

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

DANUZA KELLY STRIOTO

**Avaliação da estabilidade genética da uva cultivar Itália (*Vitis
vinifera* L.)**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO 2014

DANUZA KELLY STRIOTO

**Avaliação da estabilidade genética da uva cultivar Itália (*Vitis
vinifera* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudete Aparecida Mangolin.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO 2014

À minha família, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

À minha mãe, Maria Aparecida Strioto, e à minha avó Pascoina da Silva Strioto, pelo amor, carinho, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu esposo, Anderson Cesar Mattia, pela presença constante, nos momentos alegres e tristes, pelo carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, que se faz presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela por quem tenho profundo respeito e admiração, pela orientação segura e competente e por sua incansável dedicação.

À professora doutora Maria de Fátima P. S. Machado, pelos ensinamentos, extrema competência e dedicação na realização deste trabalho.

À professora doutora Sandra Collet, pelos ensinamentos e apoio recebido.

Aos professores do Laboratório de Genética Animal, pelo carinho e amizade. E aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética, principalmente ao Sergio Luiz Calvi e à Leila Andreia Frota, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos Secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro, pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, pela amizade e companhia durante as disciplinas, principalmente à Camila Castro e à Angélica Albuquerque, que tanto contribuíram para este trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais e do Laboratório de Genética Animal, especialmente aos grandes amigos que conquistei e que irão ficar para sempre em meu coração, Andréa Florindo das Neves, Liriana Belizário Cantagalli, Vanessa Neves de Azevedo Fernandes e Maycon Rodrigo Ruiz Bevilaqua, pelos ensinamentos, paciência, apoio e incentivo nos momentos difíceis e nos momentos de diversão, tornando a rotina de laboratório

mais agradável. Aos alunos do PIBIC, Tauana Gibim Eisele, Giovana Marinelli e Afonso Pepinelli, pela amizade e grande ajuda na realização dos experimentos.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Danuza Kelly Strioto, filha de Wilson Vieira e de Maria Aparecida Strioto, nasceu em Cianorte, estado do Paraná, ao primeiro dia do mês de janeiro de 1988.

Em dezembro de 2002, encerrou o Ensino Fundamental, na Escola Estadual Princesa Isabel, cidade de Cianorte-PR. No ano de 2005, concluiu o Ensino Médio no Centro Educacional Cianorte (CEC), também em Cianorte-PR.

Graduou-se em Ciências Biológicas – Licenciatura, em dezembro de 2010, pela Universidade Paranaense (Unipar), em Cianorte-PR.

Em março de 2012, iniciou Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Análise Genética Vegetal.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Uva Itália (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	3
2.2. Propagação vegetativa: estabilidade e variabilidade genética em <i>Vitis vinifera</i> L.	4
2.3. Marcadores moleculares em <i>Vitis</i>	9
2.3.1. Microssatélites ou marcadores SSR em <i>Vitis</i>	10
2.3.2. Marcadores ISSR em <i>Vitis</i>	16
2.3.3. Detecção de variação clonal em clones de uva	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Coleta das folhas da cultivar de uva Itália	22
3.2. Extração e quantificação do DNA de folhas da cultivar de uva Itália.....	22
3.2.1. Primeira etapa.....	22
3.2.2. Segunda etapa.....	23
3.2.3. Terceira etapa	23
3.3. Amplificação e análise do DNA	24
3.3.1. Amplificação e análise dos microssatélites	24
3.3.2. Amplificação e análise dos ISSR (<i>Inter Single Sequence Repeats</i>)	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Análise do marcador microssatélite (SSR).....	30
4.2. Análise do marcador ISSR	45
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

STRIOTO, Danuza Kelly. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2014. **Avaliação da estabilidade genética da uva cultivar Itália (*Vitis vinifera* L.)** Professora Orientadora: Claudete Aparecida Mangolin. Professores Conselheiros: Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

O gênero *Vitis* L. é bastante diverso e se encontra distribuído pelas regiões temperadas e subtropicais do mundo. Dentro da espécie *Vitis vinifera* L., temos a cultivar Itália, obtida por meio do cruzamento de Bicane com Moscatel de Hamburgo. Apesar das uvas da cultivar Itália serem propagadas vegetativamente a ocorrência de mutações somáticas parece ser um evento frequente, promovendo alta variabilidade genética. A proposta do presente estudo foi avaliar a estabilidade genética da cultivar Itália, estudando duas classes diferentes de sequências de DNA, os microssatélites, também chamados de sequências simples repetidas (SSR), e as regiões que estão entre as sequências simples repetidas (ISSR), de amostras coletados em três propriedades do município de Marialva e de uma propriedade do município de Sarandi-PR. Para avaliar as primeiras sequências, foram utilizados 13 pares de *primers*. Para estes locos estudados, observamos 27 alelos (2,08 alelos/loco) e as evidências são de um número reduzido de alelos. O polimorfismo obtido para as amostras estudadas com SSR foi de 61,54%. Os parâmetros de diversidade genética apontam para um aumento de heterozigotos nas amostras dos quatro acessos da cultivar Itália (valores negativos de F_{IS} foram observados para 8 dos 13 locos analisados), o valor médio do F_{IS} foi de -0,3404. O valor de F_{ST} foi de 0,0688, indicando moderada diferenciação entre os acessos. Os valores de similaridade genética variaram de 0,8516 (entre os acessos 2 e 4) a 0,9884 (entre os acessos 1 e 3). A análise das sequências SSR possibilitou a discriminação entre as amostras da cultivar Itália e foi possível constatar que as amostras desta cultivar se mantêm geneticamente estáveis. Para o estudo das sequências ISSR, foram utilizados 14 *primers*, os quais amplificaram 135 segmentos de DNA. O polimorfismo obtido para este marcador foi de 80%. Apesar do alto polimorfismo, as relações de similaridade e de distância genética de Nei entre os quatro acessos apontam para uma baixa diferenciação entre eles, sendo que os valores de similaridade variaram de 0,9503 (entre os acessos 1 e 4) a 0,9801 (entre os acessos 2 e 3). O valor de

similaridade genética calculado por meio do coeficiente de Jaccard para as 57 amostras da cultivar Itália variou de 0,8358 a 1,0000. Para os dois marcadores, também foi realizada uma análise bayesiana e os resultados desta análise indicam que as 57 plantas dos quatro acessos foram organizadas em 3 grupos diferenciais de alelos. Os resultados de nosso estudo apontam que a cultivar Itália tem se mantido geneticamente estável. Este fato pode ser constatado pelo número de alelos observados em análise realizada em 2006 (2,12 alelos) e em 2012 (2,08 alelos). Com os nossos resultados, pode-se constatar que o marcador SSR possibilitou discriminar os quatro acessos da cultivar Itália, contrariando as evidências de que os marcadores microssatélites não são adequados para discriminar amostras geneticamente muito similares e que, apesar do alto polimorfismo presente nas sequências ISSR, este marcador apontou para uma baixa discriminação para as plantas dos quatro acessos coletados.

Palavras-chave: *Vitis vinifera* L., cultivar Itália, microssatélites, ISSR, estabilidade genética.

ABSTRACT

STRIOTO, Danuza Kelly. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, February 2014.
Evaluation of the genetic stability in grape of cultivar Italia (*Vitis vinifera* L.)
Adviser: Claudete Aparecida Mangolin. Committee Members: Maria de Fátima Pires da Silva Machado and Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

The genus *Vitis* L. is not only highly diverse but is also distributed in many temperate and subtropical regions. The cultivar Italia (*Vitis vinifera* L.) by cross-breeding between Bicane and Moscatel de Hamburgo. Although grapes of the cultivar Italia are vegetally propagated, somatic mutations are rather frequent, with great genetic variability. Current research evaluated the genetic stability of the cultivar Italia by analyzing two different classes of DNA sequences, namely, the microsatellites or simple repeated sequences (SSR), and the regions between the simple repeated sequences (ISSR) of samples collected in three plantations in the municipality of Marialva and one in Sarandi PR Brazil. The first sequences were evaluated by using 13 pairs of primers. Loci studied registered 27 alleles (2.08 alleles/locus) and evidence of a reduced number of alleles. Polymorphism of the samples under analysis with SSR was 61.54%. Genetic diversity parameters indicated an increase of heterozygotes in the samples of the four accesses the cultivar Italia (negative rates of F_{IS} were reported for 8 out of the 13 loci analyzed), with mean rate of F_{IS} as - 0.3404. Since F_{ST} rate was 0.0688, a moderate differentiation between accesses was indicated. Genetic similarity rates varied between 0.8516 (between accesses 2 and 4) and 0.9884 (between accesses 1 and 3). The analysis of SSR sequences discriminated samples of the cultivar Italia and established the genetic stability of the samples of this cultivar. Fourteen primers were used for the study of ISSR sequences which amplified 135 DNA segments. The polymorphism for this marker was 80%. In spite of this high polymorphism, relationships of similarity and Nei genetic distance between the four accesses indicate low differentiation, with similarity rates ranging between 0.9503 (between accesses 1 and 4) and 0.9801 (between accesses 2 and 3). Genetic similarity rates calculated by the coefficient of Jaccard for 57 samples of the cultivar Italia ranged between 0.8358 and 1.0000. A Bayesian analysis performed for the two markers showed that the 57 plants of the 4 accesses were organized into

3 allele differential groups. Results show that the cultivar Italia has maintained itself genetically stable, provided by the number of alleles in 2006 (2.12 alleles) and in 2012 (2.08 alleles). With our results we can see that the marker SSR allowed to discriminate the four accesses the cultivar Italy, contrary to the evidence that microsatellite markers are not suitable to discriminate genetically very similar samples, and that despite the high polymorphism present in ISSR sequences, this marker pointed to a low discrimination for plants of the four accesses collected.

Keywords: *Vitis vinifera* L.; cultivar Italia; microsatellites; ISSR; genetic stability.

1. INTRODUÇÃO

Sousa (1996) relata que a videira está entre as plantas mais antigas cultivadas pelo homem e o ser humano, desde os primórdios de sua existência, já se alimentava dos frutos desta planta. Com o passar do tempo, o homem aprendeu a fabricar produtos a partir da uva, como o vinho, a passa e o suco. De acordo com o mesmo autor, esta cultura teve sua origem há cerca de quatro milhões de anos, no período Terciário, nos territórios hoje correspondentes à Geórgia, Armênia e Azerbaijão, e, a partir desse ponto, as videiras primitivas dispersaram-se para duas direções, uma Américo-Asiática e outra Euroasiática. De acordo com Ambrosi et al. (1994) e Jackson (1994), as uvas foram cultivadas pelos egípcios, por volta de 4.700 anos antes de Cristo, com evidências para a produção de vinho na Mesopotâmia no ano 3.000 antes de Cristo. Segundo Pio Corrêa (1926), foi por volta do ano 600 antes de Cristo que o homem aprendeu a podar a videira e com isso aumentar a produção e o sabor do fruto. Mas foram os romanos que transformaram a viticultura em um comércio lucrativo.

O gênero *Vitis* L. é bastante diverso. Contém de 40 a 60 espécies na Ásia, cerca de 25 na América do Norte e uma espécie na Europa, a *Vitis vinifera* L. Esta última é a principal espécie cultivada hoje, enquanto as outras são utilizadas basicamente para programas de melhoramento de porta-enxerto e cultivares resistentes aos fungos. Estima-se que existe 6.000 cultivares de *V. vinifera* L. (Alleweldt e Dettweiler, 1994) e destas menos de 400 são comercialmente importantes (Galet, 2000).

Segundo Sousa (1959), no Brasil a videira foi introduzida no ano de 1532 e, na região Noroeste do estado do Paraná, o cultivo da uva fina de mesa da variedade Itália teve seu início na década de 60 (Camargo, 1998), no município de Marialva - PR, no ano de 1962, pela colônia japonesa (Oliveira-Collet, 2003). Mesmo com a redução da produção nos últimos anos, segundo os dados do Departamento de Economia Rural-SEAB-PR, 2012, o Paraná passou do 4º para o 5º lugar entre os estados mais produtores. Esta informação é em relação ao ano de 2010, mas a viticultura continua sendo uma atividade importante para a região noroeste do estado (Mello, 2010).

Uma variedade de videira, de acordo com Pelsy (2010), consiste em um conjunto de clones, originados por propagação vegetativa a partir de uma única videira selecionada. A maioria dos clones de uma variedade é idêntico, mas alguns clones podem mostrar genótipos divergentes e muitas vezes pode-se observar também fenótipos diferentes. Os clones que apresentam variações fenotípicas são muitas vezes observados e considerados como parte da mesma variedade e, quando os clones da mesma variedade apresentam fenótipos diferentes, eles são agrupados como diferentes cultivares (Boursiquot e This, 1999). Nas regiões Norte e Noroeste do Paraná são cultivadas quatro variedades de uvas finas de mesa do grupo Itália, sendo elas: Itália - coloração verde; e as de cor: Rubi - coloração rosada, Benitaka - coloração rosada intensa e Brasil - coloração preta. Nestas regiões, o surgimento de cultivares de cor a partir da cultivar Itália é explicado pela ocorrência de mutação somática (Camargo, 1998).

Trabalhos com uvas da cultivar Itália, realizados por Orasmo et al. (2007), Maia et al. (2008) e Maia (2009), indicaram que, apesar de propagadas, vegetativamente, elas apresentaram alta variabilidade genética, sendo que a exposição constante a agrotóxicos pode contribuir para tais resultados e também em parte esta alta diversidade genética pode ser determinada pela presença de elementos transponíveis (TES), causando alterações somáticas e contribuindo, assim, com a instabilidade genética nas parreiras de uvas da cultivar Itália.

Frente ao exposto, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a estabilidade das videiras da cultivar Itália da região de Marialva e Sarandi, uma vez que estas, apesar de serem propagadas vegetativamente, são descritas como apresentando alta variabilidade. Para a obtenção desta informação, a diversidade genética foi avaliada em duas classes diferentes de sequências de DNA, os microssatélites, também chamados de sequências simples repetidas (SSR), e as regiões que estão entre as sequências simples repetidas (ISSR). Para isso, foram coletadas amostras da cultivar Itália de três propriedades do município de Marialva e uma do município de Sarandi, ambas as cidades do estado do Paraná. A análise de sequências de SSR e ISSR fornecerá informações da variabilidade e similaridade genética entre os acessos desta espécie e, com estas informações, poderemos fazer comparações com dados já obtidos, confrontando as propostas de estabilidade ou diversidade genética para as amostras da cultivar Itália.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Uva Itália (*Vitis vinifera* L.)

A viticultura é referida como uma das mais antigas atividades de agricultura (Sousa, 1959). Segundo Sousa (1996), o homem já consumia os frutos das videiras antes destes serem utilizados para a produção de vinhos e, no final do século XIX, a produção de uva de mesa tornou-se de grande importância. De acordo com Janick e Moore (1975) e Sousa (1996), a videira *Vitis vinifera* L., assim como outras espécies do gênero, estão distribuídas pelas regiões temperadas e subtropicais do mundo, exibindo variações como: qualidade dos frutos, resistência a patógenos e produtividade, o que garante um elevado potencial de variabilidade genética que pode ser explorado por meio de estratégias de melhoramento, por reprodução sexuada.

A videira está classificada no grupo Cormófitas, da divisão Spermatophyta, da subdivisão Angiospermae, da classe Dicotyledoneae, da ordem Rhamnales, da família Vitaceae, do gênero *Vitis*. Segundo Souza (1996), dentro da família Vitaceae, o gênero *Vitis* é o único de importância econômica, social e histórica e a ele pertencem todas as videiras selvagens ou cultivadas.

Até a metade do século XX, conforme Camargo (1998), o cultivo da uva no Vale do Submédio São Francisco era limitado à exploração familiar. Foi somente por volta de 1950 que surgiram os primeiros empreendimentos comerciais. Dados do Departamento de Economia Rural-SEAB-PR (2012) registraram que no Brasil a área cultivada com videiras ocupa 80.651 ha e a produção passa de 1,4 milhão de toneladas. Os principais estados produtores são: Rio Grande do Sul, Pernambuco, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Bahia e Minas Gerais.

Com a produção de uva Itália, a partir da década de 60, a viticultura brasileira consolidou-se como atividade econômica. A cultivar Itália foi desenvolvida pelo melhorista Ângelo Pirovano, na Itália, por meio do cruzamento de Bicine com Moscatel de Hamburgo, realizado em 1911 (Sousa, 1996). No Brasil, a videira foi inicialmente introduzida em São Paulo, pela expedição colonizadora de Martin Afonso de Souza, em 1532 (Sousa, 1959). No Paraná, o cultivo da uva Itália teve início na década de 60 (Camargo, 1998), mas precisamente na região noroeste do estado. Os primeiros parreirais plantados foram no município de Marialva-PR, nas

propriedades das famílias Yamanaka e Wakita, no ano de 1962, e foram provenientes de material propagativo do município de Ferraz de Vasconcelos-SP (Oliveira-Collet, 2006).

A cultura da uva ainda tem sido considerada uma atividade importante para o desenvolvimento da região noroeste do estado e o município de Marialva é conhecido como a capital da Uva Fina de Mesa, com uma produção anual de 35.000 toneladas em 1.000 ha de parreiras, envolvendo cerca de 1.000 famílias na atividade. Mas, nos últimos 10 anos, a área de produção de uva diminuiu cerca de 1/3, em razão do crescimento de outras atividades rurais, como a floricultura e a horticultura, e ainda pela grande oportunidade de emprego na região metropolitana de Maringá (Emater-PR, 2013).

Houve, em 2012, de acordo com os dados estatísticos disponíveis no portal do IBGE, uma redução de 0,52% na produção de uvas no Brasil, em relação ao ano de 2011, e a maior redução da produção ocorreu no estado do Paraná (-32,86%). Também ocorreu redução de produção nos estados da Bahia (-4,80%) e de São Paulo (-0,18%). Em relação ao ano de 2011, em Pernambuco, Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, houve um aumento da produção de uvas de 7,71%, 3,09%, 4,64% e 1,29%, respectivamente. Em 2012, a produção destinada ao processamento (vinho, suco e derivados) foi de 830,92 milhões de quilos, o que representa 57,07% da produção nacional. O restante da produção (42,93%) foi destinado ao consumo "in natura".

No Paraná, segundo dados do DERAL-SEAB, no ano de 2012, as uvas de mesa e para a transformação agroindustrial representaram 6,2% do volume de frutas produzidas, com os parreirais distribuídos em 6,1 mil hectares. As colheitas proporcionaram 105,0 mil toneladas de uvas.

2.2. Propagação vegetativa: estabilidade e variabilidade genética em *Vitis vinifera* L.

Alleweldt e Dettweiler (1994) descrevem a videira como uma planta milenar, tendo evoluído de modo a adaptar-se às mais diversas situações de propagação e cultivo. Segundo os referidos autores, a videira é uma das mais antigas culturas agrícolas e tem sido cultivada para a produção de frutas de mesa, frutas secas, suco e vinho. O número de materiais referenciados como variedades mantidas em

coleções de germoplasma em todo o mundo foi estimado em aproximadamente 10.000, e a maioria destes materiais pertencem às espécies europeias de *Vitis vinifera* L. O grande número de variedades é provavelmente o resultado de vários processos, como: vários centros de domesticação de *Vitis silvestris* selvagens e locais (Arroyo-Garcia et al., 2006), subsequentes cruzamentos entre videiras domesticadas e videiras selvagens locais, a velha prática de produção de mudas de cruzamentos espontâneos e, em menor grau, durante o século passado, o melhoramento convencional (Pelsy, 2010).

Hidalgo (1993) registrou que a videira pode ser propagada de duas formas: sexuada (por semente) ou assexuada (por via vegetativa). O referido autor destacou que as sementes são úteis para o melhoramento genético, para a obtenção de novas variedades, mas que a propagação de videiras por meio de sementes tem sido desvantajosa para o produtor, pois as novas plantas apresentam vigor, produtividade e qualidade dos frutos inferiores aos da planta-mãe. O outro fator considerado desvantajoso deste processo é a demora na formação do fruto para colheita. Por outro lado, a propagação vegetativa que se baseia na facilidade que os ramos têm de emitir brotos e raízes. Tem sido considerada útil porque as plantas filhas têm as mesmas características da planta mãe e, desde que não ocorram mutações somáticas nas células geradoras que deram origem ao clone, a prole será idêntica aos progenitores (Hidalgo, 1993; Forneck, 2005).

A reprodução clonal é o mesmo que a reprodução assexuada ou propagação sem meiose. Segundo Forneck (2005), a clonalidade é um conceito dinâmico, onde a variação genética é introduzida por inúmeros mecanismos, para garantir uma estratégia de vida assexuada, mantendo a variação e fornecendo um sistema aberto de adaptação e seleção. Segundo este autor, para uma cultura de plantas lenhosas e perenes, como é o caso das videiras, a clonalidade é usada para manter genótipos idênticos e de interesse. Esta é uma estratégia conservativa, utilizada para obter cópias originais do parental e por seleção clonal selecionar novos clones de cultivares. Após as mudas serem selecionadas, estas são multiplicadas por propagação vegetativa. A propagação vegetativa vem sendo usada na viticultura como uma aliada, para a adaptação a diferentes climas e tipos de solos e, também, no controle de pragas e doenças do solo. Uma técnica importante de propagação é a estaquia, por proporcionar a multiplicação de plantas-matrizes escolhidas (Meletti, 2000), sendo um método simples e rápido para obter plantas

adultas. Segundo Higashi et al. (2000), a estaquia facilita a proliferação de genótipos desejados. Por não sofrer a meiose, os rametes (brotações originárias da planta mãe) são geneticamente idênticos aos ortetes (planta mãe) e as variações fenotípicas que possam existir entre os rametes dentro de um clone são, provavelmente, de origem ambiental ou por fatores relacionados ao propágulo, como o tamanho da estaca, o período que as estacas são coletadas e as condições em viveiro.

Para a videira, que é uma cultura tão importante, a propagação vegetativa tem sido o método preferido, perpetuando castas selecionadas desde os tempos dos romanos. Esta informação está relatada nos livros III e IV do escritor agrícola romano Columella (Robinson, 2006). As cultivares ou variedades de videiras atuais (*Vitis vinifera* L.) são compostas de clones com características ampelográficas homogêneas, isto é, compartilham características morfológicas comuns e a distinção destas é observada apenas por pequenas diferenças (Pelsy, 2010).

Uma variedade de videira, de acordo com Pelsy (2010), consiste em um conjunto de clones, originados por propagação vegetativa a partir de uma única videira selecionada, portanto crescida a partir de uma única plântula. Este autor destaca que a maioria dos clones de uma variedade são idênticos, mas que alguns podem mostrar genótipos divergentes e muitas vezes pode-se observar também fenótipos diferentes. Quando os clones apresentam uma faixa aceitável de variação de fenótipos, eles podem ser considerados como parte da mesma variedade. Quando os clones da mesma variedade apresentam fenótipos diferentes, eles são agrupados como diferentes cultivares (Boursiquot e This, 1999).

A clonalidade já foi estudada sob vários aspectos, envolvendo morfologia, fisiologia, ecologia e evolução dos recursos naturais de plantas reproduzindo-se assexuadamente. Os trabalhos de clonalidade das últimas décadas são relativamente limitados para plantas lenhosas e perenes (Rajora 1999; Schenk 1999; Chung e Epperson 2000) e os dados foram reunidos na revisão descrita por Eckert (1999). A maioria das abordagens para estudar clonalidade focalizaram populações de plantas em seu hábitat natural (De Kroon e Van Groenendael, 1997), examinando os efeitos de forças seletivas ecológicas e do meio ambiente natural sobre as populações. Um dos objetivos de analisar clones cultivados é a possibilidade de seleção clonal de genótipos superiores. A videira (*Vitis vinifera*) é uma excelente planta para estudar a clonalidade, tanto por causa de sua importância econômica

como da dependência da propagação vegetativa. As cultivares atuais é o resultado da seleção de genótipos melhorados de origem antiga, na maior parte gerados por cruzamentos intencionais e espontâneos há muitos séculos atrás. Cada cultivar antiga expressa distintos fenótipos, resultando em conjuntos de clones morfologicamente diferentes. Estes clones têm se espalhado pelo mundo ajustando-se a diferentes ambientes e técnicas de cultivo. As causas discutidas para a variação clonal são infecções por vírus, policlonalidade e mutações (Forneck, 2005).

Forneck (2005) registrou que a videira tem sido utilizada como um modelo para a investigação de clonalidade em plantas lenhosas e perenes, pois ela é uma planta cultivada, propagada vegetativamente que já é bastante investigada. O referido autor destaca que os marcadores moleculares em combinação com características fenotípicas são usados para identificar os clones e que estes podem ainda ser utilizados para quantificar a variação genética neutra dentro e entre populações de clones. Ainda segundo este autor, o marcador mais poderoso empregado para a análise de clonalidade em videira é o AFLP (polimorfismo no comprimento do fragmento amplificado) e que menores resoluções foram obtidas com RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e ISSR (regiões inter sequencias simples repetidas de DNA).

Forneck (2005) também ressalta, na sua revisão, que as fontes de variação genética em clones de videira são múltiplas e que o polimorfismo resulta principalmente de mutações somáticas que ocorrem naturalmente durante o crescimento da planta. Este autor relaciona os vários tipos de mutações responsáveis pela diversidade genética entre os clones: mutações somáticas pontuais, variação somaclonal, retrotransposons, quimerismo, mudanças epigenéticas, grandes deleções, recombinações mitóticas e até mesmo número variável de repetições em seqüências microssatélites. Todas estas alterações tem sido avaliadas e confirmadas com o emprego de marcadores moleculares e a estimativa de diversidade genética intravarietal foi possível, uma vez que sistemas de detecção de alta resolução tornaram-se disponíveis.

Pelsy (2010) registrou que as mutações somáticas, quando presentes, na maioria dos casos, não afetam a planta como um todo, mas elas podem afetar apenas uma camada de células, produzindo quimeras periclinais. O referido autor salienta que tais estruturas não ameaçam a aptidão da planta, sendo que estas são estáveis e mantidas por propagação vegetativa e que, ocasionalmente, rearranjos

celulares na quimera podem levar à homogeneização do genótipo da planta inteira. Através destes mecanismos moleculares e celulares, novos genótipos de clones são originados ao longo do tempo e desta forma as variedades de videira evoluem (Pelsy, 2010).

Várias causas foram propostas por diferentes investigadores para explicar a variação que ocorre entre os clones cultivados. Uma delas é de que diferentes clones não são verdadeiros clones, mas sim uma população de indivíduos muito aparentados, talvez irmãos, de morfologia semelhante, conceito denominado policlonalidade. A policlonalidade em cultivares lenhosos e perenes foi proposta há muito tempo, mas só foi comprovada recentemente utilizando marcadores moleculares. Este evento tem sido estudado com marcadores SSR (simples sequências repetidas) que permitem a detecção clara de policlones (Vignani et al., 1996; Silvestroni et al., 1997; Filippetti et al., 1999).

A outra proposta para explicar a variação que ocorre entre os clones cultivados considera a interferência de patógenos como vírus que promovem vários fenótipos com genótipos idênticos. As viroses contribuem para aumentar a variabilidade fenotípica dentro de cultivares de videira. As videiras, em comum com outras plantas lenhosas e perenes, estão sujeitas à infecções por vírus e patógenos semelhantes a vírus. Há várias doenças debilitantes causadas por viróides, fito ou micoplasmas. Estudos realizados tem sugerido que o desempenho geral de clones de videira é melhorado após o saneamento do material vegetal (Mannini, 2000).

Forneck (2005) considera que a variação clonal também pode ser induzida por meio de mutações que ocorrem e induzem mudanças genéticas estáveis. Estas alterações genéticas são visualizadas por meio da observação de alterações na morfologia ou pelo uso de marcadores moleculares. Há abundante evidência para a ocorrência de mutações somáticas em plantas (Klekowski e Godfrey, 1989) e variação genética molecular foi encontrada entre clones naturais em várias espécies de plantas. Variações somáticas são mais comuns em locos com alta taxa de mutação, como, por exemplo, em sequências de microssatélites (Schlotterer et al., 1998; Udupa e Baum, 2001).

Forneck (2005) considerou que, mesmo sendo a reprodução sexuada o mecanismo que impulsiona a evolução das plantas de modo geral, inclusive das videiras, a propagação vegetativa aumentou o impacto de mutações somáticas e este mecanismo tem sido importante para a manutenção da diversidade das

videiras. A seleção clonal de indivíduos superiores identificados pelos produtores conduziu à produção de muitos clones com fenótipos diferentes, mas mantendo o mesmo nome do cultivar original. Algumas das mutações existentes são mantidas em um estado quimérico, afetando apenas algumas camadas de células individuais (Franks et al., 2002). Assim, o fenótipo da planta é o resultado da combinação de diferentes células com genótipos diferentes.

Elementos transponíveis (TES) são descritos como os maiores contribuintes para propulsionar a variabilidade do genoma e, com isso, promover mutações somáticas (Collier e Largaespada, 2007; Deragon et al., 2008). Provavelmente, os TES apresentam um importante papel na domesticação e melhoramento genético da videira. Para Benjak et al. (2008), existe uma grande variedade de famílias de transposons, que são importantes para a formação do genoma da videira.

A cultivar Itália vem sendo mantida por propagação vegetativa, mas a ocorrência de mutações somáticas parece ser um evento frequente. Kishino e Mashima (1980) relataram que mutações somáticas em plantas de Itália cultivadas na região de Marialva-PR originaram as cultivares Rubi e Benitaka. Em Floraí, também no Paraná, foi descrito por Gonçalves (1995) o surgimento da cultivar Brasil, através de mutação somática nas parreiras da cultivar Benitaka. Relatos indicam que as mutações ocorridas não são muito estáveis, pois, em algumas localidades no Paraná, aconteceram reversões, enquanto em outros lugares as plantas parecem ser estáveis (Oliveira-Collet et al., 2006).

A análise de isozimas de 7 sistemas enzimáticos, segundo Oliveira-Collet (2005), indicou uniformidade genética nas cultivares Itália, Rubi, Benitaka e Brasil, conforme trabalho de Maia et al. (2008), que indica a similaridade genética entre as 4 cultivares, quando estas foram avaliadas utilizando o marcador RAPD. Ao contrário disso, Maia (2009) mostrou que alguns clones da cultivar Itália apresentaram níveis moderados de diferenciação genética ($F_{ST} = 0,0648$), mesmo sendo mantidos por propagação vegetativa, indicando, portanto, que estes não são geneticamente uniformes.

2.3. Marcadores moleculares em *Vitis*

A descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) facilitou a visualização de fragmentos específicos de DNA e, com essa facilidade e rapidez,

surgiram novos marcadores moleculares que impulsionaram novos dados para diversas espécies (Caixeta et al., 2006). A identificação de cultivares usando marcadores moleculares tem sido considerada mais eficiente, porque estes avaliam diretamente o genótipo e existe maior variabilidade em nível de DNA que comparado com o nível morfológico (Thomas et al., 1993). Portanto, os marcadores são de grande importância nos programas de melhoramento, pois utilizados tanto para mapear características de interesse econômico como para isolar genes específicos. Como os marcadores moleculares são fragmentos específicos do DNA e são encontrados em regiões específicas do genoma, eles podem ser identificados em uma população e vêm sendo utilizados para investigar e identificar as videiras.

A literatura registrou muitos estudos utilizando marcadores, entre os quais podemos citar o emprego de: RFLP (polimorfismo no comprimento dos fragmentos clivados) (Blaich, 1989; Striem et al., 1990; Bourquin et al., 1992; Bowers et al., 1993; Thomas et al., 1993), de RAPD (Jean-Jaques et al., 1993; Gorgocena et al., 1993; Büscher et al., 1993; Büscher et al., 1994; Lodhi et al., 1997), de AFLP (Cervera et al., 2000), daqueles que fazem uso de retrotransposons (D'onofrio et al., 2010; Castro et al., 2011), de ISSR (Hassan et al., 2011; Zeinali et al., 2012; Jing e Wang, 2013) e de SSR (Thomas e Scott 1993; Thomas et al., 1994; Bowers et al., 1996; Sefc et al., 1999; Di Gaspero et al., 2000; Arnold et al., 2002). Os marcadores baseados em microssatélites, como SSR e ISSR, são considerados importantes na identificação de cultivares, sendo vantajosos, quando comparados com outros marcadores, baseados em PCR, tais como RAPD e AFLP. Esta vantagem é devida à alta reprodutibilidade (Goulão e Oliveira, 2001).

2.3.1. Microssatélites ou marcadores SSR em *Vitis*

Tautz et al. (1986) descreveram que os genomas eucariotos são repletos de sequências simples repetidas, as quais consistem de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*, sendo estas regiões denominadas microssatélites, SSR ou STR (*Short Tandem Repeats*). Morgante e Olivieri (1993) previram que, devido a diversas características dos microssatélites, tais como abundância nos genomas eucarióticos, alto nível de polimorfismo, herança mendeliana, codominância, locos específicos e a detecção baseada em PCR, estes marcadores se tornariam poderosos marcadores para os seres humanos, animais e plantas. Segundo Tautz

(1989) e Borém e Caixeta (2009), este marcador era considerado um dos grupos mais polimórficos de marcadores moleculares disponíveis no mercado.

O Polimorfismo de sete locos SSR foi avaliado em 12 clones de *Vitis vinifera* L. cv. 'Sangiovese', uma antiga cultivar Italiana de uva de vinho (Vignani et al., 1996). Estes marcadores mostraram que onze clones eram idênticos, mas o clone SG T8 diferiu dos demais por um alelo em quatro locos. O estudo com microsatélites sugeriu que, provavelmente, os onze clones idênticos foram originados de um único progenitor e que o compartilhamento de alelos de SG T8 com os demais clones avaliados é o que se espera para uma plântula pai ou irmã de 'Sangiovese', sugerindo que esta cultivar possa ter origem policlonal. Estes autores sugeriram que o marcador microsatélite apresenta bom potencial para resolver problemas desta natureza.

Moncada et al. (2006) analisaram a diversidade genética intravarietal na cultivar de uva de vinho 'Cabernet Sauvignon'. Um total de 59 amostras de clones obtidas de 7 países (França, Chile, Espanha, Austrália, Hungria, EUA e Itália) foi analisado e neste estudo foram utilizados 84 marcadores SSR. Foram encontrados 18 locos polimórficos (21,4%) e na população analisada foram identificados 22 genótipos diferentes, que apresentaram similaridade genética superior a 97%. As populações da França e do Chile, consideradas maiores, mostraram clara divergência nos polimorfismos detectados. Os resultados obtidos com estes microsatélites permitiram o rastreamento da dispersão geográfica, sustentando a hipótese filogenética da França como centro de origem da diversificação de 'Cabernet Sauvignon'.

As análises moleculares de DNA, conforme Meneghetti et al. (2009), são essenciais para a identificação de uvas e para a investigação de diferenças genéticas entre clones de *Vitis vinifera* L. Os marcadores SSR foram considerados marcadores universalmente utilizados para a identificação das variedades ou cultivares de videiras (This et al. 2004). As aplicações de marcadores microsatélites incluem não só a identificação de cultivares, mas também testes de paternidade, reconstrução de *pedigree* e estudos sobre a estrutura genética de populações (Meneghetti et al., 2009). Segundo estes autores, a capacidade de detectar diferenças alélicas por meio da análise de microsatélites pode esclarecer as definições econômicas de "cultivar" e "clone" no que diz respeito às uvas de vinho.

Na Itália, Carimi et al. (2010) utilizaram seis marcadores microsatélites para caracterizar a variabilidade genética de videiras de diversas áreas da Sicília. Em 70 diferentes cultivares foram descobertos casos interessantes de sinonímias e homonímias. As semelhanças genéticas entre cultivares foram analisadas para investigar suas relações e explicá-las do ponto de vista histórico.

Cipriani et al. (2010) analisaram a diversidade genética de uma coleção de 1.005 acessos de videira, utilizando 34 marcadores microsatélites. A comparação de perfis moleculares revelaram 200 grupos de sinonímias. O agrupamento dos acessos resultou em uma fraca correlação com a sua origem geográfica e/ou área atual de cultivo, revelando uma grande mistura de variedades locais com aquelas amplamente cultivadas. Os SSRs com repetições de tri a penta nucleotídeos mostraram grande capacidade de discriminar os acessos.

A variabilidade genética de clones da cv. Pinot foi estudada por Jahnke et al. (2011), utilizando 16 locos microsatélites. Os resultados indicaram alta similaridade entre os clones de Pinot. Os clones de Pinot Gris da Hungria formaram um grupo que apresentou maior similaridade com Pinot Gris 34 da Romênia. Os outros clones de Pinot Gris formaram outro grupo com Pinot Noir C-162, todos originados da Europa Ocidental (Alemanha, França). Os autores afirmaram que as diferenças genéticas dos clones avaliadas com microsatélites poderiam ser rastreadas até suas origens geográficas.

Ergul et al. (2011) caracterizaram geneticamente uvas selvagens (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*) da região da Anatólia na Ásia Menor e, para isso, estes autores utilizaram 15 microsatélites nucleares. Em geral, os acessos de locais geograficamente mais próximos mostraram maiores similaridades genéticas que os de locais mais distantes. A relação genética entre videira selvagem e cultivada da Península da Anatólia indicou clara separação entre elas. No entanto, os autores não descartaram uma contribuição genética local. Este estudo revelou informações úteis para gestão e potencial utilização de germoplasma de uva selvagem anatoliana.

As videiras da região de Astúrias (nordeste da Espanha) foram avaliadas e identificadas por Moreno-Sanz et al. (2011), usando os marcadores SSR. Um total de 293 acessos foram coletados em vinhedos antigos e analisados por meio de nove marcadores microsatélites. Os resultados do estudo forneceram uma visão geral do estado dos atuais recursos fitogenéticos e, apesar da erosão genética substancial

sofrida pela vinha asturiana, variabilidade maior do que a esperada foi detectada. A descoberta de novos genótipos de videira foi um fato de grande importância. Estes investigadores concluíram que os recursos genéticos de videira estão sendo reduzidos drasticamente em todo o mundo, de modo que este novo material genético deve ser incluído em bancos de germoplasma para sua conservação e posterior avaliação agronômica e enológica.

Oualkadi et al. (2011) compararam cultivares de duas coleções do Marrocos com cultivares de países vizinhos (Argélia e Tunísia). Os dados de diversidade genética, a partir da análise de 20 marcadores SSR nucleares e três de cloroplasto, foram obtidos para um conjunto de 211 cultivares de diferentes origens. A diversidade para nSSR e para cpDNA nos grupos marroquino e argelino foram semelhantes, mas um pouco menor do que no grupo tunisiano. O agrupamento das cultivares com base em dados de SSR refletiu sua origem geográfica. Os resultados confirmaram que a diferenciação do material marroquino evoluiu de forma independente do material da Europa.

Também na Espanha, a caracterização de germoplasma utilizando marcadores SSR ofereceu ferramentas confiáveis para ajustar a qualidade e a representatividade das amostras de um banco de germoplasma. A caracterização da diversidade genética de populações selvagens de videira, utilizando 25 locos nucleares de SSR, realizada por De Andrés et al. (2012), mostrou que o germoplasma cultivado e o germoplasma selvagem são geneticamente divergentes, com baixo nível de introgressão. As análises das relações genéticas entre as videiras silvestres e cultivadas poderiam sugerir uma contribuição genética de acessos silvestres da Espanha para cultivares ocidentais atuais.

As videiras tradicionalmente cultivadas em diferentes regiões geográficas do Norte Africano e as videiras selvagens da Tunísia foram analisadas por Riahi et al. (2012). Estes autores utilizaram vinte marcadores microssatélites altamente polimórficos. Um total de 330 alelos foi detectado e um extenso polimorfismo genético foi registrado, tanto nos acessos cultivados como nos acessos selvagens. As amostras selvagens da Tunísia e as cultivares Norte Africanas apresentaram um alto nível de diferenciação, indicando que as cultivares Norte Africanas não derivaram diretamente de populações selvagens locais, mas principalmente poderia corresponder a materiais importados, introduzidos provavelmente da região Leste ou resultante de cruzamentos entre elas.

Na Turquia, Agar et al. (2012) utilizaram marcadores SSR para investigar a diversidade genética entre quatro populações de *Vitis vinifera* cv. Kabarcik amostradas do Vale do Coruh, em altitudes de 800-1.150 m. As distâncias genéticas entre as populações variaram de 0,072 a 0,216. A diferenciação genética entre as populações foi fortemente relacionada à distância geográfica.

No Irã, uma coleção de germoplasma contendo a maioria das cultivares de uvas do país foi analisada por Doulati-Baneh et al. (2013) e, nesta análise, foram utilizados 23 locos de SSR. A integração dos resultados obtidos com SSR e os dados ampelográficos permitiu identificar as cultivares iranianas. Os dados obtidos com SSR foram coerentes e concordaram com o *pedigree* conhecido ou com a história de cada cultivar. A metodologia foi apontada como uma ferramenta importante para a certificação de uvas de qualidade produzidas em regiões específicas.

Bacilieri et al. (2013) estudaram a estrutura genética da videira cultivada usando um conjunto de dados de 2.096 genótipos definidos por 20 marcadores microssatélites. A análise revelou três principais grupos genéticos definidos pelo uso humano e origem geográfica: a) cultivares de vinho da região oeste, b) cultivares de vinho dos Balcãs e leste da Europa, e c) um grupo composto principalmente de cultivares de uva de mesa do Mediterrâneo Oriental, do Cáucaso, países do Médio e Extremo Oriente. Um segundo nível da estrutura revelou dois grupos adicionais: um grupo geográfico da Península Ibérica e do Magrebe e um grupo composto por uvas de mesa de origens recentes da Itália e da Europa Central. Este estudo forneceu evidências de que o grupo de *Vitis vinifera* L. cultivado é geneticamente estruturado. A relação genética de cultivares foi moldada principalmente pelo uso humano, em combinação com um efeito geográfico. A descoberta de grande parte dos genótipos miscigenados pode ser resultado de grandes intercâmbios humanos, mediados entre as regiões produtoras de uvas ao longo da história e de criação recente.

No trabalho de Pelsy et al. (2010), os marcadores microssatélites nucleares não foram eficientes para avaliar a diversidade dentro de coleções de clones e nem para revelar o polimorfismo clonal de sete variedades francesas de uva de vinho. Os autores concluíram que nem sempre o marcador escolhido é o mais adequado para alcançar o objetivo proposto e que uma alternativa para solucionar alguns problemas poderia ser o uso de mais de um marcador molecular. Imazio et al. (2002) caracterizaram 24 acessos da cultivar Traminer, por meio dos marcadores

moleculares SSR, AFLP e MSAP (polimorfismo no comprimento amplificado sensível a metil). Os resultados mostraram que SSR não era uma ferramenta poderosa para distinção de clones. Em contraste, a técnica de AFLP foi capaz de distinguir 16 dos 24 cultivares, mesmo que a similaridade média tenha sido alta (97,1%). A técnica MSAP foi utilizada para avaliar diferenças qualitativas no grau de metilação de DNA entre clones. Resultados sugerem que as diferenças morfológicas entre os clones são provavelmente devido ao efeito sinérgico de modificações genéticas e ambientais e que a identificação clonal pode ser muito melhorada, usando ferramentas moleculares como AFLP e MSAP.

Cretazzo et al. (2010) utilizaram diferentes marcadores e analisaram 94 videiras (Manto Negro, Callet, Moll e amostras identificadas incorretamente). A amplificação de 33 locos microssatélites revelou estreitas relações entre Manto Negro, Callet, Moll e outras variedades de uva. Contudo, análises por AFLP, SAMPL (amplificação seletiva de locos microssatélites polimórficos) e M-AFLP (polimorfismo em fragmentos de microssatélites amplificados) foram adequadas para a discriminação genética de clones. Mais de 900 bandas foram obtidas para nove combinações de *primers*. O sistema M-AFLP foi mais eficiente para detectar diferenças genéticas intravarietais. O uso destes marcadores permitiu o agrupamento de videiras em grupos homogêneos, fornecendo informações essenciais sobre estratégias de saneamento do material para obter propagação certificada.

Meneghetti et al. (2011) usaram marcadores derivados de PCR para investigar o nível e a distribuição da variabilidade genética de 53 acessos da cv. Garnacha, vindos da Itália, França e Espanha. Para verificar a identidade varietal das amostras, foram avaliados 14 locos SSR e os resultados obtidos mostraram que os marcadores moleculares AFLP, SAMPL e M-AFLP foram os mais adequados. Os marcadores AFLPs discriminaram as várias amostras de Garnacha; os marcadores SAMPLs permitiram distinguir poucos genótipos com base na sua origem geográfica, enquanto os marcadores M-AFLPs revelaram-se específicos, permitindo a diferenciação de todos os acessos.

Leão e Motoike (2011) analisaram, por meio de 20 marcadores moleculares RAPD e sete microssatélites, a diversidade genética de 47 acessos de uvas de mesa, procedentes do Banco de Germoplasma de Videira da Embrapa Semiárido, avaliação realizada. Os marcadores microssatélites foram mais eficientes do que os

RAPD na identificação das relações de parentesco. As informações de distância genética, baseadas em características moleculares, aliadas ao desempenho agrônômico das cultivares permitiram a recomendação de parentais para cruzamentos para a obtenção de híbridos superiores nas populações segregantes do programa de melhoramento de videira da Embrapa Semiárido.

Aradhya et al. (2013), para examinar a estrutura filogenética do gênero *Vitis*, utilizaram marcadores SSR e AFLP. Amostras do Leste da Ásia e Norte-Americanas exibiram forte divergência e cada grupo mostrou grande diferenciação em vários subgrupos. A maioria dos agrupamentos apresentou uma frequência moderada de genótipos miscigenados, sugerindo fluxo gênico interespecífico dentro do gênero. Os marcadores SSR e AFLP apresentaram resultados semelhantes para os parâmetros de diversidade genética.

No trabalho de Emanuelli et al. (2013), os padrões de diversidade molecular de 22 locos SSR e 384 SNPs (polimorfismo de único nucleotídeo) foram investigados em 2.273 acessos de videira, incluindo selvagens, cultivares híbridos interespecíficos e porta-enxertos. Apesar do grande número de duplicatas e das relações clonais entre os acessos, foi observado um alto nível de variação genética. A heterozigosidade esperada foi maior para locos SSR (0,81) do que para SNPs (0,34). A análise da estrutura genética da coleção de germoplasma de uva revelou vários níveis de estratificação. A divisão principal foi entre os acessos de *V. vinifera* e não *vinifera*, seguido pela distinção entre videiras selvagens e domesticadas.

As análises moleculares mostraram que *Vitis vinifera* é uma espécie caracterizada pela ampla variabilidade genética, que ocorre no nível inter e intravarietal, sugerindo a necessidade de preservação dos biótipos autóctones encontrados em diferentes áreas por uma seleção apropriada dos materiais de multiplicação.

2.3.2. Marcadores ISSR em *Vitis*

O marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) é um fragmento de DNA de 100 a 3000 pb, amplificado via PCR usando somente um *primer* com 16 a 20 pb, desenhado a partir de sequências de microssatélites, amplificando região inter-SSR. Este marcador foi criado pela necessidade de explorar repetições de microssatélites

sem utilização do sequenciamento do DNA. Sendo assim, não há a necessidade do conhecimento prévio do genoma (Zietkiewicz et al., 1994).

A técnica para identificar marcadores ISSR é eficiente, simples, rápida e de baixo custo (Zietkiewicz et al., 1994). Segundo Reddy et al. (2002), os produtos da reação são sequências de diferentes tamanhos entre duas regiões de SSR idênticas, proveniente de anelamento do *primer* em direções opostas. A técnica tem como benefícios a elevada reprodutibilidade, grande flexibilidade, uso de pouco DNA e alto polimorfismo (Joshi et al., 2000).

Embora seja um marcador dominante, têm a vantagem de analisar múltiplos locos em uma única reação (Goulão e Oliveira, 2001). ISSR é considerado mais específico do que os outros marcadores dominantes, pois o *primer* pode ser ancorado na extremidade 5' ou 3', com 1 a 3 nucleotídeos adicionais à sequência repetitiva (Zietkiewicz et al., 1994; Bornet e Branchard, 2001). Os alelos polimórficos vão aparecer sempre que num genoma estiver faltando a sequência repetida, ou tenha ocorrido uma deleção ou uma inserção que modifique a distância entre as repetições. As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente (Goulão e Oliveira, 2001). A eletroforese para evidenciar os fragmentos amplificados pode ser feita em gel de agarose, corado com brometo de etídio, ou em gel de poliacrilamida (Liu e Wendel, 2001). A análise dos géis é realizada por uma leitura para a presença (1) e ausência (0) dos fragmentos amplificados.

A vantagem do ISSR, frente ao SSR, é que, para o primeiro, não há a necessidade de se conhecer o genoma da espécie para produção do marcador, pois o *primer* é inespecífico, podendo ser usado para várias espécies. A desvantagem do ISSR é que, por ser dominante, este marcador não separa heterozigotos de homozigotos. Em razão dos *primers* utilizados serem mais longos e baseados em SSR, tecnicamente, *fingerprinting* obtido com ISSR é bastante reprodutível e, assim, permite que a amplificação do DNA seja realizada com maior rigor (Reddy et al., 2002; Kishore et al., 2013). Em relação a outros marcadores dominantes, como o RAPD, o ISSR é mais específico, pois, além da sequência repetitiva utilizada como *primer*, pode ser ancorado de 1 a 3 bases nitrogenadas nas extremidades 5' ou 3' e, neste caso, as temperaturas de anelamento são mais elevadas do que as utilizadas para os *primers* de RAPD. Estas características aumentam a reprodutibilidade dos resultados de ISSR (Zietkiewicz et al., 1994; Bornet e Branchard, 2001). Já o AFLP

revela elevada quantidade de locos e alta repetibilidade, mas apresenta dificuldades, por ser uma técnica extremamente elaborada e com custo elevado. No entanto, o marcador ISSR combina a facilidade do RAPD e a robustez de outros dois marcadores, o AFLP e SSR, sendo, por isso, indicado para trabalhos que requerem resultados confiáveis e de baixo custo (Tikunov et al., 2003).

Os ISSRs são recomendados para análises de espécies relacionadas evolutivamente e, também, empregado para a diferenciação rápida entre indivíduos aparentados, pois apresentam resultados confiáveis, devido à sua abundância e dispersão por todo o genoma. São marcadores de alta reprodutibilidade, abundância de locos polimórficos, apresentando facilidade, rapidez na execução do experimento e baixo custo, se comparado com os demais marcadores (Rodrigues, 2010; Borba et al., 2005).

Embora a técnica ISSR apresente alguns problemas como, por exemplo ser um marcador dominante, ela tem se revelado uma ferramenta eficaz no estudo de problemas de sistemática e de hibridação, bem como genética de populações (Reddy et al., 2002; Kishore et al., 2013). Segundo Almeida (2006), essa técnica pode ser usada em programas de melhoramento vegetal para seleção de genótipos para analisar várias espécies de plantas, tanto no estudo de acessos como espécies silvestres. Também é aplicada em estudos de diversidade genética, *fingerprinting* e seleção assistida. ISSR tem sido amplamente utilizado para a avaliação de estrutura genética de população e para estudar a diversidade genética de plantas (Meloni et al., 2006). Marcadores ISSR também foram usados por vários autores em diferentes trabalhos para análise da diversidade genética (HE et al., 2006; Manimekalai e Nagarajan, 2006; Singh et al., 2011; Baloch et al., 2010).

Estudos vêm sendo realizados em *Vitis vinifera*, usando a técnica de ISSR no mundo todo. Argade et al. (2009) usou o marcador ISSR para caracterizar as variedades de uvas sem sementes cultivadas na Índia. A uva (*Vitis vinifera* L.) do Egito, uma das principais espécies cultivadas nesse país, também foi estudada com o marcador ISSR. A cultura da uva no Egito é composta de ecótipos e cultivares locais, chamadas de variedades. Estas vêm sendo propagadas de forma clonal, com ampla distribuição por várias décadas e, em função desta forma de propagação, as uvas egípcias estão seriamente ameaçadas por grave erosão genética. Para preservar os genótipos locais e melhorar a cultura da uva no Egito, Hassan et al. (2011), utilizando 10 *primers* de ISSR e 20 caracteres morfológicos, avaliaram três

cultivares. A análise genética por meio de marcadores moleculares foi realizada para avaliar a diversidade genética e, segundo estes autores, os resultados obtidos poderão ser utilizados como ferramenta para a identificação de cultivares e para estudar as relações filogenéticas entre as cultivares.

No trabalho realizado por Zeinali et al. (2012), marcadores moleculares ISSR foram empregados, juntamente com a avaliação de caracteres morfológicos, para investigar a variação genética entre 20 variedades de *Vitis vinifera* coletadas no oeste do Azerbaijão. Neste estudo, foram utilizados 10 *primers* ISSR e o coeficiente de similaridade obtido variou de 0,33 a 0,87, resultados que revelaram seis grupos principais e forneceram informações sobre a diversidade entre estas variedades, as quais poderão ser utilizadas para o melhoramento genético. Os autores relatam que o marcador ISSR pode ser utilizado como uma rápida, fácil, econômica e confiável técnica para a avaliação da diversidade genética intraespecífica em videira.

Marcadores ISSRs também foram utilizados por Jing e Wang (2013) para caracterizar a relação genética entre espécies de uvas selvagens chinesas e cultivares americanas e europeias. Foi detectada diversidade genética entre 70 acessos de uvas, incluindo 52 clones de 17 espécies de uvas selvagens chinesas, sete híbridos interespecíficos, 10 cultivares de *Vitis vinifera* L. e uma linhagem de *Vitis riparia* L. Os resultados mostraram que os 70 clones ou acessos apresentaram similaridade entre 0,08 e 0,93, indicando grande diversidade entre os acessos. Todos os acessos foram divididos em dois grandes grupos: o grupo chinês de uvas selvagens e o grupo das cultivares americanas e europeias.

Além destes trabalhos, existem pesquisas que utilizam o ISSR associado a outros marcadores, como o RAPD usado para avaliar a distância genética da uva cultivada na região central do Chile e também para comparar as cultivares do Chile com a recém cultivar introduzida da França (Herrera et al., 2002). Nos trabalhos realizados por Nookaraju e Agrawal (2012) e por Pereira et al. (2012), foram utilizadas as técnicas de ISSR associadas com microssatélite para avaliação genética das videiras. A diversidade genética de 21 acessos de videira da província do Curdistão (Noroeste do Irã) foi avaliada por Seyedimoradi et al. (2012) e, para este estudo, foram utilizados os marcadores ISSR e DAMD (DNA minissatélite diretamente amplificado). Os dois marcadores revelaram bom poder de resolução. A análise de agrupamento para os marcadores ISSR e DAMD revelou que os genótipos estudados podem ser divididos em três e dois grupos distintos,

respectivamente. Este foi o primeiro relato da comparação de desempenho entre dois marcadores, indicando que ISSR e DAMD podem ser usados para detectar polimorfismo de genótipos de videira.

2.3.3. Detecção de variação clonal em clones de uva

Segundo estudos realizados por vários investigadores, o marcador AFLP oferece a melhor resolução para avaliar a variação genética derivada de mutações somáticas. Vários trabalhos mostram que este marcador apresenta a capacidade de detectar variação genética entre os clones de diferentes cultivares de videira (Sensi et al., 1996; Goto-Yamamoto, 2000; Cervera et al., 2000; Merdinoglu et al., 2000; Scott et al., 2001; Cervera et al., 2001; Cervera et al., 2002; Imazio et al., 2002; Fanizza et al., 2003; Forneck et al., 2003a, b). Os estudos realizados por Fanizza et al. (2003), também utilizando marcador AFLP, não mostraram variações em clones da cultivar Itália. A escala de diversidade encontrada parece depender do número de marcadores produzidos e do material clonal estudado.

O marcador RAPD também foi utilizado em alguns trabalhos para identificar diferenças genéticas entre clones. Nestes trabalhos foram obtidos alguns marcadores RAPD associados a clones (Striem et al., 1994; Regner et al., 2000a,b; Merdinoglu et al., 2000; Regner e Kaserer, 2002) e, nos trabalhos realizados por Tschammer e Zyprian (1994) e Ye et al. (1998), também utilizando o marcador RAPD, não foram detectadas diferenças entre clones de diferentes cultivares de uva. Os marcadores SSRs são considerados como bastante adequados para estudos em videira, embora poucos estudos tenham sido realizados para estudar as diferenças entre clones. Os estudos iniciais com SSR não detectaram diferenças de alelos entre clones e, portanto, este marcador não tem sido descrito como o mais adequado para detectar variações clonais (Forneck, 2005). Os marcadores SSR têm sido usados para estabelecer análise de *pedigree* de cultivares de videira (Bowers e Meredith, 1997) e utilizados para a identificação de cultivares. Marcadores microssatélites também foram utilizados para estudar policlonalidade de acessos de cultivares de videira (Filippetti et al., 1999; Kozjak et al., 2003). O uso destes marcadores em análises genética de plantas é importante para caracterizar a estabilidade em nível de intervariedade. Os estudos confirmaram a variação genética em sequências SSR e variações específicas para a ausência de alelos (alelos nulos), para a adição de

um ou vários alelos (quimerismo) e para o surgimento de novos alelos (Cipriani et al., 1994; Vignani et al., 1996; Loureiro et al., 1998; Sefc et al., 1998; Regner et al., 2000b). Franks et al. (2002) utilizou marcadores SSR para analisar o estado quimérico de clones. Os resultados destes estudos sugerem que o quimerismo é um processo que ocorre frequentemente em clones de videira.

Marcadores ISSR também têm sido utilizados por vários grupos para aumentar a resolução e a reprodutibilidade, problemas observados com a técnica de RAPD. Níveis limitados de variação genética podem ser revelados usando RAPD. Regner et al. (2000a) encontraram marcadores ISSR específicos para 10 clones de *V. vinifera* cv. Riesling.

Poucos estudos com o objetivo de examinar variações clonais utilizando RFLP-PCR foram publicados e nestes estudos não foram detectadas variações e nenhuma diferença entre os clones foi relatada. No trabalho realizado por Gogorcena et al. (1993), foram avaliados nove clones de Pinot Noir, juntamente com Pinot Blanc e Pinot Gris, e não foi encontrada nenhuma diferença. Bourquin et al. (1995) estudaram clones de porta-enxerto, utilizando RFLP-PCR, e também não observaram nenhuma diferença entre eles.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das folhas da cultivar de uva Itália

As folhas jovens (recém-expandidas) da cultivar Itália (*Vitis vinífera* L.) utilizadas neste estudo foram coletadas em três parreirais de produtores do município de Marialva (estado do Paraná) e um no município de Sarandi (Paraná), no ano de 2012 (Quadro 1). Cerca de cinco folhas de cada planta foram coletadas, identificadas, acondicionadas em papel alumínio e mantidas no gelo em caixa de isopor. No laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (LCTVE-DBC/UEM), estas folhas foram congeladas rapidamente com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C, até o momento da extração do DNA.

Quadro 1 - Localização e coordenadas geográficas das propriedades onde as folhas da cultivar Itália foram coletadas

Acesso	Número de plantas	Localização	Coordenadas geográficas
1 (Sítio Humberto Feltrin)	16	Estrada Caraná - Km 3, Marialva, PR	23° 30'56" sul, 51°47'57" oeste
2 (Sítio Carlos Rolla)	12	Estrada Marialva - Km 3, Marialva, PR	23°30'32" sul, 51°49'01" oeste
3 (Sítio Paulo Cezar Antunes da Silva)	14	Estrada Uvarana - Km 1, Sarandi, PR	23°24'49" sul, 51°48'54" oeste
4 (Sítio Nei Cazolato)	15	Estrada Prof. Paulinho - Km 3, Marialva, PR	23°27'37" sul, 51°46'28" oeste

3.2. Extração e quantificação do DNA de folhas da cultivar de uva Itália

Para a extração de DNA das amostras, foi utilizado o método descrito por Thomas et al. (1993). No total, foi extraído o DNA de 57 amostras e o número de amostras para cada propriedade está apresentado no Quadro 1. Para facilitar a descrição do processo de extração de DNA, o protocolo foi dividido em três etapas, como apresentado a seguir:

3.2.1. Primeira etapa

Nitrogênio líquido foi utilizado para pulverizar 100 mg de folhas de cada amostra coletada. O pó obtido foi distribuído em 4 microtubos de 2 mL e

homogeneizado com 1500 µL de tampão de extração 'A', descrito no Quadro 2. Após a homogeneização, foi realizada a centrifugação, a 4 °C, durante 10 minutos, com 3.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e em cada tubo foram adicionados 800 µL do tampão 'B', descrito no Quadro 2. Após a homogeneização, os tubos foram incubados em banho-maria, a 37 °C, durante 30 minutos, e estes foram agitados a cada 5 minutos. Após este período, os tubos foram retirados do banho-maria e mantidos na bancada até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (preparado na proporção de 24:1) e os tubos foram agitados por inversão, durante 3 minutos. Em seguida, foram centrifugados em temperatura ambiente, por 12 minutos com 12.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e a este foram adicionados 0,54 vezes o volume de isopropanol. Após algumas inversões, os tubos foram novamente centrifugados como anteriormente, obtendo-se o *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* seco em temperatura ambiente e a este foram adicionados 200 µL de TE (Tris/HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0). O DNA foi ressuspenso e armazenado a 4 °C na geladeira.

3.2.2. Segunda etapa

Foram adicionados, em cada tubo, 2 µL de RNase (20 ng/µL) e os tubos foram mantidos, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após este período, foram acrescentados 100 µL de acetato de amônio 7,5 M e, após algumas inversões, os tubos foram centrifugados em temperatura ambiente, por 12 minutos, a 12.000 rpm. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos novos e a eles foram adicionados 0,54 vezes o volume de isopropanol. Os tubos foram armazenados *overnight* a -20°C.

3.2.3. Terceira etapa

Foi realizada, na sequência, centrifugação em temperatura ambiente, por 12 minutos, com 12.000 rpm, obtendo-se novamente um *pellet*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 300 µL de etanol 70 % gelado. Após a lavagem, realizou-se uma centrifugação, por 12 minutos, com 12.000 rpm. O sobrenadante foi vertido delicadamente e os tubos colocados em estufa a 37 °C até que todo o etanol

fosse evaporado. O *pellet* foi ressuspendido em 50 μ L de TE e os tubos foram vedados com parafilm[®] e armazenados em geladeira com 4°C.

Quadro 2 - Composição dos Tampões 'A' e 'B' utilizados para extração de DNA de folhas de uva Itália

Reagentes	Tampão de extração 'A'	Tampão de extração 'B'
PVP-40	2,50%	2,50%
NaCl	0,25 M	0,5 M
Tris HCl pH 7,0	-	0,2 M
Tris HCl pH 8,0	0,25 M	-
EDTA	50 mM	50 mM
β -mercaptoetanol	0,10%	1%
Sarcosil	-	3%
Etanol	-	20%
H ₂ O MiliQ	q.s.p.	q.s.p.

O DNA extraído de cada amostra foi quantificado, utilizando o equipamento Picodrop Spectrophotometer (Pico 100 – Version 4.0/21/03/11). Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 10 ng/ μ L.

3.3. Amplificação e análise do DNA

As reações de amplificação foram realizadas com o DNA extraído de 57 amostras de folhas jovens dos quatro acessos da cultivar de uva Itália, coletados nas quatro propriedades descritas no Quadro 1.

3.3.1. Amplificação e análise dos microssatélites

Para a escolha dos marcadores microssatélites polimórficos foram testados 38 pares de *primers* já mapeados para uva e que fazem parte do banco de *primers* do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (DBC/UEM). Dos 38 pares de *primers* testados, foram selecionados 13, pois estes amplificaram regiões específicas e com indícios de polimorfismo. Os pares de *primers* que não amplificaram fragmentos específicos nos testes não foram usados.

A PCR foi preparada em microtubos de 0,2 mL, sendo utilizado para a reação 25 ng de DNA, tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de

KCl), 2 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 1U de Taq-DNA Polimerase (Invitrogen) e 0,3 µM de cada um dos *primers Forward* e *Reverse* específicos e água mili-Q para um volume final de 20 µL de solução (Quadro 3).

Quadro 3 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação de microssatélites de uva Itália

Reagentes	Concentração estoque dos reagentes	Concentração final dos reagentes	µL/20 µL de reação
H ₂ O	-	-	11,7
Tampão	10 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2 mM	1,6
dNTPs	2,5m M/cada	0,1 mM/cada	0,8
<i>Primer</i> (F)	10 µM	0,3 µM	0,6
<i>Primer</i> (R)	10 µM	0,3 µM	0,6
Taq-DNA Polimerase	5 U/ µL	1 U	0,2
DNA	10 ng/ µL	25ng	2,5
Total			20µL

Inicialmente, para a amplificação dos microssatélites, foi utilizado o programa *Touchdown PCR* (DON et al., 1991), descrito no Quadro 4, utilizando o termociclador (Techne TC-512). Aos produtos das amplificações, foram adicionados 2 µL de tampão *Loading* (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e estes foram separados em gel de agarose 4% (50% de agarose Metaphor e 50% de agarose comum) usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Para estimar o tamanho dos alelos amplificados, foi utilizado o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Invitrogen). Os géis foram expostos a um campo elétrico de 60 Volts, por 4 horas, e corados em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL. A imagem foi capturada em transluminador L-PIX HE, Loccus biotecnologia.

Para aqueles pares de *primers* que não anelaram e, portanto, não amplificaram a região de microssatélite com o programa *Touchdown PCR*, foi testado um programa com temperatura de anelamento específica. Para os *primers* Udv 085, Udv 096 e Vmc4c6, foi utilizado um programa com desnaturação inicial de 94 °C por 2 segundos e 30 ciclos constituídos de 94 °C por 30 segundos,

temperatura de anelamento de 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após estas etapas, foi realizado uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Quadro 4 - Sequência das etapas do programa utilizado para amplificação do DNA com marcador microssatélite

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94°C	1 minuto
2	Desnaturação	94°C	1 minuto
3	Anelamento	65°C (1°C/ciclo)	1 minuto
4	Extensão	72°C	2 minutos
5	Voltar ao passo 2 - 9 vezes	-	-
6	Desnaturação	94°C	1 minuto
7	Anelamento	55°C	1 minuto
8	Extensão	72°C	2 minutos
9	Voltar ao passo 6 - 19 vezes	-	-
10	Extensão final	72°C	2 minutos
11	Imersão	10°C	∞

A partir do padrão de bandas obtido para cada loco de microssatélites, foram calculados os índices de diversidade em cada população estudada. A variabilidade genética foi estimada por meio de uma estatística descritiva que determinou o número de locos polimórficos, número de alelos por loco, número efetivo de alelos por loco, número efetivo de alelos (N_e), que foi estimado como $N_e=1/(1-H_o)$, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), distância genética entre populações, frequências alélicas e o afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco. Todos esses parâmetros foram calculados utilizando o programa POPGENE 1.32 (YEH et al., 1999). Neste mesmo programa, foi construído um dendrograma e uma matriz de distância e identidade genética de Nei (1972), usando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*).

Foi utilizado também o programa STRUCTURE v 2.3.2. (Pritchard et al., 2000), que se baseia na determinação de grupos heteróticos a partir de dados moleculares. Evanno et al. (2005) sugeriram estimar ΔK como:

$$\Delta K = \frac{\{avg [L(K + 1)] - 2avg [L(K)] + avg [L(K - 1)]\}}{sd [L(K)]}$$

onde *avg* é a média aritmética nas repetições e *sd* é o desvio padrão da repetição L(K). O valor de K corresponde ao valor médio da distribuição de ΔK (Rodríguez-Ramilo et al., 2009).

Foi realizada, por meio dos conceitos descritos acima, a análise implementada pelo programa STRUCTURE v. 2.3.2. (Pritchard et al., 2000), cuja base é o modelo de separação de grupos (*clusters*), que atribui indivíduos a um número K de populações, fundamentada na estimativa Bayesiana, em conformidade aos equilíbrios esperados de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados dentro de cada população. Esta análise foi realizada com valor de *length burning* de 5000, com valor de MCMC de 50.000 e valor de corte de 10%; foram testados de K= 2 a K= 5. O software STRUCTURE HARVESTER v.0.6.1 (Earl e Von, 2009) foi usado para processar os arquivos de resultados do Structure v 2.3.2.

3.3.2. Amplificação e análise dos ISSR (*Inter Single Sequence Repeats*)

A seleção de *primers* utilizados neste estudo foi feita por meio de testes de 30 *primers* de ISSR que fazem parte do banco de *primers* do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (DBC/UEM). Também foram testadas a concentração de DNA, que inicialmente foi 2,5 μ L, depois 2,0 μ L e por fim 1,5 μ L; a concentração do MgCl₂ foi de 1,6 μ L para 1,92 μ L, o *primer* iniciou com 0,4 μ L e foi para 0,5 μ L; e a temperatura de anelamento foi testada no intervalo de 48°C até 52°C. Dos 30 *primers* testados, foram selecionados 14, pois estes apresentaram um padrão de fragmentos amplificados bem definido. Os *primers* que após estes testes não amplificaram fragmentos específicos foram descartados dessa pesquisa.

A PCR foi preparado em microtubos de 0,2 mL, sendo utilizado para a reação 15 ng de DNA, tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,8), 2,4 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 1 U de *Taq-DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen), 0,25 μ M de *primer* e água mili-Q para um volume final de 20 μ L de solução (Quadro 5). A PCR foi realizada no termociclador Techne TC-512, seguindo as temperaturas descritas no Quadro 6.

Aos produtos das ampliações foram acrescentados 2 μ L de tampão *Loading* (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e estes foram separados em gel de agarose 1,5%, usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1

mM EDTA). Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb *DNA Ladder* (Invitrogen). Os géis foram expostos a um campo elétrico de 60 Volts, por 4 horas, e após este período foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL. A imagem foi capturada em transluminador L-PIX HE, Loccus biotecnologia.

Quadro 5 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação em ISSR

Reagentes	Concentração estoque dos reagentes	Concentração final dos reagentes	µL/20 µL de reação
H ₂ O	-	-	13,08
Tampão	10 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,4 mM	1,92
dNTPs	2,5mM/cada	0,1 mM/cada	0,8
<i>Primer</i>	10 µM	0,25 µM	0,5
Taq-DNA Polimerase	5 U/µL	1 U	0,2
DNA	10 ng/µL	15ng	1,5
Total			20µL

Para a análise do produto amplificado para cada *primer* de ISSR e para cada amostra analisada, os fragmentos foram lidos como presentes (1) ou ausentes (0) e uma matriz binária foi construída. Esta matriz foi utilizada para as análises realizadas com o programa NTSYS-pc - 2.02K *software* (ROHLF, 1989). As semelhanças genéticas entre os pares de amostras foram analisadas usando o coeficiente de Jaccard e o dendrograma construído por implementação do método de UPGMA. Os dados também foram avaliados para calcular os índices de diversidade genética em cada população, utilizando o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999). Neste mesmo programa, foi construído um dendrograma e uma matriz de distância e identidade genética de Nei (1972) usando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*).

Foi utilizado também o programa STRUCTURE v 2.3.2. (Pritchard et al., 2000), que se baseia na determinação de grupos heteróticos a partir de dados moleculares. O método de Evanno et al. (2005) foi utilizado para estimar o ΔK .

Quadro 6 - Sequência das etapas do programa utilizado para amplificação do DNA com marcador ISSR

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94°C	5 minutos
2	Desnaturação	94°C	1 minuto
3	Anelamento	49,5 °C a 51 °C	1 minuto
4	Extensão	72°C	1 minuto e 30 segundos
5	Voltar ao passo 2 34 vezes	-	-
6	Extensão final	72°C	7 minutos
7	Imersão	4°C	∞

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do marcador microssatélite (SSR)

Foram testados, para a escolha dos marcadores polimórficos, 38 pares de *primers* para microssatélites já mapeados para uva e que fazem parte do banco de *primers* do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (DBC/UEM). Dos 38 pares de *primers* testados, foram selecionados 13, pois estes amplificaram regiões específicas e com indícios de polimorfismo. Estes *primers*, suas sequências e o número de alelos amplificados por eles estão apresentados no Quadro 7.

A análise do loco *Udv01* apresentou 3 alelos para as amostras dos acessos 1 e 2, enquanto para os demais locos (*Vmc4d4*, *Vmc4a1*, *Scu08vv*, *Udv085*, *Udv096*, *Vmc4c6*, *Scu10vv*, *Udv011*, *Udv034*, *Scu15vv*, *Vvmd5*, *Udv032*) foram encontrados apenas 2 diferentes alelos (Quadro 8, Figura 1 e 2). Portanto, as evidências são de um número reduzido de alelos (27 alelos) para os 13 locos SSR analisados nas 57 amostras dos quatro acessos da cultivar Itália (2,08 alelos/loco), contrastando com o número e a variação no número de alelos em locos SSR, que tem sido descrito como muito alto em diversas variedades e em cultivares de uvas analisadas (AGAR et al., 2012; Doulati-Baneh et al., 2013).

Em 60 cultivares de *Vitis vinifera* cv. Kabarcik amostradas do Vale do Coruh foram identificados de 2 a 6 alelos por loco SSR (Agar et al., 2012); em 23 locos SSR avaliados para a coleção de germoplasma do Irã, contendo a maioria das cultivares de uvas do país, foram detectados de 2 a 15 alelos/loco de SSR (Doulati-Baneh et al., 2013). Num total de 293 acessos da região de Astúrias, na Espanha, foram observados de 9 a 13 alelos/loco SSR (Moreno-Sanz et al., 2011); nos 7 locos SSR analisados foi detectada uma frequência de 10,7 alelos por loco em 47 acessos de uva de mesa do Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido (Leão e Motoike, 2011). Numa comparação feita por Oualkadi et al. (2011) entre cultivares de duas coleções do Marrocos com cultivares de países vizinhos (Argélia e Tunísia), foi identificado 7,8 alelos/loco SSR nas cultivares do Marrocos, 6,9 alelos/loco SSR da Argélia e 8,8 alelos/loco SSR no material analisado da Tunísia. This et al. (2004) detectaram de 13 a 23 alelos/locos. Snoussi et al. (2004) estudaram 109 cultivares de uva de mesa e variedades silvestres de uma coleção na Tunísia e observaram de

5 a 9 alelos/locos. Em 4 cultivares e em um híbrido de uvas da França, Merdinoglu et al. (2005) observaram de 1 a 8 alelos/locos. Em 25 variedades crioulas do Peru e da Argentina e em 46 cultivares de Portugal, Martínez et al. (2006) e Lopes et al. (2006) observaram de 6 a 13 alelos/locos e de 5 a 12 alelos/locos, respectivamente. Quando 38 cultivares de diferentes espécies do gênero *Vitis* foram estudadas, Fernández et al. (2008) observaram de 5 a 12 alelos/locos.

Quadro 7 - *Primers*, sequências de nucleotídeos dos *primers* microssatélite e o número de alelos detectados para cada *primer* usado nas amostras dos quatro acessos da cultivar Itália

<i>Primer</i>	Sequência de nucleotídeos	Número de alelos
Udv-01	TCATTTTCTTGATCGAAGTCCA ^(F) TGAGCATCAAACAGGAAGC ^(R)	3
mc4d4	GTCTTGTAATGGAACCAACTGC ^(F) AGATTGACCTGGACCTGAAACT ^(R)	2
Vmc4a1	ATGCGACCTTAATAAATTGGGAA ^(F) AAGCTAGGCTTGTATGAGGGAGA ^(R)	2
Scu08vv	CGAGACCCAGCATCGTTTCAAG ^(F) GCAAATCCTCCCCGTACAAGTC ^(R)	2
Udv-085	CTCCCCAGTAACCATGGAAG ^(F) CACTGGATGAGATGGCAGAA ^(R)	2
Udv-096	CTTCCCCATGAAGCTCTATTT ^(F) CGGAGAGTTGCGAGTACTA ^(R)	2
Vmc4c6	CTCCATCCCTATCTCATCAG ^(F) CTCTAACACCCAATCTCACA ^(R)	2
Scu10vv	TACCCCAACAACCCTTTTTCCC ^(F) TTCTCCGCCACCTCCTTTTCCAC ^(R)	2
Udv-011	TTTATGGCAACCCTCCAATC ^(F) TTGATGGTCCACTGGAAGT ^(R)	2
Udv-034	AAGAGACCAAGGATAGATCAAACA ^(F) AAATGCAACGGGAGATGGTA ^(R)	2
Scu15vv	GCCTATGTGCCAGACCAAAAAC ^(F) TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC ^(R)	2
Vvmd5	CTAGAGCTACGCCAATCCAA ^(F) TATACCAAAAATCATATTCCTAAA ^(R)	2
Udv-032	CATGCGTATGTGTTAGAGAGCA ^(F) CATGGCATGTGCTTTGTTAT ^(R)	2

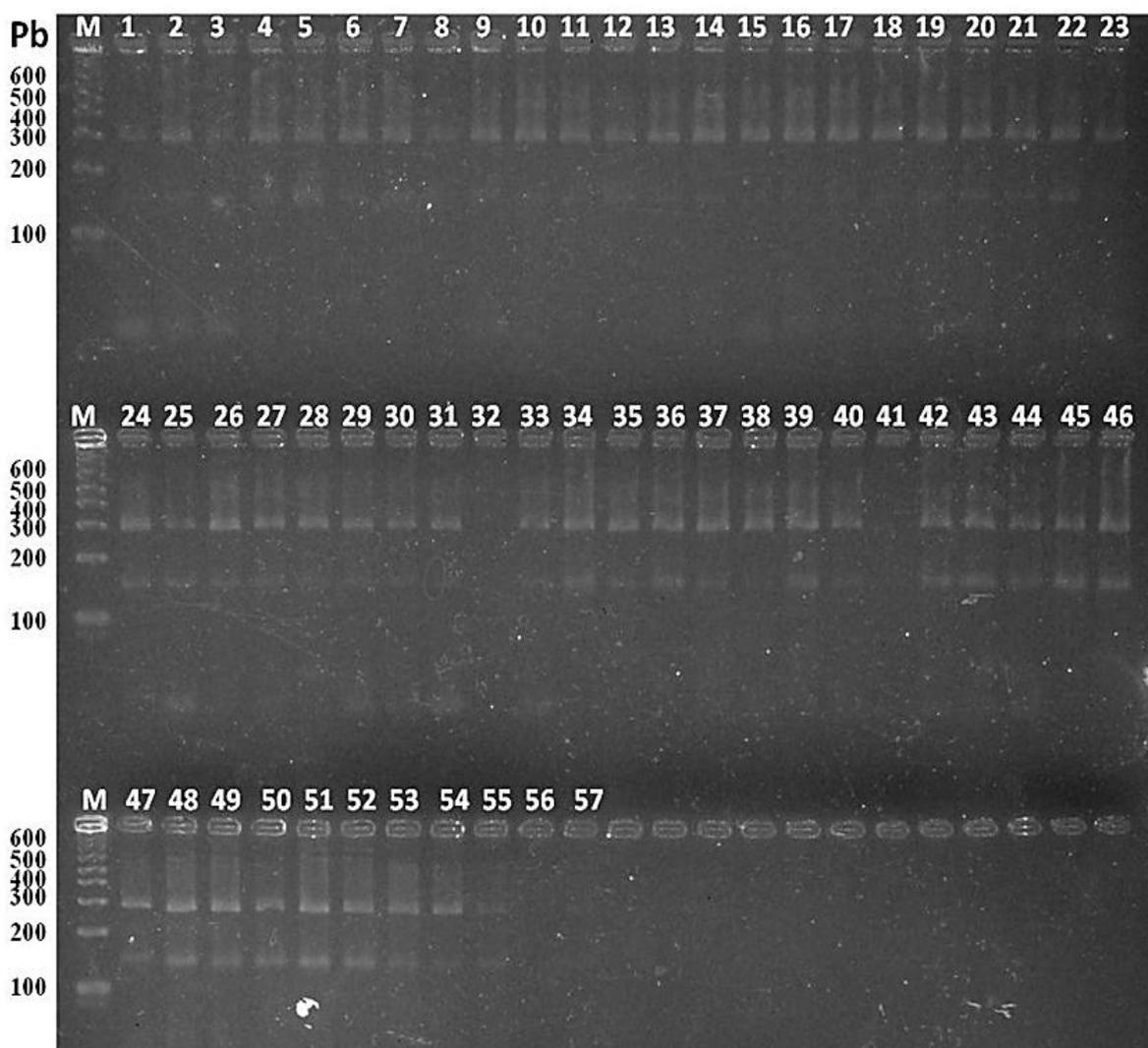


Figura 1 - Gel de agarose 4% (50% agarose comum e 50% agarose Metaphor) para separar os produtos da amplificação dos DNAs das 57 amostras dos 4 acessos da cultivar Itália (1-16 plantas do acesso 1, 17-28 plantas do acesso 2, 29-42 plantas do acesso 3, 43-57 plantas do acesso 4). Estas amostras foram amplificadas com o *primer* do loco *Udv011*. A primeira amostra (M) indica o *ladder* de 100 pb (Invitrogen) e as demais amostras indicam os alelos *a* e *b* (heterozigotos) presentes nas 57 amostras da cultivar Itália.

Existem vários trabalhos com as cultivares de *V. vinifera* e nestes foram estudados clones da uva Itália, mas ainda são poucos os estudos de diversidade ou estabilidade genética, utilizando microssatélites. Estudo de clones de uva Itália das regiões Sul (Paraná) e Sudeste (São Paulo) do Brasil, realizado por Maia (2009), utilizando 17 locos de microssatélites, também apontou para um número baixo de alelos. O referido autor descreveu 36 alelos, com apenas 2,12 alelos/locos. Os resultados do número de alelos/loco para os estudos de clones de uva Itália contrastam com os resultados divulgados para outras variedades e cultivares de

uvas, conforme salientado acima. O número de alelos nos locos SSR da cultivar Itália é menor que o número de alelos observado em outras variedades e cultivares de uvas e este número baixo tem se mantido inalterado para plantas da cultivar Itália no período de 6 anos (2006 – 2012).

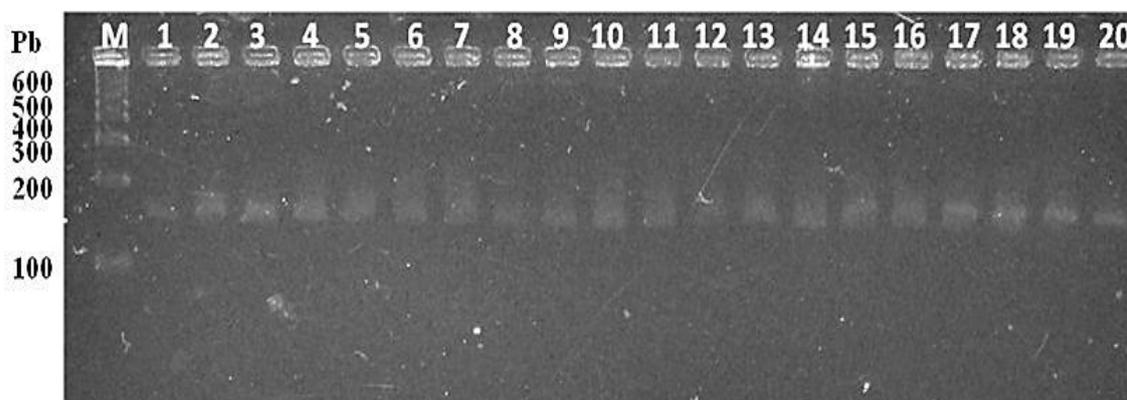


Figura 2 - Gel de agarose 4% (50% agarose comum e 50% agarose Metaphor) para separar o produto da amplificação dos DNAs de amostras dos acessos da cultivar Itália (1-20) com o *primer* Udv01. A primeira amostra (M) do gel indica o marcador *ladder* 100 pb (Invitrogen).

A análise da estabilidade genética em clones de quatro variedades da França e da Itália tem indicado o surgimento de novos alelos em locos SSR no decorrer de um período de 3 anos (Crespan, 2004). Entretanto, nas amostras da cultivar Itália analisadas no presente estudo, foi observado apenas 2,08 alelos/locos nas amostras de Marialva, previamente analisados por Maia (2009), que descreveu 2,12 alelos/locos. Desta forma, é possível indicar estabilidade genética em locos SSR (*Udv01*, *Vmc4d4*, *Vmc4a1*, *Scu08vv*, *Udv085*, *Udv096*, *Vmc4c6*, *Scu10vv*, *Udv011*, *Udv034*, *Scu15vv*, *Vvmd5*, e *Udv032*) para as amostras de uva Itália cultivada na região de Marialva no decorrer de 6 anos.

Números baixos de alelos em locos SSR de uvas têm sido registrados para clones da variedade Carbenet Sauvignon e da cultivar Pinot (Moncada et al., 2006; Jahnke et al., 2011). Moncada et al. (2006) descreveram apenas de 2 a 3 alelos/locos em 84 locos SSR analisados em 59 clones da variedade Cabernet Sauvignon de diferentes origens (Chile, França, Itália, Austrália, Espanha, Hungria e Estados Unidos). Jahnke et al. (2011) estudaram 12 clones da cv. Pinot e descreveram de 1 a 4 alelos.

Nos 13 locos SSR analisados para a cultivar Itália dos quatro acessos de Marialva e Sarandi, foram encontrados os alelos *a* e *b* com frequências iguais a 0,50,

respectivamente, nos locos: *Vmc4a1*, *Scu10vv*, *Udv011*, *Udv034* e *Udv032*, ou seja, todas as plantas avaliadas foram heterozigotas (Figura 3). Os locos *Scu10vv*, *Udv034* e *Udv032* também foram utilizados no estudo de Maia (2009) e este autor observou que estes locos também se apresentaram heterozigotos (alelos *a* e *b*) para 100% das plantas da cultivar Itália estudadas na região de Marialva. O loco *Udv085* também foi utilizado no presente trabalho e no trabalho de Maia (2009) e nestes dois trabalhos as plantas avaliadas de Marialva foram 100% heterozigotas. Para as plantas coletadas em Sarandi, no presente trabalho, observamos para este loco, diferenças para a frequência entre os alelos *a* (0,6071) e *b* (0,3929). Portanto, este microsatélite (*Udv085*) pode ser utilizado para mostrar a divergência genética entre as 57 diferentes plantas dos quatro acessos coletados. Os locos *Scu15vv* e *Vvmd5*, que também foram utilizados no presente trabalho e no trabalho de Maia (2009), no presente estudo, apresentaram os alelos *a* e *b* distribuídos com frequências variáveis para todas as plantas, enquanto, no estudo de Maia (2009), todas as plantas de Marialva estudadas foram heterozigotas. Para o primeiro loco (*Scu15vv*), somente as plantas coletadas no acesso 1 foram 100% heterozigotas; para os demais acessos e para o segundo loco (*Vvmd5*), a frequência entre os dois alelos foi diferente de 0,5000. O loco *Vmc4d4* apresentou frequência alélica entre *a* e *b* bastante variável, enquanto as plantas coletadas em Sarandi foram 100% heterozigotas, sugerindo também que este loco é importante para estudar divergência genética na cultivar Itália.

Os demais locos estudados no presente trabalho (*Udv01*, *Scu08vv*, *Udv096* e *Vmc4c6*) apresentaram frequências variáveis para os alelos *a* e *b* (diferentes de 50%), para as diferentes plantas coletadas nos diferentes acessos de Marialva e de Sarandi (Quadro 8). As frequências uniformes e equivalentes a 0,50 dos alelos *a* e *b* para todas as plantas avaliadas dos quatro acessos ocorreram para 5 dos 13 locos estudados (38,46%). Também observamos que, para os locos *Vmc4c6* e *Scu15vv*, houve acessos específicos e 100% das plantas forma heterozigotas e, para o primeiro loco, este evento foi observado nas plantas dos acessos 1 e 2 e, para o segundo loco, somente nas plantas do acesso 2, ambas coletadas em Marialva. Esta informação mostra que os acessos das diferentes localidades apresentam divergência genética. Para o loco *Scu08vv* o alelo *b* se encontra fixado nas plantas do acesso 2.

As frequências dos alelos nos locos *Udv01*, *Vmc4d4*, *Vmc4a1*, *Scu08vv*, *Udv085*, *Udv096*, *Vmc4c6*, *Scu10vv*, *Udv011*, *Udv034*, *Scu15vv*, *Vvmd5*, e *Udv032* das plantas dos quatro acessos de Itália estão descritos no Quadro 8. Nos locos *Udv085*, *Scu10vv*, *Udv034*, e *Udv032* das amostras de acessos de Marialva foi verificado que 100% das plantas são heterozigotas para os alelos *a* e *b*. Estes quatro locos foram analisados previamente por Maia (2009) e também foram identificados 100% de plantas heterozigotas para os mesmos alelos. Estas evidências indicam estabilidade genética dos acessos de Itália da região de Marialva no período de 6 anos (2006 - 2012), embora esta estabilidade não possa ser estendida para os demais locos SSR não analisados em períodos anteriores ao deste trabalho.

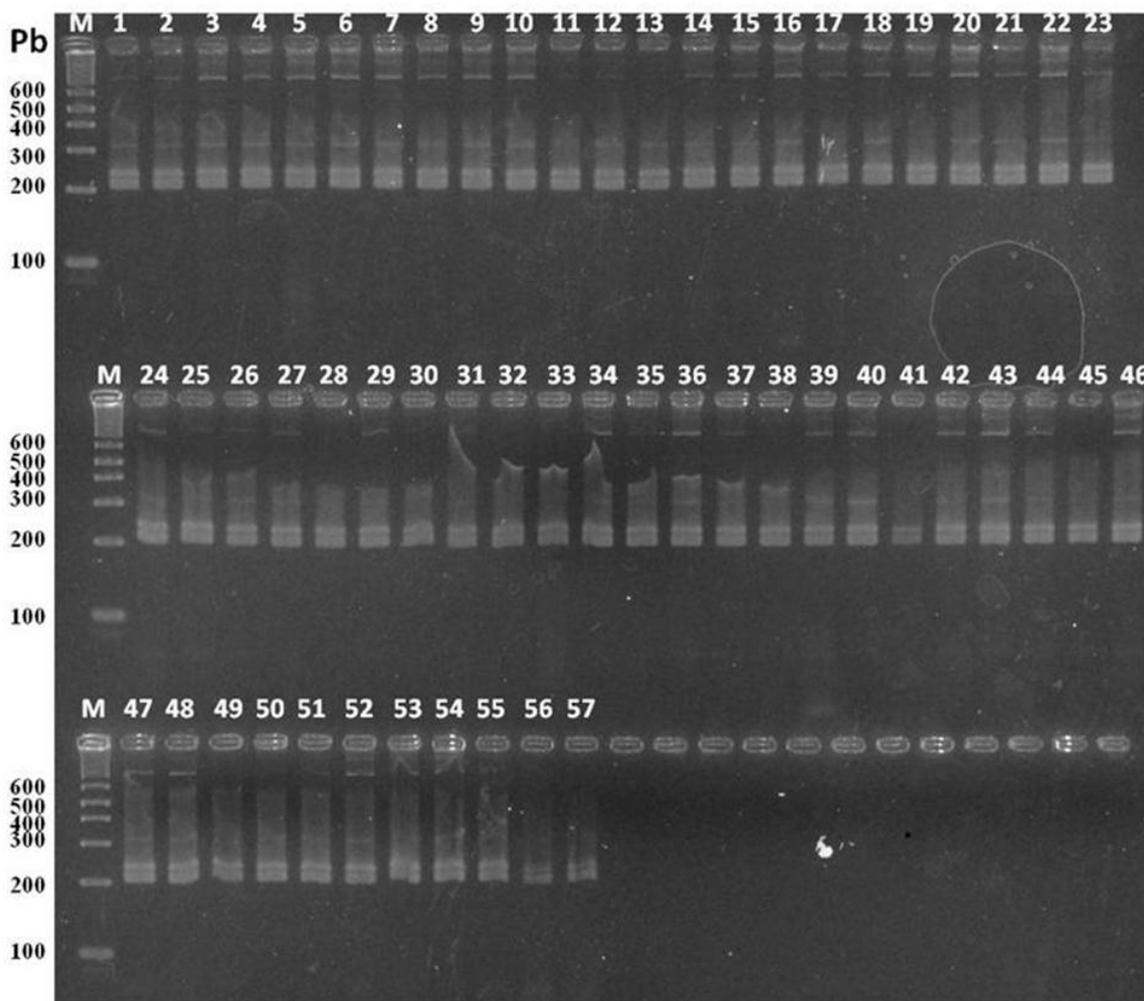


Figura 3 - Gel de agarose 4% (50% agarose comum e 50% agarose Metaphor) para separar o produto da amplificação dos DNAs de amostras da cultivar Itália (1-57) com o *primer* *Scu10vv*, onde 100% das plantas são heterozigotas. A primeira amostra (M) do gel indica o marcador de peso molecular *ladder* 100 pb (Invitrogen).

Quadro 8 - Frequência dos alelos para os diferentes locos SSR analisados para os quatro acessos da cultivar de uva Itália

Loco	Acesso 1	Acesso 2	Acesso 3	Acesso 4
Udv01				
Alelo A	0,1250	0,0833	0,2143
Alelo B	0,7500	0,2500	0,7857	0,7333
Alelo C	0,1250	0,6667	0,2667
Vmc4d4				
Alelo A	0,4375	0,0833	0,5000	0,8000
Alelo B	0,5625	0,9167	0,5000	0,2000
Vmc4a1				
Alelo A	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Alelo B	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Scu08vv				
Alelo A	0,4375	0,5714	0,4667
Alelo B	0,5625	1	0,4286	0,5333
Udv085				
Alelo A	0,5000	0,5000	0,6071	0,5000
Alelo B	0,5000	0,5000	0,3929	0,5000
Udv096				
Alelo A	0,6562	0,4583	0,5714	0,2000
Alelo B	0,3438	0,5417	0,4286	0,8000
Vmc4c6				
Alelo A	0,5000	0,5000	0,5714	0,4667
Alelo B	0,5000	0,5000	0,4286	0,5333
Scu10vv				
Alelo A	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Alelo B	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Udv011				
Alelo A	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Alelo B	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Udv034				
Alelo A	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Alelo B	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Scu15vv				
Alelo A	0,5000	0,5417	0,6429	0,6333
Alelo B	0,5000	0,4583	0,3571	0,3667
Vvmd5				
Alelo A	0,2500	0,4167	0,2143	0,1333
Alelo B	0,7500	0,5833	0,7857	0,8667
Udv032				
Alelo A	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Alelo B	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000

As frequências diferentes e variáveis dos alelos *a* e *b* nos locos *Udv01*, *Vmc4d4*, *Scu08vv*, *Udv085*, *Udv096*, *Vmc4c6*, *Scu15vv* e *Vvmd5* apontam para um polimorfismo de 61,54% na cultivar Itália. Diferentes eventos podem estar relacionados a esse polimorfismo nos locos SSR analisados nas plantas da cultivar Itália propagadas vegetativamente.

As evidências de um número reduzido de alelos por loco SSR (2 a 3 alelos) e a detecção de um terceiro alelo (alelo *c*) em somente 7,69% de locos polimórficos poderiam indicar uma redução na diversidade genética para a cultivar Itália. Entretanto, as frequências variáveis dos alelos *a* e *b* em 61,54% dos locos SSR conferiram uma proporção alta de plantas heterozigotas nos quatro acessos. A heterozigosidade média observada variou de 0,5879, nas plantas do acesso 3, a 0,6298, nas plantas do acesso 1. A heterozigosidade média esperada variou de 0,4509, nas amostras do acesso 2, a 0,4936, nas amostras do acesso 1 (Quadro 9). O valor de H_o estimado para os quatro acessos da cultivar Itália foi de 0,6086 (Quadro 10). Valores altos de heterozigosidade média observada parece ser uma evidência em várias outras variedades e cultivares de videiras. De Andrés et al. (2012) caracterizaram a diversidade genética de populações selvagens de videira, utilizando 25 locos SSR, e obtiveram 0,62 para a H_o média. Valores maiores foram descritos nos estudos realizados por Doulati-Baneh et al. (2013), usando 23 locos de SSR para avaliar cultivares iranianas ($H_o = 0,73$). Ergul e tal. (2011), analisando locos SSR de uvas selvagens da Anatólia, observaram um valor de H_o igual a 0,74. Nos clones de Itália de três locais da região Sul (Paraná) e de três locais da região Sudeste (São Paulo) do Brasil, o valor de H_o estimado por Maia (2009) para 17 locos SSR foi ainda mais alto ($H_o = 0,85$). A heterozigosidade alta encontrada na cultivar Itália foi atribuída por Maia (2009) à sua origem, que é resultado do cruzamento das variedades Bicane e Moscatel de Hamburgo.

O valor para a heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,4916$) nos quatro acessos de Itália (Quadro 10) foi menor do que os valores estimados para diversas outras variedades e cultivares de uvas. Na análise de 25 locos SSR em videiras selvagens, o valor de H_e foi estimado em 0,73 (De Andrés et al., 2012). Na análise de outras variedades selvagens de videira, os valores de H_e foram estimados em 0,81 (Ergul et al., 2011) e 0,85 (Moreno-Sanz, 2011). Porém, o valor de H_e nos locos SSR das quatro amostras analisadas no presente estudo foi equivalente ao valor de

He descrito por Maia (2009) nos 15 locos SSR (He = 0,4923) dos clones de Itália das regiões Sul e Sudeste do Brasil.

Quadro 9 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para as amostras dos quatro acessos da cultivar Itália de *Vitis vinifera* L. obtidos com os *primers* de microssatélite, onde Na: número de alelos observados; Ne: número efetivos de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada

Locos	Acesso 1				Acesso 2			
	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
<i>Udv01</i>	3,0000	1,6842	0,0000	0,4194	3,0000	1,9459	0,0000	0,5072
<i>Vmc4d4</i>	2,0000	1,9692	0,0000	0,5081	2,0000	1,1803	0,0000	0,1594
<i>Vmc4a1</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5161	2,0000	2,0000	1,0000	0,5217
<i>Scu08vv</i>	2,0000	1,9692	0,0000	0,5081	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
<i>Udv085</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5161	2,0000	2,0000	1,0000	0,5217
<i>Udv096</i>	2,0000	1,8221	0,1875	0,4657	2,0000	1,9862	0,0833	0,5181
<i>Vmc4c6</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5161	2,0000	2,0000	1,0000	0,5217
<i>Scu10vv</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5161	2,0000	2,0000	1,0000	0,5217
<i>Udv011</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5161	2,0000	2,0000	1,0000	0,5217
<i>Udv034</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5161	2,0000	2,0000	1,0000	0,5217
<i>Scu15vv</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5161	2,0000	1,9862	0,9167	0,5181
<i>Vvmd5</i>	2,0000	1,6000	0,0000	0,3871	2,0000	1,9459	0,0000	0,5072
<i>Udv032</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5161	2,0000	2,0000	1,0000	0,5217
Média	2,0769	1,9265	0,6298	0,4936	2,0000	1,8496	0,6154	0,4509
Locos	Acesso 3				Acesso 4			
	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
<i>Udv01</i>	2,0000	1,5077	0,1429	0,3492	2,0000	1,6423	0,0000	0,4046
<i>Vmc4d4</i>	2,0000	2,0000	0,0000	0,5185	2,0000	1,4706	0,0000	0,3310
<i>Vmc4a1</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5185	2,0000	2,0000	1,0000	0,5172
<i>Scu08vv</i>	2,0000	1,9600	0,0000	0,5079	2,0000	1,9912	0,0000	0,5149
<i>Udv085</i>	2,0000	1,9122	0,7857	0,4947	2,0000	2,0000	0,8667	0,5172
<i>Udv096</i>	2,0000	1,9600	0,1429	0,5079	2,0000	1,4706	0,4000	0,3310
<i>Vmc4c6</i>	2,0000	1,9600	0,8571	0,5079	2,0000	1,9912	0,8000	0,5149
<i>Scu10vv</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5185	2,0000	2,0000	1,0000	0,5172
<i>Udv011</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5185	2,0000	2,0000	1,0000	0,5172
<i>Udv034</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5185	2,0000	2,0000	1,0000	0,5172
<i>Scu15vv</i>	2,0000	1,8491	0,7143	0,4762	2,0000	1,8672	0,7333	0,4805
<i>Vvmd5</i>	2,0000	1,5077	0,0000	0,3492	2,0000	1,3006	0,0000	0,2391
<i>Udv032</i>	2,0000	2,0000	1,0000	0,5185	2,0000	2,0000	1,0000	0,5172
Média	2,0000	1,8967	0,5879	0,4849	2,0000	1,8257	0,6000	0,4553

O maior valor de heterozigosidade média observado, em comparação com a heterozigosidade média esperada nos quatro acessos da cultivar Itália (Quadro 10), está em concordância com o que tem sido descrito, tanto para cultivar Itália como

para outros grupos de cultivares de uvas analisando locos SSR (Moreno-Sanz et al., 2011; Maia, 2009; Sefc et al., 2000). Segundo Maia (2009), alguns autores acreditam que os elevados níveis de heterozigidade tenham se tornado uma condição vital para as espécies, sendo que a seleção das plantas altamente heterozigotas tenha se fortalecido durante a domesticação e cultivo, enquanto os genótipos eram selecionados de acordo com suas características agrônômicas.

Os parâmetros de diversidade genética apresentados no Quadro 10 apontam para um aumento de heterozigotos nas amostras dos quatro acessos da cultivar Itália (valores negativos de Fis foram observados para 8 dos 13 locos SSR analisados). Este excesso de heterozigotos deve ser decorrente da origem da cultivar, de alterações nas frequências dos alelos nos locos SSR e de mutações que determinam a geração de novos alelos. O valor médio do Fis foi igual a -0,3404, indicando o excesso de heterozigotos. Para o loco *Scu15vv*, o valor de Fis foi igual a -0,7521; para os locos *Vmc4c6* e *Udv085* foi igual a -0,8400 e a -0,8474, respectivamente, e o maior valor de Fis (-1,0000) foi observado nos locos *Vmc4a1*, *Scu10vv*, *Udv011*, *Udv034* e *Udv032*, os quais apresentaram 100% das plantas heterozigotas.

A análise da divergência genética entre as amostras dos quatro acessos (Fst) da cultivar Itália resultou em um valor global igual a 0,0688 (Quadro 10), indicando um nível moderado de divergência genética entre as mesmas, de acordo com as proposições de Wright (1978). Segundo este autor, o valor de F_{ST} entre 0,05 e 0,15 indica moderada diferenciação entre os acessos analisados. Um nível de diferenciação genética moderado ($F_{st} = 0,0648$) também foi descrito nos seis clones da cultivar Itália analisados por Maia (2009) e para outras cultivares locais e comerciais da Tunísia ($F_{st} = 0,06$) (Snoussi et al., 2004). Nos quatro acessos da cultivar Itália analisados no presente estudo, os valores de divergência genética foram altos ($0,25 \leq F_{st} \leq 0,15$), de acordo com Wright (1978), nos locos *Udv01* ($F_{st} = 0,2244$), *Vmc4d4* ($F_{st} = 0,2616$) e *Scu08vv* ($F_{st} = 0,2055$), indicando que estes três locos são adequados e podem ser recomendados para diferenciar as quatro amostras da cultivar Itália.

Um fenótipo formado por três bandas no gel de agarose foi observado no loco *Udv32* nas amostras dos quatro acessos da cultivar Itália (Figura 4), indicando a ocorrência de quimerismo somático para os quatro acessos. O quimerismo somático é bastante comum em videira (Pelsy, 2010). Este tipo de instabilidade alélica tem

sido estudado e descrito para locos SSR em diferentes variedades de uvas (Riaz et al., 2002; Franks et al., 2002; Bertsch et al., 2003; Hocquigny et al., 2004; Crespan, 2004; Moncada et al., 2005; 2006; Maia et al., 2009) e a estrutura quimérica dos locos SSR tem sido apontada como geradora e como justificativa para a existência de divergência genética entre clones das cultivares Cabernet Sauvignon e Pinot (Moncada et al., 2006). O termo quimerismo, ou quimeras, foi definido (Dermen, 1960) para caracterizar um tipo específico de mosaico genético, em que uma ou duas camadas inteiras de células do meristema apical são geneticamente distintas e cada uma permanece se desenvolvendo independente das camadas adjacentes, ou seja, as camadas de células do meristema contêm alelos diferentes (Thompson e Olmo, 1963). Embora este terceiro alelo do fenótipo de 3 bandas não tenha sido considerado para os cálculos do número de alelos e estimativas da divergência genética nos quatro acessos da cultivar Itália, a existência do terceiro alelo no loco *Udv32* aponta para uma diversidade genética real, maior que a estimada.

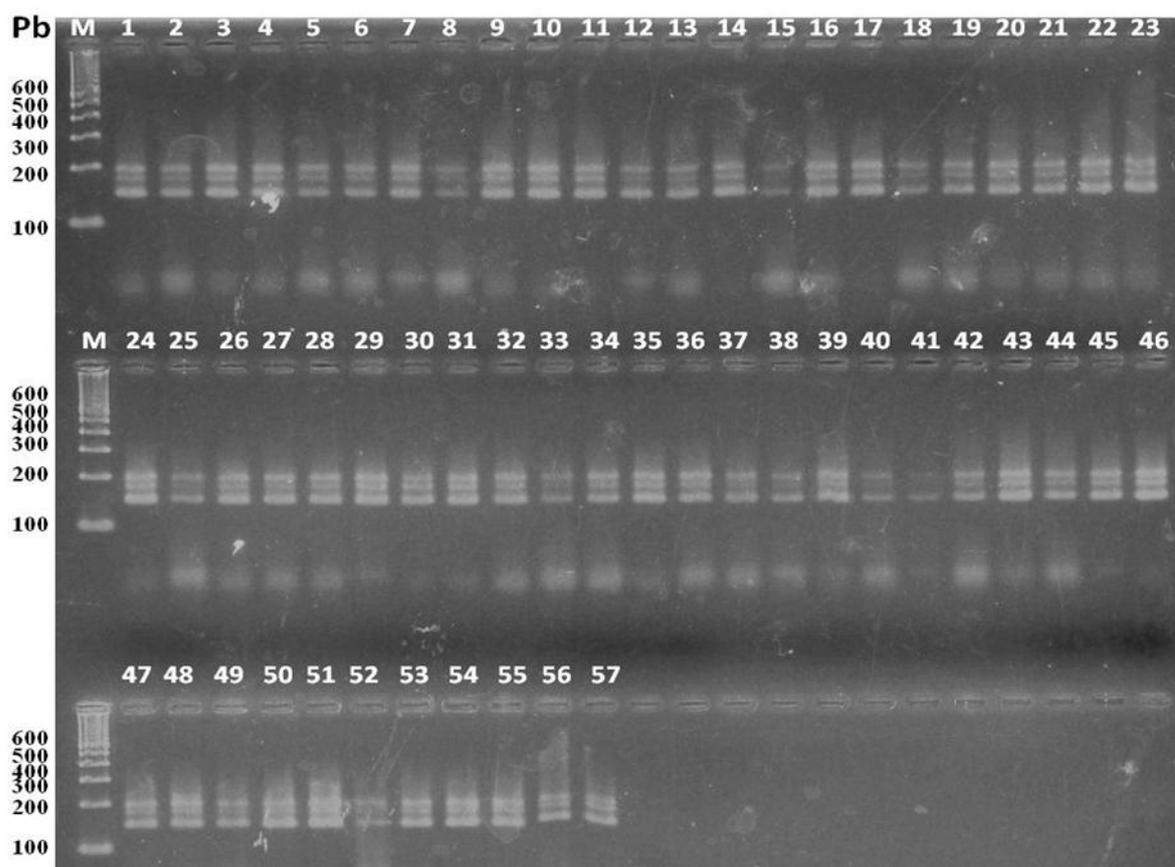


Figura 4 - Géis de agarose 4% (50% agarose comum e 50% agarose Metaphor), mostrando um terceiro alelo (c) encontrado juntamente com os alelos a e b, formando um fenótipo de 3 bandas (quimérico) para os DNAs de plantas dos quatro acessos da cultivar Itália amplificados com o *primer* do loco *Udv32*.

As relações de similaridade e distância genética de Nei entre as mostras dos quatro acessos estudados podem ser visualizadas no Quadro 11 e na Figura 5. Os valores de similaridade genética variaram de 0,8516 (entre as amostras dos acessos 2 e 4) a 0,9884 (entre as amostras dos acessos 1 e 3). A maior similaridade genética foi observada entre as plantas de um acesso de Marialva (acesso 1) e o acesso de Sarandi (acesso 3). Esta evidência indica que, apesar de os primeiros parreirais plantados no município de Marialva (PR), no ano de 1962, terem sido provenientes de material propagativo do município de Ferraz de Vasconcelos (SP), conforme o relato de Oliveira-Collet (2006), as mutações e/ou recombinações somáticas estabelecem um mosaico genético (Crespan, 2004; Martínez et al., 2006) e podem ser eventualmente fixadas e transferidas para novas plantas por propagação vegetativa, promovendo uma diferenciação do DNA entre clones de uma mesma origem.

Quadro 10 - Estimativa do número de alelos observados (Na), número efetivos de alelos (Ne), heterozigosidade observada (Ho), esperada (He), diversidade genética (Fis) e diferenciação genética (Fst) dos quatro acessos da cultivar Itália de *Vitis vinifera* L.

Locos	Na	Ne	Ho	He	Fis	Fst
<i>Udv01</i>	3	2,0294	0,0351	0,5117	0,9118	0,2244
<i>Vmc4d4</i>	2	1,9945	0,0000	0,503	1,0000	0,2616
<i>Vmc4a1</i>	2	2,0000	1,0000	0,5044	-1,0000	0,0000
<i>Scu08vv</i>	2	1,9011	0,0000	0,4782	1,0000	0,2055
<i>Udv085</i>	2	1,9945	0,9123	0,503	-0,8474	0,0086
<i>Udv096</i>	2	1,9945	0,2105	0,503	0,5370	0,1184
<i>Vmc4c6</i>	2	1,9994	0,9123	0,5043	-0,8400	0,0059
<i>Scu10vv</i>	2	2,0000	1,0000	0,5044	-1,0000	0,0000
<i>Udv011</i>	2	2,0000	1,0000	0,5044	-1,0000	0,0000
<i>Udv034</i>	2	2,0000	1,0000	0,5044	-1,0000	0,0000
<i>Scu15vv</i>	2	1,9514	0,8421	0,4918	-0,7521	0,0150
<i>Vvmd5</i>	2	1,5888	0,0000	0,3739	1,0000	0,0563
<i>Udv032</i>	2	2,0000	1,0000	0,5044	-1,0000	0,0000
Média	2,0769	1,9580	0,6086	0,4916	-0,3404	0,0688

A maioria dos clones em uma variedade são idênticos, mas alguns podem mostrar genótipos e até mesmo fenótipos divergentes. As diferenças entre os clones podem ser resultantes de polimorfismo clonal que ocorre principalmente devido a eventos naturais de mutações e estes podem ocorrer durante o desenvolvimento da videira (Hartmann et al., 2001), e/ou devido a modificações epigenéticas em

A organização de dois grupos relativamente divergentes com os quatro acessos de origem comum da cultivar Itália, mostra que os marcadores SSR usados para a análise foram adequados e efetivos para discriminar amostras muito similares da cultivar Itália, contrariando algumas evidências de que os marcadores SSR não são adequados para discriminar clones (Moncada et al., 2006). A investigação de Moncada et al. (2006) com 84 marcadores microssatélites revelou níveis de similaridade genética maiores que 97% em um conjunto de 59 clones de Cabernet Sauvignon coletados em sete países. Hocquigny et al. (2004) também descreveram níveis de similaridade genética maiores que 96%, em um conjunto de 145 clones de cinco cultivares Pinot, analisando 50 marcadores microssatélites. Nas amostras dos quatro acessos estudados no presente estudo, a análise dos 13 locos SSR mostrou um nível de similaridade inferior a 90% entre os acessos 2 e 4 ($I = 0,8516$), ambos cultivados na região de Marialva (PR) e com a mesma origem.

Uma análise bayesiana foi realizada para confirmar e explorar as relações genéticas entre os genótipos individuais. Esta análise foi realizada com o programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Para cada uma das 5 mil corridas, foram realizadas 50.000 repetições e o grupo mais apropriado foi selecionado por meio do método proposto por Evanno et al. (2005). O valor ótimo de K determinado pela análise Baysiana ($\Delta K_2 = 0,00$; $\Delta K_3 = 16,9334$; $\Delta K_4 = 1,1225$; $\Delta K_5 = 0,00$) indicou que as plantas dos quatro acessos foram agrupadas em três grupos. O *bar plot* obtido para o valor de K ($K = 3$; $\Delta K = 16,9334$) e os resultados foram consistentes com a evidência de que os alelos estão misturados nas amostras dos acessos 1, 3 e 4 e que, no acesso 2, ocorre o predomínio de alelos dos grupos vermelho e azul.

A análise do *bar plot* (Figura 6) indica a divisão das amostras de acordo com suas relações genéticas. Os três grupos de alelos podem ser observados nas amostras dos quatro acessos. Embora as amostras dos 4 acessos compartilhem uma parte dos três conjuntos de alelos, a frequência com que estes alelos são compartilhados em cada acesso imprime uma característica genética para cada um deles (Quadro 12). É possível observar que, nas amostras do acesso 2, existe maior proporção para o grupo de alelos simbolizados pelas cores verde e vermelha (0,557 e 0,417, respectivamente), e que o grupo de alelos simbolizado pela cor azul, frequente para as demais amostras, aparece em uma baixa frequência (0,025), determinando a diferenciação entre as amostras do acesso 2 e as amostras dos

demais acessos. Esta mesma forma de organização foi observada para a análise com o método UPGMA.

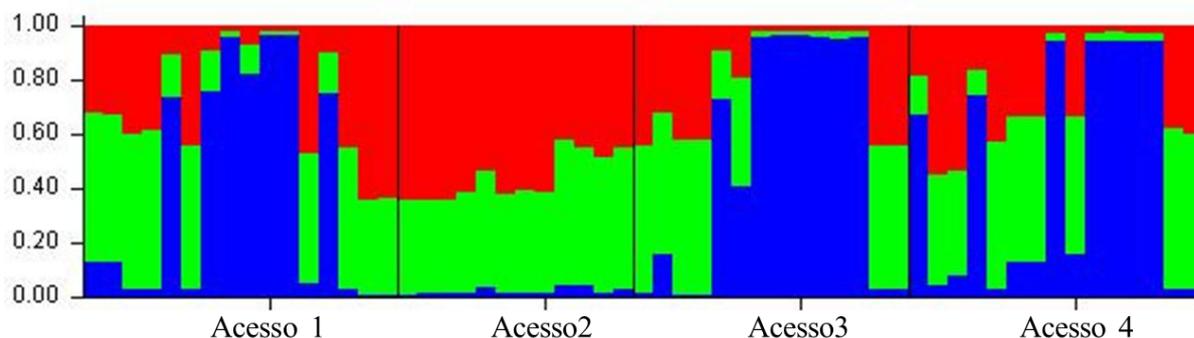


Figura 6 - *Bar plot* das amostras dos quatro acessos da cultivar Itália agrupadas em 3 grupos alélicos. Grupo 1 (vermelho), grupo 2 (verde) e grupo 3 (azul).

A Figura 6 ilustra claramente a similaridade entre as amostras dos acessos 1, 3 e 4 e a divergência das amostras do acesso 2. No bar plot, é evidente que as amostras do acesso 2 se diferenciam das demais, devido à frequência menor de alelos do grupo 3 (azul), sugerindo que a diferenciação genética nos acessos da cultivar Itália de origem comum pode ocorrer devido à perda de alelos. A heterozigosidade alta como resultado do cruzamento entre Bicane e Moscatel de Hamburgo que originou a cultivar Itália (Souza, 1996) parece se perder em determinado acesso (acesso 2, por exemplo), levando à diferenciação genética do mesmo. Esta sugestão de perda de alelos levando a uma diferenciação genética pode ser sustentada pela evidência do não surgimento de novos alelos nos locos SSR no período de 6 anos (2006 – 2012). As mutações somáticas em nível de DNA nos acessos de Itália da região de Marialva não ocorrem devido ao surgimento de novos alelos em locos SSR.

Quadro 12 - Número de acessos, proporção de plantas distribuídas em cada grupo alélico e número de plantas analisadas em cada acesso

Acessos	Grupos			Nº de plantas
	1	2	3	
1	0,278	0,320	0,403	16
2	0,557	0,417	0,025	12
3	0,204	0,283	0,514	14
4	0,249	0,298	0,453	15

4.2. Análise do marcador ISSR

Apenas 14 dos 30 *primers* para ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) testados amplificaram e apresentaram padrão bem definido de bandas no gel: ISSR-2, ISSR-5, ISSR-6, ISSR-8, ISSR-18, ISSR-19, ISSR-20, ISSR-21, ISSR-23, ISSR-807, ISSR-811, ISSR-813, ISSR-822 e ISSR-825 (Quadro 13). Esses 14 *primers* foram utilizados para amplificar o DNA das 57 amostras dos quatro acessos, gerando 135 segmentos de DNA reproduzíveis (bandas), dos quais 23 foram polimórficos nas amostras do acesso 1 (polimorfismo de 17,04), 26 nas amostras do acesso 2 (polimorfismo de 17,78), 28 nas amostras do acesso 3 (polimorfismo de 20,74) e 31 nas amostras do acesso 4 (polimorfismo de 22,96) (Quadro 14). O número de bandas produzidas para cada *primer* variou de 7 a 13, com uma média de 9,64 segmentos de DNA por *primer*. O menor número de segmentos (7) foi produzido pelos *primers* ISSR-2, ISSR-6 e ISSR-20 e o maior número de segmentos (13) foi produzido pelo *primer* ISSR-5 (Quadro 13). O padrão de segmentos de DNA amplificados pelo *primer* ISSR-811 está apresentado na Figura 7.

A proposta de usar marcadores ISSR para analisar o polimorfismo em nível de DNA das amostras de acessos da cultivar Itália pode ser considerado uma estratégia promissora e interessante para comparar amostras de acessos, porque o número de segmentos inter locos SSR amplificadas no presente estudo foi mais alto (135) do que os números de segmentos amplificados descritos em outros estudos com videiras (Argade et al., 2009; Hassan et al., 2011; Zeinali et al., 2012). Argade et al. (2009) descreveram 94 marcadores ISSR em 43 variedades de uvas sem sementes, usando o mesmo número de *primers* (14) usado no presente estudo com os clones de Itália. Hassan et al. (2011) aplicaram 10 *primers* para ISSR em variedades de uvas egípcias e encontraram 48 segmentos amplificados. Em variedades de uvas do Irã, Zeinali et al. (2012) descreveram 91 segmentos amplificados. Nestes estudos, assim como em outros estudos com uvas (Nookaraju e Agrawal, 2012; Jing e Wang, 2013), os marcadores ISSR têm sido apontados como promissores para comparar variedades, devido ao número, à definição clara e à reprodutibilidade de segmentos amplificados. Em estudos onde foram usados marcadores RAPD e ISSR para comparar cultivares de *V. vinifera* no Chile (Cabernet sauvignon, Cabernet franco, Merlot e Carmenere), as duas técnicas foram capazes de distinguir as cultivares, mas o poder de resolução do ISSR foi

considerado superior ao do RAPD, sugerindo que este seria o marcador mais adequado para analisar um grande número de cultivares. Com este marcador, foi possível detectar variabilidade entre clones de Merlot chileno e francês, com um alto grau de divergência (64%) entre eles, sugerindo que o Merlot francês não é nem mesmo um parente próximo do estoque do Merlot do Chile (Herrera et al., 2002).

Quadro 13 - *Primers*, sequências de nucleotídeos dos *primers* ISSR e número de segmentos por *primer* amplificados nas amostras dos quatro acessos da cultivar Itália

<i>Primers</i>	Sequências (5' → 3')	T. de anelamento (°C)	Segmentos amplificados
ISSR-6	(AG) ₈ TA	51°C	7
ISSR-807	(AG) ₈ T	50,5°C	11
ISSR-811	(GA) ₈ C	50,5°C	11
ISSR-813	(CT) ₈ T	49,5°C	10
ISSR-19	(AG) ₈ TG	50°C	9
ISSR-20	(AG) ₈ CC	50°C	7
ISSR-825	(AC) ₈ T	49,5°C	11
ISSR-2	(AC) ₈ AG	51°C	7
ISSR-822	(TC) ₈ ^a	50,5°C	9
ISSR-23	(AG) ₈ AT	51,5°C	11
ISSR-21	(GA) ₈ T	50°C	9
ISSR-18	(AG) ₈ TT	50°C	10
ISSR-5	(AC) ₈ AA	51°C	13
ISSR-8	(ACTC) ₄	51°C	10
TOTAL			135

O polimorfismo nas sequências inter locos SSR (ISSR) foi alto (80%) nas 57 plantas dos quatro acessos, mas baixo entre as amostras de cada acesso analisado. O polimorfismo nas ISSR foi maior para as amostras do acesso 4 (22,96%). O índice de Shannon (h) e a diversidade genética de Nei (i) usados como parâmetros para expressar a diversidade genética em amostras de populações, também foram maiores nas amostras do acesso 4 (Quadro 14). Os valores de índice de Shannon e de diversidade genética descritos com os marcadores ISSR em uvas têm sido maiores dos estimados nas amostras dos acessos da cultivar Itália. Jing e Wang (2013) descreveram valores maiores, tanto para índice de Shannon (0,40) como

para a diversidade genética de Nei (0,24), usando ISSR para estudar a relação genética entre espécies de uvas selvagens chinesas e cultivares americanas e europeias.

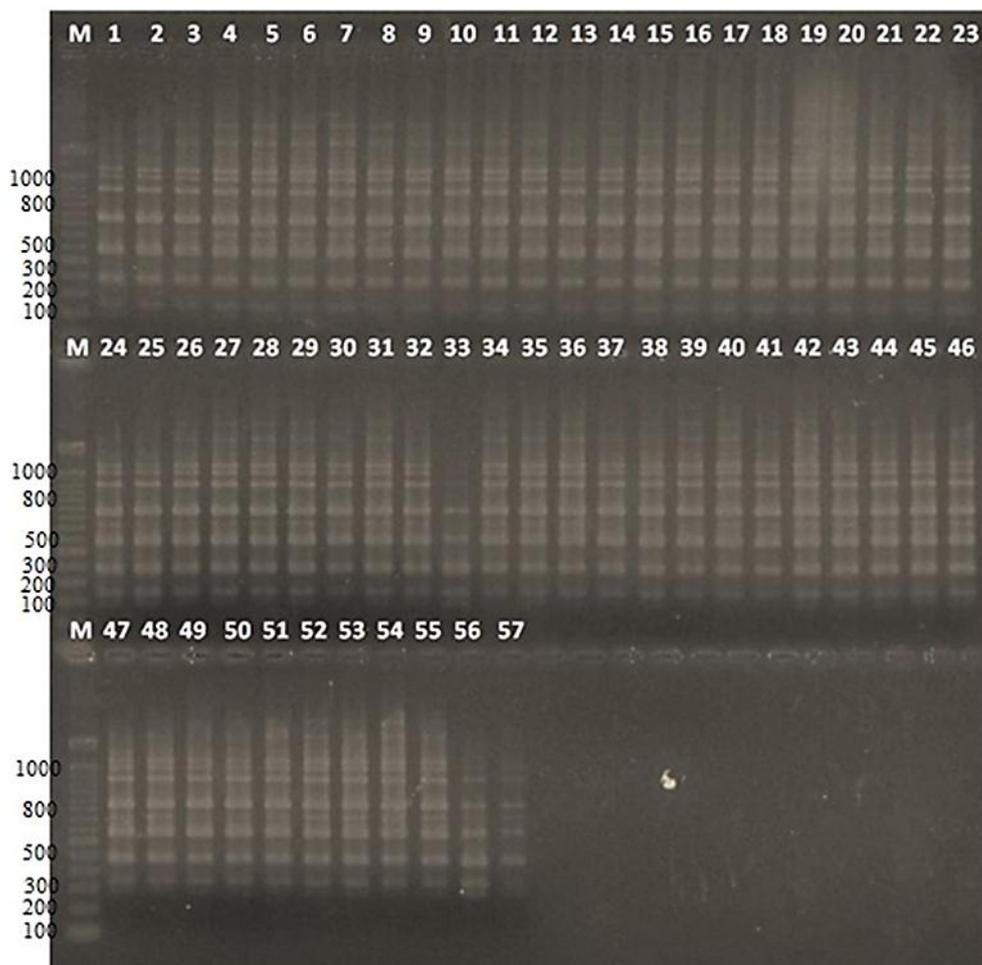


Figura 7 - Gel de agarose comum concentrado 1,5%, utilizado para separar os segmentos amplificados de DNAs das 57 amostras dos quatro acessos da cultivar Itália pelo *primer* ISSR-811. M é o marcador de peso molecular DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen).

O nível de divergência genética estimado para os marcadores de ISSR das amostras dos quatro acessos da cultivar Itália, representado por G_{st} , foi alto ($G_{st} = 0,2127$). Este alto valor se deve à grande variação para alguns segmentos de ISSR, indicando que os quatro acessos de origem comum formam amostras geneticamente estruturadas, onde a diversidade genética é baixa dentro das amostras de cada acesso e alta entre as amostras dos quatro acessos. De acordo com Wright (1978), valores de G_{st} entre 0,15 e 0,25 indicam alto nível de divergência interpopulacional

ou alto nível de diferenciação genética entre as populações. Portanto, o polimorfismo nas sequências interlocos SSR promove divergência genética entre as amostras dos quatro acessos.

Quadro 14 - Amostras de acessos, Número de alelos observados (Na), Número efetivo de alelos (Ne), Índice de Shannon (h), Diversidade genética de Nei (1973)(i), N° de locos polimórficos e a porcentagem de locos polimórfico

Acessos	Na	Ne	h	i	N° de locos polimórficos	% de locos polimórficos
Acesso 1	1,1704	1,1429	0,0765	0,1089	23	17,04%
Acesso 2	1,1926	1,1642	0,0875	0,1241	26	19,26%
Acesso 3	1,2074	1,1496	0,0841	0,1222	28	20,74%
Acesso 4	1,2296	1,1708	0,0954	0,138	31	22,96%
Média/locos	1,3407	1,1826	0,1095	0,1671	108	80%

O valor de similaridade genética estimado pelo coeficiente de Nei (NEI, 1972) evidenciou que as amostras dos acessos 2 e 3 são as mais similares ($I = 0,9801$) e que as amostras dos acessos 1 e 4 são as mais divergentes ($I = 0,9503$) (Quadro 15). O dendrograma representando as relações de identidade entre os quatro acessos está na Figura 8. Este dendrograma mostra a formação de dois grupos. A amostras dos acessos 1, 2 e 3 foram organizadas no primeiro grupo e a amostra do acesso 4, que apresenta o maior polimorfismo nos marcadores ISSR, está isolada no segundo grupo. O intervalo dos valores de identidade genética entre 0,9503 e 0,9803 estimados indica a base genética estreita das amostras dos quatro acessos, que deve ser devido à origem comum destes acessos. A base genética revelada com os marcadores ISSR em uvas tem sido mais ampla. Jing e Wang (2013) descreveram um intervalo de 0,08 a 0,93 entre espécies de uvas selvagens chinesas e cultivares americanas e europeias, indicando grande diversidade entre os acessos destas uvas, que pode ser justificado pela origem diversa das mesmas.

Uma base genética estreita nas amostras dos quatro acessos da cultivar Itália também foi evidente quando as 57 plantas foram individualmente comparadas, usando o coeficiente de Jaccard e com o programa NTSYS (Rohlf, 1989). Os valores de identidade genética entre as plantas foram observados no intervalo de 0,8358 (entre a planta 7 do acesso 1 e a planta 24 do acesso 2; entre a planta 8 do acesso 1 e a planta 24 do acesso 2) a 1,0000 (plantas 17 e 18 do acesso 2). O

dendrograma gerado a partir da análise de similaridade genética, representado na Figura 9, mostrou a organização de um grupo maior (um grande grupo), onde estão agrupadas 92% das plantas, e um grupo menor, com apenas 8% das 57 plantas dos acessos da cultivar Itália. No dendrograma da Figura 9 também está evidente os efeitos da origem comum dos quatro acessos. O polimorfismo observado nas regiões de ISSR foi alto (80%) e o índice de similaridade também (0,9503 – 0,9801 entre acessos, e 0,8358 – 1,0000 entre plantas).

Quadro 15 - Coeficiente de similaridade e distância genética de Nei, avaliados para os quatro acessos da cultivar Itália

Acessos	1	2	3	4
1	****	0,9742	0,9694	0,9503
2	0,0261	****	0,9801	0,9758
3	0,0311	0,0201	****	0,9676
4	0,051	0,0245	0,0329	****

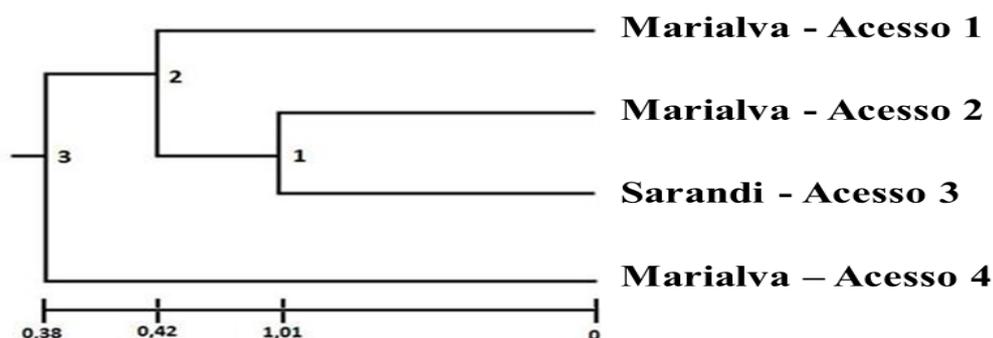


Figura 8 - Dendrograma da distância genética entre as amostras dos quatro acessos da cultivar Itália. A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA empregando o programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al., 1999).

Além das análises realizadas com o coeficiente de Nei (1973) e com o coeficiente de Jaccard, foi realizada uma análise bayesiana das relações genéticas para os dados obtidos com ISSR. Para esta análise, foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para cada uma das 5 mil corridas, foram realizadas 50.000 repetições e o grupo mais apropriado foi selecionado por meio do método proposto por Evanno et al. (2005). O valor ótimo de K, determinado pela análise Baysiana, indicou que as plantas dos quatro acessos foram agrupadas em três grupos (K = 3; $\Delta K = 1,6808$). O *bar plot* obtido para o valor de K (K = 3; $\Delta K = 1,6808$) está representado na Figura 10 e os resultados mostram que a maioria das

plantas (96,5%) pertencem ao grupo 3 (azul), 2% ao grupo 1 (vermelho) e apenas 1,5% pertencem ao grupo 2 (verde).

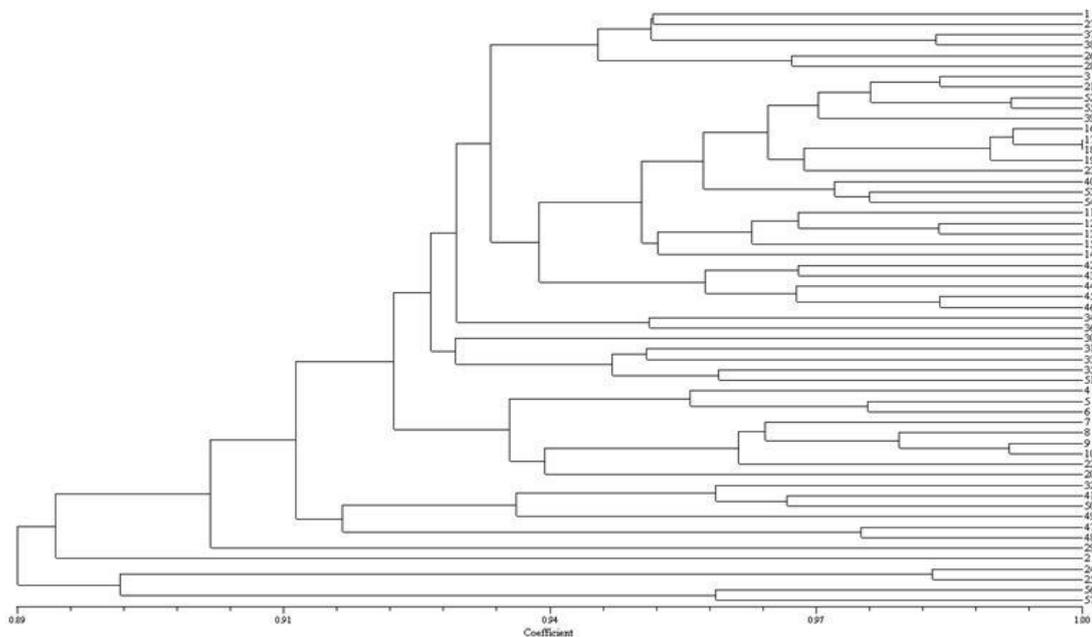


Figura 9 - Dendrograma construído para as 57 amostras dos quatro acessos da cultivar Itália analisadas com marcadores de ISSR utilizando o programa Ntsys-pc - 2.02K(ROHLF, 2000) e o método de UPGMA.

A prevalência de homogeneidade de plantas compartilhando o mesmo grupo azul no *bar plot* reflete bem a origem comum das amostras dos quatro acessos da cultivar Itália, apesar do polimorfismo alto (80%) identificado nas regiões inter locos SSR.

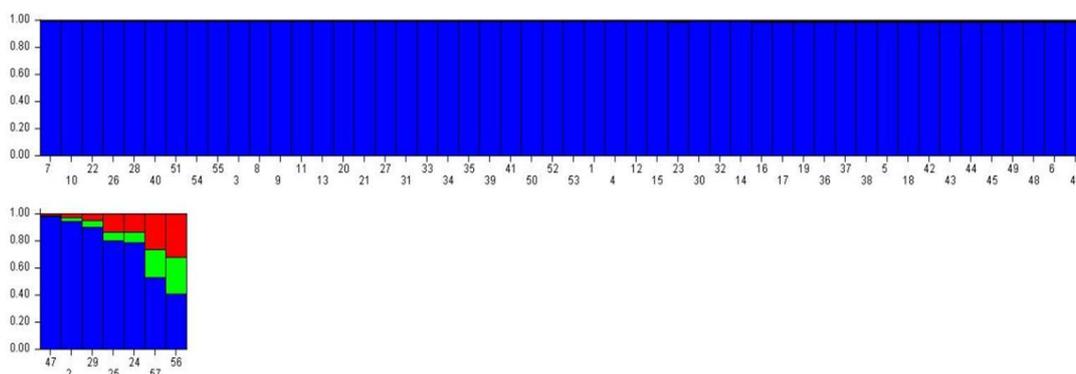


Figura 10 - Dendrograma obtido com o programa Structure para as 57 plantas de uva Itália analisadas com ISSR.

A análise da divergência genética entre as amostras dos quatro acessos (F_{ST}) da cultivar Itália, utilizando o marcador SSR, foi de 0,0688 (Quadro 10), indicando um nível moderado de divergência genética entre as mesmas. Este resultado difere dos obtidos com o marcador ISSR. Para este marcador, o valor de G_{ST} foi de 0,2127, indicando que, com esta análise, é possível observar um alto nível de variação entre as 57 amostras dos quatro acessos. Este resultado é um reflexo das diferentes sequências do genoma avaliadas por estes dois marcadores.

Os microssatélites, no presente trabalho, revelaram similaridade entre 85,16% a 98,84% e os resultados permitiram a separação das amostras dos quatro acessos em 2 grupos: no primeiro grupo temos as amostras dos acessos 1, 3 e 4 e no segundo grupo as amostras do acesso 2. Para o ISSR, a relação de similaridade e de distância genética de Nei entre as amostras dos quatro acessos foi de 0,9503 entre as amostras de acessos 1 e 4 e de 0,9801 entre as amostras de acessos 2 e 3. Para o ISSR, também observamos a formação de 2 grupos: no primeiro grupo estão as amostras de acessos 1, 2 e 3 e no segundo as amostras do acesso 4. A avaliação das sequências de ISSR indica que os quatro acessos de origem comum apresentam a variação distribuída no genoma de todas as 57 amostras dos quatro acessos, não possibilitando que estes fossem discriminados.

5. CONCLUSÕES

a) Marcadores microssatélites foram utilizados nesta análise para averiguar a estabilidade genética em plantas de acessos da cultivar Itália e foi possível constatar que, em um período de 6 anos de cultivo, esta cultivar tem se mantido inalterada, apresentando estabilidade genética. Este fato pode ser constatado pelo número de alelos mantidos em análise realizada em 2006 (2,12 alelos) e em 2012 (2,08 alelos).

b) O polimorfismo observado para as sequências de microssatélites foi de 61,54%. Os resultados obtidos com este marcador possibilitaram discriminar amostras muito similares dos quatro acessos da cultivar Itália, contrariando as evidências de que os marcadores microssatélites não são adequados para discriminar clones.

c) As sequências inter microssatélites (ISSR) apresentaram um polimorfismo de 80%. Apesar do alto polimorfismo para este marcador, com os resultados obtidos, não é possível discriminar as amostras dos quatro acessos. Os marcadores de ISSR indicam que os quatro acessos de origem comum apresentam a variação distribuída no genoma de todas as amostras e isso é observado pelo alto índice de similaridade entre os acessos e entre as plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAR, G.; YILDIRIM N.; ERCISLI, S.; ERGUL, A.; YUKSEL, C. Determination of Genetic Diversity of *Vitis vinifera* cv. Kabarcik Populations from the Coruh Valley Using SSR Markers. **Biochemical Genetics**, 50:476–483, 2012.
- ALLEWELDT, G.; DETTWEILER, E. **The resources of vitis**: world list of grapevine collections. Weinsberg: Geilweilwehof, 1994.
- ALMEIDA, C.M.A. **Diversidade genética em populações de *Aechmea fulges Brong.* (Bromeliaceae) na Mata Atlântica de Pernambuco**. Recife: UFRPE. 2006 55p.
- AMBROSI, H.; DETTWEILER, E.; RÜHL, E.H.; SCHMID, J.; SCHUMANN, F. **Farbatlas Rebsorten: 300 Sorten und ihre Weine**. Stuttgart Ulmer: Verlag, 1994. 533p.
- ARADHYA, M.; WANG Y.; WALKER, M.A.; PRINS, B.H.; KOEHMSED, M.A.; VELASCO, D.; GERRATH, J.M.; DANGL, G.S.; PREECE J.E. Genetic diversity, structure, and patterns of differentiation in the genus *Vitis*. **Plant Systematics and Evolution**. 299:317–330, 2013.
- ARGADE, N.C.; TAMHANKAR, S.A.; KARIBASAPPA, G.S.; PATIL, S.G.; RAO, V.S. DNA Profiling and Assessment of Genetic Relationships Among Important Seedless Grape (*Vitis vinifera*) Varieties in India Using ISSR Markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 18:45-51, 2009.
- ARNOLD, C.; ROSSETTO, M.; MCNALLY, J.; HENRY, R.J. The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. **American Journal of Botany**, 89:22-28, 2002.
- ARROYO-GARCIA. R.; RUIZ-GARCIA, L.; BOLLING, L.; OCETE, R.; LOPEZ, M.A.; ARNOLD, C. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. **Molecular Ecology**, 15:3707–3714, 2006.
- BACILIERI, R.; LACOMBE, T.; CUNFF, L.L.; VECCHI-STARAZ, M.; LAUCOU, V.; GENNA, B.; PÉROS, J.P.; THIS, P.; BOURSQUOT, J.M. Genetic structure in

cultivated grapevines is linked to geography and human selection BMC. **Plant Biology**, 1:13-25, 2013.

BALOCH, F.S.; CEMAL, K.; ARIOGLU, H.; OZKAN, H. Assaying of diversity among soybean (*Glycin max* (L.) Merr.) and peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes at DNA level. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 34:285–301, 2010.

BENJAK, A.; FORNECK, A.; CASACUBERTA, J.M. Genome-wide analysis of the “cut-and-paste” transposons of grapevine. **PLoS ONE**, 3:e3107, 2008.

BERTSHC, C.; KIEFFER, F.; TRIOULEYRE, C.; BUTTERLIN, G.; MERDINOGLU, D.; WALTER, B. Molecular profiling of *Vitis vinifera* Chardonnay obtained by somatic embryogenesis. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, 34:223-227, 2003.

BLAICH, R. The analysis of restriction fragment length polymorphism as a tool for the differentiation of grapevine cultivars. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, 42:33-35, 1989.

BORBA, R.S.; GARCIA, M.S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A.C.; ZIMMER, P.D.; BRANCO, J.S.C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, 34:565-569, 2005.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2009. 531p.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology**, 19:209–215, 2001.

BOURQUIN, J.C; OTTEN, L.; WALTER, B. PCR-RFLP analysis of *Vitis*, *Ampelopsis* and *Parthenocissus* and its application to the identification of rootstocks. **Vitis**, 34:103–108, 1995.

BOURQUIN, J.C.; TOURNIER, P.; OTTEN, L.; WALTER, B. Identification of sixteen grapevine rootstocks by RFLP and RFLP analysis of nuclear DNA extracted from the wood. **Vitis**, 31:157-162, 1992.

BOURSIQUOT, J.M.; THIS, P. Essai de definition du cepage. **Progrès Agricole et Viticole**, 116:359–361, 1999.

- BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, 39: 628-633, 1996.
- BOWERS, J.E.; MEREDITH, C.P. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. **Nature Genetics**, 16: 84–87, 1997.
- BOWERS, J.E.; BANDMAN, E.B.; MEREDITH, C.P. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. **American Journal of Enology and Viticulture**, 44:266-274, 1993.
- BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BACHMANN, O.; BLAICH, R. On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Vitis**, 33:15-17, 1994.
- BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BLAICH, R. Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of Random Amplified Polymorphic DNA techniques using 10-mer primers. **Vitis**, 32:187-188, 1993.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: MG. 2006. p. 9-78.
- CAMARGO, U.A. Cultivares para a Viticultura Tropical no Brasil. **Informe Agropecuário – EPAMIG**, 19:15-19, 1998.
- CARIMI, F.; MERCATI, F.; ABBATE, L.; SUNSERI, F. Microsatellite analyses for evaluation of genetic diversity among Sicilian grapevine cultivars. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 57:703–719, 2010.
- CASTRO, I.; D'ONOFRIO C.; MARTÍN, J.P.; ORTIZ, G.M.; LORENZIS, G.; FERREIRA, V.; PINTO-CARNIDE, O. Effectiveness of AFLPs and Retrotransposon-Based Markers for the Identification of Portuguese Grapevine Cultivars and Clones. **Molecular Biotechnology**, 52:26–39, 2011.
- CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; RODRÍGUEZ-TORRES, I.; CHAVEZ, J.; CABELLO, F.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. Varietal diversity within grapevine accessions of cv. Tempranillo. **Vitis**, 41:33–36, 2002.

- CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; SÁNCHEZ-ESCRIBANO, E.; CENIS, J.L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Characterization of genetic variation within table grape varieties (*Vitis vinifera* L.) based on AFLP markers. **Vitis**, 39:109-114, 2000.
- CERVERA, M.T.; RODRIGUEZ, I.; CABEZAS, J.A.; CHAVEZ, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; CABELLO, F. Morphological and molecular characterization of grapevine accessions known as “Albillo”, one of the oldest varieties grown in Spain. **American Journal of Enology and Viticulture**, 52:127–135, 2001.
- CHUNG, M.G.; EPPERSON, B.K. Clonal and spatial genetic structure in *Eurya emarginata* (Theaceae). **Heredity**, 84:170–177, 2000.
- CIPRIANI, G.; FRAZZA, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. **Vitis**, 33:211–215, 1994.
- CIPRIANI, G.; SPADOTTO, A.; JURMAN, I.; GASPERO, G.; CRESPIAN, M.; MENEGHETTI, S.; FRARE, E.; VIGNANI, R.; CRESTI, M.; MORGANTE, M.; PEZZOTTI, M.; PE, E.; POLICRITI, A.E.; TESTOLIN, R. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. **Theoretical and Applied Genetics**, 121:1569–1585, 2010.
- COLLIER, L.; LARGAESPADA, D. Transposable elements and the dynamic somatic genome. **Genome Biology**, 8:S5, 2007.
- CRESPIAN, M. Evidence on the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 108:231–237, 2004.
- CRETAZZO, E.; MENEGHETTI, S.; DE ANDRÉ, M.T.; GAFORIO, L.; FRARE, E.E.; CIFRE, J. Clone differentiation and varietal identification by means of SSR, AFLP, SAMPL and M-AFLP in order to assess the clonal selection of grapevine: the case study of Manto Negro, Callet and Moll, autochthonous cultivars of Majorca. **Annals of Applied Biology**, 157:213–227, 2010.
- D’ONOFRIO, C.; LORENZIS, G.; GIORDANI, T.; NATALI, L.; CAVALLINI, A.; SCALABRELLI, G. Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. **Tree Genetics & Genomes**, 6:451–466, 2010.
- DE ANDRÉS, M.T.; BENITO, A.; PEREZ-RIVERA, G.; OCETE, R.; LOPEZ, M.A.; GAFORIO, L.; MUÑOZ, G.; CABELLO, F.; MARTINEZ ZAPATER J.M.; ARROYO-

- GARCIA, R. Genetic diversity of wild grapevine populations in Spain and their genetic relationships with cultivated grapevines. **Molecular Ecology**, 21:800–816, 2012.
- DE KROON, H.; VAN GROENENDAEL, J. **The ecology and evolution of clonal growth in plants**. Netherlands: Backhuys Publishers, 1997. 453p.
- DERAGON, J.; CASACUBERTA, J.M.; PANAUD, O. Plant transposable elements. **Plant Genomes**, 4:69–82, 2008.
- DERMEN, H. Nature of plant sports. **Am Horticult Magazine**, 39:123–173, 1960.
- DI GASPERO, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R.; EDWARDS, K.J.; CIPRIANI, G. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. **Theoretical and Applied Genetics**, 101:301-308, 2000.
- DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, 19:4008, 1991.
- DOULATI-BANEH, H.; MOHAMMADI, S.A.; LABRA, M. Genetic structure and diversity analysis in *Vitis vinifera* L. cultivars from Iran using SSR markers. **Scientia Horticulturae**, 160: 29-36, 2013.
- EARL, D.A.; VON, H.B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, 4:359–361, 2009.
- ECKERT, C.G. Clonal plant research: proliferation, integration, but not much evolution. **American Journal of Botany**, 86:1649–1654, 1999.
- EMANUELLI, F.; LORENZI, S.; GRZESKOWIAK, L.; CATALANO, V.; STEFANINI, M.; TROGGIO, M.; MYLES, S.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; ZYPRIAN, E.; MOREIRA, F.M.; GRANDO M.S. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. **BMC Plant Biology**, 13:39, 2013.
- ERGUL, A.; PEREZ-RIVERA, G.; SOYLEMEZOGLU, G.; KAZAN, K.; ARROYO-GARCIA, R. Genetic diversity in Anatolian wild grapes (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*) estimated by SSR markers. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, 9:375–383,2011.

- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14:2611-2620, 2005.
- FANIZZA, G.; CHAABANE, R.; RICCIARDI, L.; RESTA, P. Analysis of a spontaneous mutant and selected clones of cv. Italia (*Vitis vinifera*) by AFLP markers. **Vitis**, 42:27–30, 2003.
- FERNÁNDEZ, M.P.; NUÑEZ, E.Y.; PONZ, F.; GERNÁIZ, S.; GALLEGO, F.J.; IBÁÑEZ, J. Characterization of sequence polymorphisms from microsatellite flanking regions in *Vitis* spp. **Molecular Breeding**, 22:455-465,2008.
- FILIPPETTI, I.; SILVESTRONI, O.; THOMAS, M.R.; INTRIERI, C. Diversity assessment of seedlings from self-pollinated Sangiovese grapevines by ampelography and microsatellite DNA analysis. **Vitis**, 38: 67–71, 1999.
- FORNECK, A. Plant breeding: clonality - a concept for stability and variability during vegetative propagation. **Progress in botany**, 66:164–183, 2005.
- FORNECK, A.; KONRADI, J.; BLAICH, R. Über die genetische Diversität der Burgunderreben und ihrer Klone. **Dtsch Weinbau-Jhrb**, 54:71–78, 2003a.
- FORNECK, A.; KONRADI, J.; BLAICH. A genetic variation analysis of *V. vinifera* cv. Pinot noir. **Acta Horticulturae**, 603:167–171, 2003b.
- FRANKS, T.; BOTTA, R.; THOMAS, M.R. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, 109:192–199, 2002.
- FRUTICULTURA - **Análise da Conjuntura Agropecuária**. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia, Dezembro de 2012. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2012_13.pdf. Acesso em: 06, janeiro, 2014.
- GALET, P. **Dictionnaire encyclopédique des cépages**. Hachette, 2000. 936p.
- GONÇALVES, J.A. **Paraná descobre nova variedade de uva**. São Paulo: Folha de São Paulo, 12, dezembro, 1995.
- GORGOCENA, Y.; ARULSEKAR, S.; DANDEKAR, A.M.; PARFITT, D.E. Molecular markers for grape characterization. **Vitis**, 32:183-185,1993.

- GOTO-YAMAMOTO, N. Phenetic clustering of grapes (*Vitis* spp.) by AFLP analysis. **Breeding Science**, 50:53–57, 2000.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, 122:81-89, 2001.
- HASSAN, N.A.; EL-HOMOSANY, A.; GOMMA, A.H.; SHAHEEN, M.A. Morphological and Issr Polymorphisms in Some Egyptian Grapes (*Vitis vinifera* L.) Collection. **World Applied Sciences Journal**, 15:1369-1375, 2011.
- HE, Q.; LIANG, G.; XIE, J.; LI, W. Genetic diversity analysis of wax apple germplasm by ISSR markers. **Acta Horticulturae Sinica**, 33:392–394, 2006.
- HERRERA, R.; CARES, V.; WILKINSON, M.J.; CALIGARI, P.D.S. Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. **Euphytica**, 124:139–145, 2002.
- HIDALGO, L. **Tratado de viticultura general**. Madrid: Mundi-Prensa, 1993. 983p.
- HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. Monitoramento nutricional e fertilização em macro, mini e microjardim clonal de *Eucalyptus*. In: **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p. 191-217.
- HOCQUIGNY, S.; PELS, F.; DUMAS, V.; KINDT, S.; HELOIR, M.C.; MERDINOGLU, D. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. **Genome**, 47:579-589, 2004.
- IMAZIO, S.; LABRA, M.; GRASSI, F.; WINFIELD, M.; BARDINI, M.; SCIENZA, A. Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar Traminer. **Plant Breeding**, 121: 531-535, 2002.
- JACKSON, R.S. Grape Species and Varieties. In: Wine science: Principles and applications. **Academic Press**, 2: 11-31, 1994.
- JAHNKE, G.; MAJER, J.; VARGA, P.; SZOKE, B. Analysis of clones of Pinots grown in Hungary by SSR markers. **Scientia Horticulturae**, 129: 32–37, 2011.
- JANICK, J.; MOORE, J.N. **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. 623p.

- JEAN-JAQUES, I.; DEFONTAINE, A.; HALLET, J.N. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Vitis**, 32:189-190, 1993.
- JING, Z.; WANG, X. Genetic relationship between Chinese wild *Vitis* species and American and European Cultivars based on ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, 46:120–126, 2013.
- JOSHI, S.P.; GUPTA, V.S.; AGGARWAL, R.K.; RANJEKAR, P.K.; BRAR, D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, 100:1311–1320, 2000.
- KAEPPLER, S.M.; KAEPPLER, H.F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, 43:179-188, 2000.
- KISHINO, A.; MASHIMA, M. Uva: *Vitis vinifera* L. In: **Manual agropecuário do Paraná**. Londrina: IAPAR, 1980. p. 138-177.
- KISHORE, G.; PANDEY, A.; DOBHAL, R.; GUPTA, S. Population Genetic Study of *Fagopyrum tataricum* from Western Himalaya Using ISSR Markers. **Biochemical Genetics**, 51:750–765, 2013.
- KLEKOWSKI, E.J.; GODFREY, P.J. Aging and mutation in plants. **Nature**, 340:389–391, 1989.
- KOZJAK, P.; KOROSK-KORUZA, Z.; JAVORNIK, B. Characterisation of cv. Refosk (*Vitis vinifera* L.) by SSR markers. **Vitis**, 42:83–86, 2003.
- LEÃO, P.C.S.; MOTOIKE S.Y. Diversidade genética em uvas de mesa por meio de marcadores moleculares RAPD e microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46:1035-1044, 2011.
- LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, 1: 205-208, 2001.
- LODHI, M.A.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. Characterization of RAPD markers in *Vitis*. **Vitis**, 36:133-140, 1997.
- LOPES, M.S.; SANTOS, M.R.S.; EIRAS DIAS, J.E.; MENDONÇA, D.; CÂMARA MACHADO, A. Discrimination of Portuguese grapevines based on microsatellite markers. **Journal of Biotechnology**, 127:34-44, 2006.

LOUREIRO, M.D.; MARTINEZ, M.C.; BOURSIQUOT, J.M.; THIS, P. Molecular marker analysis of *Vitis vinifera* 'Albarino' and some similar grapevine cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 123:842–848, 1998.

MAIA, S.H.Z. **Diversidade Genética na Cultivar de Uva Itália (*Vitis vinifera* L.), Utilizando Marcadores Microssatélites**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 46p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

MAIA, S.H.Z.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic diversity in somatic mutants of grape (*Vitis vinifera* L). Cultivar Italia based on random amplified polymorphic DNA. **Genetics and Molecular Research**, 8:28-38, 2009.

MAIA, S.H.Z.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic diversity in somatic mutants of grape (*Vitis vinifera* L). cultivar Italia based on random amplified polymorphic DNA. **Genetics and Molecular Research**: 1-11, 2008.

MANIMEKALAI, R.; NAGARAJAN, P. Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. **Scientia Horticulturae**, 108:49–54, 2006.

MANNINI, F. Clonal selection in grapevine: interactions between genetic and sanitary strategies to improve propagation material. **Acta Horticulturae**, 528:703–712, 2000.

MARTINEZ, E.L.; CAVAGNARO, F.P.; MASUELLI, W.R.; ZUNIGA, M. SSR based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. **Plant Science**, 170:1036-1044, 2006.

MELETTI, L.M.M. Propagação de frutíferas tropicais. Guaíba: **Agropecuária**, 2000. 239p.

MELLO, L.M.R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2009. **Embrapa uva e vinho**, Bento Gonçalves, 2010. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2009vf.pdf>. Acesso em: 30, março, 2010.

MELONI, M.; PERINI, D; FILIGHEDDU, R.; BINELLI, G. Genetic variation in five Mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Annals of Botany**, 97: 299–304, 2006.

- MENEGHETTI, S.; COSTACURTA, A.; CRESPIAN, M.; MAUL, E.; HACK, R.; REGNER, F. Deepening inside the homonyms of Wildbacher by means of SSR markers. **Vitis**, 48-3:123-129, 2009.
- MENEGHETTI, S.; COSTACURTA, A.; FRARE, E.; ROLD, G.; MIGLIARO, D.; MORREALE, G.; CRESPIAN, M.; SOTE´S, V.; CALÒ,A. Clones Identification and Genetic Characterization of Garnacha Grapevine by Means of Different PCR-Derived Marker Systems. **Molecular Biotechnology**, 48:244–254, 2011.
- MERDINOGLU, D.; BUTTERLIN, G.; BAUR, C.; BALTHAZARD, J. Comparison of RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for genetic diversity analysis in *Vitis vinifera* L. **Acta Horticulturae**, 528:193–197, 2000.
- MERDINOGLU, D.; BUTTERLIN, G.; BEVILACQUE, L.; CHIQUET, A.; ADAM-BLONDON, A.F; DECROOCQ, S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. **Molecular Breeding**, 15:349-366, 2005.
- MONCADA, X.; MUNOZ, L.; MERDINOGLU, D.; CASTRO, M.H.; HINRICHSEN, P. Clonal polymorphism in the red wine cultivars “Carmenere” and “Cabernet Sauvignon”. **Acta Horticulturae**, 689:513-519, 2005.
- MONCADA, X.; PELSAY, F.; MERDINOGLU, D.; HINRICHSEN, P. Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers. **Genome**, 49:1459-1472, 2006.
- MORENO-SANZ, P.; LOUREIRO, M.D.; SUÁREZ, B. Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain). **Scientia Horticulturae**, 129:433–440, 2011.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. **Plant Journal**, 3:175-182, 1993.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 70:3321-3323, 1973.
- NEI, M.; FELDMAN, M.W. Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theoretical Population Biology**, 3:460-465, 1972.

NOOKARAJU, A.; AGRAWAL, D.C. Genetic homogeneity of in vitro raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. **South African Journal of Botany**, 78:302–306, 2012.

OLIVEIRA-COLLET, S.A.; MACHADO, M.F.P.S. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 33: 691-703, 2005.

OLIVEIRA-COLLET, S.A.; ZEQUIM-MAIA, S.H.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M. F.P.S. Mutações e recombinações genéticas geram uvas coloridas. **Biociência & Desenvolvimento**, 35:28-35, 2006.

OLIVEIRA-COLLET, S. **Caracterização isoenzimática de cultivares de uva de mesa *Vitis vinifera* L. (Vitaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2003. 70p. Tese (Doutorado em Agronomia).

ORASMO, G.R. **Caracterização genética e bioquímica de esterases em cultivares de Videira (Vitaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 65p. Tese (Doutorado em Agronomia).

ORASMO, G.R.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Biochemical and genetic polymorphism for carboxylesterase and acetyesterase in grapeclones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) cultivars. **Biochemical Genetics**, 45:663-670, 2007.

OUALKADI, A.; ATER, M.; MESSAOUDI, Z.; HEIT, K.; LAUCOU, V.; BOURSQUOT, J.M.; LACOMBE, T.; THIS P. Genetic diversity of Moroccan grape accessions conserved ex situ compared to Maghreb and European gene pools. **Tree Genetics & Genomes**, 7:1287–1298, 2011.

PELSY, F. Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. **Heredity**, 104: 331–340, 2010.

PELSY, F.; HOCQUIGNY, S.; MONCADA, X.; BARBEAU, G.; FORGET, D.; HINRICHSEN, P.; MERDINOGLU, D. An extensive study of the genetic diversity within seven French wine grape variety collections. **Theoretical and Applied Genetics**, 120:1219–1231, 2010.

- PEREIRA, L.; MARTINS-LOPES, P.; BATISTA, C.; ZANOL, G.C.; CLÍMACO, P.; BRAZÃO, J.; EIRAS-DIAS, J.E.; GUEDES-PINTO H. Molecular Markers for Assessing Must Varietal Origin. **Food Analytical Methods**, 5:1252–1259, 2012.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. 747p.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945-959, 2000.
- RAJORA, O.P. Genetic biodiversity impacts of silvicultural practices and phenotypic selection in white spruce. **Theoretical and Applied Genetics**, 99: 954–961, 1999.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, 128: 9–17, 2002.
- REGNER, F.; KASERER, H. Investigations into the genetic variability of Traminer clones. **Mitt Klosterneuburg**, 52:177–186, 2002.
- REGNER, F.; STADELBAUER, A.; EISENHELD, C.; KASERER, H. Genetic relationships among Pinots and related cultivars. **American Journal of Enology and Viticulture**, 51: 7–17, 2000a.
- REGNER, F.; WIEDECK, E.; STADELBAUER, A. Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. **Vitis**, 39:103–107, 2000b.
- RIahi, L.; LAUCOU, V.; CUNFF, L.L.; ZOGHLAMI, N.; BOURSQUOT, J.M.; LACOMBE, T.; HEIT, K.; MLIKI, A.; THIS, P. Highly polymorphic nSSR markers: A useful tool to assess origin of North African cultivars and to provide additional proofs of secondary grapevine domestication events. **Scientia Horticulturae**, 141: 53–60, 2012.
- RIAZ, S.; GARRISON, K.E.; GANGL, G.S.; BOURSQUOT, J.M.; 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.
- ROBINSON, J. The Oxford Companion to Wine, 3rd edn. **Oxford University Press: USA**. 2006. 840p.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2010. 81p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais).

RODRÍGUEZ-RAMILO, S.T.; TORO, M.A.; FERNÁNDEZ, J. Assessing population genetic structure via the maximisation of genetic distance. **Genetics Selection Evolution**, 41:49, 2009.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC Version 1.80: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter Software, 1989.

SCHENK, H.J. Clonal splitting in desert shrubs. **Plant Ecology**, 141:41–52, 1999.

SCHLOTTERER, C.; RITTER, R.; HARR, B.; BREM, G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. **Molecular Biology and Evolution**, 15:1269–1274, 1998.

SCOTT, K.D.; ABLETT, E.M.; LEE, L.S.; HENRY, R.J. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless Grape. **Euphytica**, 113:245–249, 2001.

SEFC, K.M.; LOPES, M.S.; LEFORT, F.; BOTTA, R.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; IBANEZ, J.; PEJIC, I.; WAGNER, H.W.; GLÖSSL, J.; STEINKELLER, H. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. **Theoretical and Applied Genetics** 10:498-505, 2000.

SEFC, K.M.; REGNER, F.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. **Vitis** 37:15–20, 1998.

SEFC, K.M.; REGNER, F.; TURETSCHKE, E.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. **Genome**, 42: 367-373, 1999.

SENSI, E.; VIGNANI, R.; ROHDE, W.; BIRICOLTI, S. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. **Vitis**, 35:183–188, 1996.

SEYEDIMORADI, H.; TALEBI, R.; HASSANI, D.; KARAMI, F. Comparative genetic diversity analysis in Iranian local grapevine cultivars using ISSR and DAMD molecular markers. **Environmental and Experimental Biology**, 10:125–132, 2012.

SILVESTRONI, O.; DI PIETRO, D.; INTRIERI, C.; VIGNANI, R.; FILIPPETTI, I.; DEL CASINO, C.; SCAIL, M.; CRESTI, M. Detection of genetic diversity among clones of cv. Fortana (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. **Vitis** 36:147–150, 1997.

SINGH, D.R.; SRIVASTAVA, A.K.; SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, R.C. Genetic diversity among three Morinda species using RAPD and ISSR markers. **Indian Journal of Biotechnology**, 10:285–293, 2011.

SNOUSSI, H.; SLIMANE, H.M.; RUIZ-GARCIA, L.; MARTINEZZAPATER, J.M.; ARROYO-GARCIA, R. Genetic relationship among cultivated and wild grapevine accessions from Tunisia. **Genome**, 47:1211-1219, 2004.

SOUSA, J.S.I. **Origens do vinhedo paulista**. São Paulo: Obelisco, 1959. 319p.

SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.

STRIEM, J.M.; BEN-HAYYIM, G.; SPIEGEL-ROY, P. Developing molecular genetic markers for grape breeding, using polymerase chain reaction procedures. **Vitis**, 33:53–54, 1994.

STRIEM, M.J.; SPIEGEL-ROY, P.; BEN-HAYYIM, G.; BECKMANN, J.; GIDONI, D. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes. **Vitis**, 29:223-227, 1990.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17:6463–6471, 1989.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, 322:652–656, 1986.

THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, R.; CONSTANTINI, L.; CRESPIAN, M.; GANGL, G.S.; EISENHEILD, C.; FERREIRA-MONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBANEZ, 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 grape cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, 109:1448-1458, 2004.

THOMAS, M.R.; CAIN, P.; SCOTT, N.S. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. **Plant Molecular Biology**, 25:939-949, 1994.

THOMAS, M.R.; MATSUMOTO, S.; CAIN, P.; SCOTT, N.S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:173-180, 1993.

THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites, STSs. **Theoretical and Applied Genetics**, 86:985-990, 1993.

THOMPSON, M.M.; OLMO, H.P. Cytohistological studies of cytochimeric and tetraploid grapes. **American Journal of Botany**, 50:901-906, 1963.

TIKUNOV, Y.M.; KHRUSTALEVA, L.I.; KARLOV, G.I. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. **Euphytica**, 131:71-80, 2003.

TSCHAMMER, J.; ZYPRIAN, E. Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. **Vitis**, 33:249-250, 1994.

UDUPA, S.M.; BAUM, M. High mutation rate and mutational bias at (TAA)_n loci in chickpea (*Cicer arietinum* L). **Molecular Genetics and Genomics**, 265:1097-1103, 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.

WALTER, B.; MARTELLI, G.P. Consideration on grapevine selection and certification. **Vitis**, 37: 87-90, 1998.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**: variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 590p.

YE, G.N.; SOYLEMEZOGLU, G.; WEEDEN, N.F.; LABOY, W.F.; POOL, R.M.; REISCH, B. I. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. **Vitis**, 37:33–38, 1998.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

ZEINALI, R.; RAHMANI, F.; ABASPOUR, N.; BANEH, H.D. Molecular and Morphological Diversity Among Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Cultivars in Iran. **International Journal of Agriculture: Research and Review**, 2:735-743, 2012.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20:176-183, 1994.