog protein
7	190_E03_104N6*	Chr4	100%	63pb	63	<i>O.sativa</i> : putative mature anther - specific protein LAT61, <i>A.thaliana</i> : BES/BZR1 homolog protein
8	190_E06_308P1*	Chr2	100%	50pb	50	<i>Triticum aestivum</i> : serine-threonine protein kinase, abscisic acid-inducible protein kinase
9	190_E10_289N1*	Chr5	98%	96pb	92	<i>O.sativa</i> , <i>Musa acuminata</i> : Putative DNAJ heat shok N-terminal domain - containing protein
10	190_F01_9N1*	Chr15	100%	59pb	59	<i>M.truncatula</i> : HMG-I and HMG-Y, DNA-binding - <i>O.sativa</i> : putative AT-hook DNA-binding
11	Contig 3	Chr19	91%	283pb	109	Protein kinase, protein aa phosphorylation
		Chr3	92%	276pb	104	<i>M.acuminata</i> : alpha amilase precursor

* TDFs with differential gene expression profiles between Isabel and Isabel Precoce.

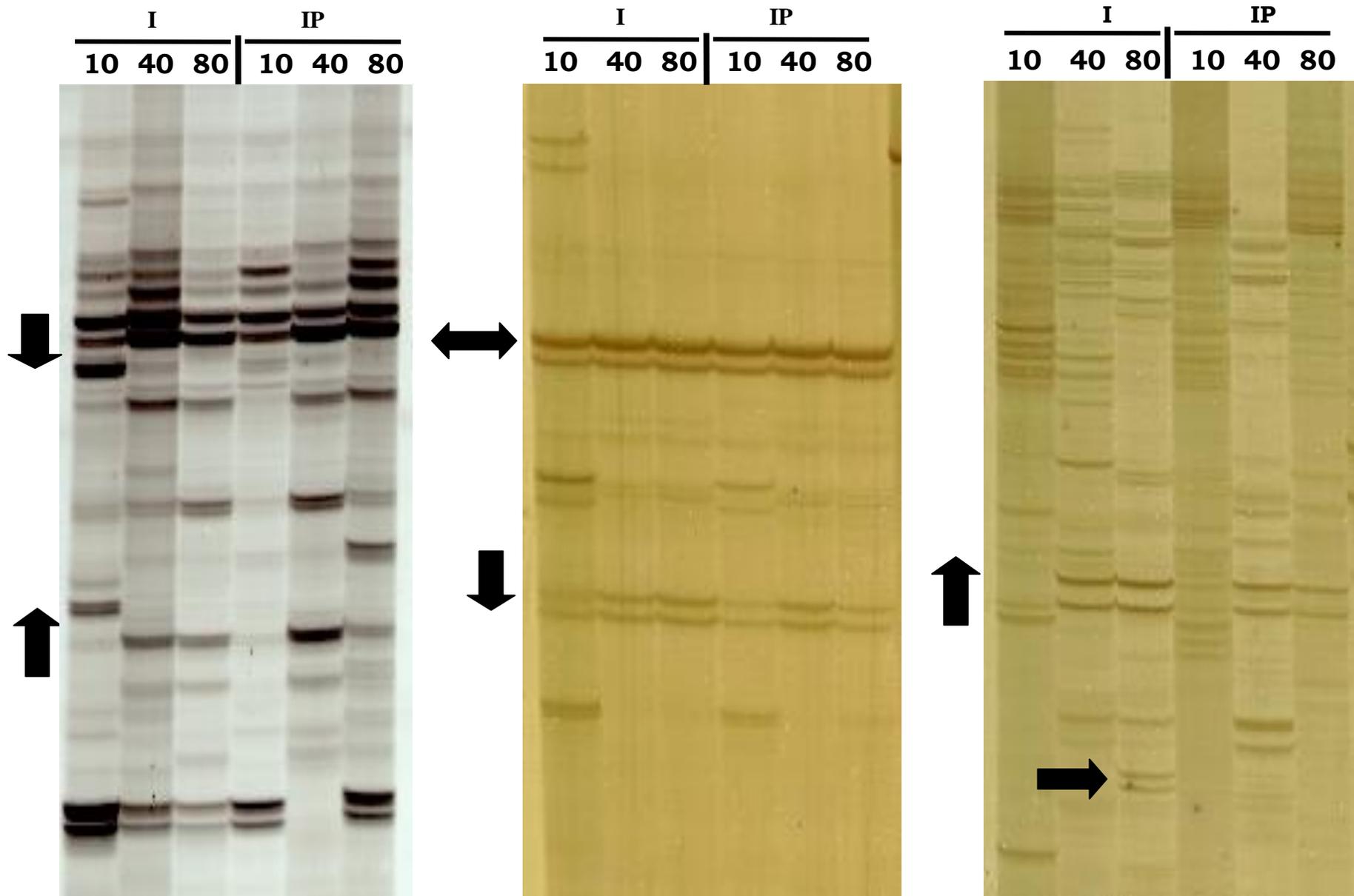


Fig.3: Acrylamide gel silver stained of products of the final amplification for three different combinations of primers (Grapevine berries). The arrows indicate the TDF pattern of expression: \leftrightarrow indicates no change of expression, \downarrow indicates decreased expression during fruit development, \uparrow indicates increased expression over fruit development. I= Isabel, IP= Isabel Precoce, 10= ten days after fruit set, 40= forty days after fruit set, 80= eighty days after fruit set.

Gene expression profile of candidate genes by real-time PCR

The expression profile of five grapevine transcripts showing modulated expression in our analyses was further investigated by real-time PCR to validate the observed cDNA-AFLP expression pattern. These genes were selected according to the *in silico* analysis and to the putative functional biological classes identified. Results of the expression profile analyses are shown in Figures 4, 5, 6, 7 and 8. The expression of Isabel Precoce Vv9N, Isabel Vv65N and Isabel and Isabel Precoce Vv102N genes were in agreement with expression pattern detected by cDNA-AFLP.

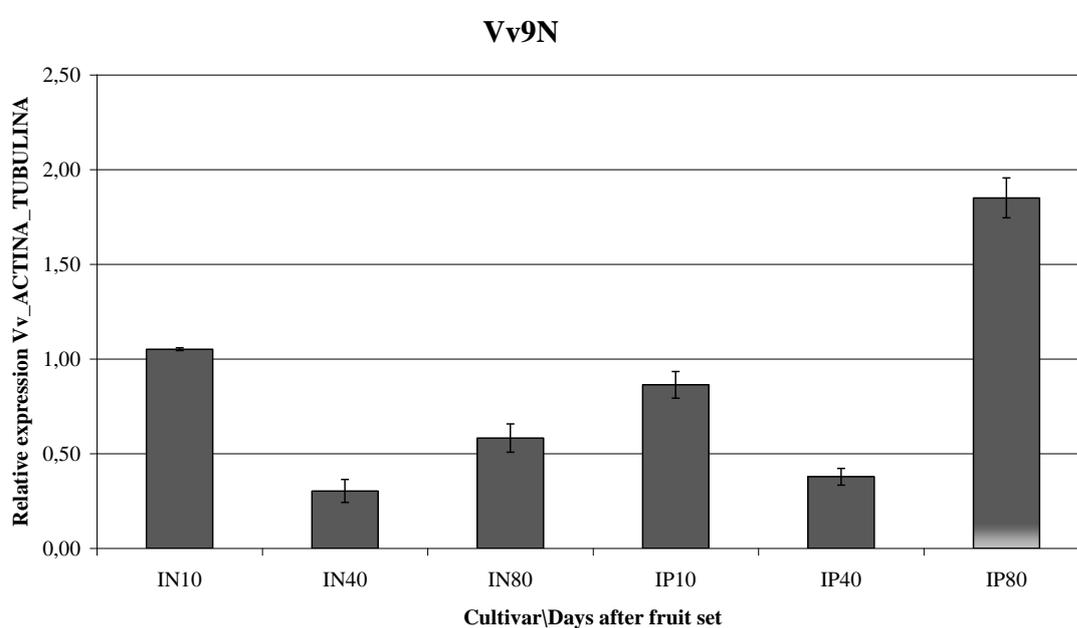


Figure 4. Real-time PCR expression profiling of Vv9N. Isabel (IN) and Isabel Precoce (IP) berry development (10, 40 and 80 days after fruit set). Expression values have been normalized with VvACTIN and Vv α TUBULIN. Bars = SD for biological triplicates.

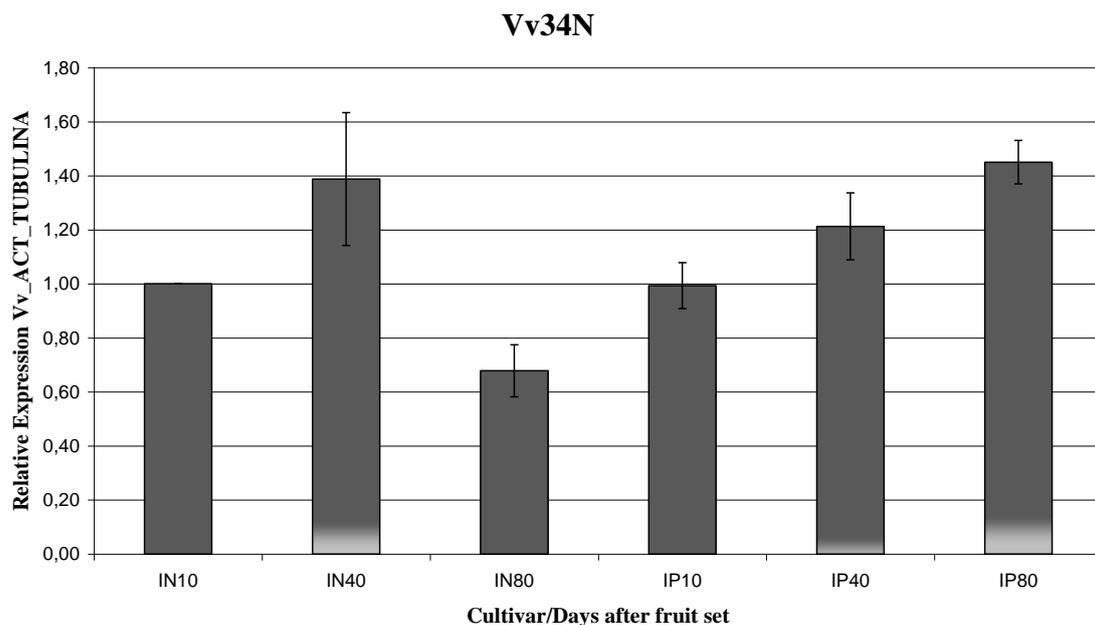


Figure 5. Real-time PCR expression profiling of Vv34N. Isabel (IN) and Isabel Precoce (IP) berry development (10, 40 and 80 days after fruit set). Expression values have been normalized with VvACTIN and Vv α TUBULIN. Bars = SD for biological triplicates.

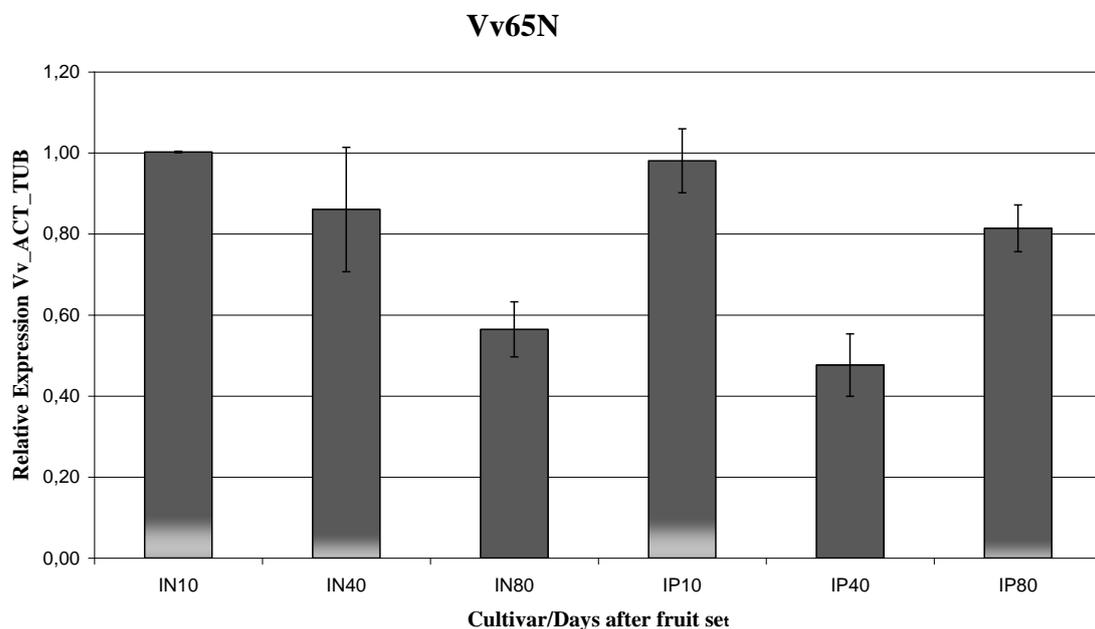


Figure 6. Real-time PCR expression profiling of Vv65N. Isabel (IN) and Isabel Precoce (IP) berry development (10, 40 and 80 days after fruit set). Expression values have been normalized with VvACTIN and Vv α TUBULIN. Bars = SD for biological triplicates.

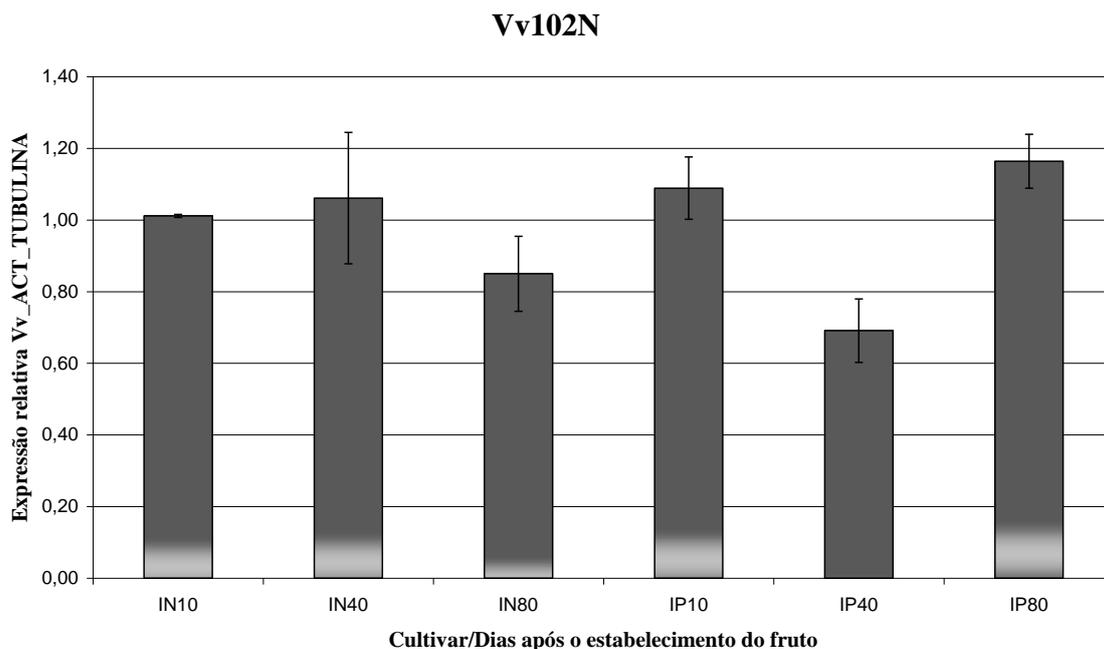


Figure 7. Real-time PCR expression profiling of Vv102N. Isabel (IN) and Isabel Precoce (IP) berry development (10, 40 and 80 days after fruit set). Expression values have been normalized with VvACTIN and Vv α TUBULIN. Bars = SD for biological triplicates.

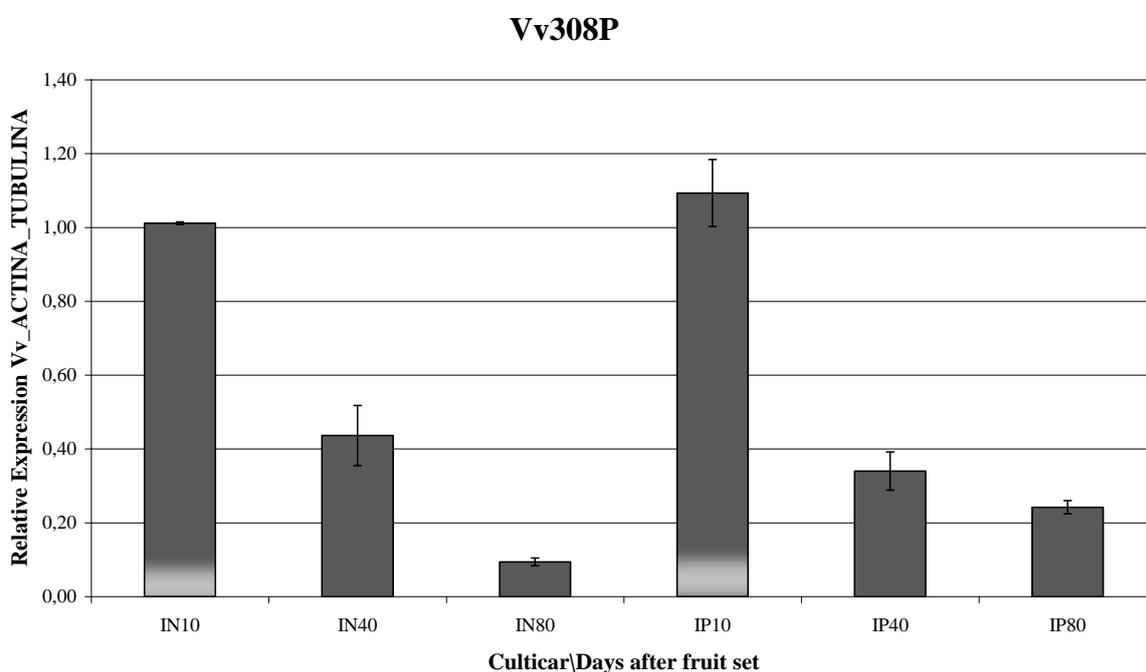


Figure 8. Real-time PCR expression profiling of Vv308P. Isabel (IN) and Isabel Precoce (IP) berry development (10, 40 and 80 days after fruit set). Expression values have been normalized with VvACTIN and Vv α TUBULIN. Bars = SD for biological triplicates.

Discussion and Conclusions

Confirmation of Cultivar Clonal Identities

Several cultivars genetically related are morphologically similar and difficult to differentiate by morphological comparison (Aradhyam *et al.*, 2003). In order to assist the identification process, SSR-based molecular markers are used to determine or confirm the identity of a particular sample of vine. The use of nine SSR loci showed that Isabel Precoce cultivar shares the molecular profile of Isabel, differing only by its precocious berry maturation phenotype. These results confirm data from the literature (Vignani *et al.*, 1996; Franks *et al.*, 2002; Riaz *et al.*, 2002), which indicated that intravarietal clones may differ considerably in phenotypes, although displaying similar DNA profiles. Ibáñez & Vélez (2005), based on a previous study carried out by This *et al.* (2004), improved a system based on nine microsatellites that could be useful to identify grapevine cultivars and putative Essentially Derived Varieties (EDVs). Once analyzing nine microsatellite loci from two different plants and founding a match, it is possible to conclude that they are of the same variety, or clones of the same variety, or synonyms, or one is an EDV of the other. Therefore, Isabel Precoce can be considered as an EDV from Isabel.

Physical and biochemical changes during fruit development

The development of grapevine berries has a similar double sigmoid curve pattern (Coombe, 1973), with a phase of rapid growth during the first four weeks after flowering, a *lag* phase – characterized by a smaller number cell divisions and an increase in cell size – between four and eight weeks after flowering, as has been reported for other cultivars, such as Cabernet Sauvignon (Symons, 2006). However, this pattern was not clearly observed for the cultivars Isabel and Isabel Precoce. Even though the cultivars follow similar development kinetics, Isabel Precoce tended to develop fruits of smaller diameter and volume than Isabel, in the harvesting season evaluated. However, statistical analysis showed no significance for the variable ($p \leq 0.05$). Isabel Precoce shows uniform maturation, unlike Isabel that, in general, presents uneven of ripeness, with ripe and green berries in the same bunch.

The increase of total soluble solids (SST) in Isabel Precoce at eight weeks after fruit set was sharper than in Isabel. This parameter indicates a physiological difference

between both cultivars, suggesting that precocity may be more closely related to changes in metabolic and biochemical characteristics. However, this difference is not clearly reflected in the diameter and volume parameters.

cDNA-AFLP analysis

cDNA-AFLP is a fast and reliable technique to identify differentially expressed genes (Bachem *et al.*, 2006; Baldwin *et al.*, 1999; Simões-Araújo *et al.*, 2002; Breyne *et al.*, 2001; Donson *et al.*, 2002). In this work, TDFs were obtained from immature berries (10 and 40 days after fruit set) and from the final stage of development (80 days after fruit set). In total, 326 TDFs were identified with expression during fruit development. From these, fifteen showed differential expression. Forty-three clones were cloned, sequenced and analyzed using Grape Genome Browser tools. The technology of cDNA-AFLP has already been used to assess the transcriptional profiles of different species of plants (Durrant *et al.*, 2000; Donson *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Barret *et al.*, 2004; Eckey *et al.*, 2004, De Paepe *et al.*, 2004; Simões-Araújo *et al.*, 2002) including grape, where this methodology has been applied successfully to assess aspects of the process of maturation in only a few cultivars of the species *V. vinifera* (Burger & Botha, 2004a; Burger & Botha, 2004b; Polesani *et al.*, 2008). The use of cDNA-AFLP technology for *V. labrusca* in this work was pioneer in obtaining a profile of transcripts differentially expressed during fruit development. In the previous studies, the technology has been demonstrated to be rapid, reliable and relatively inexpensive to identify new genes differentially expressed when compared, for example, to microarrays, Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) and Differential Display Reverse Transcription (DDRT). The cDNA-AFLP technique allowed the analysis of multiple samples simultaneously, without need of full knowledge of the genome (or ESTs); it provides a versatile and suitable condition for the functional analysis of gene expression at a genomic scale.

The number and size of TDFs (88 bp – 2,000 bp) varied according to the primer combination used in selective amplification, as previously reported by Simões-Araújo *et al.* (2002). The TDFs isolated from gels and reamplified averaged 248 bp in size, with the majority of fragments ranging from 84 bp to 770 bp. Kemp *et al.* (2005) used the same methodology to study the differential expression in cassava and obtained an average size of 270 bp (ranging from 122 bp to 511 bp). From 326 TDFs expressed during fruit development and removed from the gel, 80 appeared to have induced

expression and 202 a down-regulated profile. Fifteen TDFs differentially expressed between cultivars were down-regulated in both cultivars, with a faster decline in Isabel Precoce. During initial and intermediate stages of grape berry development, the berries increase in size due to successive cell divisions, followed by accumulation of tartaric and malic acid, tannins, anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acid and seed maturation (Silva *et al.*, 2005). These changes cause an increase in the level of transcripts in these cells to maintain metabolism during this period. In the final stage of development (fruit maturation) fruit softening, cellular expansion, glucose and fructose accumulation, decrease of malate and change in the ratio of cellular respiration take place (Silva *et al.*, 2005). Metabolic activity of the berries tend to decrease when approaching the end of maturation, with consequent decrease in gene transcription. These features may be associated with the largest number of TDFs identified as down-regulated throughout fruit development. Data provided by real-time PCR analysis confirmed the original expression profiles observed in the cDNA-AFLP polyacrilamide gels for Isabel Precoce Vv9N, Isabel Vv65N and in both cultivars for Vv102N. Vv9N showed homology to an AT-hook DNA-binding protein, which belongs to a family of High Mobility Group proteins HMG-I(Y) that binds to the minor groove of DNA via a conserved nine amino acid peptide called AT-hook (Reeves & Nissen, 1990). Many of these proteins have been shown to have an effect on the architecture of chromatin at levels beyond the action of basic histones and also play a role in transcription regulation by acting as accessory factors influencing the association of transcription factors with chromatin (Thanos & Maniatis, 1992, Strick & Laemmli, 1995). Plants are characterized by a set of AT-hook proteins which have an N-terminal histone H1 globular domain motif followed by multiple AT-hook motifs. The combination of the H1 globular domain with the At-hook motifs suggests that they could function as a special class of linker histone involved in chromatin organization (Thanos & Maniatis, 1992, Schuler *et al.*, 1991, Meijer *et al.*, 1996). These AT-hook containing histone-like proteins could function in specific atypical nucleosome-like structures involved in transcriptional or architecture regulation (Aravind & Landsman, 1998). Considering these findings, we cannot exclude that Vv9N may also play a similar role in grapevine. Vv65N had a match with an RNA-binding domain protein also called RNA recognition motif (RRM). This is one of the most abundant protein domains in eukaryotes (Cléry *et al.*, 2008). RRM-containing proteins are involved in most post-transcriptional gene expression processes (mRNA and rRNA processing, RNA export and stability)

(Dreyfuss *et al.*, 2002). Over the past 10 years, biochemical and structural studies have shown that the domain is not only involved in RNA/DNA recognition but also in protein–protein interaction. In plants, RRM proteins are present in chloroplasts and are involved in 3' end processing of chloroplast mRNA (Schuster & Grussem, 1991). They have also been discovered in plant mitochondria. Their biological functions, however, remain unclear (Vermel *et al.*, 2002). Vv102N belongs to a plant protein family of unknown function with a DUF822 domain. Real-time PCR assays did not reproduce the expression pattern of Vv34N and Vv308P observed in cDNA-AFLP polyacrilamide gels. The regulation of these two genes could be affected by environmental factors.

Considering that Isabel and Isabel Precoce differ only in the time course of berry development a reasonable number of differentially expressed TDFs was found. The effects of somatic mutation, which occurred in Isabel Precoce, apparently affects only those features related to early ripening (green berry stage), a period in which the profile of the identified TDFs showed anticipation when compared to Isabel.

The grapevine genome sequence was completed (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007), facilitating the identification and cloning of candidate gene sequences and primer designing. Grapevine somatic variants exhibiting unusual berry development represents unique material to enable the investigation of the regulation of reproductive development. This report is the first description of a grapevine somatic variant showing precocious berry development. The data obtained here will provide initial clues to guide further functional studies on fruit development and offer opportunities to investigate various aspects of fruit development in grapevine.

References

- Aradhya K, Dangl GS, Prins BH, Boursiquot JM, Walker AM, Meredith CP, Simon CJ.** 2003. Genetic structure and differentiation in cultivated grape *Vitis vinifera* L. *Genetical Research* **81**,179-182.
- Bachem CW, Van der Hoeven RS, De Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG.** 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* **9**, 745-753.
- Baldwin D, Crane V, Rice D.** 1999. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 96-103.
- Barret P, Brinkman M, Dufour P, Murigneux A, Beckert M.** 2004. Identification of candidate genes for in vitro androgenesis induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 1660-1668.
- Boss PK, Vivier M, Matsumoto S, Dry IB, Thomas MR.** 2001. A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to AGAMOUS and SHATTERPROOF, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Molecular Biology* **45**, 541-553.
- Boss PK, Thomas MR.** 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape "green revolution" mutation. *Nature* **416**, 847-850.
- Breyne P, Zabeau M.** 2001. Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 136-142.
- Burger AL, Botha FC.** 2004a. Ripening-related gene expression during fruit ripening in *Vitis vinifera* l. CV. Cabernet Sauvignon and Clairette blanche. *Vitis* **43**, 59-64.
- Burger AL, Botha FC.** 2004b. Cloning of a specific ripening-related gene from the multiple of ripening-related genes identified from a single band excised from a cDNA-AFLP gel. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**, 225-236.
- Carmona MJ, Cubas P, Martínez-Zapater, JM.** 2002. VFL, the grapevine FLORICAULE/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiology* **130**, 68-77.
- Chatelet P, Laucou V, Fernandez L, Sreekantan L, Lacombe T, Martínez-Zapater JM, Thomas MR, Torregrossa L.** 2007. Characterization of *Vitis vinifera* L. somatic variants exhibiting abnormal flower development patterns. *Journal of Experimental Botany* **58**, 4107-4118.
- Clery A, Blatter M, Allain FHT.** 2008. RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Current Opinion in Structural Biology* **18**, 290-298.
- Coombe BG & Hale CR.** 1973. Hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology* **51**, 629-634.
- De Paepe A, Vuylsteke M, Van Hummelen P, Zabeau M, Van der Straeten D.** 2004. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insight into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **39** 537-559.
- Donson J, Fang YW, Espiritu-Santo G, Zabeau WM, Van der Straeten D.** 2002. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Molecular Biology* **48**, 75-97.
- Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N.** 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**:195-205.

- Durrant WE, Rowland O, Piedras P, Hammond-Kosack KE, Jones LDG.** 2000. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* **12**, 963-977.
- Eckey C, Korell M, Leib K, Biedenkopf D, Jansen C, Langen G, Kogel KH.** 2004. Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology* **55**, 1-15.
- Fernandez L, Romieu C, Moing A, Bouquet A, Maucourt M, Thomas MR, Torregrossa L.** 2006. The grapevine *fleshless berry* mutation. A unique genotype to investigate differences between fleshy and nonfleshy fruit. *Plant Physiology* **140**, 537-547.
- Fernandez L, Torregrossa L, Terrier N, Sreekantan L, Grimplet J, Davies C, Thomas MR, Romieu C, Ageorges A.** 2007. Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. *Plant Molecular Biology* **63**, 307-323.
- Fialho FB.** 1999. Interpretação da Curva de Crescimento de Gompertz. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 4 p. (*Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico*, 237).
- Franks T, Botha R, Thomas MR, Franks J.** 2002. Chimerism in grapevines: implication for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 192-199.
- Goes da Silva F, Iandolino A, Al-kayal F, Bohlmann MC, Cushman MA, Lim H, Ergul A, Figueroa R, Kabologlu EK, Osborne C, Rowe J, Tattersall E, Leslie A, Xu J, Baek J, Cramer GR, Cushman JC, Cook DR.** 2005. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiology* **139**, 574-597.
- Ibáñez J, Vélez MD.** 2005. A microsatellite-based system for the protection of grapevine varieties. working group on biochemical and molecular techniques and DNA profiling in particular. Ninth Session.
- Jaillón O, Aury J, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C.** 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463-467.
- Jensen PJ, Rytter J, Detwiler EA, Travis JW, Mcnellis TW.** 2003. Rootstock effects on gene expression patterns in apple scions. *Plant Molecular Biology* **53**, 493-511.
- Kemp BP, Beeching JR, Coope RM.** 2005. cDNA-AFLP reveals genes differentially expressed during the hypersensitive response of cassava. *Molecular Plant Pathology* **6**, 113-123.
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H.** 2004. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* **304**, 982.
- Lefort F, Douglas GC.** 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science* **56**, 259-263.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lodhi MA, Guang-Ning Y, Norman FW, Bruce IR.** 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**, 6-13.

- Meier U.** 2001. Grapevine. In Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. *Federal Biological Research Centre of Agriculture and Forestry, Berlin, Germany.*
- Meijer AH, van Dijk EL, Hoge JH.** 1996. Novel members of a family of AT hook-containing DNA-binding proteins from rice are identified through their in vitro interaction with consensus target sites of plant and animal homeodomain proteins. *Plant Molecular Biology* **31**, 607-618.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C.** 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* **4**, 347-354.
- Polesani M, Filomena D, Alberto F, Anita Z, Mario P, Andreas K, Annalisa P.** 2008. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* **9**, 142.
- Reeves R, Nissen MS.** 1990. The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 8573-8582.
- Riaz S, Dangl GS, Edwards KJ, Meredith CP.** 2002. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**, 508-514.
- Rozen S & Staletsky HJ.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In 'Bioinformatics methods users and protocols: methods in molecular biology'. (Eds S Krawetz, S Mineser) pp. 365-386 (Humana Press: Totowa)
- Schuler GD, Altschul SF, Lipman DJ.** 1991. A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins* **9**, 180-90.
- Schuster G & Gruissem W.** 1991. Chloroplast mRNA- 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *The EMBO Journal* **10**, 1493-1502
- Silva FG, Alberto I, Al-Kayal F, Bohlmann MC, Cushman MA, Hyunju L, Ergul A, Figueroa R, Kabologlu EK, Osborne C, Rowe J, Tattersall E, Leslie A, Xu J, Baek J, Cramer GR, Cushman JC, Cook DR.** 2005. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiology* **139**, 574-597.
- Simões-Araújo JL, Rodrigues RL, Gerhardt LBG, Mondego JMC, Alves-Ferreira M, Rumjanek NG, Pinheiro-Margis M.** 2002. Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules. *FEBS Letters* **515**, 44-50.
- Strick R, Laemmli UK.** 1995. SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell* **83**, 1137-48.
- Symons GM, Davies C, Yuri S, Dry IB, Reid JB.** 2006. Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology* **140**, 150-158.
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Léon C, Renaudin J, Dedaldechamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S.** 2005. Isogene specific oligo arrays reveals multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* **222**: 832-847.
- Thanos D, Maniatis T.** 1992. The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell* **71**, 777-89.
- This P, Jung A, Boccaci P, Borrego J, Botta R, Constantini L, Crespan M, Dangl GS, Eisenheld C, Ferreira-Monteiro F, Grandó S, Ibáñez J, Lacombe T, Laucou V, Magalhães R, Meredith CP, Milani N, Peterlunger E, Regner F, Zulini L,**

- Maul E.** 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of a grape cultivars. *Theoretical Applied Genetics* **109**,1448-1458.
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo D, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J.** 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*, **2**: e1326.
- Venter M, Burger AL, Botha FC.** 2001. The identification of differentially expressed sequences in *Vitis vinifera* using cDNA-AFLP technology. *Vitis* **40**,191-196.
- Vermel M, Guermann B, Delage L, Grienberger JM, Marechal-Drouard L & Gualberto JM.** 2002. A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. *The Proceedings of National Academy of Sciences Online (US)* **99**, 5866–5871.
- Vignani R, Bowers JE, Meredith CP.** 1996. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* Sangiovese. *Scientia horticultrae* **65**,163-169.
- Wagner HW, Sefc KM.** 1999. *Identity 1.0*. Wienn: Centre for Applied Genetics-University of Agricultural Sciences.
- Waters DLE, Holton TA, Ablett EM, Lee LS, Henry R.** 2006. The ripening wine grape berry skin transcriptome. *Plant Science* **171**, 132-138.
- Yang L, Zheng B, Mao C, Yi K, Liu F, Wu Y, Tao Q, Wu P.** 2003. cDNA-AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit. *Gene* **314**, 141-148.

4.3. Avaliação do Padrão de Expressão de Genes durante o Desenvolvimento de Frutos das Cultivares Isabel e Isabel Precoce

Com a finalidade de comparar a expressão de genes relacionados com o desenvolvimento do fruto da videira entre as duas cultivares deste estudo, foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Esta comparação foi realizada empregando-se 29 genes presentes durante o desenvolvimento do fruto (**Tabela 1**). Entre os 29 genes avaliados, sete foram testados a fim de estabelecer normalizadores internos (VvACT, VvGAPDH, VvEF-1- α , VvTUBULINA, VvAQUAPORINA, VvUBIQUITINA, VvSAND). Dentre estes, VvACT e VvGAPDH mostraram expressão constitutiva entre os estádios de desenvolvimento avaliados e entre as cultivares. Os demais codificam proteínas com funções preditas ou estabelecidas na regulação da transcrição (VvMYBA1, VvMYBPA1, VvFT, VvYAB2, VvHB13, VvMSA, VvMADS9, VvMADS1), enzimas do metabolismo secundário (VvCHS, VvF3H, VvUFGT, VvPAL, VvADH1, VvADH2, VvADH3), estresse e defesa (VvGRIP4), metabolismo do etileno (VvTT282A08), morfogênese e desenvolvimento (VvCTG1027667, VvTT1028151, VvRB004G11, VvSP2, VvBURP1).

As análises foram realizadas empregando RNA extraído de tecidos com início no estágio de estabelecimento do fruto até a colheita durante as safras de 2005/2006 e 2007/2008. Os perfis de expressão mostraram-se relativamente conservados entre as safras avaliadas e entre as cultivares para os genes VvFT, VvMYBPA1, VvCTG1027667 e VvBURP1 (**Figuras 9, 10, 11, 12**). Em pelo menos um estágio do desenvolvimento avaliado, o gene de estudo mostrou-se significativamente induzido na cultivar Isabel Precoce. Outros genes, tais como VvMADS1, VvTT282A08, VvRB004G11 e VvGRIP4 mostraram perfil transcricional conservado entre as duas safras avaliadas (**Figuras 13, 14, 15, 16**). No entanto, a quantidade de transcritos não foi diferente entre as cultivares. Os demais genes não reproduziram um perfil transcricional conservado entre as safras avaliadas, conforme as **Figuras 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26** (VvMSA, VvHB13, VvYB2, VvSP2, VvCTG1028151, VvPAL, VvCHS, VvF3H, VvADH1, VvADH2, respectivamente).

O gene VvFT mostrou diferença de expressão entre as cultivares nas duas safras aos 30/40 DAEF, com pico de expressão neste estágio, no entanto, aumentado em Isabel Precoce, com diferença pequena, no entanto, significativa. VvCTG1027667 apresentou expressão significativamente maior em Isabel Precoce no estabelecimento do fruto e aos 10/15 DAEF. O fator de transcrição VvMYBPA1 mostrou alta expressão no início do amadurecimento do fruto, caindo a níveis basais até o final das análises. A expressão desse gene foi aumentada em Isabel Precoce aos 15/10 30/40 DAEF, no entanto, apenas com significância na safra 2005/2006. VvBURP1 teve expressão aumentada em Isabel Precoce aos 15/10 e 30/40 DAEF, com significância estatística apenas na safra de 2005/2006.

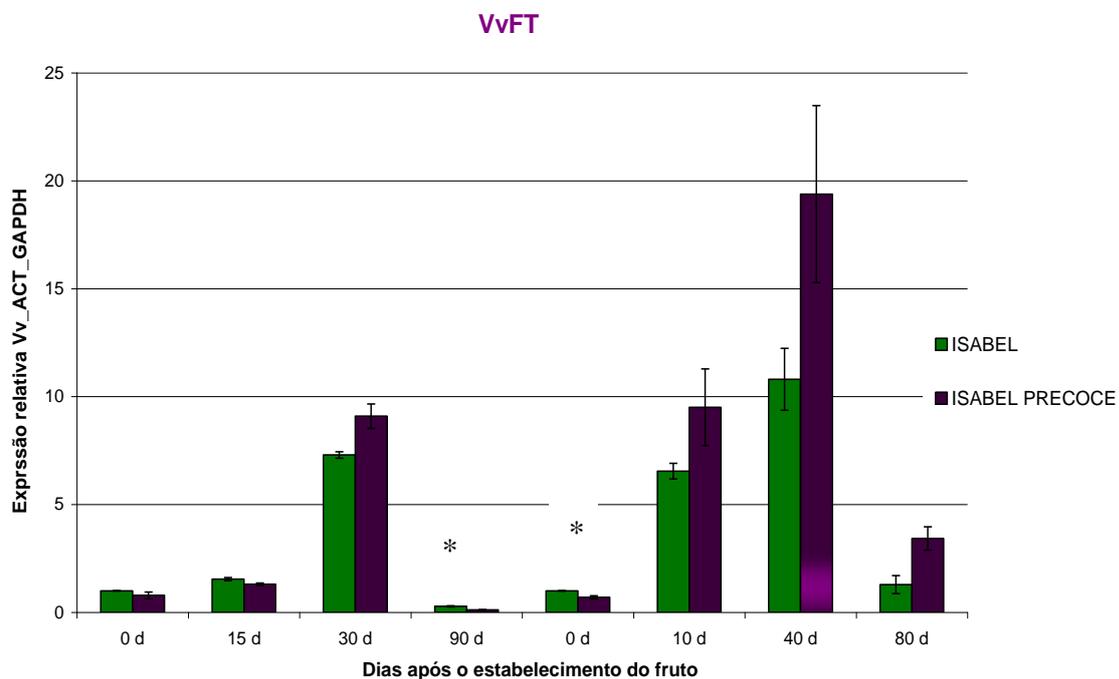


Figura 9. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvFT. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

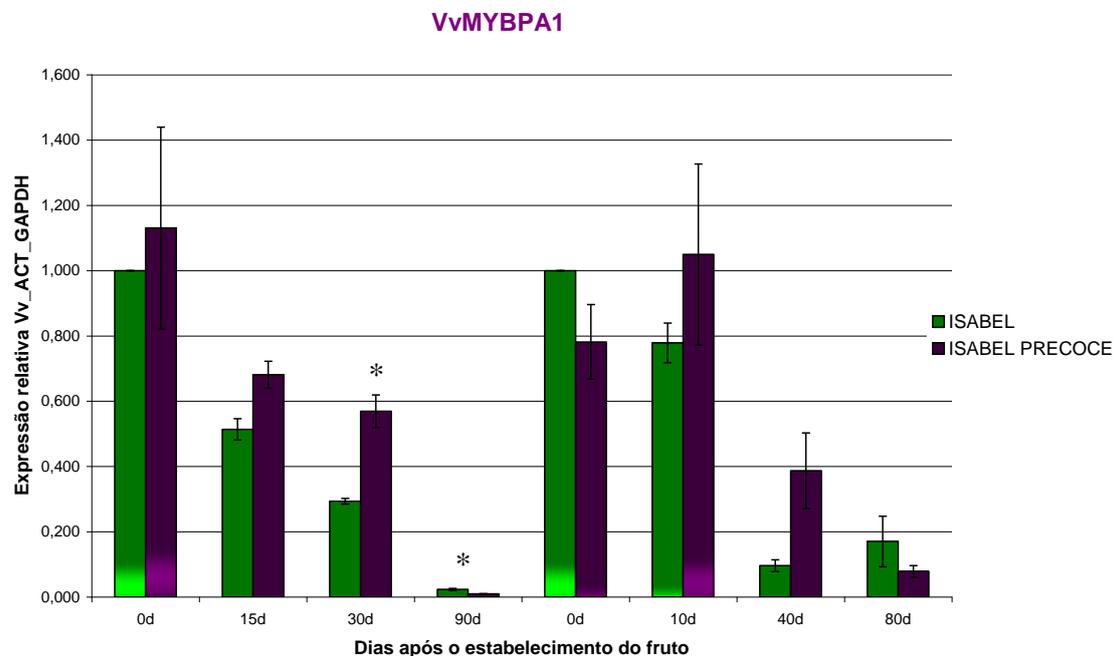


Figura 10. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvMYBPA1. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

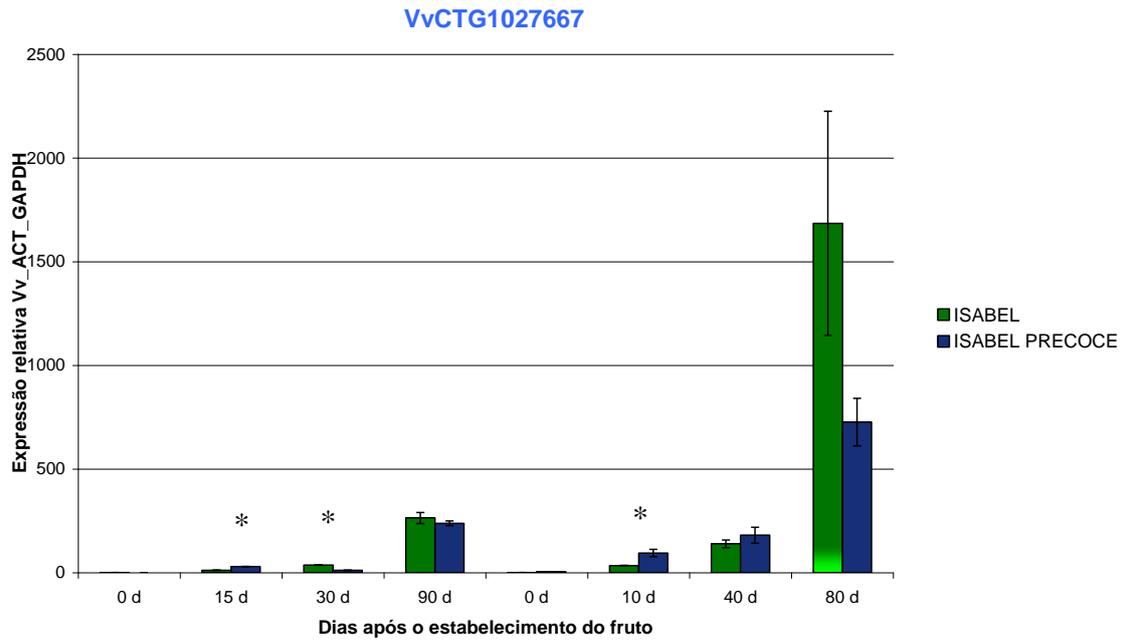


Figura 11. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvCTG1027667. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

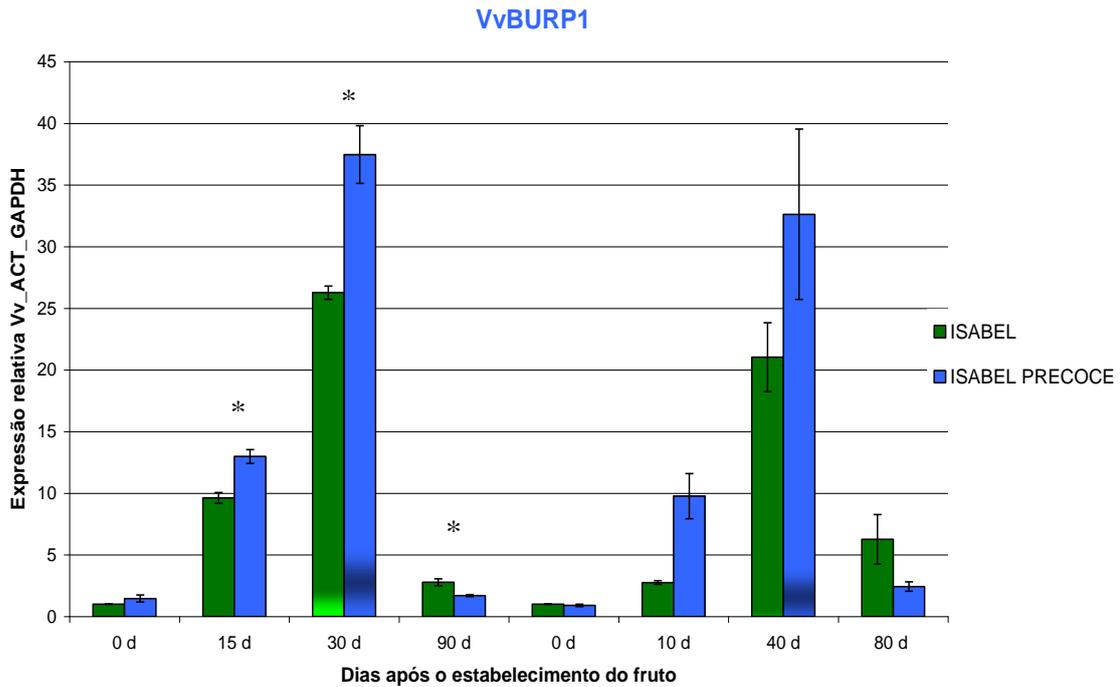


Figura 12. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvBURP1. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

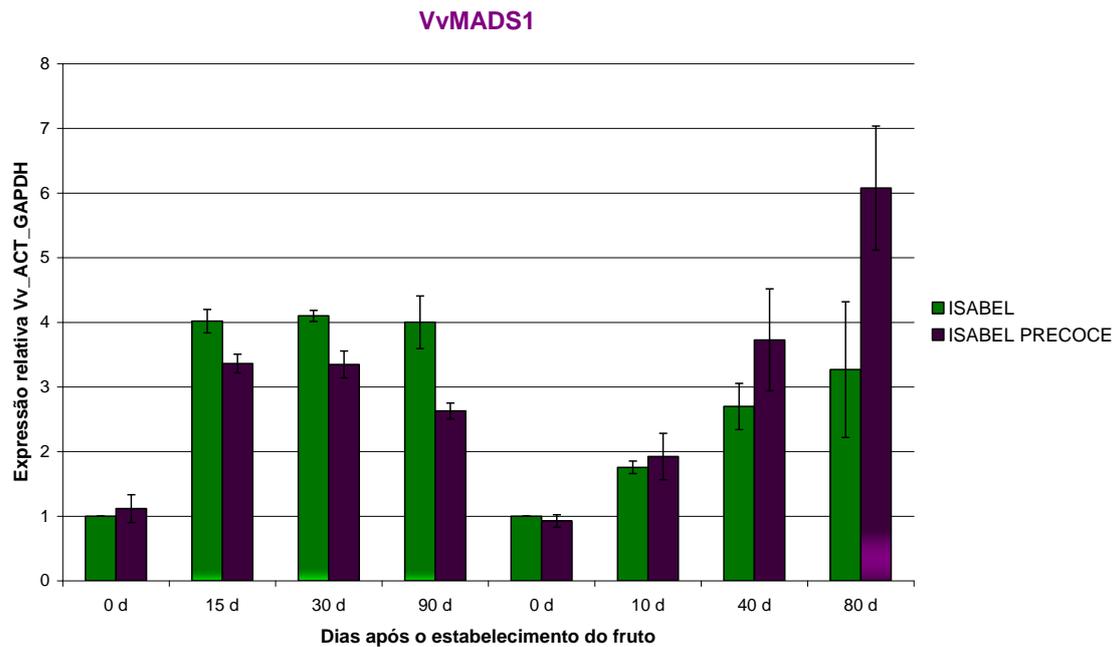


Figura 13. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene *Vvmads1*. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos *VvActina* e *VvGAPDH*. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

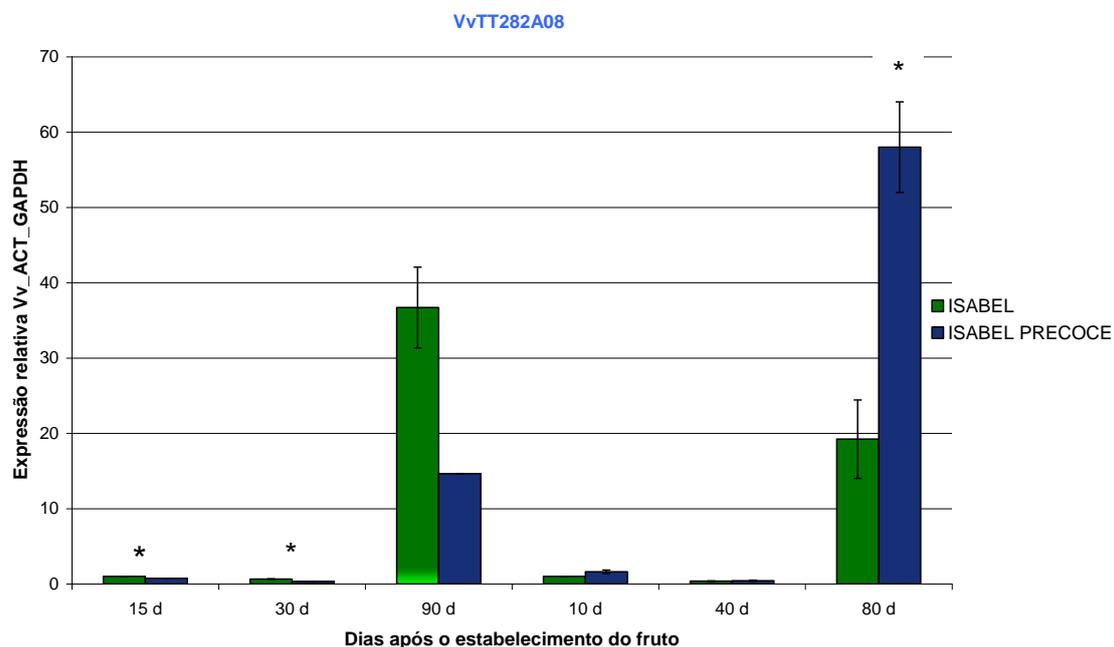


Figura 14. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvTT282A08. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

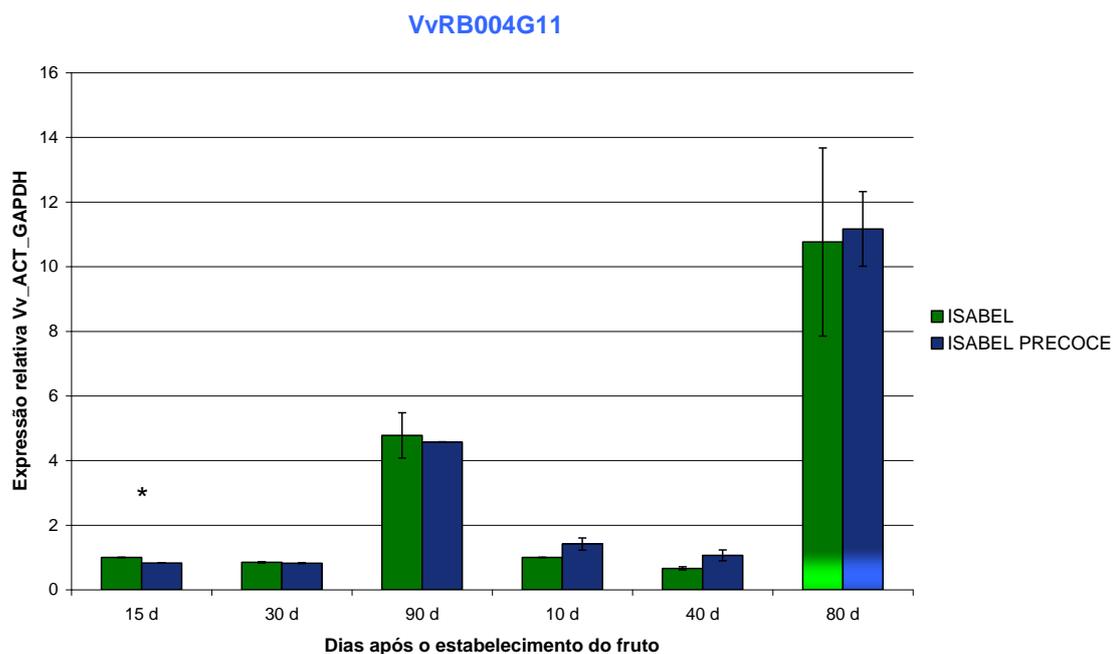


Figura 15. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvRB004G11. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

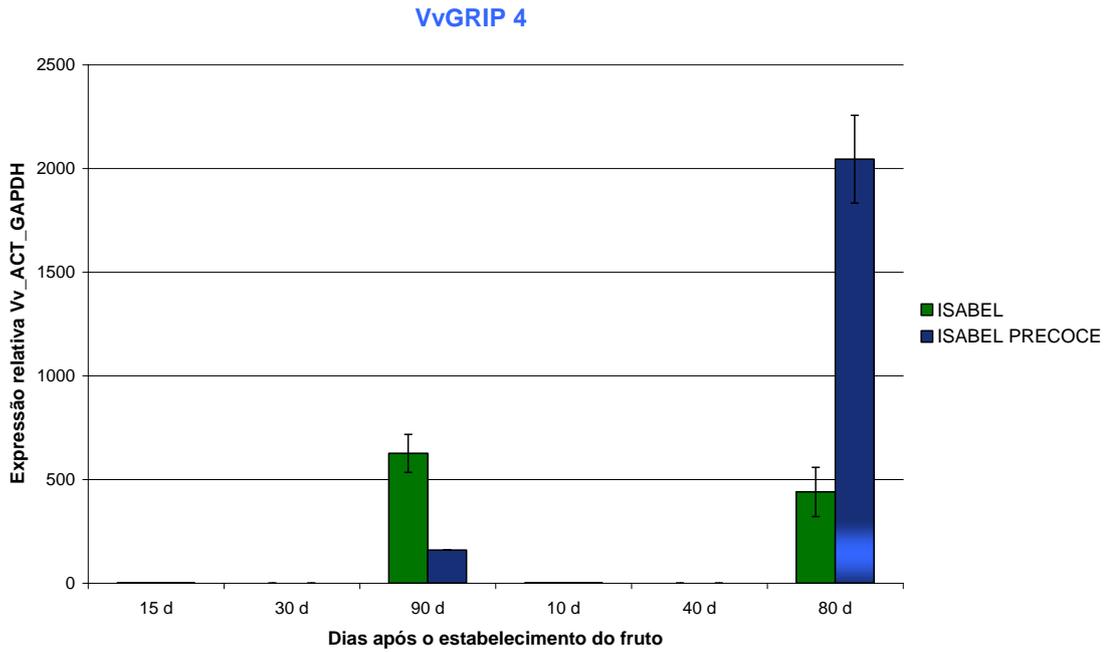


Figura 16. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvGRIP4. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

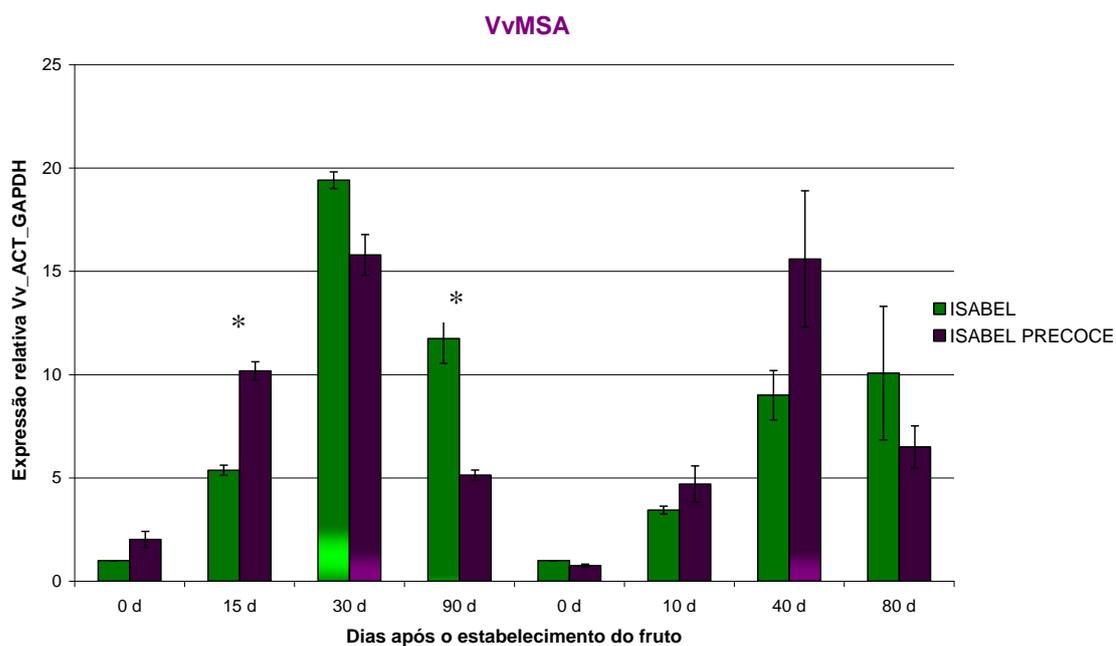


Figura 17. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvMSA. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

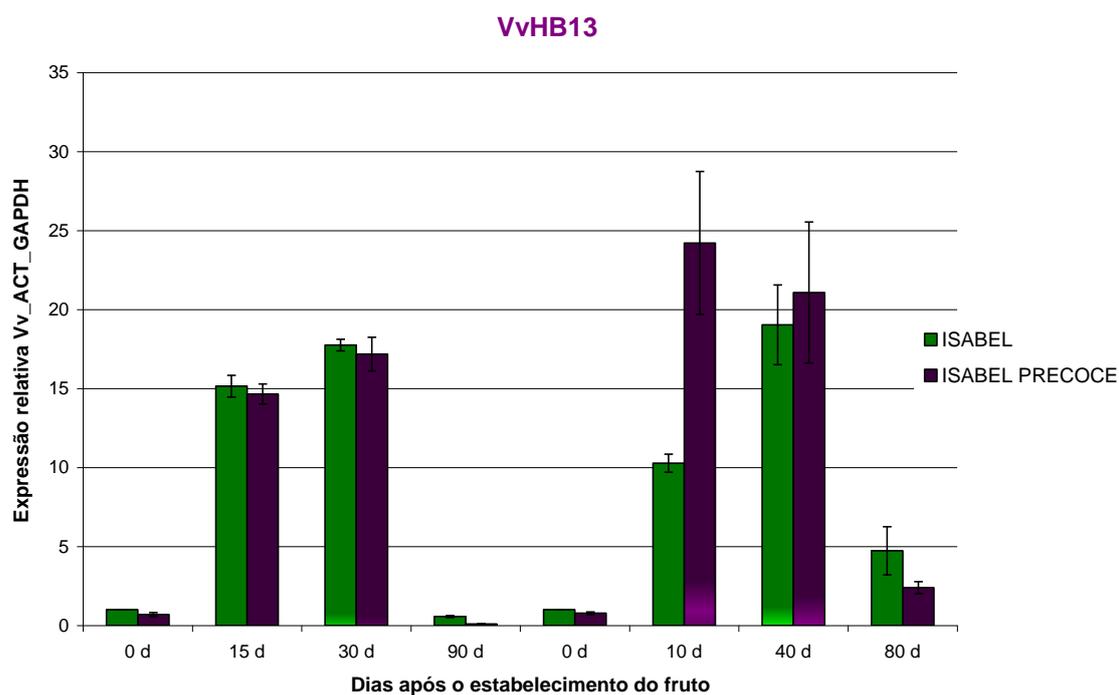


Figura 18. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvHB13. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

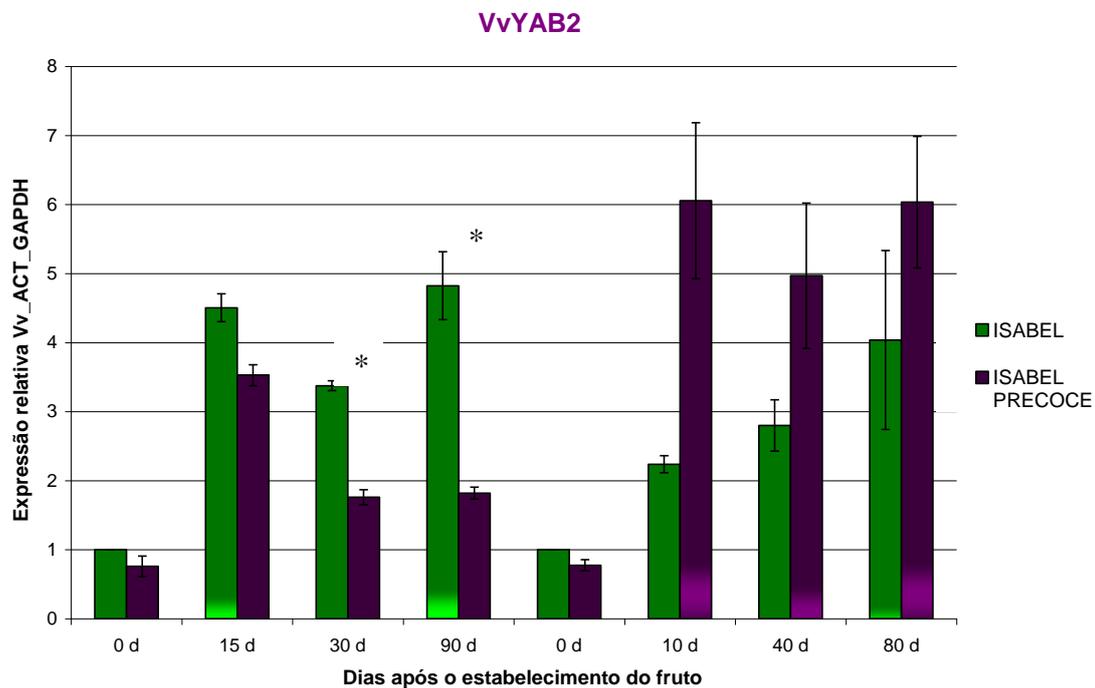


Figura 19. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvYAB2. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

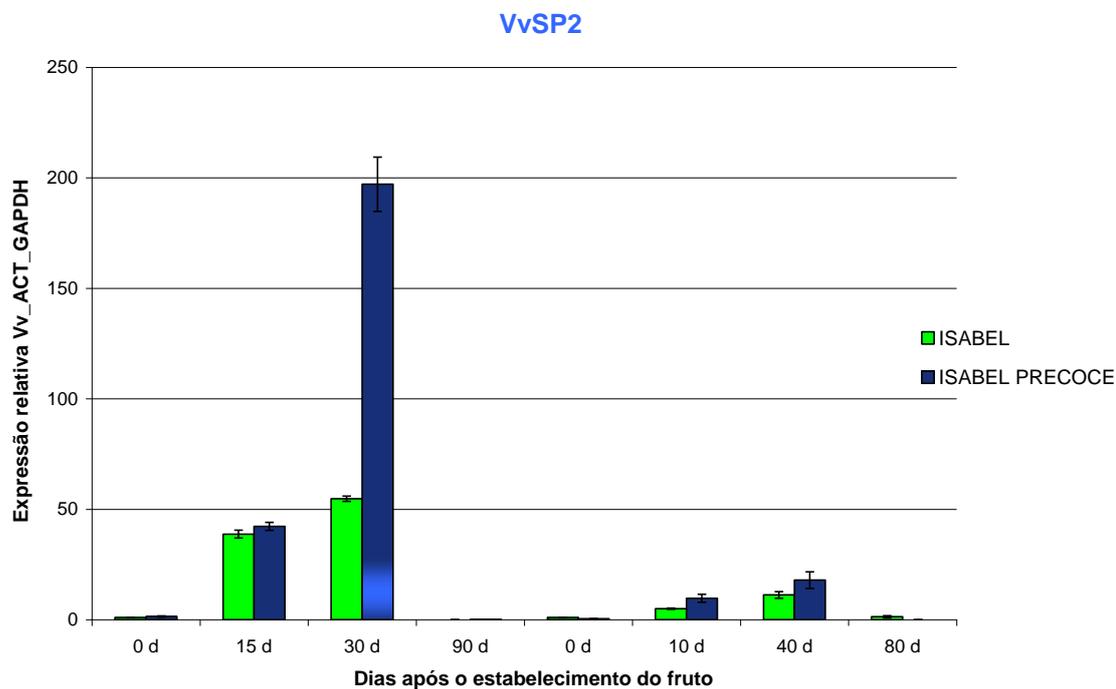


Figura 20. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvSP2. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

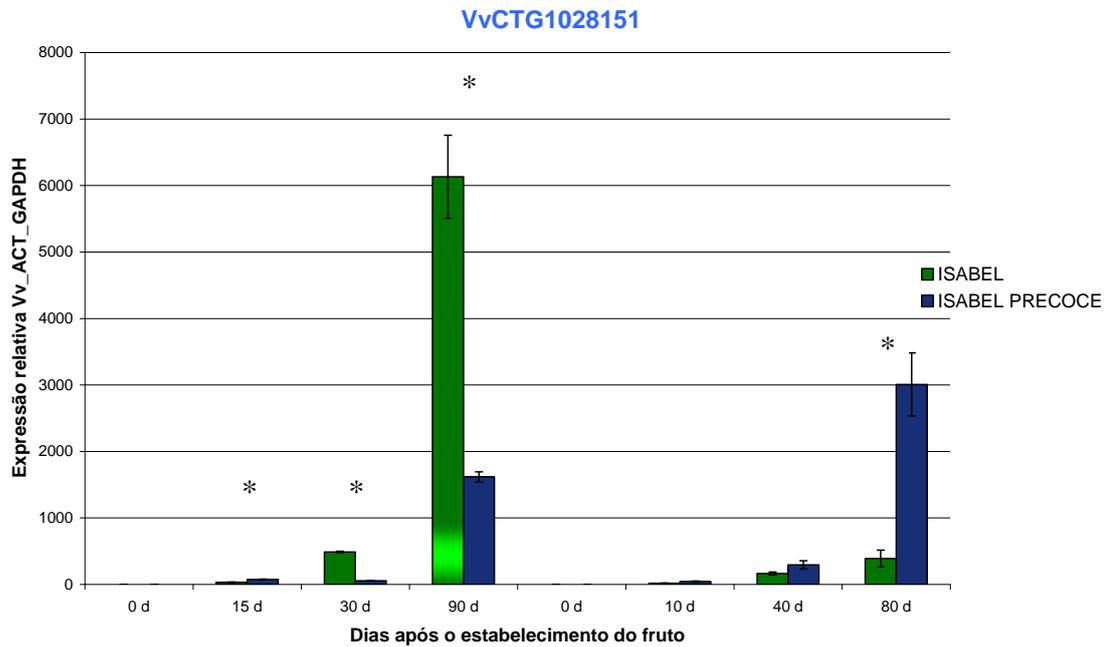


Figura 21. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvCTG1028151. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

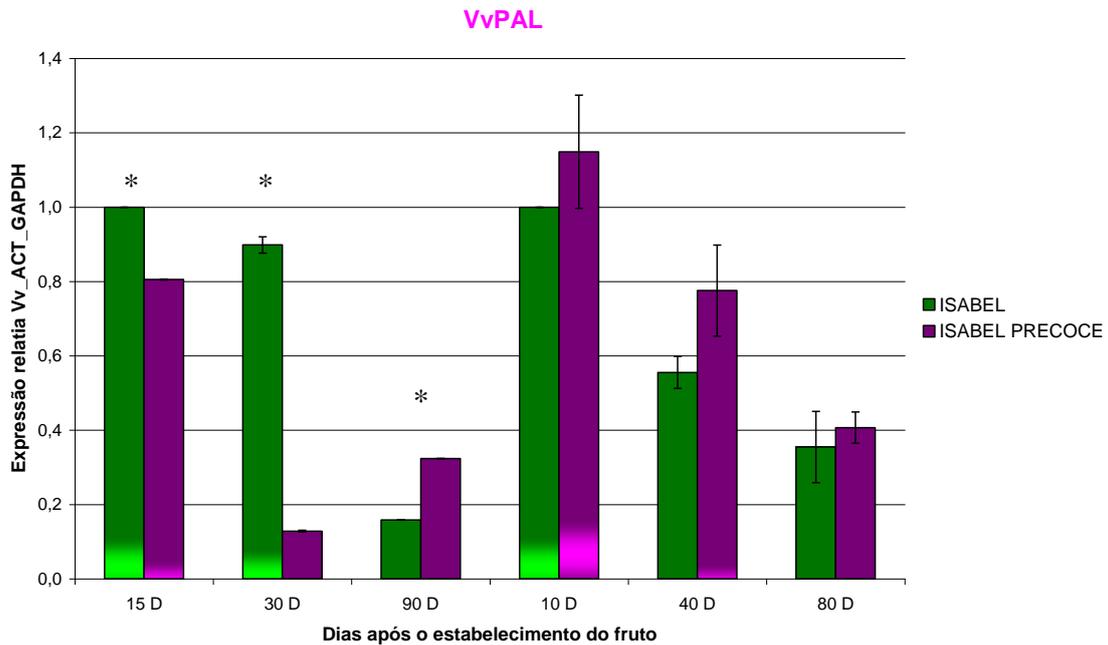


Figura 22. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvPAL. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

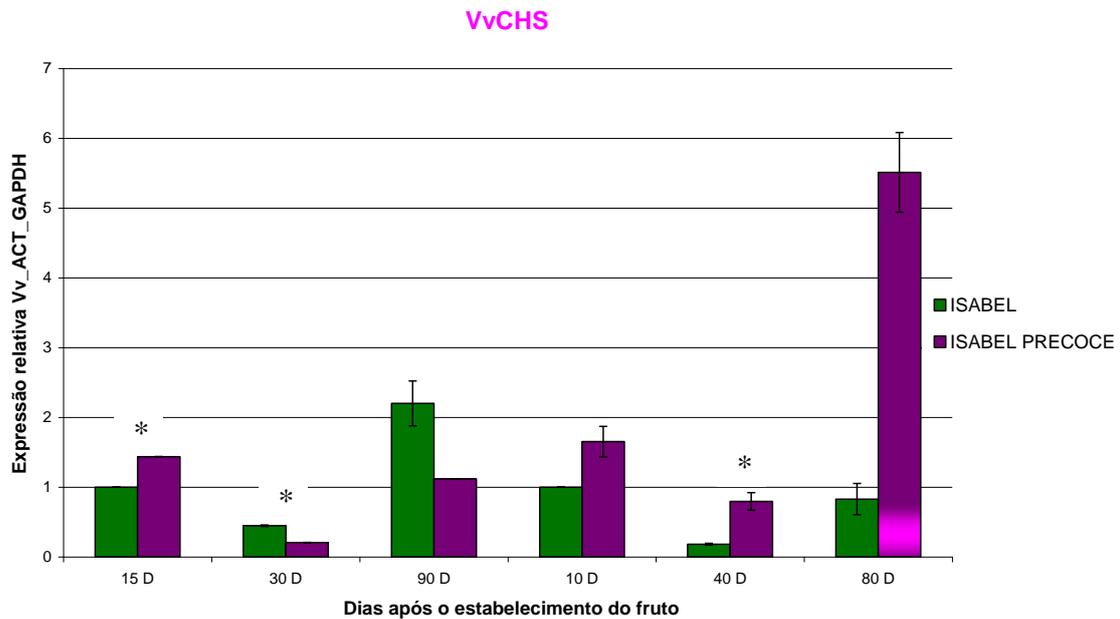


Figura 23. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvCHS. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

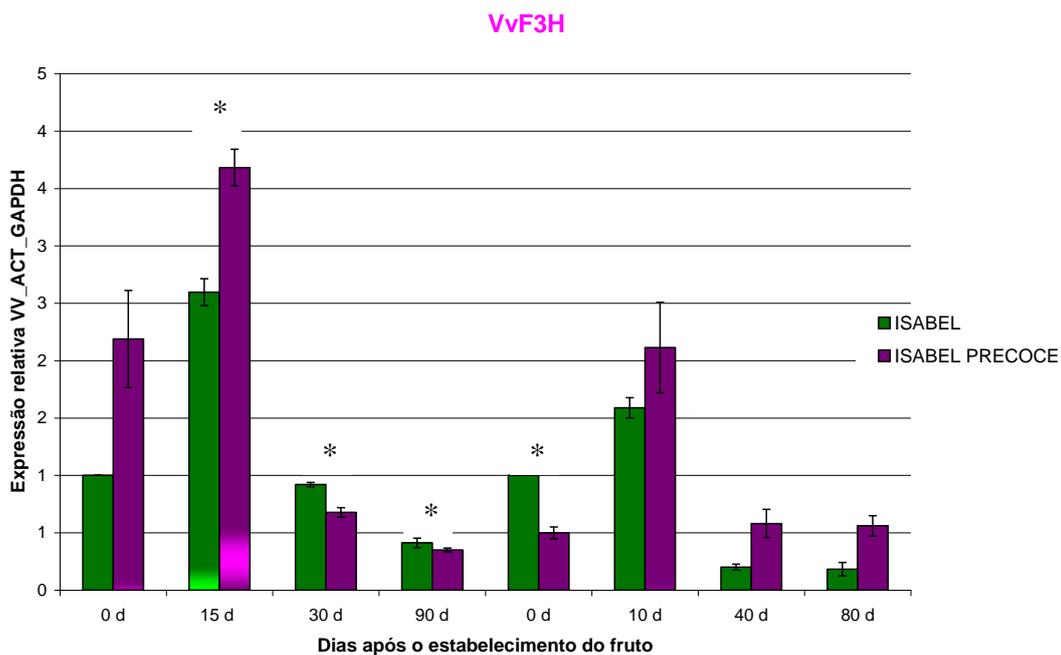


Figura 24. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvF3H. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

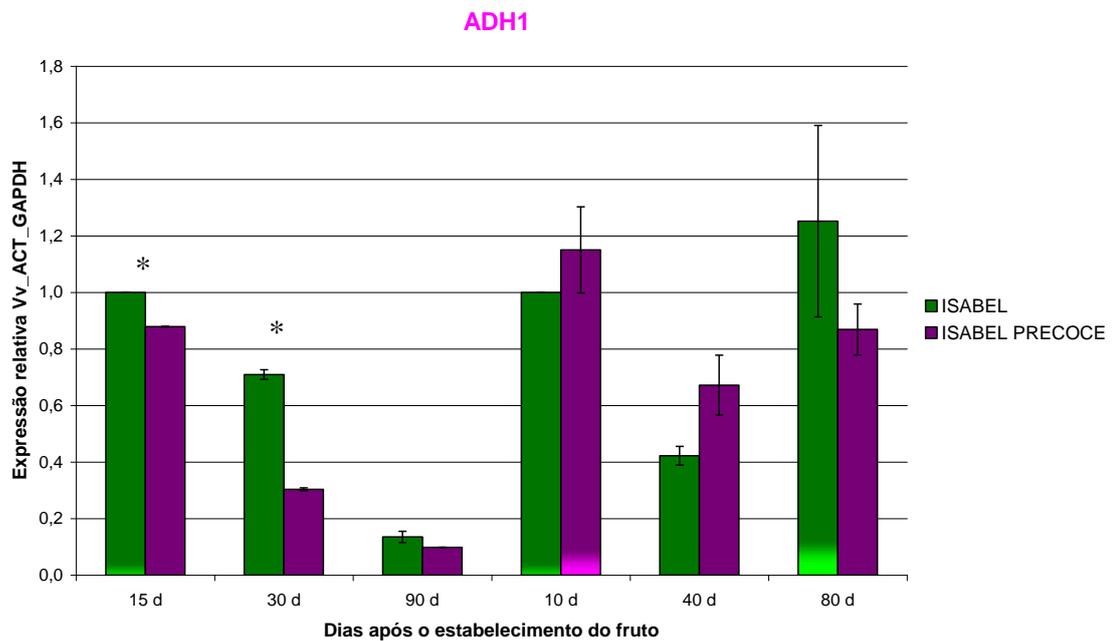


Figura 25. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvADH1. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

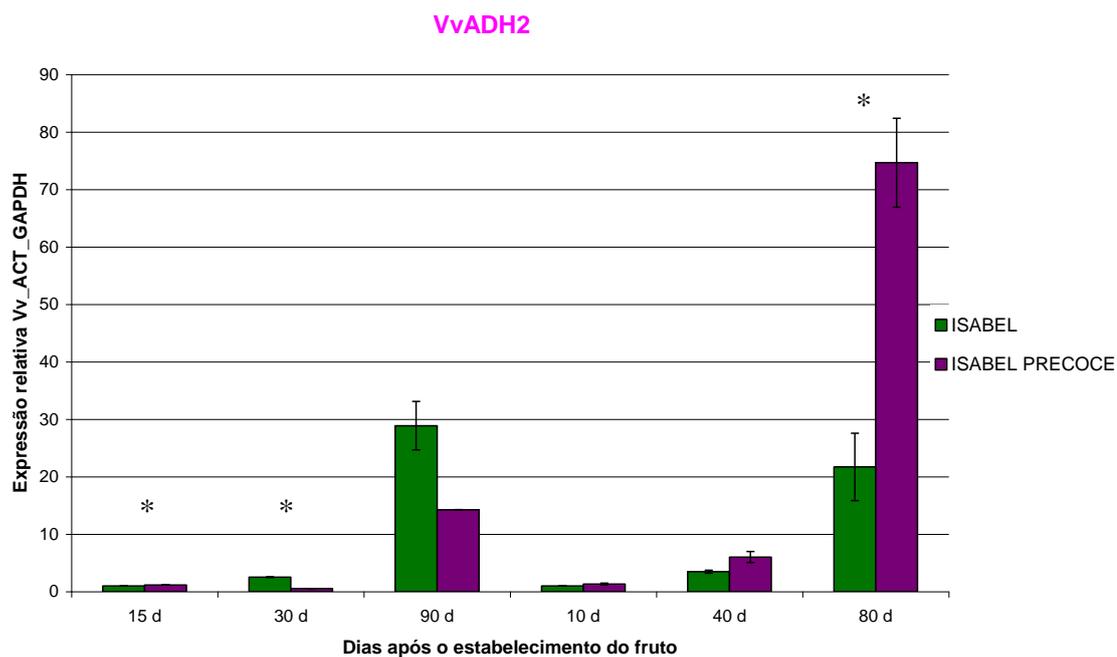


Figura 26. Análises por qRT-PCR do nível de expressão do gene VvADH2. As bagas foram coletadas após 0, 15, 30 e 90 DAEF na safra de 2005/2006 e 0, 10, 40 e 80 DAEF na safra de 2007/2008. O nível de expressão foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes constitutivos VvActina e VvGAPDH. Asteriscos indicam que os valores diferem significativamente entre as cultivares na referida data de coleta ($p \leq 0,05$). Barra roxa: fator de transcrição; barra azul: gene estrutural; barra rosa: enzima do metabolismo secundário.

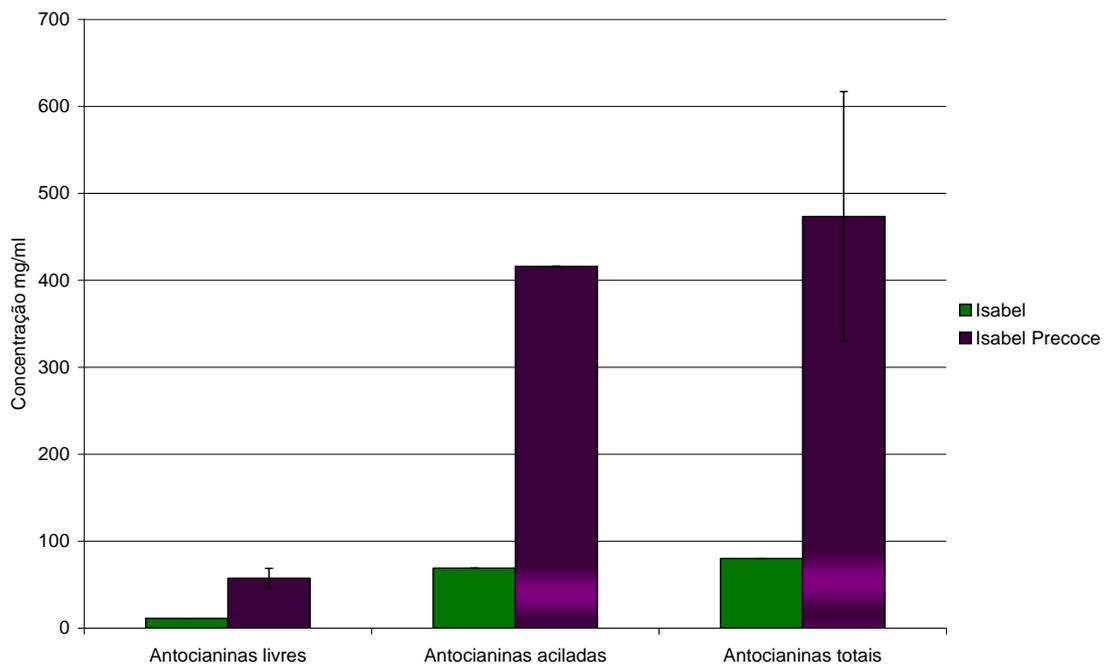


Figura 27: Quantificação de antocianinas entre as cultivares Isabel e Isabel Precoce. Amostragem realizada aos 80DAEF durante a safra de 2008/2009.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi proposto que a mutação Isabel Precoce, que possui antecipação da data de colheita de cerca de trinta dias em relação à sua parental Isabel, fornece um modelo de estudo adequado para o entendimento da regulação gênica durante o processo de desenvolvimento de frutas não-climatéricas. Apesar de o tempo de desenvolvimento e maturação do fruto da cultivar Isabel Precoce ser reduzido, o diâmetro, peso e volume das bagas não são alterados em relação à cultivar Isabel (ver página 52) A cultivar Isabel Precoce apresentou, em média, dez vezes mais antocianinas totais quando comparada com a cultivar Isabel na data amostrada. A determinação do conteúdo de antocianinas utilizando HPLC confirmou o fenótipo de antecipação da maturação na cultivar Isabel Precoce, já que o acúmulo de antocianinas nas cascas das cultivares de uva colorida são marcadores para o início do *véraison* (CONDE *et al.*, 2007).

Algumas cultivares geneticamente próximas são morfologicamente muito similares e difíceis de diferenciar mediante comparação botânica (ARADHYAM *et al.*, 2003). Para auxiliar nesta diferenciação, marcadores moleculares do tipo microsatélite (SSR) foram utilizados para determinar ou confirmar a identidade de uma amostra particular de videira. A utilização de nove loco de SSR demonstrou que a cultivar Isabel Precoce possui o mesmo perfil genético-molecular da sua parental Isabel, diferenciando-se apenas quanto ao caráter de maturação precoce. Estes resultados corroboram dados da literatura (VIGNANI *et al.*, 1996; FRANKS *et al.*, 2002; RIAZ *et al.*, 2002), os quais afirmam que clones intravarietais podem diferir consideravelmente no fenótipo, mesmo que tenham perfis de DNA praticamente idênticos. Essa propriedade nos permitiu avaliar e comparar a expressão utilizando qRT-PCR de uma série de genes sabidamente envolvidos no processo de desenvolvimento, morfogênese e maturação do fruto da videira entre as cultivares. Dentre os 22 genes avaliados, quatro (VvFT, VvMYBPA1, VvCTG1027667, VvBURP1) mantiveram o perfil transcricional conservado entre as duas safras avaliadas (safras 2005/2006 e 2007/2008) e com expressão diferencial entre os dois genótipos em pelo menos um estágio de desenvolvimento avaliado. Esses

genes parecem sofrer menor efeito do ambiente e são candidatos potenciais de participação no fenótipo de maturidade precoce observado, podendo ser a porção do genoma diretamente alterada ou apenas sofrer a consequência da alteração de expressão de outro gene. O padrão de expressão dos demais genes variou entre as safras, indicando possível influência de fatores ambientais sobre sua regulação, e, portanto, não participando do fenótipo de interesse.

5.1. Genes com Padrão de Expressão Conservado entre as Safras

5.1.1.VvFT

A expressão do gene VvFT atingiu seu pico de expressão em 30 e 40 DAEF nas safras 2005/2006 e 2007/2008 respectivamente, sendo induzido na cultivar mutante. FT codifica uma proteína com similaridade às proteínas que se ligam a fosfatidiletanolamina (PEBPs), as quais também são encontradas em leveduras e bactérias (BRADLEY *et al.*, 1996). A família gênica PEBPs de *Arabidopsis* inclui FT como também outros cinco genes relacionados - TSF (TWIN SISTER OF FT), TFL1 (TERMINAL FLOWER 1), BFT (BROTHER OF FT AND TFL1), ACT (*A. thaliana* CENTRORADIALIS HOMOLOGUE) e MFT (MOTHER OF FT E TFL; KOBAYASHI *et al.*, 1999). Em *A. thaliana*, o gene FT é positivamente regulado pelo fator de transcrição CONSTANS (CO) durante o florescimento (Sreekantan *et al.*, 2006). FT interage com FD, um fator de transcrição do tipo bZIP promovendo a floração em *Arabidopsis* pela ativação direta de APETALA1 (AP1) (ABE *et al.*, 2005; WIGGE *et al.*, 2005). A videira tem uma fase juvenil curta durante a qual ocorre a produção de folhas com filotaxia espiral. A transição para a fase adulta é marcada por mudanças na forma e filotaxia dessas folhas e pela formação de gavinhas (GERRATH *et al.*, 1998). Na videira as gavinhas são órgãos que ajudam na escalada da planta em direção à luz e se desenvolvem a partir de meristemas laterais, os quais, também podem dar origem a inflorescências após a indução da floração. A formação de um meristema lateral, que pode se diferenciar em uma estrutura estéril (gavinha) ou fértil (inflorescência) representa uma característica peculiar do desenvolvimento reprodutivo em Vitaceae (CARMONA *et al.*, 2007). Os

mesmos autores associaram o padrão de expressão de VvFT à indução sazonal da floração em gemas latentes e ao desenvolvimento de inflorescências, flores e frutos. Estes autores ainda demonstraram que a super-expressão de VvFT em *Arabidopsis* causa efeitos similares a expressão de FT, promovendo o florescimento e a produção de flores terminais. CARMONA *et al.* (2007) também observaram a expressão de VvFT durante o desenvolvimento do fruto e especialmente no desenvolvimento de sementes, sugerindo um papel para este gene durante esses processos ainda não descritos em outros sistemas vivos. O pico de expressão de VvFT aos 30 DAEF (**Figura 7**) em nosso trabalho, o que corresponde a fase verde e inicial do desenvolvimento, fornece mais um indício da participação desse fator de transcrição na regulação do processo de velocidade e/ou desenvolvimento do fruto da videira, além da sua função de promotor da floração.

5.1.2. VvMYBPA1

Apesar do nível de expressão do gene VvMYBPA1 ter sido maior no estabelecimento do fruto, a indução na expressão desse gene na cultivar Isabel Precoce durante este estágio na safra de 2005/2006 não foi observada na safra 2007/2008. No entanto, a indução da expressão na cultivar mutante em 30/40 DAEF manteve-se nas duas safras avaliadas. VvMYBPA1 é um fator de transcrição do tipo MYB que controla a expressão de genes da rota das proantocianidinas (PAs) ligando-se preferencialmente aos promotores dos genes leucoantocianidina redutase (LAR) e antocianidina redutase (ANR). PAs são taninos condensados, polifenóis do metabolismo secundário sintetizado pela via de biossíntese dos flavonóides (BOGS *et al.*, 2007). Estão presentes em várias espécies de plantas (*Medicago truncatula*, *A. thaliana*) e podem agir na defesa contra doenças e na dormência de sementes (DEBEAUJON *et al.*, 2000; PETERS & CONSTABEL, 2002). As PAs estão presentes em muitas frutas e produtos derivados como vinho, suco de frutas e chás, podendo contribuir para seu sabor e agregando benefícios para a saúde. Esses compostos funcionam como antioxidantes conferindo proteção contra radicais livres mediados por injúria e doenças cardiovasculares (BAGCHI *et al.*, 2000; MIDDLETON *et al.*, 2000; COS *et al.*, 2004). Em *Arabidopsis*, a via de

biossíntese que leva ao acúmulo de PA foi caracterizada usando os mutantes *transparent testa (tt)* e *tannin-deficient seed (tds)*, os quais não são capazes de acumular PAs em suas sementes (SHIRLEY *et al.*, 1995; ABRAHAMS *et al.*, 2002). Alguns locos TT e TDS identificados codificam enzimas da rota geral de síntese dos flavonóides e outras enzimas, transportadores e reguladores especialmente envolvidos no acúmulo de PA. O gene VvMYBPA1 é homólogo a TT2 de *Arabidopsis* e, conforme BAUNDRY *et al.* (2004), TTG1 (TRANSPARENT TESTA GLABRA1) pode participar da ativação de TT2. A videira sintetiza PAs nas sementes e cascas de frutas, onde seu acúmulo ocorre durante os primeiros estádios do desenvolvimento do fruto até o início do amadurecimento (*véraison*, BOGS *et al.*, 2007). Esse padrão de acúmulo de transcritos foi observado em nosso experimento (**Figura 8**). No *véraison*, a via de síntese dos flavonóides é ativada para produção de antocianinas nas cascas de uvas de cor tinta e o fator de transcrição VvMYBA, o qual apenas é expresso após o *véraison*, parece participar da regulação da síntese de antocianinas durante o amadurecimento (KOBAYASHI *et al.*, 2002; WALKER *et al.*, 2007). A expressão temporal e tecido específico de ANR e LAR corresponde com o acúmulo de PA anterior ao *véraison* (BOGS *et al.*, 2005), sugerindo ser um fator regulatório independente no controle do acúmulo de PA em uva. BOGS *et al.* (2007) demonstraram que VvMYBPA1 é capaz de ativar os promotores dos genes VvANR e VvLAR,1 mas também de outros genes da rota geral de biossíntese dos flavonóides em videira. No entanto, VvMYBPA1 não foi capaz de ativar a síntese antocianinas, sugerindo ser específico em videira na rota de síntese de PA. A síntese de antocianinas e PA compartilham enzimas da rota dos flavonóides até a enzima leucoantocianidina desoxigenase (LDOX) catalisar a síntese de antocianidinas (ABRAHAMS *et al.*, 2003), a qual é substrato para a síntese de antocianinas via uridina-difosfato-glicosiltransferase (UFGT) e para a síntese de PA catalisada por ANR e LAR. Portanto, UFGT e ANR/LAR são enzimas que levam ao acúmulo de antocianinas e PA, respectivamente, e representam um possível ponto de controle da rota.

Ambos os fatores de transcrição foram expressos durante a fase verde do desenvolvimento do fruto, correspondente aos Estádios I e II, e a expressão desses genes caíram a níveis basais na última amostragem, que por sua vez,

correspondente ao Estádio III. Os Estádios I e II são caracterizados pelo acúmulo de diversos solutos que participam da expansão da baga, compostos fenólicos, aminoácidos, micronutrientes e compostos aromáticos. O acúmulo desses dois fatores de transcrição nesses estádios com padrão de expressão induzido na cultivar mutante pode indicar sua contribuição para a aceleração do processo de desenvolvimento do fruto da cultivar Isabel Precoce que inicia no final do Estádio II e estabelece-se ao longo do Estádio III.

5.1.3. VvCTG1027667

O crescimento do fruto é dependente da divisão e da expansão celular, e o desenvolvimento do fruto em nível celular já foi documentado em várias espécies, incluído maçã (BLANPIED & WILDE, 1968; STEUDLE & WIENEKE, 1985, GOFFINET *et al.*, 1995), pêssego (SCORZA *et al.*, 1991; ZANCHIN *et al.*, 1994), pepino (MARCELIS & HOFMANEIJER, 1993) e videira (SCHLOSSER *et al.*, 2008), entre outros. A expansão de células requer o afrouxamento da parede celular primária e a síntese e integração de material novo onde houve perda anterior. As conseqüências do afrouxamento vão desde rompimento de ligações químicas entre os componentes da parede celular até a acidificação ou ação de enzimas hidrolíticas (SCHLOSSER *et al.*, 2008). NUNAN *et al.* (2001) caracterizaram a atividade de expressão do mRNA de inúmeras enzimas modificadoras de parede celular e observaram a expressão de β -galactosidase, α -galactosidase, pectina metiltransferase, pectina liase.

As expansinas são proteínas de afrouxamento de parede celular em plantas, envolvidas na expansão da célula e em uma variedade de outros processos de desenvolvimento nos quais ocorrem modificações da parede celular. Expansinas possuem um domínio (domínio 1) homólogo à família das glicosídeo-hidrolase 45 (GH₄₅), a maioria dos membros dessa família consiste de endoglicanases fúngicas do tipo β -1,4-D-endoglicanase. O domínio 1 das expansinas compartilha com GH₄₅ um número conservado de cisteínas, que formam pontes de dissulfeto nas enzimas de fungos. No entanto, apesar da presença do motivo conservado GH₄₅, nenhuma atividade hidrolítica foi descrita

para expansinas (SAMPEDRO & COSGROVE, 2005). Discussões sobre enzimas com atividade elicitora endo-(1,3)- β -glicanase geralmente estão centradas em atividade antimicrobiana, mas recentemente uma endo-(1,3)- β -glicanase foi isolada e caracterizada a partir do fruto da banana e pode estar envolvida no amadurecimento e amolecimento do tecido (PEUMANS *et al.*, 2000). GOES DA SILVA *et al.* (2005) identificaram as primeiras duas expansinas de videira. Estas são expressas em diferentes estádios de desenvolvimento de fruto e flores. Proteínas do tipo expansinas são componentes essenciais da indução ácida do afrouxamento da parede celular em plantas (COSGROVE *et al.*, 1998). VvCTG1027667 codifica uma proteína putativa expressa durante a floração e em frutos após o *vérasion*. Em nossos experimentos foi possível observar expressão desde os primeiros estádios de desenvolvimento, com maior acúmulo aos 90/80 DAEF. Aos 15/10 DAEF foi possível observar indução significativa de VvCTG1027667 na cultivar Isabel Precoce (**Figura 9**). O acúmulo de transcrito de VvCTG1027667 na cultivar Isabel Precoce pode ser um dos fatores contribuintes para a aceleração da fase verde e ácida da cultivar mutante devido a sua habilidade de estender as paredes celulares rapidamente através do rompimento de ligações não-covalentes.

A presença do gene VvCTG1027667 entre os que apresentaram expressão conservada entre as safras analisadas e induzido na cultivar mutante, pode ser o resultado da expressão de genes regulatórios ainda não conhecidos. A proteína correspondente a esse gene deve participar diretamente do afrouxamento da parede celular para subsequente expansão da célula e por isso o acúmulo de transcritos é induzido na cultivar mutante.

5.1.4. VvBURP1

VvBURP1 foi identificado por Fernandez *et al.* (2007) juntamente com outros genes, no mutante de uva para ausência de polpa "*fleshless berry*" da cultivar Ugni Blanc de *V. vinifera* L.. Esse gene mostrou-se reprimido em comparação com a cultivar selvagem, indicando sua participação no processo de morfogênese do fruto, pois sua ausência contribui para o fenótipo ausência de polpa. Neste mesmo trabalho, o gene mostrou máxima expressão durante a

fase verde do desenvolvimento do fruto assim como em raízes. Em nossos experimentos, foi possível observar esse mesmo comportamento (**Figura 10**), com máxima expressão aos 30/40 DAEF induzida na cultivar mutante significativamente na safra de 2005/2006. VvBURP1 pertence a uma família de proteínas com domínio c-terminal BURP (BNM2, USP, RD22, Poligalacturonase, HATTORI *et al.*, 1998). Os membros da família BURP incluem cinco proteínas: (1) a subunidade β da poligalacturonase 1 (PG β 1) encontrado em *Lycopersicon esculentum* e envolvido na despolimerização da pectina e amolecimento da parede celular durante o amadurecimento do fruto (ZHENG *et al.*, 1992); (2) proteínas embrionárias identificadas em *Vicia faba*, que exibem similitude com hidrolases e podem ser secretadas (BASSUNER *et al.*, 1988) e ainda, elementos promotores responsáveis pela expressão semente específica (BAUMLEIN *et al.*, 1991; FIEDLER *et al.*, 1993); (3) proteínas induzidas por alumínio de *Glycine max* homólogas a proteínas reprimidas por auxinas (ADR6) e induzidas em plantas expostas ao alumínio (RAGLAND & SOLIMAN, 1997); (4) proteínas responsivas à seca (RD22) identificadas em um *screening* de uma biblioteca de cDNA construída a partir de folhas de *A. thaliana* submetidas a estresse por seca (YAMAGUCHI-SHINOZAKI *et al.*, 1992); (5) proteína identificada em *Brassica napus* (BNM2) durante *screening* de genes expressos durante a embriogênese (BOUTILIER *et al.*, 1994). VvBURP1 apresentou maior similaridade com o subgrupo BNM2. O subgrupo BNM2 parece estar envolvido na embriogênese (BOUTILIER *et al.*, 1994), na diferenciação das células do parênquima de sementes (BATCHELOR *et al.*, 2002) e na maturação do pólen (WANG *et al.*, 2003). HATTORI *et al.* (1998) identificaram essa classe de proteínas como sendo exclusiva de plantas. Essas proteínas não são definidas apenas pelo domínio BURP, mas também por outros quatro módulos: (1) um domínio hidrofóbico N-terminal, seguido de (2) um segmento conservado curto ou outro segmento curto, (3) um segmento que consiste de unidades repetitivas as quais são únicas para cada membro e (4) o domínio BURP C-terminal. Não está ainda definida a função do domínio BURP, no entanto, HATTORI *et al.* (1998) especulam que esse domínio protéico funcionaria como poliproteínas, com função em comum sendo codificado pelo domínio BURP e uma segunda função sendo codificada pelas regiões adjacentes. No entanto, poliproteínas multifuncionais são raras em

plantas e geralmente codificadas por transposons (VOYTAS & AUSUBEL, 1998) ou são de origem viral ou bacteriana (cloroplástica). Outra possibilidade explorada pelos mesmos autores, é que o domínio BURP está envolvido na marcação de polipeptídeos adicionados ou imobilizados em um local definido na célula como a parede celular, por exemplo, (ZHENG *et al.*, 1992). Nesse aspecto, o motivo repetido CH pode fornecer uma âncora para a ligação à parede celular através da interação com proteínas sulfatadas ou outros compostos sulfatados da parede celular. Proteínas com domínio BURP possuem estrutura primária similar. . No entanto, a expressão dos seus genes difere, tendo sido encontrada em flores, gemas e sementes de *B. napus*, sementes crescidas sob condições de alta salinidade em *Arabidopsis thaliana*, células do parênquima de raízes, caules e frutos maduros em *Z. mays*, sementes de *V. faba*, raízes na presença de alumínio em *R. communis* (HATTORI *et al.*, 1998). Sendo assim, o fato de genes que codificam proteínas com domínio BURP possuírem padrões de expressão divergentes e provavelmente funções diferentes sugerem que esse domínio possui papel importante no desenvolvimento de plantas.

VvBURP não possui ainda função definida. No entanto, parece participar do estabelecimento da morfogênese do fruto. Demonstramos que esse gene, semelhantemente aos fatores de transcrição citados acima, tem expressão preferencialmente na fase verde do desenvolvimento do fruto da videira, fortalecendo dessa forma a hipótese de que a característica de maturidade precoce estaria determinada ainda nos primeiros estádios de desenvolvimento.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi realizado um estudo visando à identificação e a caracterização de genes envolvidos no estabelecimento da morfogênese, do desenvolvimento e da maturação dos frutos da videira. Para isso, foram utilizadas duas cultivares de fenótipos contrastantes quanto ao período de desenvolvimento do fruto com a finalidade de contribuir para o melhor entendimento dos processos associados ao desenvolvimento e à maturação do fruto dessa espécie. Além disso, foram avaliados parâmetros físicos tais como peso, diâmetro e volume das bagas, a fim de verificar se outras características foram afetadas pela mutação de antecipação da maturação. Também foi realizada a quantificação de antocianinas entre as cultivares por HPLC em cascas de frutas da última coleta da safra 2007/2008 a fim de confirmar por meio de análise química a antecipação do início da maturação do fruto da cultivar Isabel Precoce. Agregado a isso, foram testados nove locos SSR ao longo do genoma com o objetivo de estabelecer a identidade clonal da cultivar mutante com sua parental selvagem. A partir dessas premissas foi possível concluir:

(1) Os parâmetros físicos avaliados não diferiram significativamente entre as cultivares, confirmando que a mutação não afetou as características de forma e volume do fruto. No entanto, o acúmulo de antocianinas foi em média, cerca de dez vezes maior na cultivar Isabel Precoce aos 80 DAEF corroborando sua clara antecipação de maturação em relação a cultivar Isabel.

(2) As análises comparativas de expressão mostraram que devido à natureza similar dos genótipos, estabelecida pelos nove loci SSR, foi possível observar expressão diferencial conservada entre safras de quatro genes entre os dezoito estudados. Destes, dois são fatores de transcrição: VvFT e VvMYBPA1 e os outros dois exercem função estrutural na célula: VvCTG1027667, VvBURP1.

(3) Os 14 genes restantes não tiveram padrão de expressão conservado entre as safras analisadas, indicando que a modulação da sua expressão é fortemente afetada pelas condições ambientais e, portanto, parecem não

participar da determinação do fenótipo de maturidade precoce da cultivar Isabel Precoce.

(4) Considerando que as cultivares Isabel e Isabel Precoce diferem apenas na característica de maturidade precoce, um número razoável de TDFs expressos diferencialmente foram identificados utilizando a técnica de cDNA-AFLP. Os efeitos da mutação aparentemente afetaram apenas as características do amadurecimento precoce (fase verde do fruto), período no qual o perfil dos TDFs identificados mostraram antecipação em Isabel Precoce.

O desenvolvimento de mapas físicos e sua integração com mapas genéticos é uma ferramenta útil na tentativa de isolar e clonar o(s) gene(s) responsáveis pela mutação na cultivar Isabel Precoce. Para tanto, na safra de 2008/2009 foi realizada auto-fecundação de plantas de Isabel Precoce crescidas nos campos experimentais da EMBRAPA Uva e Vinho com o intuito de obter uma população para gerar marcas que possam ser ancoradas nesses mapas disponíveis e ainda verificar se a mutação está presente em homozigose ou heterozigose.

Além disso, a avaliação da expressão dos ortólogos de CO e TTG1, reguladores de FT e TT2 de *Arabidopsis* respectivamente, em videira torna-se importante a fim de verificar se estes também apresentam padrão de expressão induzido na cultivar mutante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, S.; DAIMON, Y.; YAMAGUCHI, A.; IKEDA, Y.; ICHINOKI, H., NOTAGUCHI, M.; GOTO, K.; ARAKI, T. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309: 1052-1056, 2005.

ABLETT, E.; SEATON, G.; SCOTT, K.; SHELTON, D.; GRAHAM, M. W.; BAVERSTOCK, P.; LEE, L. S.; HENRY, R. Analysis of grape ESTs: global gene expression patterns in leaf and berry. *Plant Science*, 159: 87-95, 2000.

ABRAHAMS, S.; TANNER, G.J.; LARKIN, P.J.; ASHTON, A.R. Identification and biochemical characterization of mutants in the proanthocyanidin pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130: 561–576, 2002.

ABRAHAMS, S.; LEE, E.; WALKER, A.R.; TANNER, G.J.; LARKIN, P.J.; ASHTON, A.R. The *Arabidopsis* TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant Journal*, 35: 624–636, 2003.

AGEORGES, A.; FERNANDEZ, L.; VIALET, S.; MERDINOGLU, D.; TERRIER, N.; ROMIEU, C. Four specific isogenes of the anthocyanin metabolic pathway are systematically co-expressed with the red colour of grape berries. *Plant Science*, 170: 372-383, 2006.

ALDINI, G.; CARINI, M.; PICCOLI, A.; ROSSONI, G.; FACINO, R.M. Procyanins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Science*, 73: 2883-2898, 2003.

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*, 81:179–192, 2003.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; STOHS, S.J.; DAS, D.K.; RAY, S.D.; KUSZYNSKI, C.A.; JOSHI, S.S.; PRUESS, H.G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148: 187–197, 2000.

BAGCHI, D.; SEN, C.K.; RAY, S.D.; DAS, D.K.; BAGCHI, M.; PREUSS, H.G.; VINSON, J.A. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res*, 523-524: 87-97, 2003.

BASSÜNER, R.; BAÜMLEIN, H.; HUTH, A.; JUNG, R.; WOBUS, U.; RAPOPORT, T.A.; SAALBACH, G.; MÜNTZ, K. Abundant embryonic mRNA field bean (*Vicia faba* L.) codes for a new class of seed proteins: cDNA cloning and characterization of the primary translation product. *Plant Molecular Biology*, 11: 321-334, 1988.

BATCHELOR, A.K.; BOUTILIER, K.; MILLER, S.S.; HATTORI, J.; BOWMAN, L.A.; HU, M.; LANTIN, S.; JOHNSON, D.A.; MIKI, B.L. SCB1, a BURP-domain protein gene, from developing soybean seed coats. *Planta*, 215: 523-532, 2002.

BAUMLEIN, H.; BOERJAN, W.; NAGY, I.; BASSUNER, R.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; WOBUS, U. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Molecular Genomics and Genetics*, 225: 459–467, 1991.

BAUNDRY, A.; HEIM, M.A.; DUBREUCQ, B.; CABOCHE, M.; WEISSHAAR, B.; LEPINIEC, L. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 39: 366–380, 2004.

BLANPIED, G.D. & WILDE, M.H. A study of cells in outer flesh of developing McIntosh apple fruits. *Botanical Gazette*, 129: 173–183, 1968.

BOGS, J.; DOWNEY, M.; HARVEY, J.S.; ASHTON, A.R.; TANNER, G.J.; ROBINSON, S.P. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology*, 139: 652–663, 2005.

BOGS, J.; JAFFÉ, F.W.; TAKOS, A.M.; WALKER, A.R.; ROBINSON, S.P. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiology*, 143: 1347-1361, 2007.

BOSS, P.K.; VIVIER, M.; MATSUMOTO, S.; DRY, I.B.; THOMAS, M.R. A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to AGAMOUS and SHATTERPROOF, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Molecular Biology*, 45: 541-553, 2001.

BOSS, P.K. & THOMAS, M.R. Association of dwarfism and floral induction with grape 'green evolution' mutation. *Nature*, 416: 847-850, 2002.

BOUTILIER, K.A.; GINES, M.J.; DEMOOR, J.M.; HUANG, B.; BASZCZYNSKI, C.L.; IYER, V.N.; MIKI, B.L. Expression of the BnmNAP subfamily of napin genes coincides with the induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 26: 1711–1723, 1994.

BRADLEY, D.; CARPENTER, R.; COPSEY, L.; VINCENT, C.; ROTHSTEIN, S.; COEN, E. Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*, 379: 791-797, 1996.

BURGER, A.L. & BOTHA, F.C. Ripening-related gene expression during fruit ripening in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and Clairette blanche. *Vitis*, 43: 59-64, 2004.

Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul, 2008. Editor Técnico: Loiva Maria Ribeiro de Mello. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho.2008.

ÇAKIR, B.; AGASSE, A.; GAILLARD, C.; SAUMONNEAU, A.; DELROT, S.; ATANASSOVA, R. A grape ASR protein involved in sugar and abscísico acid signaling. *The plant Cell*, 15: 2165-2180, 2003.

CAMARGO, U. A. Isabel Precoce: Alternativa para a Vitivinicultura Brasileira. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 4 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 54).

CARMONA, M.J.; CUBAS, P.; CALONJE, M.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Flowering transition in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Canadian Journal of Botany*, 85: 701-711, 2007.

CHATELET, O.; LAUCOU, V.; FERNANDEZ, L.; SREEKANTAN, L.; LACOMBE, T.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; THOMAS, M.R.; TORREGROSSA, L. Characterization of *Vitis vinifera* L. somatic variants exhibiting abnormal flower development patterns. *Journal of Experimental Botany*, 58: 4107-4118, 2007.

CHERVIN, C.; EL-KEREAMY, A.; ROUSTAN, J.P.; LATCHÉ, A.; LAMON, J. BOUZAYEN, M. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science*, 167: 1301-1305, 2004.

CLOUSE, S.D. Brassinosteroids: plant counterparts to animal steroidshormones? *Vitam Horm*, 65: 195–223, 2002.

COOMBE, B.G. & HALE, C.R. Hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology*, 51: 629-634, 1973.

CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A.C.P.; TAVARES, R.M.; SOUZA, M.J.; AGASSE, A.; DELROT, S.; GÉROS, H. Biochemicla Changes throughout grape Berry development and fruti and wine quality. *Food*, 1: 1-22, 2007.

COS, P.; DEBRUYNE, T.; HERMANS, N.; APERS, S.; BERGHE, D.V.; Vlietinck, A.J. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current Medicinal Chemistry*, 11: 1345–1359, 2004.

COSGROVE, D.J. Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology*, 118: 333–339, 1998.

DAVIES, C.; BOSS, P.K.; ROBINSON, S.P. Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the

expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiology* 115: 1155-1161, 1997.

DEBEAUJON, I.; LEON-KLOOSTERZIEL, K.M.; KOORNNEEF, M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122: 403–414, 2000.

Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29760>. Acesso em 15/12/2008.

Disponível em: <http://www.wineinstitute.org> Acesso em: 19 de novembro de 2008.

EINSET, J. & PRATT, C.; (1975) Grapes. In: JANICK, J. AND MOORE, J.N. (eds) *Advances in Fruit Breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, pp. 130–153.

EL-KEREAMY, A.; CHERVIN, C.; ROUSTAN, J.P.; CHEYNIER, V.; SOUQUET, J.M.; MOUTOUNET, M.; RAYNAL, J.; FORD, C.; LATCHÉ, A.; PECH, J.C.; BOUZAYEN, M. Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum*, 119: 175-182, 2003.

FAO (2007) <http://faostat.fao.org>

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res*, 475: 89-111, 2001.

FERNANDEZ, L.; ROMIEU, C.; MOING, A.; BOUQUET, A.; MAUCOURT, M.; THOMAS, M.R.; TORREGROSSA, L. The grapevine *fleshless* berry mutation. A unique genotype to investigate differences between fleshy and nonfleshy fruit. *Plant Physiology*, 140: 537-547, 2006.

FERNANDEZ, L.; TORREGROSSA, I.; TERRIER, N.; SREEKANTAN, I.; GRIMPLET, J.; DAVIES, C.; THOMAS, M.R.; ROMIEU, C.; AGEORGES, A. Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. *Plant Molecular Biology*, 63: 307-323, 2007.

FIALHO, F. B. Interpretação da Curva de Crescimento de Gompertz. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 1999. 4 p. (Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 237).

FIEDLER, U.; FILISTEIN, R.; WOBUS, U.; BAUMLEIN, H. A complex ensemble of cis-regulatory elements controls the expression of a *Vicia faba* non-storage seed protein gene. *Plant Molecular Biology*, 22: 669–679, 1993.

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

GERRATH, J.M.; LACROIX, C.R.; POSLUSZNY, U. Phyllotaxis in the Vitaceae. In: JEAN, R.V.; BARABE, D. (eds), *Symmetry in Plants*, World Scientific, Singapore, 89-107, 1998.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 725-749, 2001.

GOES DA SILVA, F.; IANDOLINO, A.; AL-KAYAL, F.; BOHLMANN, M.C.; CUSHMAN, M.A.; LIM, .H.; ERGUL, A.; FIGUEROA, R.; KABOLOGLU, E.K.; OSBORNE, C.; ROWE, J.; TATTERSALL, E.; LESLIE, A.; XU, J.; BAEK, J.; CRAMER, G.R.; CUSHMAN, J.C.; COOK, D.R. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiology*. 139: 574-597, 2005.

GOFFINET, M.C.; ROBINSON, T.L.; LAKSO, A.N. A comparison of Empire apple fruit size and anatomy in unthinned and hand-thinned trees. *Journal of Horticultural Science*, 70: 375–387, 1995.

HATTORI, J.; BOUTILIER, K.A.; CAMPAGNE, M.M.V.; MIKI, B.L. A conserved BURP domain defines a novel group of plant proteins with unusual primary structures. *Molecular Genomics and Genetics*, 259:424–428, 1998.

JAILLÓN, O.; AURY, J.; NOEL, B.; POLICRITI, A.; CLEPET, C.; CASAGRANDE, A.; CHOISNE, N.; AUBOURG, S.; VITULO, N.; JUBIN, C. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449: 463-467, 2007.

JEONG, S.T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, S.; ESAKA, A. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167: 247-252, 2004.

KOBAYASHI, Y.; KAYA, H.; GOTO, K.; IWABUCHI, M.; ARAKI, T.; A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 286: 1960-1962, 1999.

KOBAYASHI, S.; ISHIMARU, M.; HIRAOKA, K.; HONDA, C. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215: 924–933, 2002.

KOBAYASHI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HIROCHIKA, H.; Retrotransposon – induced mutations in grape skin color. *Science*, 304: 982, 2004.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.

MACGOVERN, P.E. (2004) Ancient wine: the search for the origins of viniculture. Princeton University Press.

MAILHAC, N. & CHERVIN, C. Ethylene and grape berry ripening. *Stewart Postharvest Review* 2: 1-5, 2006.

MANARESI A. Trattato di Viticoltura. Edizioni Agricole, Bologna, 1946. 623p.

MARCELIS, L.F.M. & HOFMANEIJER, L.R.B. Cell division and expansion in the cucumber fruit. *Journal of Horticultural Science*, 68: 665–671, 1993.

MIDDLETON, E.J.R.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDIS, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Review*, 52: 673–751, 2000.

MULLINS, M. G.; BOUQUET, A.; WILLIAMS, L. E. (1992) Biology of grapevine. Cambridge, GrãBretanha : Cambridge University Press, 239p.

NUNAN, K.J.; DAVIES, C.; ROBINSON, S.P.; FINCHER, GB. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta*, 214: 257–264, 2001.

OLLAT, N.; DIAKOU-VERDIN, P.; CARDE, J.P.; BARRIEU, F.; GAUDILLÈRE, J.P.; MOING, A. Grape berry development: a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 36, 109-131, 2002.

PACEY-MILLER, T.; SCOTT, K.; ABLETT, E.; TINGEY, S.; CHING, A.; HENRY, R. Genes associated with the end of dormancy in grapes. *Functional and Integrative Genomics*, 3: 144-152, 2003.

PETERS, D.J. & CONSTABEL, C.P. Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Journal*, 32: 701–71, 2002.

PEUMANS, W.J.; BARRE A.; DERYCKE, V.; ROUGE, P.; ZHANG, W.; MAY, G.D.; DELCOUR, J.A.; VAN LEUVEN, F.; VAN DAMME, E.J.M. Purification, characterization and structural analysis of an abundant -1,3-glucanase from banana fruit. *European Journal of Biochemistry*, 267: 1188–1195, 2000.

RAGLAND, M. & SOLIMAN, K.M. Sali5-4a (accession No.U64866) and Sali3-2 (accession No. U89693), two genes induced by aluminum in soybean roots (P6R97-071). *Plant Physiology*, 114: 395, 1997.

REID, K.E.; OLSSON, N.; SCHLOSSER, J.; PENG, F.; LUND, S.T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6: 27, 2006.

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*, 127, 508-514, 2002.

ROMEYER, F.M.; MACHEIX, J.J.; GOIFFON, J.P.; REMINIAC, C.C.; SAPIS, J.C. The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 346-349, 1983.

SAMPEDRO, J. & COSGROVE, D.J. The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6: 242, 2005.

SCHLOSSER, J.; OLSSON, N.; WEIS, M.; REID, K.; PENG, F.; LUND, S.; BOWEN, P. Cellular expansin and gene expression in the developing grape (*Vitis vinifera* L.). *Protoplasma*, 232: 255-265, 2008.

SCORZA, R.; MAY, L.G.; PURNELL, B.; UPCHURCH, B. Differences in number and area of mesocarp cells between small-fruited and large-fruited peach cultivars. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 116: 861–864, 1991.

SHIRLEY, B.W.; KUBASEK, W.L.; STORZ, G.; BRUGGEMANN, E.; KOORNNEEF, M.; AUSUBEL, F.M.; GOODMAN, H.M. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant Journal*, 8: 659–671, 1995.

SOUZA, J. S. I. *Uvas Para o Brasil*. São Paulo: Melhoramentos 1996, 445 p.

SPILLER, G.A.; STORY, J.A.; FURUMOTO, E.J.; CHEZEM, J.C.; SPILLER, M. Effect of tartaric acid and dietary fibre from sun-dried raisins on colonic function and on bile acid and volatile fatty acid excretion in healthy adults. *Br J Nutr*, 90: 803-807, 2003.

SREEKANTAN, L.; THOMAS, M.R. VvFT and VvMADS8, the grapevine homologues of the floral integrators FT and SOC1, have unique expression patterns in grapevine and hasten flowering in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biology*, 33: 1129-1139, 2006.

SRINIVASAN, C. & MULLINS, M.G. Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.): Formation of inflorescence in vitro by isolated tendrils. *Plant Physiology*, 61: 126-130, 1978.

STEUDLE, E. & WIENEKE, J. Changes in water relations and elastic properties of apple fruit cells during growth and development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110: 824–829, 1985

SYMONS, G.M.; DAVIES, C.; SHAVRUKOV, Y.; DRY, I.B.; REID, J.B.; THOMAS, M.R. Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology*, 140: 150-158, 2006.

TERRIER, N.; GLISSANT, D.; GRIMPLET, J.; BARRIEU, F.; ABBAL, P.; COUTURE, C.; AGEORGES, A.; ATANASSOVA, R.; LÉON, C.; RENAUDIN, J.; DEDALDECHAMP, F.; ROMIEU, C.; DELROT, S.; HAMDY, S. Isogene specific oligo arrays reveals multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta*, 222: 832-847, 2005.

TESNIERE, C.; DAVIES, C.; SREEKANTAN, L.; BOGS, J.; THOMAS, M.R.; TORREGROSSA, L. Analysis of the transcript levels of VvAdh1, VvAdh2 and VvGrip4, three genes highly expressed during *Vitis vinifera* L. berry development. *Vitis*, 45: 75-79, 2006.

THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, R.; CONSTANTINI, L.; CRESPIAN, M.; DANGL, G.S.; EISENHELD, C.; FERREIRA-MONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBÁÑES, J.; LACOMBE, T.; LAUCOU, V.; MAGALHÃES, R.; MEREDITH, C.P.; MILANI, N.; PETERLUNGER, E.; REGNER, F.; ZULINI, L.; MAUL, E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of a grape cultivars. *Theoretical Applied Genetics*, v.109, p.1448-1458, 2004.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics*, 22: 511-519, 2006.

VELASCO, R.; ZHARKIKH, A.; TROGGIO, M.; CARTWRIGHT, D.A.; CESTARO, A.; PRUSS, D.; PINDO, M.; FITZGERALD, L.M.; VEZZULLI, S.; REID, J. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*, 2:e1326, 2007.

VENTER, M.; BURGER, A.L.; BOTHA, F.C. Molecular analysis of fruit ripening: The identification of differentially expressed sequences in *Vitis vinifera* using cDNA-AFLP technology. *Vitis*, 40: 191-196, 2001.

VIGNANI, R.; BOWERS, J. E.; MEREDITH, C. P. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* Sangiovese'. *Scientia horticulturae*, 65:163-169, 1996.

VOYTAS, D.F. & AUSUBEL, F.M. A copia-like transposable element family in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 336: 242-244, 1988.

WALKER, A.R.; LEE, E.; ROBINSON, S. Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion

of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant Molecular Biology*, 62: 623-635, 2006.

WALKER, A.R.; LEE, E.; BOGS, J.; MCDAVID, D.A.J.; THOMAS, M.R.; ROBINSON, S.P. White grapes arose through mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant Journal*, 49: 772-785, 2007.

WANG, A.M.; XIA, Q.; XIE, W.S.; DATLA, R.; SELVARA, J.G. The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100:14487–14492, 2003.

WATERS, D.L.; HOLTON, T.A.; ABLETT, E.M.; LEE, L.S.; HENRY, R.J. cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin. *Functional and Integrative Genomics*, 5: 40-58, 2005.

WEAVER, R.J. & MONTGOMERY, R. Effect of ethephon on coloration and maturation of wine grapes. *American Journal Enology and Viticulturists*. 25: 39–41, 1974.

WIGGE, P.A.; KIM, M.C.; JAEGER, K.E.; BUSCH, W.; SCHIMID, M.; LOHMANN, J.U.; WEIGEL, D. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 309: 1056-1059, 2005.

WINKLER, A.J., COOK, J.A., KLIEWER, W.M. AND LIDER, L.A. (1974) *General Viticulture*. University of California Press, Berkeley.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; KOIZUMI, M.; URAO, S.; SHINOZAKI, K. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiology*, 33: 217–224, 1992.

ZANCHIN, A.; BONGHI, C.; CASADORO, G.; RAMINA, A.; RASCIO, N. Cell enlargement and cell separation during peach fruit development. *International Journal of Plant Sciences*, 155: 49–56, 1994.

ZHENG, L.; HEUPEL, R.C.; DELLAPENNA, D. The beta subunit of tomato fruit polygalacturonase isoenzyme 1: isolation, characterization, and identification of unique structural features. *Plant Cell*, 4:1147-1156, 1992.