

LÍVIA SANTOS CAPEL

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA  
EMPREGANDO MARCADOR MOLECULAR RAPD

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
FEVEREIRO - 2008

LÍVIA SANTOS CAPEL

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA  
EMPREGANDO MARCADOR MOLECULAR RAPD

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.

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
FEVEREIRO – 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C238c Capel, Livia Santos  
Caracterização genética de porta-enxertos de videira empregando marcador molecular RAPD / Livia Santos Capel. -- Maringá : [s.n.], 2008.  
49 f. : il.

Orientadora: Prof. Dr. Claudete Aparecida Mangolin.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, 2008.

1. Uva - Porta-enxertos - Identificação. 2. Uva - Porta-enxertos - Variedades. 3. Uva - Porta-enxertos - Norte e Noroeste do Paraná. 4. Uva - Porta-enxertos - RAPD. I. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 2l.ed.634.8

Dedico todo o meu trabalho àqueles que considero um presente de Deus, que sempre me apoiaram e me encorajaram em mais uma jornada de minha vida:

Meus pais, José Luiz e Maria Iraci, meus irmãos: Laís, Luiz A. e Júnior;

e meu Esposo: André...

À vocês minha gratidão e todo o meu amor...

## AGRADECIMENTO

A Deus, por iluminar sempre minha caminhada e oportunizar meu crescimento.

À Universidade Estadual de Maringá, à Coordenação e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao CNPq, pela apoio financeiro, através de bolsa de estudo.

À professora, orientadora e amiga, doutora Claudete Aparecida Mangolin, pelo seu exemplo de ética profissional, pelo aprendizado, crescimento e carinho proporcionado.

À COROL - Cooperativa de Rolândia, pelo material biológico de variedades de uva analisado neste estudo.

À Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa em Uva e Vinho (Bento Gonçalves-RS), pelo fornecimento das estacas da variedade Kober 5BB.

À professora doutora Sandra e às queridas amigas, Adriana e Márcia, que me forneceram os primeiros ensinamentos sobre as técnicas de trabalho em laboratório e manuseio de equipamentos, auxiliando no desenvolvimento das pesquisas.

Às professoras doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki e doutora Ana Silvia Helena Zequim Maia, e aos Professores doutor José Ricardo e doutor Erasmo Renesto, pelos maravilhosos momentos de convivência e aprendizado.

Aos técnicos de laboratório, Sérgio e Leila, pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela amizade que construímos.

A todos os amigos dos laboratórios “17” e “21”, pelo carinho e incentivo.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram com mais esta vitória.

## **BIOGRAFIA**

Lívia Santos Capel é natural de Paranavaí, Estado do Paraná. Nasceu em 17 de maio de 1982. Filha de José Luiz Barbosa Capel e Maria Iraci dos Santos Capel. Casada com André Ivan Bernardin Mânica.

Realizou o ensino fundamental na Escola Estadual Newtom Guimarães na cidade de Paranavaí - PR, sendo este completado no ano de 1992. Posteriormente, na mesma cidade, realizou inicialmente o curso de ensino médio no Colégio Estadual Bento Munhoz da Rocha Neto, sendo concluído no Colégio Paroquial, no ano de 1996. Os estudos de segundo grau foram realizados no período de 1997 a 1999 no Colégio Nobel de Paranavaí.

Graduada em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia, em dezembro de 2004, obteve habilitação em licenciatura plena e bacharelado, pela Universidade Paranaense – UNIPAR *campus* Paranavaí - PR.

Como Professora Substituta da Secretaria do Estado do Paraná, ministrou aulas de biologia e ciências no último bimestre de 2006 no Colégio Estadual Rodrigues Alves.

Ingressou, em março de 2006, no Programa de Pós-graduação de Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Origem da videira.....	4
2.2. Classificação botânica.....	5
2.3. A uva no Brasil e no Município de Marialva.....	6
2.4. Propagação da videira .....	7
2.5. Porta-enxertos de uva.....	8
2.6. Porta-enxertos estudados.....	10
2.6.1. Kober 5BB e 420-A .....	10
2.6.2. Schwarzmann .....	11
2.6.3. IAC-766 - Campinas .....	12
2.6.4. Traviú.....	13
2.6.5. IAC-572 - Jales .....	14
2.7. Identificação dos porta-enxertos .....	15
2.7.1. Ampelografia.....	16
2.7.2. Marcadores bioquímicos .....	17
2.7.3. Marcadores moleculares.....	18
2.8. Marcadores Moleculares em <i>Vitis</i> .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Variedades de porta-enxerto de uva.....	22
3.2. Extração do DNA de folhas das variedades de porta-enxerto de uva.....	23
3.3. Avaliação e quantificação dos DNAs extraídos.....	24
3.4. Amplificação do DNA e seleção de <i>primers</i> .....	25
3.5. Análise dos resultados.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	27
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

## RESUMO

CAPEL, Livia Santos. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2008. **Caracterização Genética de Porta-enxertos de Videira Empregando Marcador RAPD**. Professora Orientadora: Dra. Claudete Aparecida Mangolin. Professores Conselheiros: Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Dra. Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

A identificação das variedades de porta-enxertos de uva através de caracteres fenológicos não é segura e tem gerado problemas para os viticultores. Assim, a proposta deste estudo foi caracterizar, através de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), as variedades de porta-enxertos de uva plantadas nas regiões Norte e Noroeste do Paraná. Os resultados poderão ser úteis para esclarecer dúvidas quanto à identificação destas variedades. O DNA das variedades dos porta-enxertos 420-A, Schwarzmans, IAC-766 – Campinas, Traviú, Kober 5BB, e IAC-572 – Jales foi extraído e amplificado, utilizando-se 17 *primers* para RAPD que resultou em 247 fragmentos, conferindo um polimorfismo total para estas variedades de 87,04%. A frequência diferencial para os fragmentos amplificados determinou uma divergência genética entre os porta-enxertos de 0,7094. A maior identidade genética foi entre as variedades IAC-766 - Campinas e Schwarzmans (83,22%) e a menor foi encontrada entre as variedades Kober 5BB e 420-A (61,96%). No dendrograma obtido, foi possível a identificação de um grupo formado pelas variedades 420-A, Schwarzmans e IAC-766 – Campinas. Os porta-enxertos, Traviú, IAC-572 - Jales e Kober 5BB não formaram grupos, refletindo, assim, a grande divergência encontrada entre eles. A amplificação do DNA com os *primers* OPB-4, OPB-5 e OPP-17 produziram fragmentos específicos para os porta-enxertos 420-A e IAC-512 – Jales; os *primers* OPB-1, OPB-3, OPB-4 e OPB-11 produziram fragmentos específicos para a variedade Kober 5BB. Estes fragmentos específicos poderão ser utilizados como marcadores dos genótipos IAC-522 – Jales, 420-A e Kober 5BB. Desta forma as variedades Kober 5BB e 420-A frequentemente confundidas, poderão ser molecularmente distinguidas.

**Palavras-chave:** *Vitis*, Porta-enxerto, RAPD.

## ABSTRACT

CAPEL, Livia Santos. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, february 2008. **Genetic Characterization of Vine Rootstock by RAPD marker.** Adviser Professor: Dra. Claudete Aparecida Mangolin. Committee Members: Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado and Dra. Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

Identification of several vine rootstocks by phenomenological traits lacks security and has brought about certain problems for vine cultivators. In current analysis RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) characterizes several rootstocks of vine planted in the northern and northwestern regions of the state of Paraná. Results may be useful to explain identification of these varieties. DNA of rootstock varieties 420-A, Schwarzmann, IAC-766 – Campinas, Traviú, Kober 5BB, and IAC-572 – Jales has been extracted and amplified by 17 primers. The 247 fragments assured total polymorphism (87.04%) for these varieties. Differential frequency for amplified fragments determined a 0.7094 genetic divergence between the rootstocks. Highest genetic identity (83.22%) has been detected between IAC-766 - Campinas and Schwarzmann (83.22%) and the lowest (61.96%) between Kober 5BB and 420-A. Dendrogram also identified a group made up of varieties 420-A, Schwarzmann and IAC-766 – Campinas. Rootstocks Traviú, IAC-572 - Jales and Kober 5BB did not make up groups and thus showed high divergence among them. DNA amplification by primers OPB-4, OPB-5 and OPP-17 produced fragments which were specific to rootstocks 420-A and IAC-512 – Jales; primers OPB-1, OPB-3, OPB-4 and OPB-11 produced fragments specific to Kober 5 BB. Specific fragments may be used as markers for genotype IAC-522 – Jales, 420-A and Kober 5BB. The frequently mixed up varieties Kober 5BB and 420-A may actually be distinguished on a molecular basis.

**Key words:** *Vitis*, rootstock, RAPD.

## 1. INTRODUÇÃO

A videira é uma das plantas frutíferas mais conhecidas desde a antiguidade, podendo ser encontrada em fósseis de épocas geológicas anteriores ao aparecimento do homem na Terra (Pio Corrêa, 1926). Sousa (1996) também relata que a videira surgiu no período terciário, milhões de anos antes do aparecimento do homem, provavelmente na atual Groenlândia, conforme comprovam os achados arqueológicos.

De acordo com Sousa (1996), o homem, que se alimentava do fruto, através da evolução de seus conhecimentos, aprendeu a fabricar produtos a partir da uva, como o vinho, a passa e o suco, e também entendeu que, para melhor tirar proveito da videira, é preciso conhecer de modo mais profundo esta planta, desde sua origem, suas espécies e variedades, bem como suas características inerentes. Tais conhecimentos são importantes para superar os obstáculos advindos da evolução das doenças e adaptar a cultura aos mais variados climas e solos, a fim de obter produções em maior quantidade e com melhor qualidade.

A videira pode ser propagada de forma sexuada (por semente) ou assexuada (por via vegetativa). As sementes são úteis para o melhoramento genético, para a obtenção de novas variedades (Hidalgo, 1993). Entretanto, na Europa, em meados do século XIX, a propagação por via vegetativa, através da técnica de enxertia, passou a ser uma prática obrigatória após a invasão da filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) (Fitch, 1855), um pulgão sugador das raízes. O sistema radicular da espécie *Vitis vinifera* é extremamente sensível à ação deste inseto, que pode ocasionar a morte da planta. Assim, o uso de porta-enxertos resistentes tornou-se a única forma de controle deste parasita e, conforme salienta Ribas (1957), o uso de porta-enxertos não só proporcionou à videira resistência à filoxera, como também permitiu o aproveitamento de muitos tipos de solos, antes tidos como inadequados para a viticultura. Desta forma, a maioria dos vinhedos brasileiros é formado através do plantio dos porta-enxertos no local do futuro vinhedo, para posterior enxertia no campo das cultivares produtoras.

No noroeste do estado do Paraná, o município de Marialva destaca-se como o maior produtor de uvas finas deste estado, contando com mais de 1.000 hectares de parreiras em produção, todas elas formadas com plantas enxertadas. Nesta região, os porta-enxertos mais usados são: o IAC-766 - Campinas, o IAC-572 – Jales, o 420-A, o IAC 313-Tropical, Kober 5BB, o Schwarzmann e o Traviú e (Kishino et al., 2007).

O porta-enxerto Kober 5BB é um cruzamento entre *Vitis berlandieri* x *V. riparia* e é bastante utilizado na região de Marialva; apresenta vigor médio e boa adaptação a diferentes tipos de solo e boa resistência à seca e às doenças fúngicas (Pommer et al., 1997). Em muitos casos, esse porta-enxerto era confundido com o 420-A, que é menos vigoroso, menos produtivo e usado em pequena escala somente no Rio Grande do Sul. Essa informação, segundo Camargo (1998), é importante, uma vez que o produtor pode adquirir o verdadeiro 420-A e obter resultados aquém do esperado.

O 420-A, segundo Camargo (1998), conforme mencionado acima, é um porta-enxerto pouco vigoroso e de difusão restrita; apresenta certa dificuldade de enraizamento, mas tem mostrado bons resultados práticos no cultivo de Cabernet Sauvignon. Pode ser uma boa opção para o cultivo de uvas para a elaboração de vinhos finos.

Pertencente ao grupo de híbridos entre *V. riparia* x *V. rupestris*, o porta-enxerto Schwarzmann é dotado de aptidão edáfica semelhante ao 101 – 14. Em terrenos pobres, pode apresentar um desenvolvimento deficiente, preferindo, assim, terrenos profundos, férteis, frescos e pouco calcários, como informa Pastena (1981).

No grupo de híbridos complexos estão incluídos o IAC-766 - Campinas e o Traviú. O IAC-766 - Campinas foi obtido a partir do cruzamento 106-8 Mgt [*V. riparia* x (*V. rupestris* x *V. cordifolia*)] x *V. tiliifolia*, realizado por Santos Neto em 1958. Este híbrido apresenta alto vigor e boa adaptação às condições edafo-climáticas paulistas; suas folhas são bastante resistentes às doenças (Pommer et al., 1997). O IAC-766 – Campinas também é um porta-enxerto bastante usado na região Norte do Paraná para a cultivar Itália e suas mutações Rubi e Benitaka (Camargo, 1998; Kishino et al., 2007). Em contrapartida, o Traviú foi produzido a partir do cruzamento entre *V. riparia* x (*V. cordifolia* x *V. rupestris* 106 – 8) e apresenta uma

adaptação similar à do 104 – 14 preferindo, porém, solos mais frescos, como informa Sousa (1969). Por outro lado, parece possuir também boa resistência à secura e simultaneamente boa adaptação a terrenos argilosos e úmidos.

O IAC-572 – Jales é oriundo do cruzamento entre *V. tiliifolia* x 101 – 14 Mgt, realizado, em 1954, no IAC (Camargo, 1998). A partir do início da década de 90, este porta-enxerto tem sido bastante difundido em todas as regiões vitícolas tropicais do país, sob a etiqueta “Tropical sem vírus”. Apresenta alto vigor, é adaptado tanto a solos argilosos como arenosos, folhas resistentes às principais doenças, ótimo enraizamento e pegamento (Pommer et al., 1997).

Entretanto, a identificação destas variedades através de caracteres fenológicos não é totalmente segura e tem gerado eventualmente problemas para os viticultores. Análises de polimorfismos de fragmentos de DNA aleatoriamente amplificados ainda não foram realizadas para estas variedades, portanto a proposta deste estudo foi caracterizar, através de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), as variedades de porta-enxertos de uva plantadas nas regiões Norte e Noroeste do Paraná com a finalidade de obter resultados que possam ser úteis para esclarecer dúvidas quanto à identificação de variedades de porta-enxerto de uva.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Origem da videira

A videira é uma das plantas frutíferas mais conhecidas desde a antiguidade, podendo ser encontrada entre fósseis de épocas geológicas anteriores mesmo ao aparecimento do homem na Terra; é originária do árido Cáucaso, na Ásia, sendo a uva uma das frutas mais antiga utilizada na alimentação humana e sendo a sua produção espalhada por todo o mundo. Sua origem data de 6.000 aC; Sousa (1996), relata que no período quaternário iniciou-se a era glacial, que cobriu a Terra com um enorme manto de gelo, obrigando a videira a refugiar-se para regiões menos atingidas pelo rigoroso inverno: o continente americano, europeu e asiático-ocidental.

Janick e Moore (1975), Huglin (1986) e Sousa (1996) consideram que, como resultado da separação da videira em diversos centros de refúgios, durante o período glacial, as videiras sofreram adaptações climáticas, que, posteriormente, com o cultivo pelo homem durante milhares de anos, determinaram o surgimento de variações. Desse modo, existem diversas espécies e milhares de variedades espalhadas por todo o mundo. Por outro lado, a origem de muitas variedades importantes para a produção de vinho cultivadas atualmente deve ter sido perdida num passado distante (Janick e Moore, 1975; Sousa, 1996). A cultura da uva, que é permanente e de longa duração (alguns vinhedos chegam a durar até 150 anos), só se tornou possível no meio das comunidades que abandonaram o nomadismo. Fixo à terra, pouco a pouco, de geração em geração, o homem foi aprimorando as técnicas de cultivo e de processamento da fruta.

Segundo os registros de Pio Corrêa (1926), foi por volta do ano 600 antes de Cristo que o homem aprendeu a podar a videira para obter uma abundante e saborosa carga de frutos, um salto definitivo na melhoria das técnicas de produção da fruta. Foram os romanos, por sua vez, que transformaram a viticultura em um comércio lucrativo, enchendo as paisagens mediterrâneas de videiras. As uvas desta época, ainda por vários séculos depois disso, destinavam-se, basicamente, à produção de

vinho. Somente por volta de 1950, surgiram os primeiros empreendimentos de proporções e finalidades comerciais.

O gênero *Vitis* L. é bastante diverso, compreende 40 a 60 espécies na Ásia, cerca de 25 na América do Norte e uma só espécie européia a *Vitis vinifera* L. Esta é a principal espécie cultivada hoje, enquanto as outras espécies são utilizadas principalmente 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). As diferentes cultivares ou variedades são adaptadas a vários tipos de solo e de clima, o que possibilita o seu cultivo em quase todas as regiões do mundo.

Sendo frutas bastante sensíveis às condições do solo e do clima em que se desenvolvem, as uvas variam muito de acordo com essas condições, apresentando características que as distinguem segundo o sabor, a acidez, a doçura, o formato, a coloração e a resistência da casca, o tamanho, a quantidade de sementes, a forma e o formato dos cachos. As que não são cultivadas servem como fonte de material genético e hoje a maioria das fontes genéticas de *V. vinifera* L. são mantidas em coleções de germoplasma.

## **2.2. Classificação botânica**

A videira está classificada no Grupo Cormófitas, da Divisão Spermatophyta, da Subdivisão Angiospermae, da Classe Dicotiledoneae, da Ordem Rhamnales, da Família Vitaceae, do Gênero *Vitis*. Na família Vitaceae, o gênero *Vitis* é o único de importância econômica, social e histórica, e a ele pertencem todas as videiras terrestres selvagens ou cultivadas (Sousa, 1996). Dentro do gênero *Vitis*, distinguem-se dois subgêneros: o Muscadinea que possui as espécies *Vitis rotundifolia*, *V. munsoniana* e *V. popenoi*, e o Euvitis que compreende mais que 50 espécies (Sousa, 1996). As espécies também podem ser agrupadas geograficamente em Euvitis Americanas, Euvitis da Ásia Oriental, e Euvitis Europeias (Ásia Ocidental). De

acordo com Toda (1991), as espécies americanas constituem a base de obtenção de porta-enxertos utilizados na viticultura. Estas apresentam uma maior ou menor resistência à filoxera. A espécie *Vitis vinifera* apresenta sensibilidade total à filoxera e a espécie *V. rotundifolia* apresenta imunidade total.

### **2.3. A uva no Brasil e no Município de Marialva**

De acordo com Sousa (1996), no Brasil, a videira foi introduzida em São Paulo, pela expedição colonizadora de Martin Afonso de Souza, em 1532. Em Pernambuco, a primeira expedição capacitada a introduzir a videira foi a de Duarte Coelho em 1535. Mas, comprovadamente, foi em 1542 que João Gonçalves fomentou o cultivo da vinha da ilha de Itamaracá (Albuquerque, 1987).

Por muito tempo, segundo Pio Corrêa (1926), predominou por aqui a idéia de que as condições ambientais não permitiriam jamais a cultura da videira, planta que era considerada delicadíssima, e que só poderia produzir em alguns países da “Velha Europa”. Hoje, no entanto, a viticultura constitui-se em uma grande fonte de riquezas para o País.

O Estado do Paraná é o maior fornecedor nacional de uva de mesa, durante o período de novembro a janeiro e de março a final de junho, determinando, assim, uma abertura de mercado onde entram poucos fornecedores. No noroeste do estado do Paraná, o município de Marialva, localizado a uma latitude 23°29'06" sul e a uma longitude 51°47'30" oeste, se localiza a leste de Maringá, sendo denominado como a capital da uva fina de mesa, destacando-se pelo seu povo trabalhador e sua grande produção de uvas finas, contando com 1.400 hectares de parreiras em produção, todas formadas com plantas enxertadas e que ocupam em torno de 5.600 pessoas na atividade. São 675 viticultores que colhem entre 10 e 12 mil toneladas de uvas finas, obtendo uma produtividade média de 27 t/ha/ano (safrão + safrinha). A cultura da uva tem sido o principal fator de desenvolvimento de Marialva-PR e de seus produtores, gerando cerca de quatro empregos por hectare ([www.seab.pr.gov.br](http://www.seab.pr.gov.br)).

Na região de Marialva, as cultivares predominantes são as cultivares com sementes, destacando-se a Itália e suas mutações Niágara, Rubi, Benitaka e Brasil. As variedades sem sementes representam uma área bem menor, destacando-se as cultivares lançadas pela Embrapa Uva e Vinho - BRS Morena, BRS Clara e BRS Linda, cujo interesse pelo cultivo tem aumentado muito nessa região, e também as cultivares tradicionais como a Vênus e a *Centennial Seedless* ([www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)).

#### **2.4. Propagação da videira**

Por ser uma espécie cultivada há milhares de anos, a videira tem evoluído de modo a adaptar-se às mais diversas situações de propagação e cultivo. A videira pode ser propagada de forma sexuada (por semente) ou assexuada (por via vegetativa). As sementes são úteis para o melhoramento genético, para a obtenção de novas variedades (Hidalgo, 1993), pois a elevada segregação genética pode dar origem a indivíduos com características diferentes dos parentais, o que é desejado pelos melhoristas. Entretanto, a propagação de videiras através de sementes tem sido desaconselhável, pois as novas plantas apresentam vigor, produtividade e qualidade dos frutos inferiores aos da planta-mãe, além de prolongar o tempo para a formação do vinhedo.

A propagação vegetativa baseia-se na facilidade que os ramos têm de emitir brotos e raízes. Nesse tipo de propagação vegetativa, as plantas obtidas têm as mesmas características da planta-mãe, a não ser que ocorra alguma mutação (Hidalgo, 1993). Para os métodos de propagação vegetativa, usam-se os ramos do ano e as técnicas mais empregadas são a estaquia e a enxertia (Fachinello et al., 1995; Peruzzo, 1995).

De acordo com Sousa (1996), a partir do século XVIII, com o aumento do intercâmbio mundial de material vegetativo, uma praga de raízes, a filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) (Fitch, 1855), foi introduzida na Europa. Esse inseto provocou enormes danos nas videiras da Europa e de todo o mundo. A partir daí, as videiras passaram a ser enxertadas sobre porta-enxertos resistentes e, atualmente, a

maioria dos vinhedos brasileiros é formado por meio do plantio dos porta-enxertos no local do futuro vinhedo, para posterior enxertia no campo das cultivares produtoras (Hidalgo, 1993; Fachinello et al., 1995; Peruzzo, 1995; Sousa, 1996).

## **2.5. Porta-enxertos de uva**

No caso da viticultura, a única maneira de controlar a filoxera, é através do uso de porta-enxertos resistentes (Boliani, 2002). Para Hartmann e Kester (1990) e Fachinello et al. (1995), a propagação de porta-enxertos de videiras e de outras plantas frutíferas por estaquia baseia-se no princípio de que é possível regenerar uma planta a partir da planta-mãe. Para este processo, as estacas utilizadas podem ser herbáceas, quando não possuem tecidos lignificados; lenhosas, com tecidos lignificados; e semilenhosas ou semi-herbáceas, quando coletadas no início da lignificação.

O domínio das técnicas de propagação é um importante passo no sucesso da implantação de um parreiral. De acordo com Santos Jesus (1994), o método tradicionalmente utilizado no sul do país é a enxertia praticada diretamente no campo durante os meses de inverno; esta é realizada sobre porta-enxertos plantados no ano anterior e em local definitivo ou enraizados em viveiro ou telado. Fachinello et al. (1995) descrevem que a utilização de estacas lenhosas é bastante difundida e isso se deve ao fato de essas apresentarem alta taxa de pegamento.

Os porta-enxertos de uva formam um complexo grupo de plantas. A maioria deles são híbridos derivados de espécies nativas de *Vitis* norte americanas e estas são usadas para conferir resistência à filoxera e também a problemas associados ao solo (De Andres, 2007). Monteiro (1999) descreve que o material biológico inclui duas partes distintas, o garfo e o porta-enxerto. A espécie *Vitis vinifera*, onde se incluem as videiras produtoras dos vinhos atuais, é susceptível à filoxera. Tendo sido constatado que outras *Vitis* eram resistentes a essa praga, estas foram introduzidas em

larga escala e hoje é uma prática normal o enxerto do tipo de *V. vinifera* desejado em um porta-enxerto resistente.

Além de apresentar resistência à praga, o porta-enxerto influencia o crescimento vegetativo, a produção e a qualidade do cacho da videira; ele sofre grande interferência edafoclimática e responde diferentemente de acordo com a copa sobre ele enxertada (Hartmann e Kester, 1990; Monteiro, 1999). Atualmente, um número relativamente grande de porta-enxertos encontra-se disponível aos produtores; porém, cada um deles apresenta suas vantagens e deficiências. Apenas com a experimentação agrícola pode-se determinar com regular precisão qual é o mais adequado para uma determinada cultivar e região (Pommer et al., 1997).

As condições fundamentais exigidas para um bom porta-enxerto na viticultura incluem resistência à filoxera e ao nematóide, adaptação ao meio ambiente, facilidade de propagação, afinidade satisfatória com as cultivares copa, sanidade e desenvolvimento de acordo com o destino da produção (Ojima, et al, 1978; Hidalgo, 1993). O uso de porta-enxertos não só proporcionou à videira resistência à filoxera, como também permitiu o aproveitamento de muitos tipos de solos, antes tidos como inadequados para a viticultura, conforme salientado por Ribas (1957).

Para os vitivinicultores, é importante saber a variedade exata que plantam porque: variedades diferentes têm custos diferenciais; o tipo de viticultura desejada requer variedades específicas; uvas e vinhos produzidos por variedades diferentes têm características qualitativas, quantitativas e preços muito diversos; o viticultor é legalmente responsável por assegurar que as castas declaradas são as que estão plantadas (Ribas, 1957; Monteiro, 1999; Leão, 2003).

Para Alvarenga et al. (2002), na busca da combinação ideal entre porta-enxertos e variedades copa, inúmeros trabalhos têm sido e deverão continuar sendo realizados, isto porque são inúmeras as variáveis que atuam sobre essa combinação e para cada uma das combinações pode haver um par ideal. Soma-se a essa condição o avanço dos programas de melhoramento. Estes programas colocam no mercado novas cultivares, tanto de copa quanto de porta-enxertos, obrigando os pesquisadores,

mais uma vez, a lançar mão de experimentações para encontrar o melhor porta-enxerto para cada local.

## **2.6. Porta-enxertos estudados**

### **2.6.1. Kober 5BB e 420-A**

Kober 5BB é um porta-enxerto resultante de um cruzamento entre *V. berlandieri* x *V. riparia*. Este cruzamento foi realizado por Sigmund Teleki, no final do século XIX, e selecionado por Kober, na Áustria. Este porta-enxerto é bastante utilizado no Norte do Paraná e tem sido muitas vezes confundido com o porta-enxerto 420-A. Este último, com elevada resistência à filoxera e certa resistência aos nematóides, é proveniente de outro cruzamento entre *V. berlandieri* x *V. riparia*, obtido na França, no ano de 1887, por Millardet e De Grasset. Em São Paulo, é recomendado como bom porta-enxerto para as variedades de uvas finas de mesa, enquanto que no Rio Grande do Sul é pouco difundido (Camargo, 1998; Sousa e Martins, 2002). Esta informação é extremamente importante, uma vez que, na busca de material isento de vírus, o agricultor pode plantar o verdadeiro 420-A, oriundo de instituições de pesquisa, e obter resultados aquém do esperado. Isso porque o 420-A imprime pouco vigor à copa e, em consequência, produtividades menores que aquelas obtidas com o Kober 5BB. Este problema foi observado em 1989 em parreirais de Maringá-PR; mais tarde em Ivoti-RS e também na região de Jales-SP.

O porta-enxerto Kober 5BB difundiu-se com a cultura da variedade Itália, difusão esta que se deve ao bom comportamento da cultivar Itália nele enxertada. O Kober 5 BB é um porta-enxerto que apresenta um bom enraizamento e boa “pega” de enxertia, imprimindo bom vigor e produtividade à copa. Adapta-se melhor a terrenos fundos, aluviais, frescos e férteis, tolerando bem os solos argilosos e pobres, enquanto manifesta boa resistência a nematóides e fungos. Há controvérsias quanto a sua resistência à seca. Quanto à morfologia, as plantas da variedade Kober 5BB possui ramos de coloração vermelha, pubescentes entre os nós e com extremidade lanosa e esbranquiçada. As folhas jovens são aranhosas e cobreadas; as folhas adultas

grandes, quase inteiras, são cuneiformes, finas, com seio peciolar em U, sendo a face superior glabra e a inferior mais clara e com tênue pubescência. A planta da Kober 5BB produz flores femininas e os cachos formados são pequenos, com bagas pequenas, esféricas e pretas (Sousa e Martins, 2002).

Morfologicamente, as plantas da variedade 420-A possuem ramos com superfície um pouco estriada, glabros de coloração verde escura com nós violáceos até a extremidade, contrastando com os entrenós. As folhas jovens são brilhantes e verde-bronzeadas. As folhas adultas são inteiras, as basais são nitidamente trilobadas, cuneiformes, espessas, brilhantes, verde escuras na face superior e pouco mais claras na face inferior, com seio peciolar em U. Esta variedade produz flores masculinas estéreis (Sousa e Martins, 2002).

Cosmo (1979) descreve o 420-A como um porta-enxerto que pode se adaptar à seca e a solos leves. Porém, não tolera terrenos muito argilosos e compactos.

### **2.6.2. Schwarzmann**

Pommer et al. (1997) classifica o porta-enxerto Schwarzmann como sendo um híbrido natural entre *Vitis riparia* e *V. rupestris*, selecionado por Bizenz, na Moravia, Região da ex-Tchecoslováquia, no início do século XX. Este porta-enxerto apresenta vigor médio e enraizamento satisfatório, é adaptado a terrenos secos, áridos, ácidos e arenosos (Sousa, 1996). Segundo Stirling e Cirami, (1984); Pommer et al., (1997), o Schwarzmann revela boa resistência a nematóides e, embora seja pouco difundido, ele é apropriado para as condições paulistas, podendo ser uma opção para a cultivar Niágara.

Seus ramos são glabros, com nós e entrenós violáceos no lado exposto ao sol. As folhas novas são verde-amareladas e brilhantes e as adultas são de coloração verde-clara, tamanho médio tendendo a reniformes, inteiras ou levemente trilobadas, com seio peciolar em lira aberta e profunda, as folhas são onduladas, apresentando na face inferior, pubescência sobre as nervuras. Produz flores masculinas e não produz frutos (Sousa e Martins, 2002).

Pastena (1981) descreveu o porta-enxerto Schwarzmann como sendo dotado de aptidão edáfica semelhante ao 101-14 e não ter apresentado, em algumas regiões vitícolas, boa afinidade com certas cultivares locais. Em terrenos pobres, pode apresentar um desenvolvimento deficiente, preferindo terrenos profundos, férteis, frescos e pouco calcários. Mostra ainda boa afinidade com cultivares viníferas, favorecendo a qualidade dos vinhos, embora não pareça revelar a capacidade de frutificação induzida por alguns outros porta-enxertos. Como o 101-14, o Schwarzmann também revelou boa afinidade, mas, na Fazenda Experimental de Caldas, da EPAMIG, em um experimento de competição de porta-enxertos combinados com híbridos franceses, o 101-14 mostrou-se, sistematicamente, mais produtivo do que o Schwarzmann (Alvarenga et al., 1982).

### **2.6.3. IAC-766 - Campinas**

No grupo de híbridos complexos estão incluídos os porta-enxertos IAC-766 - Campinas e Traviú. O IAC-766 - Campinas foi obtido a partir do cruzamento 106-8 Mgt [*V. riparia* x (*V. rupestris* x *V. cordifolia*)] x *V. tiliifolia*, realizado por Santos Neto (1957), citado por Pommer et al. (1997) e Camargo, (1998). O IAC-766 - Campinas é um porta-enxerto menos vigoroso que o IAC-572 - Jales. Isso, em alguns casos, dificulta a obtenção de plantas com desenvolvimento adequado para a realização da enxertia de inverno, realizada no local definitivo quando o transplante é feito tardiamente (após o mês de dezembro). Em regiões com ocorrência de temperaturas mais baixas, este porta-enxerto tende a entrar em dormência durante o inverno, apresentando intensa queda de folhas. Santos Neto (1973) afirmou que o porta-enxerto IAC-766 - Campinas é um dos mais indicados para uvas finas de mesa. Trata-se de um porta-enxerto vigoroso, o enraizamento das suas estacas é satisfatório e apresenta boa resistência às doenças (Pereira e Leitão Filho, 1973).

O IAC-766 – Campinas é recomendado para cultivares como Itália, Rubi, Benitaka, Brasil, Red Globe, Centennial Seedless, BRS Clara, BRS Morena e BRS Linda. Embora haja necessidade de estudos mais completos, acredita-se que esse

porta-enxerto seja uma boa alternativa para cultivares de uvas sem sementes e uvas para suco, devido ao fato de proporcionar menor vigor à copa, o que favorece a diferenciação de gemas nas uvas sem sementes e facilita o manejo da copa nas uvas para suco em espaçamentos adensados (Sousa, 1996; Pommer et al., 1997).

As plantas desse porta-enxerto possuem folhas com a face superior verde-escura e a inferior um pouco mais clara; apresentam nervuras primárias com leve pigmentação de antocianina; pêlos simples hialinos e bem curtos, além de esparsos pêlos lanuginosos em ambas as faces; lobos foliares pouco nítidos e base foliar bem fechada, com os bordos quase se sobrepondo; brotos terminais bronzeados ou verde-bronzeados, com abundante indumentário tanto simples como lanuginoso, ambos brancacentos; caules adulto verde-amarelados e esporadicamente com estrias bronzeadas, cilíndricos, glabros e com pigmentação antociânica nos nós (Sousa e Martins, 2002).

#### **2.6.4. Traviú**

O porta-enxerto Traviú foi produzido a partir do cruzamento entre *V. riparia* x (*V. rupestris* x *V. cordifolia*), também conhecido como Riparia do Traviú ou 106-8 Mgt, obtido por Millardet e de Grasset, na França, em 1882. Segundo Sousa (1969), este porta-enxerto apresenta uma adaptação similar à do 104-14, preferindo, porém solos mais frescos. Por outro lado, parece possuir boa resistência à secura e simultaneamente boa adaptação a terrenos argilosos e úmidos. Pereira e Leitão Filho (1973) apresentaram o Traviú como possuindo afinidade para a maioria das cultivares. Este porta-enxerto é utilizado principalmente com as cultivares de Niágara e induz bons rendimentos quando utilizado com as cultivares Patrícia, Soraya, Rainha, Seibel 2 e IAC 138-22. Para a cultivar Itália, o Traviú proporciona menores produções do que quando esta é combinada com o porta-enxerto Kober 5BB. Mas, por outro lado, quando a Itália está associada com Traviú, ocorre antecipação da maturação em alguns dias e formação de cachos mais soltos. De acordo com as colocações de Pommer et al. (1997) e Simão (1998), desde que sejam respeitadas as

exigências naturais e específicas, ou adaptações dos porta-enxertos, é possível que as cultivares de Niágara tenham boas possibilidades de responder bem a enxertias realizadas sobre o du Lot, o Traviú, ou mesmo o Golia, o que já não acontecerá com o 5BB.

As plantas do porta-enxerto Traviú apresentam folhas cuneiformes, de coloração verde-escura na face superior e levemente mais clara e opaca na inferior, apresentam nervuras primárias pigmentadas de antocianinas em seu terço basal; pilosidade esparsa em ambas as faces, constituída por pêlos simples, curtos e brancos; lobos longo-acuminados e bem salientes; seio peciolar em U; pecíolo de coloração vermelho escura e dotado de pêlos lanuginosos brancacentos; os brotos terminais são levemente bronzeados e as folhas jovens brilhantes, com pecíolo e lâmina sericio-pilosos. Os caules adultos são avermelhados, glabros e levemente reluzentes. A planta do Traviú produz flores femininas, que dão origem a poucos frutos (Sousa e Martins, 2002).

#### **2.6.5. IAC-572 - Jales**

Dos porta-enxertos criados pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), destaca-se principalmente o IAC-572-Jales, pela adaptação e afinidade com as principais cultivares em uso nas regiões tropicais. O IAC-572-Jales é oriundo do cruzamento entre *V. tiliifolia* x 101-14 Mgt, realizado, em 1954, no IAC (Camargo, 1998). A partir do início da década de 90, este porta-enxerto vem sendo bastante difundido em todas as regiões vitícolas tropicais do país, sob a etiqueta “Tropical sem vírus”. A difusão ocorreu a partir de material sadio, obtido por termoterapia no IAC, propagado, em Tupi Paulista - SP, pelo viticultor Nelson Fujino e levado para Jales, para o Vale do São Francisco e para as novas regiões vitícolas em desenvolvimento no Mato Grosso do Sul e no Mato Grosso. Em 1993, o IAC-572 – Jales foi identificado em matrizeiro formado pela Agropecuária Labrunier Ltda. sediada no Vale do São Francisco, a partir de material proveniente de Tupi Paulista.

Atualmente, este é o porta-enxerto mais propagado, substituindo o IAC-313-Tropical em praticamente todos os novos plantios a partir dos anos 1994/1995, tanto no Vale do São Francisco como no Noroeste de São Paulo e outras regiões. O IAC-572 - Jales é um pouco menos vigoroso que o porta-enxerto Tropical, sendo de fácil enraizamento, apresentando bom índice de sobrevivência quando transplantado para o campo e boa afinidade geral com as principais cultivares de uvas finas, como a Itália, Rubi, Benitaka, Brasil, Red Globe, Christmas Rose, Perlette e Centennial. Também tem sido usado com sucesso para a cultivar Niagara Rosada na região de Jales e nos estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Camargo, 1998).

As plantas do porta-enxerto IAC-572 - Jales possuem folhas de coloração verde-escura na face superior e verde-clara e opaca na face anterior, com nervuras primárias, secundárias e seio peciolar pigmentados com antocianina; pilosidade nas duas faces, formada por pêlos brancos e curtos, concentrados ao longo das nervuras; lobos desenvolvidos correspondentes às três nervuras primárias, razão pela qual a folha se apresenta trilobada; seio peciolar em V; pecíolo vermelho escuro ou bronzeado, opaco. Os brotos terminais são verde-claros ou levemente bronzeados. As folhas e os ramos novos são densamente revestidos de pilosidade lanuginosa; os caules adultos são verde-bronzeados ou levemente amarelados, lisos e opacos, com esparsos pelos lanuginosos brancos (Sousa e Martins, 2002).

## **2.7. Identificação dos porta-enxertos**

A identificação de espécies, variedades, cultivares e híbridos de uvas, tradicionalmente é dependente das características das folhas e frutos (Lin e Walker, 1997). A utilização destas características para a identificação é uma habilidade de praticidade e é realizada com certa dificuldade devido às variações condicionadas pelos ambientes e o estágio de desenvolvimento da planta. Porta-enxertos com mesmo parentesco ou similar podem ter muitas características vitícolas diferentes, e a escolha apropriada do porta-enxerto pode ser essencial para um ótimo

crescimento e qualidade do fruto. Por isso, é importante a correta identificação dos porta-enxertos.

Para a indústria, por exemplo, a identificação de videiras é uma necessidade essencial e esta tem sido realizada através de ampelografia de campo; por este método, os cultivares são distinguidos com base em características morfológicas. A propagação vegetativa e a disseminação global dos cortes propagados vegetativamente por centenas de anos têm causado problemas para o sistema de identificação baseado em genótipos (Thomas et al., 1994). O problema é que, embora haja variedades que sejam perfeitamente distinguíveis a olho nu, sendo o exemplo extremo a distinção entre variedades brancas e tintas quando o fruto está maduro, há muitas variedades com características de matéria-prima enológica muito diferentes, mas com aparências muito similares. Quando a isso é acrescida a influência ambiental, o resultado é um elevado grau de variabilidade ao fenótipo, (em linguagem comum, o resultado visível da interação entre a herança genética e o ambiente), levando a uma impossibilidade de identificação correta de certas variedades ou cultivares.

De acordo com Monteiro (1999), existem três grandes grupos para a detecção de polimorfismos: a ampelografia, os marcadores celulares e os marcadores moleculares

### **2.7.1. Ampelografia**

A ampelografia é o método usual e de utilização generalizada na identificação de variedades, mas, apesar da sua grande e evidente contribuição para a viticultura nacional, esse método apresenta desvantagens inerentes ao fato de utilizar as características fenotípicas da videira no processo de classificação. Sendo o fenótipo a expressão do genótipo e levando em consideração que, durante o crescimento da videira (fase em que o genótipo se exprime em fenótipo), esta expressão é influenciada pelo ambiente e a ampelografia introduz no processo da

classificação, variáveis não controladas e dependentes do ambiente (Wolfe, 1976; Dias, 1994).

Em busca de uma modo que fosse o mais objetivo possível e que permitisse diferenciar todas as castas, foi necessário desenvolver um método que utilizasse parâmetros que se mantivessem inalterados em todas as circunstâncias. Atualmente, o genótipo satisfaz a esses requisitos e, desse modo, permite uma análise constante, objetiva e independente das variações ambientais (Monteiro, 1999).

### **2.7.2. Marcadores bioquímicos**

Os métodos bioquímicos, como a análise de isoenzimas, têm sido desenvolvidos para complementar e assistir a identificação ampelográfica, determinando o genótipo de cultivares. Muitos autores têm utilizado as isoenzimas como marcadores bioquímicos para identificar videiras (Wolfe, 1976; Weeden et al., 1988; Bachmann 1989; Calò et al., 1989; Parfitt e Arulsekhar, 1989; Walters et al., 1989; Boursiquot e Parra, 1992; Walker e Liu, 1995). Entretanto, o uso destes marcadores é limitado em *Vitis*, pois poucos sistemas enzimáticos estão padronizados e disponíveis. Além desta limitação, o uso de isoenzimas não indica diretamente o genótipo, uma vez que fatores fisiológicos, ambientais, relacionados com desenvolvimento e expressão tecido-específica interferem nos resultados obtidos. Os resultados obtidos expressam o fenótipo para os *loci* analisados (Botta et al., 1995; Walker e Liu, 1995; Oliveira-Collet et al., 2005).

Análises com isoenzimas também tem sido utilizadas para distinguir os porta-enxertos e cultivares frutíferas (Wolf, 1976; Walker e Liu, 1995; Weeden et al., 1998;), mas esta técnica é freqüentemente restrita, devido ao limitado número de *loci* detectáveis, ao polimorfismo também limitado e à expressão de certos produtos gênicos. Assim, o uso de marcadores moleculares baseados em DNA para a identificação dos genótipos foi proposto para superar estas limitações das análises bioquímicas.

### 2.7.3. Marcadores moleculares

Os recentes avanços na biologia molecular têm permitido detectar facilmente seqüências polimórficas de DNA, e têm sido aplicadas para a identificação de cultivares e estudos filogenéticos para diversas plantas. As seqüências polimórficas de DNA não são influenciadas pelas condições ambientais ou culturais e o uso delas é proposto como uma grande vantagem sobre as características morfológicas ou fisiológicas (Goto - Yamamoto et al., 1998). Vários marcadores têm sido utilizados, incluindo o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Bourquin et al., 1993) RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Wu e Lin, 1994) e microssatélites ou SSR (*Simple Sequences Repeat*) (Thomas e Scott, 1993; Bowers et al., 1996; Rongwen et al., 1995).

De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1996), um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente da expressão de um gene, como no caso de proteínas, caracteres morfológicos, ou de um segmento específico de DNA, neste caso correspondendo a regiões expressas ou não do genoma, cuja seqüência e função podem ou não ser conhecidas. Os marcadores moleculares podem complementar o melhoramento de forma distinta, fornecendo uma medida confiável da diversidade genética, que pode ser utilizada para a determinação do grau de parentesco entre linhagens e variedades, para proteção dos direitos da propriedade intelectual. Pode, ainda, contribuir, por meio de seu ligamento com alelos de interesse, no primeiro passo, para o entendimento da biologia e da estrutura de muitas características, especialmente quantitativas (Borém e Miranda, 2005).

A proposta de Thomas e Scott (1993) é de que a identificação de cultivares usando marcadores de DNA deva ser mais eficiente, pois estes avaliam diretamente o genótipo independente do fenótipo. Esta identificação é importante para os programas de melhoramento, para mapear características de interesse econômico e isolar genes específicos.

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu, em 1990, com a idéia de utilizar *primers* mais curtos e de seqüências arbitrárias para dirigir a reação de amplificação, eliminando, assim, a necessidade do

conhecimento prévio da seqüência. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos. Williams et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado - RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*; DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso).

RAPD é basicamente uma variação de protocolo de PCR, com duas características distintas: utiliza um só *primer* ao invés de um par de *primers*; este *primer* tem seqüência arbitrária e, portanto, sua seqüência alvo é desconhecida. Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes. Portanto, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD possui natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente. Enquanto o genótipo homocigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda no gel, os genótipos homocigoto dominante (AA) e heterocigoto (Aa) são colocados juntos na mesma classe fenotípica, ou seja, como a presença da banda no gel (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

## **2.8. Marcadores Moleculares em *Vitis***

Nas últimas décadas, diferentes tipos de marcadores de DNA têm sido desenvolvidos e utilizados para investigar e identificar videiras. Entre estes estão o RFLP (Blaich, 1989; Striem et al., 1990; Bourquin et al., 1992; Bowers et al., 1993; Thomas e Scott, 1993); RAPD (Jean-Jaques et al., 1993; Gorgocena et al., 1993; Büscher et al., 1993; Büscher et al., 1994; Lodhi et al., 1997); SSR ou microssatélites (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) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Cervera et al., 2000).

O emprego de marcadores moleculares utilizando análises de seqüências de DNA aleatoriamente amplificadas, referida como RAPD (Williams et al., 1990) ou AP-PCR (Welsh e McClelland, 1991), tem sido importante e pode resolver vários aspectos no estudo das videiras. RAPD é uma técnica simples, mas poderosa. É um método baseado em PCR, permitindo a amplificação casual de segmentos

inespecíficos do DNA genômico criando um *fingerprint* de marcadores polimórficos. Variações nos *fingerprints* produzidas pelas análises com RAPD tem a sua origem a partir de mudanças nas seqüências onde os *primers* se anelam nos diferentes genomas. O polimorfismo é criado a partir do momento que a seqüência é amplificada em um indivíduo, mas não em outro (Benter et al., 1995).

O polimorfismo resultante quando RAPD é utilizado é importante, pois pode gerar alta quantidade de marcadores de DNA, oferecendo uma boa possibilidade para os estudos de relação genética em *Vitis*, uma vez que apresenta uma grande diversidade intraespecífica (Grando et al., 1996).

De acordo com Vidal et al. (1996), o uso de RAPD permitiu a separação de 32 variedades de uva branca (*Vitis vinifera* L.), crescidas em diferentes regiões da França e Espanha. As variedades foram separadas em três grupos com influências do Atlântico e do Mediterrâneo. Assim, este marcador pôde ser empregado para separar espécies de acordo com sua origem geográfica. Este marcador também foi importante para analisar as relações entre uvas selvagens e as cultivadas do Japão, Coréia e China. Os resultados obtidos evidenciam uma clara separação entre uvas cultivadas e selvagens (Goto-Yamamoto et al., 1998).

As variedades cultivadas, os porta-enxertos e as espécies selvagens de genótipos indianos foram avaliados e os resultados possibilitaram a separação das espécies selvagens e porta-enxertos dos genótipos cultivados (Tamhantar et al., 2001). As espécies cultivadas foram separadas em dois grupos, constituídos principalmente de *V. labrusca* e *V. vinifera*. As uvas para a produção de vinho ainda puderam ser separadas em diferentes subgrupos. As origens e autenticidade de muitos cultivares de uva (*V. vinifera*) usadas para a produção de vinho não são claras e estão sujeitas a algumas controvérsias (Herrera et al., 2002). Utilizando RAPD, verificou-se que foi possível a comparação das quatro cultivares no Chile e os resultados deste trabalho mostram que a Merlot cultivada no Chile e na França são altamente divergentes, representando diferentes genótipos.

Cuisset (1998) registrou que uma associação dos marcadores RAPD, microssatélites e caracteres morfológicos possibilitaram a discriminação de uvas de vinho, de mesa e de porta-enxertos. As uvas de vinho puderam ser agrupadas de

acordo com sua origem geográfica. Através destes estudos foi possível supor que a evolução das uvas de vinho não se deve somente à propagação vegetativa e a procedimentos de seleção, mas também foi promovida por atividades de cruzamentos.

O uso de PCR-multiplex tem sido importante para auxiliar os programas de melhoramento desta cultura. É um método que permite uma rápida identificação genética de porta-enxertos, sendo útil em todos os casos onde a identificação baseada em caracteres morfológicos não apresenta consistência (Frei et al., 2004).

Um considerável investimento também tem sido feito para investigar caracteres quantitativos, para subsidiar os programas de melhoramento e em estudos genéticos para a uva. Um aumento no número de *loci* de microssatélites em uva disponibilizados por vários autores (Thomas e Scott, 1993; Thomas et al., 1994; Cipriani et al., 1994; Bowers et al., 1996; Regner et al., 2000; Sefc et al., 1999; Scott et al., 2000; Di Gaspero et al., 2000; Arnold et al., 2002), aliado com a facilidade de emprego deste marcador, tem mostrado que os *loci* SSR podem ser utilizados para a construção de mapas genéticos, sendo assim possível o estudo de caracteres que apresentam herança quantitativa em uva (Bellin et al., 1999; Dalbó et al., 2000).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Variedades de porta-enxerto de uva

Para a extração de DNA, foram utilizadas folhas jovens e completamente expandidas de 15 a 20 plantas das seguintes variedades de porta-enxerto de uva: 420-A, Schwarzmann, IAC-766 – Campinas, Traviú, Kober 5BB e IAC-572 – Jales (Quadro 1). As folhas foram coletadas em uma área experimental da Cooperativa de Rolândia (COROL), no município de Rolândia-PR. Também foram necessárias de 15 a 20 estacas da variedade Kober 5BB, oriundas da EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa em Uva e Vinho - Bento Gonçalves-RS.

**Quadro 1.** Cruzamentos entre espécies de uvas que deram origem aos porta-enxertos analisados

<b>Variedades de Porta-enxertos</b>	<b>Origem</b>
420-A	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>
Traviú	<i>V. riparia</i> x ( <i>V. rupestris</i> – <i>V. cordifolia</i> )
IAC-572 - Jales	<i>V. tiliifolia</i> x 101-14 Mgt
IAC-766 - Campinas	Traviú x <i>V. tiliifolia</i>
Schwarzmann	<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>
Kober 5BB	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>

Fonte: Camargo, 1998; Pommer et al., 1997; Sousa e Martins, 2002.

As folhas coletadas das cinco primeiras variedades foram identificadas, armazenadas em sacos de sombrite e mantidas em gelo desde a coleta até o laboratório, onde foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80 °C até o momento de extração de DNA. As estacas da variedade Kober 5BB, fornecidas pela Embrapa de Bento Gonçalves – RS, foram plantadas no Jardim Didático da Universidade Estadual de Maringá e, após a brotação as folhas jovens completamente expandidas, foram coletadas para o processo de extração de DNA.

### 3.2. Extração do DNA de folhas das variedades de porta-enxerto de uva

Para a extração do DNA genômico das folhas dos porta-enxertos de uva, foi utilizado a metodologia descrita por Thomas e Scott (1993) com algumas modificações. Foi extraído o DNA de 15 amostras de cada uma das seis variedades e, para facilitar o processo de extração, o protocolo foi dividido em três etapas:

**Primeira etapa** - 100 mg de folhas de cada amostra foi pulverizada com nitrogênio líquido e o pó obtido foi distribuído em 4 microtubos de 2 mL e homogeneizado com 1250  $\mu$ L de tampão de extração 'A', descrito no Quadro 2. Após a homogeneização, foi realizada a centrifugação a 4 °C, durante 10 minutos, a 4.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e em cada tubo foi adicionado 700  $\mu$ L do tampão 'B', descrito no Quadro 2. Após a homogeneização, os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C, durante 30 minutos, sendo 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, foi adicionado 700  $\mu$ L de clorofórmio: álcool isoamílico (preparado na proporção de 24:1) e os tubos foram agitados durante 3 minutos. Em seguida foram centrifugados em temperatura ambiente por 12 minutos a 16.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e a este foi adicionado 0,54 vezes o volume de isopropanol. Após algumas inversões, os tubos foram novamente centrifugados como anteriormente, obtendo-se o *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco em temperatura ambiente e a este foi adicionado 200  $\mu$ L de TE (Tris/HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0). O DNA foi ressuspendido e armazenado em geladeira a 4°C.

**Segunda etapa** – Em cada tubo, foi adicionado 2  $\mu$ L de RNase (20 ng/ $\mu$ L), e estes foram mantidos por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, foi acrescentado 100  $\mu$ L de acetato de amônio a 7,5 M e, após algumas inversões, os tubos foram centrifugados em temperatura ambiente por 12 minutos a 16.000 x g. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos novos e a eles adicionados 0,54 vezes o volume de isopropanol. Os tubos foram armazenados *over night* em freezer a 20°C.

**Terceira etapa** – Em seguida, foi realizada centrifugação em temperatura ambiente por 12 minutos a 16.000 x g obtendo-se o *pellet*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 300 µL de etanol 70 % gelado. Após a lavagem, realizou-se uma centrifugação a 4 °C, por 12 minutos, com 16.000 x g. O sobrenadante foi vertido delicadamente e os tubos colocados na estufa a 37 °C até que todo o etanol fosse evaporado. O *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de TE e os tubos 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 porta-enxertos de uva

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

### 3.3. Avaliação e quantificação dos DNAs extraídos

As etapas de avaliação, quantificação do DNA, coloração do gel e estocagem do DNA foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Zequim-Maia (2003), para folhas jovens de *Vitis vinifera* L.

Para quantificar o DNA extraído e avaliar a sua integridade, os DNAs das amostras de folhas de porta-enxerto de uva e soluções de DNA de fago λ de concentrações conhecida (50, 100, 150, 200 e 250 ng) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8 %, preparado com tampão TAE e concentração 1X pH 8,0 (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA) (Hoisington et al., 1994), sob voltagem de 80 V. Para a visualização, o gel foi corado em banho de Brometo de Etídio preparado com 0,5 µg/mL. Em seguida, o gel foi fotografado sob luz UV,

utilizando o programa KODAK 1D 3.5. As quantificações foram confirmadas através do uso do espectrofotômetro.

### **3.4. Amplificação do DNA e seleção de *primers***

As reações de amplificação foram realizadas com DNA extraído de folhas jovens dos diferentes porta-enxerto de uva. Para tanto, foram selecionadas em média 11 amostras de cada variedades, totalizando 65 amostras. As demais amostras de DNA extraídas foram guardadas como amostras reserva.

Como base para a amplificação, foi utilizado o protocolo original descrito por Williams et al. (1990) com padronizações para as concentrações de alguns dos componentes. Para a padronização da reação, foram testadas as concentrações de DNA (20, 25 e 30 ng; esta última não apresentada no gel), e de MgCl<sub>2</sub> (2,0, 2,5 e 3,0 mM). Para os testes de padronização de amplificação, foram utilizados os *primers* OPB-03 e OPB-11 e amplificados os DNAs de quatro amostras escolhidas ao acaso.

As reações de amplificação para os ensaios de RAPD, foram realizadas em um termociclador Techne TC-512 e preparadas em microtubos de 0,2 mL para um volume final de reação de 20 µL. Para a padronização da reação, foram testados 20, 25 e 30 ng de DNA genômico e 2,0; 2,5 e 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, com 0,2 µM de *primer*, 1 U de *Taq-DNA polimerase* (Invitrogen), tampão de reação (Invitrogen) 1X, 0,1 mM de cada dNTP e água mili-Q autoclavada qsp.

A desnaturação do DNA foi feita em 96 °C por cinco minutos, seguida por 45 ciclos de amplificação (94 °C por 45 s, 35 °C por 60 s, 72 °C por 90 s). Após os 45 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min em 72 °C.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 2%, usando tampão TBE 0,5X pH 8,0 (0,045 M Tris-borato, 0,001 M EDTA). A eletroforese foi realizada por aproximadamente 5 horas, com 60 Volts. Os géis foram corados com banho de brometo de etídio e a imagem capturada com *Ultraviolet Transilluminador High Performance-Edas 290*, utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

Para definir o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb DNA *Ladder* (Invitrogen).

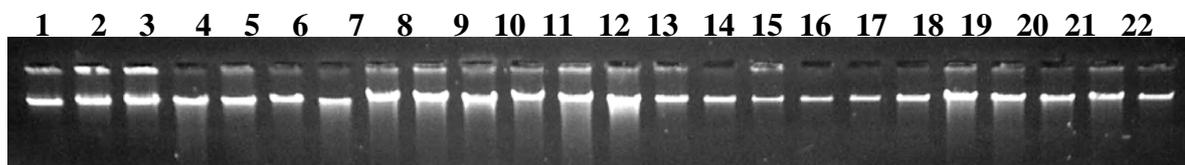
Para a seleção dos marcadores, foram avaliados 83 *primers* para RAPD pertencentes a diferentes Kits: A (1-20), B (1-20), C (1-20), F (5, 9, 13), I (5), L (11), M (1-10) e P (2, 4, 7-11 e 17), desenvolvidos pela *Operon Technologies Inc.* Dentre eles, foram selecionados aqueles que apresentaram bandas bem fracionadas e nítidas no gel de agarose após as amplificações realizadas com uma amostra de cada variedade.

### **3.5. Análise dos resultados**

A análise dos produtos das amplificações foi realizada em termos da presença ou ausência de cada fragmento de DNA amplificado. O resultado da leitura dos géis foi utilizado para a construção de uma matriz binária. Para a obtenção dos resultados, foi utilizado o aplicativo Popgene 1.32 (YEH et al., 1999) e o agrupamento foi realizado pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair\_Group Method Using Arithmetic Average*). Usando este aplicativo, foram estimadas a identidade genética de Nei e a distância genética entre as variedades dos porta-enxertos de uva agrupadas em um dendrograma, também construído pelo mesmo aplicativo. Também foi calculado o  $G_{st}$  que é definido como uma medida de diferenciação genética entre as subpopulações (Nei, 1977). Na estatística F, de Wright, a medida de diferenciação genética  $G_{st}$  pode ser aplicada a níveis de subdivisão hierárquica adicionais, tais como populações dentro de uma região geográfica, subpopulações dentro de populações, colônias dentro de subpopulações e indivíduos dentro de colônias, utilizando-se, em cada caso, as frequências alélicas correspondentes ao nível em questão (Alfenas, 2006). Nei (1972, 1973) propôs também as medidas de similaridade genética (I) e de distância genética (D), que comparam as frequências alélicas entre as populações. Estas medidas podem ser utilizadas para a construção de dendrogramas (na análise de grupamentos).

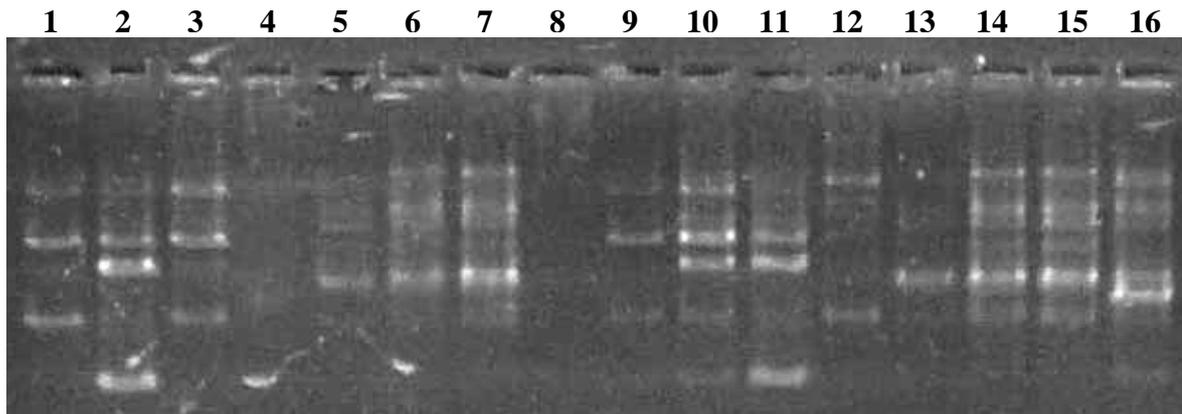
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através da análise em gel de agarose a 0,8% foi possível verificar a integridade das amostras de DNA e determinar a concentração de DNA de todas as amostras das seis variedades de porta-enxerto de uva estudadas. A quantificação foi realizada através de comparação das bandas das amostras das diferentes variedades com as de DNA do fago  $\lambda$  de concentrações conhecidas (50, 100, 150, 200 e 250 ng). Em função desta comparação, foi possível determinar que a quantidade dos 65 DNAs extraídos e selecionados variou de 67 a 530 ng/ $\mu$ L (Figura 1). Apesar de Lin e Walker (1997) descreverem que a extração de DNA de tecido de câmbio em *Vitis* seja um método efetivo tanto para a qualidade como para a quantidade de DNA extraído, a metodologia descrita por Thomas e Scott (1993), empregando folhas como material biológico, utilizada no presente trabalho, foi eficiente para a amplificação do DNA, utilizando *primers* arbitrários e os resultados foram reproduzíveis.

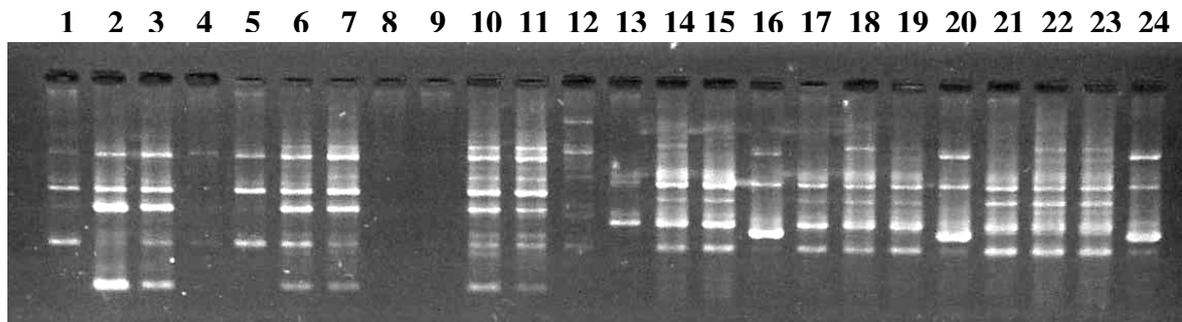


**Figura 1.** Gel de agarose a 0,8% utilizado para avaliar e quantificar as amostras de DNA. **1, 2 e 3** são amostras de DNA fago  $\lambda$  com as concentrações de 50, 100 e 150 ng respectivamente. As amostras de **4 a 24** são DNAs extraídos das variedades de porta-enxerto de uva.

Para garantir que os resultados fossem reproduzíveis, concentrações de DNA e de  $MgCl_2$  foram testadas. Foi possível verificar que a melhor concentração de DNA foi a de 30 ng, uma vez que, quando esta concentração foi utilizada, um maior número de fragmentos amplificados foi obtido (Figura 2). Para o  $MgCl_2$ , as bandas de DNA nítidas e bem fracionadas foram obtidas quando a concentração de 3,0 mM foi utilizada para a reação (Figura 3). Estas condições de amplificação foram adotadas para todas as amostras estudadas.



**Figura 2.** Gel de agarose a 2% utilizado para separar os fragmentos de DNA amplificados durante a padronização da concentração de DNA. Para as amostras de 1 a 8 foi utilizada a concentração de 20 ng e para as amostras de 9 a 16 foram utilizadas as mesmas amostras de DNA na concentração de 25 ng. Para amplificar as amostras de 1 a 4 e de 9 a 12 foi utilizado o *primer* OPB-03 e para as amostras de 5 a 8 e de 13 a 16 o *primer* OPB-11.



**Figura 3.** Gel de agarose a 2% utilizado para separar os fragmentos de DNA amplificados durante a padronização para a concentração de  $MgCl_2$ . Para as amostras de 1 a 12 a reação foi realizada com o *primer* OPB-03 e de 13 a 24 com o *primer* OPB-11. De 1 a 4 e 13 a 16 a concentração do  $MgCl_2$  utilizado foi de 2,0 mM; de 5 a 8 e de 17 a 20 foi de 2,5 mM; de 9 a 12 e 21 a 24 foi utilizado 3,0 mM. As amostras 1, 5, 9, 13 17 e 21 são da variedade 420-A; as amostras 2, 6, 10, 14, 18 e 22 da variedade Schwarzmann; 3, 7, 11, 15, 19 e 23 da variedade Traviú e 4, 8, 12, 16, 20 e 24 da variedade IAC-766 - Campinas.

Para avaliar a diversidade genética dentro e entre as variedades de porta-enxerto de uva, foram testados um total de 83 *primers* para RAPD; destes, 17 foram selecionados conferindo um aproveitamento de 20,48% para os *primers* avaliados. This et al. (1997) testaram 21 *primers* para RAPD para selecionar marcadores moleculares para a identificação de porta-enxertos de uva; desses *primers* testados,

somente seis foram utilizados para a análise. Quando combinações de 64 *primers* para AFLP foram testadas por Upadhyay et al. (2007) para analisar três porta-enxertos de uvas da Índia, somente 10 deles amplificaram todos os porta-enxertos, conferindo um aproveitamento de 15,6%. Assim, a efetividade dos *primers* para diferentes marcadores testados e selecionados para *Vitis* parece ser baixa.

Os *primers* selecionados no presente trabalho foram aqueles que apresentaram maior número de bandas com maior polimorfismo (Figura 4); outra qualidade para a escolha dos *primers* foi a reprodutibilidade dos fragmentos amplificados. Para estudar a diversidade genética dos 65 indivíduos selecionados das seis variedades de porta-enxerto de uva, foram selecionados e utilizados os *primers* OPB-01, OPB-03, OPB-04, OPB-05, OPB-07, OPB-08, OPB-10, OPB-11, OPB-15, OPB-17, OPB-18, OPC-02, OPC-04, OPC-07, OPP-08, OPP-11 e OPP-17.

As reações de amplificações resultaram em 247 fragmentos amplificados, com uma média de 14,5 fragmentos amplificados por *primer*. Dos fragmentos obtidos, 32 foram monomórficos e 215 polimórficos, conferindo, assim, um polimorfismo total para as variedades estudadas de 87,04%. Os *primers* OPB-03, OPB-04, OPB-08, OPC-07 e OPP-08 apresentaram 100,00% de polimorfismo, produzindo cada um 15, 17, 14, 17 e 14 fragmentos, respectivamente. O *primer* OPB-15 foi o que apresentou menor polimorfismo (36,36%), gerando 11 fragmentos dos quais somente 4 foram polimórficos (Quadro 3).

O polimorfismo obtido para as seis variedades de porta-enxerto no presente estudo foi mais alto (87,04%) do que o verificado para quatro variedades de *Vitis vinifera*, utilizando também o marcador RAPD (Zequim-Maia, 2003). O polimorfismo de 65% encontrado para as quatro cultivares também foi considerado alto. Orasmo et al. (2007) trabalhando com as mesmas cultivares de *Vitis vinifera* L. observaram um polimorfismo de 61,7% para alelos nulos para a carboxilesterase EST-3. A ocorrência de *crossing-over* somático, induzido por elementos genéticos transponíveis que promovem rearranjos cromossômicos, tem sido descrita por Oliveira-Collet et al. (2005) como o mecanismo responsável pelo alto polimorfismo em variedades de uvas de cor (*Vitis vinifera* L.). Esses rearranjos somáticos descritos para *Vitis vinifera* podem também explicar o alto nível de polimorfismo observado

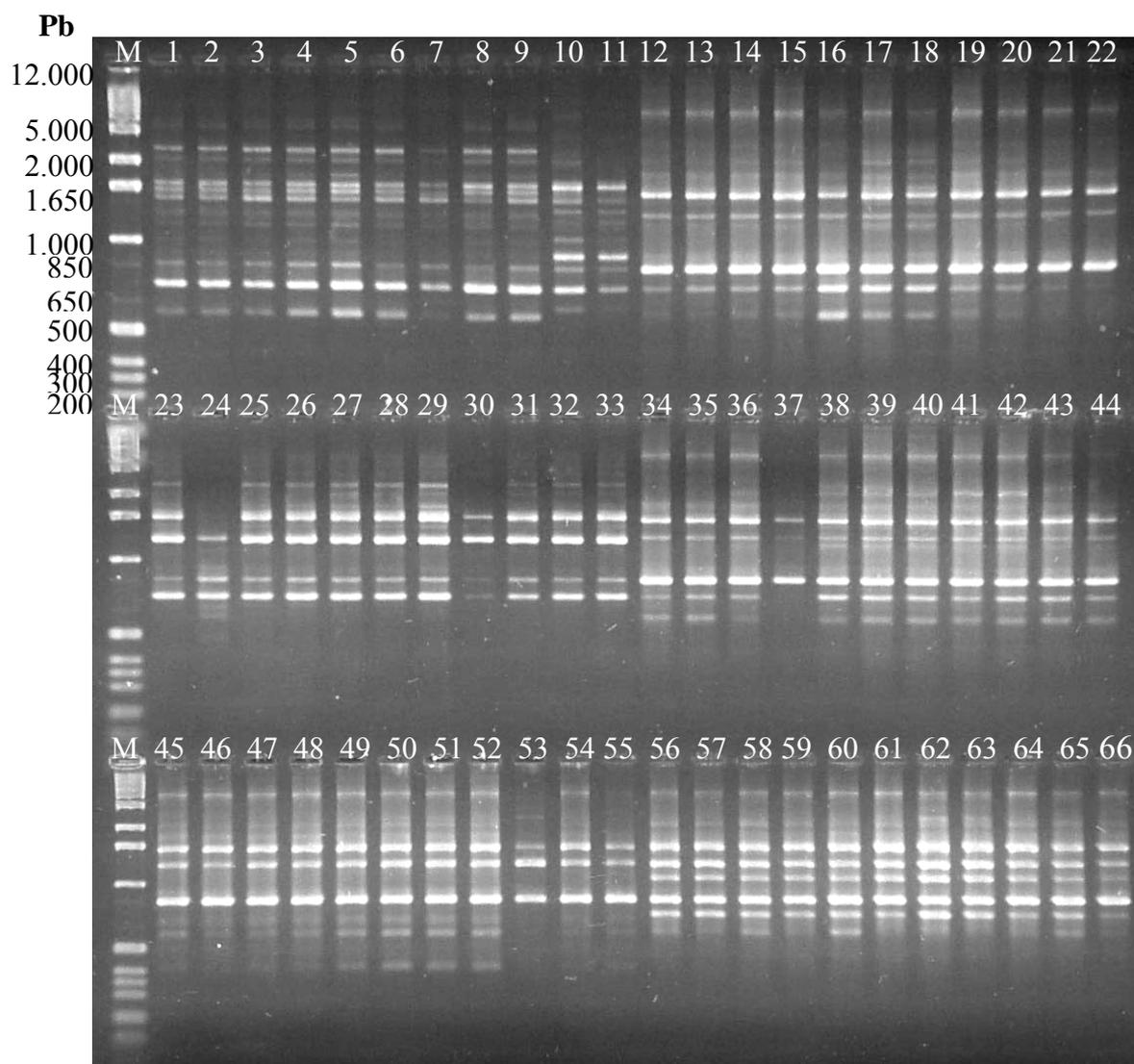
para as seis variedades de porta-enxerto. O mais alto polimorfismo obtido com uso de RAPD para os porta-enxertos pode estar relacionado com a forma de avaliação do marcador. Com o emprego de isozimas é avaliada a expressão de genes e, quando seqüências de nucleotídeos são avaliadas de forma arbitrária, uma maior extensão do genoma é estudada. Nesta forma de análise, são avaliadas seqüências que podem estar associadas a um papel funcional e seqüências que apresentam somente papel estrutural (Dziechciarkova, et al., 2004; Koch e Kiefer, 2006).

**Quadro 3.** Número e freqüência dos fragmentos monomórficos e polimórficos obtidos para cada *primer* utilizados para a amplificação das diferentes variedades de porta-enxerto de uva

<i>Primers</i>	Total de	Fragmentos	%	Fragmentos	%
	Fragmentos	Monomórficos		Polimórficos	
OPB-01	12	2	16,67	10	83,33
OPB-03	15	0	0	15	100,00
OPB-04	17	0	0	17	100,00
OPB-05	12	2	16,67	10	83,33
OPB-07	16	3	18,75	13	81,25
OPB-08	14	0	0	14	100,00
OPB-10	12	5	41,67	7	58,33
OPB-11	18	1	5,56	17	94,44
OPB-15	11	7	63,64	4	36,36
OPB-17	16	1	6,25	15	93,75
OPB-18	12	3	25,00	9	75,00
OPC-02	15	2	13,34	13	86,66
OPC-04	16	3	18,75	13	81,25
OPC-07	17	0	0	17	100,00
OPP-08	14	0	0	14	100,00
OPP-11	13	1	7,70	12	92,30
OPP-17	17	2	11,77	15	88,23
<b>TOTAL</b>	<b>247</b>	<b>32</b>	<b>12,96</b>	<b>215</b>	<b>87,04</b>

A freqüência diferencial para os fragmentos observados para as seis variedades de porta-enxertos determinou uma divergência genética entre elas de 0,7094. 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. No Quadro 4, é possível observar a diferença de polimorfismo entre as variedades, sendo o menor polimorfismo o encontrado na variedade IAC-572 - Jales

(21,91%). A variedade que apresentou o maior polimorfismo foi a 420-A, com 49,24% de fragmentos polimórficos. Uma grande variação genética entre cultivares *Vitis* tem sido observada por Koesis et al. (2005), sendo que estes autores estimaram a diversidade genética para 12 cultivares de *V. vinifera*, empregando o marcador molecular RAPD, e encontraram que a variação genética entre as cultivares foi entre 0,419 e 0,642.



**Figura 4.** Gel de agarose 2%, utilizado para separação dos fragmentos de DNA de diferentes variedades de porta-enxerto de uva amplificados com o *primer* OPP-17. As amostras de 1 a 11 são da variedade 420-A; 12 a 22 são da variedade Schwarzmann; 23 a 33 são da variedade Traviú; 34 a 44 são da variedade IAC-766 - Campinas; 45 a 55 são da variedade IAC-572 - Jales; 56 a 66 são da variedade Kober 5BB e M corresponde ao marcador 1Kb DNA *ladder* (Invitrogen).

A diversidade genética calculada pelos coeficientes de Identidade ou de Distância Genética de Nei (1978) mostrou maior identidade genética entre as variedades IAC-766 - Campinas e Schwarzmann, com 83,22% de similaridade e a menor similaridade genética foi encontrada entre as variedades Kober 5BB e 420-A (61,96%). Esses resultados estão apresentados na matriz de similaridade (Quadro 5). A diferença genética entre os porta-enxertos pode ser justificada pela composição genética inicial de cada um deles (os cruzamentos dos quais eles foram originados). No Quadro 1, é possível verificar que cruzamentos de espécies diferentes foram utilizados para a produção dos porta-enxertos diferentes. Assim, as diferenças na composição genética oriunda dos parentais destes cruzamentos devem estar refletidas no valor de  $G_{st} = 0,7094$ .

Por outro lado, as variedades 420-A e Kober 5BB, que possuem a mesma origem, ou seja, são resultantes do cruzamento entre *V. berlandieri* x *V. riparia* e que são freqüentemente confundidas por serem morfológicamente não distinguíveis, foram as variedades que apresentaram a maior distância genética (0,4786). A partir dos dados obtidos utilizando os 17 *primers* para RAPD foi construído um dendrograma (Figura 5), onde é possível a identificação de um grupo formado pelas variedades 420-A, Schwarzmann e IAC - 766 - Campinas. Os porta-enxertos, Traviú, IAC - 572 - Jales e Kober 5BB não formaram grupos, refletindo assim a grande divergência encontrada entre eles. As variedades 420-A, Schwarzmann e IAC 766 - Campinas formaram um grupo no dendrograma, apesar de terem origens diferentes.

O fato de variedades originadas a partir do mesmo cruzamento parental apresentarem diferenças genéticas em nível molecular é mais uma evidência de que a divergência de marcadores moleculares não necessariamente determina ou é acompanhada por divergência morfológica. Apesar da similaridade morfológica entre as duas variedades que apresentaram a mesma origem genética, as performances destas também são diferentes. Quando comparados quanto à performance, o 420-A apresenta pouco vigor, difusão restrita e dificuldade de enraizamento (Camargo, 1998). Quando o produtor, em vez de utilizar o cultivar Kober 5BB, utiliza o 420-A, os resultados obtidos quanto à produtividade são muito inferiores ao esperado.

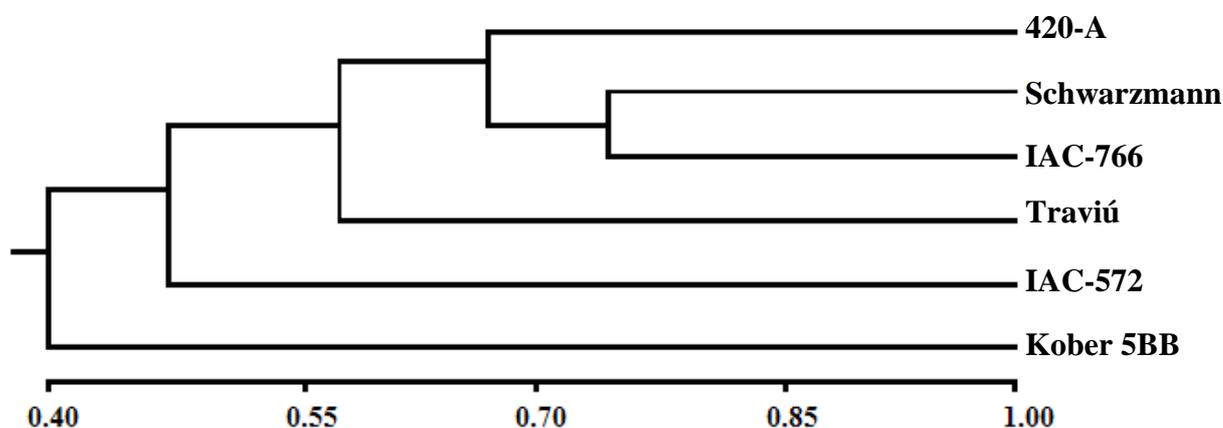
**Quadro 4.** Número total de fragmentos amplificados e o número de fragmentos monomórficos e polimórficos obtidos com os 17 *primers* para RAPD para cada variedade de porta-enxerto de uva

Variedades	Total de Fragmentos	Fragmentos Monomórficos	Fragmentos Polimórficos	Polimorfismo (%)
420-A	197	100	97	49,24 %
Schwarzmann	176	117	59	33,52 %
Traviú	185	118	67	36,22 %
IAC-766 - Campinas	187	112	75	40,11 %
IAC-572 - Jales	178	139	39	21,91 %
Kober 5BB	180	138	42	23,33 %

**Quadro 5.** Matriz de similaridade construída a partir dos coeficientes de identidade ou distância genética de Nei (1978) para as 6 variedades de porta-enxertos obtida com os dados obtidos por RAPD

Variedades	420-A	Schwarzmann	Traviú	IAC-766	IAC-572	Kober 5BB
420-A	****	0,8076	0,7425	0,7754	0,6697	0,6196
Schwarzmann	0,2137	****	0,7412	0,8322	0,6788	0,6358
Traviú	0,2978	0,2994	****	0,7416	0,6625	0,6685
IAC-766	0,2544	0,1836	0,2989	****	0,7557	0,6873
IAC-572	0,4009	0,3874	0,4117	0,2801	****	0,6687
Kober 5BB	0,4786	0,4529	0,4028	0,3749	0,4025	****

Obs: Identidade Genética de Nei (acima da diagonal) e Distância Genética (abaixo da diagonal)



**Figura 5.** Agrupamento obtido para os seis porta-enxertos de uva realizado através do método UPGMA e obtido a partir da análise de 247 fragmentos amplificados com *primers* para RAPD.

A amplificação do DNA de porta-enxerto com os *primers* OPB-1, OPB-3, OPB-4, OPB-5, OPB-11, e OPP-17 produziram fragmentos que podem ser utilizados para diferenciar as variedades 420-A, Kober 5BB, e IAC-572 – Jales (Quadro 6). O *primer* OPB-4, por exemplo, determina a amplificação do fragmento 4 específico na variedade 420-A e dos fragmentos 10 e 13 específicos na variedade Kober 5BB. Os *primers* OPB-1, OPB-3, e OPB-11 também determinam a amplificação de fragmentos específicos (fragmentos 2, 13, e 6) na variedade Kober 5BB; o *primer* OPP-17 amplifica especificamente o fragmento 1 na variedade IAC-572 – Jales e o fragmento 2 na variedade 420-A (Quadro 6). Esse é um aspecto positivo e promissor para a análise dos fragmentos aleatórios de DNA amplificados no presente estudo. Os fragmentos especificados pelos respectivos *primers* poderão ser utilizados como marcadores dos genótipos IAC-522 – Jales, 420-A e Kober 5BB. Dessa forma, as variedades Kober 5BB e 420-A, freqüentemente confundidas, poderão ser molecularmente distinguidas.

A divergência genética produzida a partir dos fragmentos de DNA analisados entre as variedades 420-A e Kober 5BB, que são de origem comum, pode ser justificada pela forma de manejo e seleção empregados no desenvolvimento das variedades. A seleção de exemplares (clones) com as características de interesse também pode gerar divergência genética molecular, na medida em que seleciona genótipos distintos que apresentam a característica de interesse. Evidências de que a domesticação e seleção artificial para caracteres quantitativos apresentam um pequeno efeito na seleção da diversidade genética também têm sido descrita para *loci* SSR (Vigouroux et al., 2005).

A ocorrência de *crossing-over* somático em cultivares de *V. vinifera*, proposta por Oliveira-Collet et al. (2005), pode determinar alterações nas seqüências de DNA que dão origem a seqüências complementares aos *primers* variáveis. Essas alterações podem ocorrer numa mesma variedade ou cultivar, estabelecendo, assim, a variabilidade genética dentro da cultivar ou variedade, podendo, ainda, dar origem a alterações morfológicas ou fisiológicas marcantes. Esta proposta para explicar uma variabilidade genética em nível de seqüências de DNA, a despeito da origem parental e da similaridade morfológica entre as variedades, pode, também, explicar as

observações de Crespan (2004). Este autor descreveu que quanto mais velha é a variedade de uva, maior é a probabilidade de observar plantas diferentes em função do acúmulo de mutações.

**Quadro 6.** Fragmentos específicos amplificados com diferentes *primers* para RAPD em diferentes variedades de porta-enxertos de uva

<b>VARIETADES</b>	<b>PRIMERS</b>	<b>FRAGMENTOS ESPECÍFICOS</b>
420-A	OPB-4	4
	OPB-5	2
	OPP-17	2
IAC-572 -Jales	OPB-4	4
	OPB-5	2
	OPP-17	1
Kober 5BB	OPB-1	2
	OPB-3	13
	OPB-4	10, 13
	OPB-11	6

O uso de RAPD no presente estudo mostrou ser uma técnica eficiente e permitiu a separação das seis variedades de porta-enxerto (Figura 5). Outros acessos de uva têm sido diferenciados quando o RAPD é utilizado (Grando et al. 1995; Loureiro et al, 1998; Ye e Soylemezoglu 1998; Tessier et al., 1999). Esse marcador pode, portanto, ser recomendado para a resolução de problemas relacionados com a identificação de uva. A qualidade de um marcador é dependente de sua reprodutibilidade e também de sua facilidade de uso. Lin e Walker (1998) avaliaram estes critérios para os marcadores SSR e RAPD em uva e concluíram que um grande número de marcadores polimórficos é produzido quando o RAPD é utilizado e que, através desta técnica, marcadores consistentes podem ser obtidos, desde que as condições da PCR sejam cuidadosamente controladas.

O desenvolvimento e o uso de marcadores para uva são bastante importantes, uma vez que a identificação de cultivares tem sido baseada em caracteres ampelográficos (Galet 1991; Boursiquot e This, 1996; Aradhya et al., 2003). A expressão de caracteres morfológicos é influenciada por fatores ambientais, biologia individual de cada planta e história de vida da planta (This et al., 2004). Assim, os

marcadores moleculares têm sido importantes no estudo de *Vitis*, uma vez que eles são eficientes no processo de identificação de cultivares muito similares e difíceis de serem diferenciadas através de comparação visual.

Os marcadores moleculares também são eficientes para discriminar clones intervarietais, que podem diferir consideravelmente, mesmo possuindo o mesmo conteúdo de DNA (Franks et al, 2002; Riaz et al, 2002). Assim, para resolver estes problemas, tais como a diferenciação entre os porta-enxertos Kober 5BB e 420-A, é importante desenvolver e estabelecer as metodologias adequadas para as análises dos diferentes marcadores moleculares, que possibilitem a caracterização e diferenciação entre as variedades e/ou cultivares de uvas. Esta diferenciação é extremamente importante, pois o agricultor, ao plantar a variedade Kober 5BB, obterá maior produtividade que ao plantar a 420-A, variedade esta que imprime pouco vigor à copa, resultando em produtividades menores.

## 5. CONCLUSÕES

1- O *primer* OPB-4 pode ser utilizado para discriminar as variedades de porta-enxerto 420-A e Kober 5BB; o fragmento 4 é específico da variedade 420-A e os fragmentos 10 e 13 da Kober 5 BB.

2- O *primer* OPP-17 produziu os fragmentos 2 e 4 que são específicos, respectivamente, para as variedades 420-A e IAC-572 – Jales. Assim, este *primer* poderá ser utilizado para discriminar estas variedades.

3- O uso de RAPD mostrou ser uma técnica eficiente, permitindo a separação das seis variedades de porta-enxerto de uva. Portanto, este marcador pode ser recomendado para a resolução de problemas relacionados com a identificação de uva.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, T.C.S. **Uva para exportação: aspectos técnicos da produção.** Frupex: EMBRAPA-SPI, 1987. 12-13 p.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos.** Viçosa: UFV, 2006. 627 p.

ALLEWELDT, G.; DETTWEILER, E. **The genetic resources of *Vitis*: world list of grapevine collections,** 2nd edn. BZ IRZ, Geilweilerhof: Siebeldingen. 1994.

ALVARENGA, L.R.; NOGUEIRA, D.J.P.; ABRAHÃO, E. **Relatório do projeto de pesquisa: competição de porta-enxertos de videiras.** Belo Horizonte: EPAMIG, 1982. 4p.

ALVARENGA, A.A.; REGINA, M.A.; FRAGUAS, J.C.; CHALFUN, N.N.J.; SILVA A.L. Influência do porta-enxerto sobre o crescimento e produção da cultivar de videira Niágara rosada (*Vitis labrusca* L. x *Vitis vinifera* L.), em condições de solo ácido. **Revista Ciência e Agrotecnologia,** edição especial:1459-1464, 2002.

ANDRADE, P.F.S. **Fruticultura - uva fina de mesa.** Disponível em: [www.seab.pr.gov.br](http://www.seab.pr.gov.br). Acesso em: 12, março, 2008.

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

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 Enology and Viticulture,** 89:22-28, 2002.

BACHMANN, O. Isoenzymes as a tool for grape cultivar identification. **Rivista di Viticoltura e di Enologia,** 42:27-31, 1989.

BELLIN, D.; STEFANINI, M.; VELASCO, R.; STELLA GRANDO, M. Una mappa molecolare del Moscato bianco. **Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura ed Neología, Univ.** 23:129-132, 1996.

BENTER, T.; PAPADOPOTILOS, S.; PAPE, M.; MANNS, M.; POLIWODA, H. Optimization and reproducibility amplified polymorphic DNA in humam. **Analytical. biochemistry**, 330:92-100,1995.

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.

BOLIANI, A.C. Efeito de seis porta-enxertos sobre a produção e a qualidade dos frutos das videiras 'Italia' e 'Rubi' (*Vitis vinifera* L.). In: XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura; Belém, Brasil. **Sociedade Brasileira de Fruticultura**, meio digital. 2002.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2005. 525p.

BOTTA, R.; CCOTT, N.S.; EYNARD, I.; THOMAS, M.R. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. **Vitis**, 34: 99-102, 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.

BOURQUIN, J.C.; SONKO, A.; OTTEN, L.; WALTER, B. Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 87:431-438, 1993.

BOURSIQUOT, J.M.; THIS, P. Les nouvelles techniques utilisées en ampélographie: informatique et marquage. In: La **viticulture à l'aube du III<sup>ème</sup> Millénaire**. J. Int Sci Vigne Vin hors série, 13-23, 1996.

BOURSIQUOT, J.M.; PARRA, P. Application de méthode d'électrophorèse pour la caractérisation et al reconnaissance des portegreffe. **Vitis**, 31:189-194, 1992.

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.

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.

BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BLAICH, R. Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of Random Amplified Polymorphic DNA techniques using 10mer primers. **Vitis**, 32:187-188, 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.

CALÒ, A.; COSTACURTA, A.; PALUDETTI, G.; CALÒ, G.; ARULSEKAR, R.; PARFITT, D. The use of isozyme markers to characterize grape cultivars. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, 42:15-22, 1989.

CAMARGO, U. A. Cultivares para a Viticultura Tropical no Brasil. **Informe Agropecuário – EPAMIG**, Belo Horizonte. 19:15-19, 1998.

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**, 109-114, 2000.

CIPRIANI, G.; FRAZZA, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. **Vitis**, 33:211-215, 1994.

COSMO, I. **Portinnesti della vite**. Bolonha: Edagricole, 1979. 160 p.

CRESPAN, M. Evidence on the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 108:231-237, 2004.

CUISSET, C. **Etude de la diversité de la vigne (*Vitis vinifera* L.) par les marqueurs morphologiques et moléculaires F-34060 Montpellier**. France: Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 1998. 174 p.

DALBÓ, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; STEINKELLNER, H.; SEFC, K.M.; REISCH, B.I. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. **Genome**, 43:333-400, 2000.

DE ANDRES, M.T.; CABEZAS, J.A.; CEVERA, M.I.; BORREGO, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; JOUVE, N. Molecular characterization of grapevine rootstocks maintained in germplasm collections. **American Journal of Enology and Viticulture**, 58:75-86, 2007.

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.

DIAS, J.E. **O Polimorfismo isoenzimático na identificação de cultivares de *Vitis vinifera* L.** Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 1994. Dissertação (Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia para provas de doutorado).

DZIECHCIARKOVA, M.; LEBEDA, A.; DOLEZALOVA, I.; ASTLEY, D. Characterization of *Lactuca* spp. Germoplasm by protein and molecular markers. **Plant soil and environment**, 50:47-58, 2004.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; LUCES FORTES, G.R. **Propagação de plantas de clima temperado**. Pelotas:UFPEL, 1995. 179 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1996. 220p.

FITCH, A. Report (upon the noxious and other insects of the state of New-York). **Transactions of the New York State Agricultural Society**, 14:705-880, 1855.

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

FREI, A.; BAUMGARTNER, D.; FREY, J.E.; GAFNER, J. Optimized identification of grapevine cultivars using multiplex microsatellite markers. **Botanica Helvetica**, 114:169-179, 2004.

GALET, P. Précis d'ampélographie pratique. In: **Galet P. (ed) Imprimerie Déhan**, 6<sup>ème</sup> edn. Montpellier, 1991. 257 p.

GALET, P. **Dictionnaire encyclopédique des cépages**. Hachette, 2000. 936 p.

GORGOCENA, Y.; ARULSEKAR, S.; DANDEKAR, A.M.; PARFITT, D.E. Molecular markers for grape characterization. **Vitis**, 32:183-185, 1993.

GOTO-YAMAMOTO, N.; MOCHIOKA, R.; BONIAN, L.; HASHIZUME, K.; UMEDA, N.; HORIUCHI, S. RFLP and RAPD análisis of wild cultivated grapes (*Vitis* spp.). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, 67:483-490, 1998.

GRANDO, M.S.; DEMICHELI, L.; SCIENZA, A. Characterization of *Vitis* germplasm using random amplified polymorphic DNA markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 43:187-192,1996.

- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Propagacion de plantas, principios y practicas**. Mexico: Continental, 1990. 760 p.
- HERRERA, R.; CARES, V.; WILKINSON, M.J.; CALIGARI, P.D.S characterization 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.
- HOFFMANN, A. Embrapa Uva e Vinho. **Sistema de produção de uva de mesa no norte do Paraná**. Disponível em: [www.embrapa.br](http://www.embrapa.br). Acesso em: 14, janeiro, 2008.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: **CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Second Edition, Mexico, D.F.: CIMMYT, 50p. 1994.
- HUGLIN, P. **Biologie et ecologie de la vigne**. Paris:Payot Lausanne, 1986. 372 p.
- JANICK, J.J.; MOORE, E. Advances in fruit breeding. West Lafayette:purdue university press. In: **Informe Agropecuario**: Belo Horizonte. 19:632 p., 1975.
- JEAN-JAQUES, I.; DEFONTAINE, A.; HALLET, J.N. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Vitis**, 32:189-190, 1993.
- KISHINO, A.Y.; CARVALHO, S.L.C; ROBERTO, S.R. **Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2007. 362 p.
- KOCH, M.A.; KIEFER,C. Molecules and migration: biogeographical studies and cruciferous plants. **Plant systematics and evolution**, 259:121-142, 2006.
- KOESIS, M.; JAROMI, L.; PUTNOKY, P.; KOSMA, P.; BORHIDI, A. Genetic diversity among twelve grape cultivars indigenous to the Carpathian Basin revealed by RAPD markers. **Vitis**, 44:87-91, 2005.

- LEÃO, P.C.S. Utilização de diferentes tipos de estacas na produção de mudas do porta-enxerto de videira, CV. IAC 572 'Jales'. **Ciência Rural**, 33:165-168, 2003.
- LIN, H.; WALKER, M.A. Extracting DNA from the Cambium Tissue for Analysis of grape Rootstocks. **HortScience**, 32:1264-1266, 1997.
- LIN, H.; WALKER, M.A. Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers. **American Journal of Enology and Viticulture**, 49:403-407, 1998.
- LODHI, M.A.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I.; Characterization of RAPD markers in *Vitis*. **Vitis**, 36:133-140, 1997.
- LOUREIRO, M.D. MARTINEZ, M.C. BOURSQUOT, J.M THIS, P. Molecular markers analysis of *Vitis vinifera* 'Albariño' and some similar grapevine cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, 123:842-848, 1998.
- MONTEIRO, F.F. Caracterização e identificação genética de castas de videira. **Boletim de Biotecnologia**, 63:5-9, 1999.
- NEI, M. Genetic distances between populations. **American Naturalist**, 106:283-292, 1972.
- OJIMA, M.; RIGITANO, C.; SCARANARI, H.J.; MARTINS, F.P.; DALL'ORTO, F.C.; NAGAI, V. Estudo de porta-enxertos para o pessegueiro. **Bragantia**, 37:45-52, 1978.
- OLIVEIRA - COLLET, S.A.; COLLET, M.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.
- ORASMO, G.R.; COLLET, S.A.O.; LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Biochemical and genetic polymorphisms for carboxylesterase and acetylerase in grape clones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) cultivars. **Biochemical Genetics**, 45:663-670. 2007.

- PARFITT, D.E.; ARULSEKAR, S. Study of parentage of grape cultivars by genetic interpretation of GPI-2 and PGM-2 isozymes. **Euphytica**, 65:195-202, 1989.
- PASTENA, B. **Trattato di viticoltura italiana**. 2 ed. Bolonha, Edagricole, 1981. 1011p.
- PEREIRA, F.M.; LEITÃO FILHO, H.F. **Caracterização botânica de porta-enxertos de videira**. Campinas, Instituto Agronômico, 1973. 20 p. (Boletim técnico, 7).
- PERUZZO, E.L. Método de forçagem para produção de mudas de videira: novas técnicas permitem alcançar melhores resultados. **Agropecuária Catarinense**, 8:17-19, 1995.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. 747 p.
- POMMER, C.V.; PASSOS, I.R.S.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. **Variedades de videira para o estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 59p. (IAC. Boletim Técnico, 166).
- REGNER, F.; STADLBAUER, A.; EISENHELD, C.; KASERER, H. Genetic relationships among Pinots and related cultivars. **American Journal of Enology and Viticulture**, 51:7-14, 2000.
- RIAZ, S.; DNGL, G. S.; EDWARDS, K. J.; MEREDITH, C. P. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 108:864-872, 2004.
- RIBAS, W.C. Variedades de cavalos de videira e sua melhor época de enraizamento. **Scientia Agricola**, 16:127-138, 1957.
- RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U. CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:43-48, 1995.

SANTOS JESUS, A.M. **Obtenção antecipada de mudas de videira (*Vitis* spp).** Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1994. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

SANTOS NETO, J.R.A. **A Cultura da Videira.** Campinas: Instituto Agrônômico, 1973. 108p.

SCOTT, K.D.; EGGLER, P.; SEATON, G.; ROSSETTO, M.; ABLETT, E.M.; LEE, L.S.; HENRY, R.J. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, 100:723-726, 2000.

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.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura.** Piracicaba: FEALQ, 1998. 760p.

SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil.** 2. ed. FEALQ, 1996. 791 p.

SOUSA, J.S.I.; MARTINS, F.P. **Viticultura Brasileira: principais variedades e suas características.** FEALQ, 2002. 368 p.

SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil.** São Paulo: Melhoramentos, 1969. 456 p.

STIRLING, G.R.; CIRAMI, R.M. Resistance and tolerance of grape rootstocks to south Australian populations of root-knot nematode. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 24:277-282, 1984.

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.

TAMHANTAR, S.A.; PATIL, S.G.; RAO, V.S. Assessment of the genetic diversity of some important grape genotypes in India using RAPD markers. **Vitis**, 40:157-161, 2001.

TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSIQUOT, J. M.; CHARRIER, A. optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 98:171-177, 1999.

THIS, P.; CUISSET, C.; BOURSIQUOT, J.M. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. **American Journal of Enology and Viticulture**, 48:492-501, 1997.

THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, R.; COSTANTINI, L.; CEPAN, M.; DANGL, G.S.; EISENHELD, C.; FERREIRA-MONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBÁÑEZ, 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.; 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.

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.

TODA, F.M. Biología de la vid: fundamentos biológicos de la viticultura. In: **Sistemática de la vid y características de sus principales especies** Madrid: Mundi-Prensa, 2:29-43, 1991.

UPADHYAY, A.; SABOJI, M.D.; REDDY, S.; DEOKAR, K.; KARIBASAPPA, G.S. AFLP and SSR marker análisis of grape rootstocks in Indian grape germoplasm. **Scientia Horticulturae**, 112:176-183, 2007.

- VIDAL, J.R.; MORENO, S.; GOGORCENA, Y.; MASA, A.; ORTIZ, J.M. On the genetic relationships and origins of six grape cultivars of Galicia (Spain) using RAPD markers. **American Journal of Enology and Viticulture**, 50:69-75, 1996.
- VIGOUROX, Y.; MITCHELL, S.; MATSUOKA, Y.; HAMBLIN, M.; KRESOVICH, S.; SMITH, J.S.; JAQUETH, J.; SMITH, O.S; DOEBLEY, J. An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellites. **Genetics**, 169:1617-30. 2005
- WALKER, M.A.; LIU, L. The use of isozymes to identify 60 grapevine rootstocks (*Vitis* spp). **American Journal of Enology and Viticulture**, 46:299-305, 1995.
- WALTERS, T.W.; POSLUSZNY, U.; KEVAN, P.G. Isozymes analysis of the grape (*Vitis*). **A practical solution. Canadian Journal of Botany**, 67:2894-2899, 1989.
- WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I.; MARTENS, M.H.E. Genetic analysis of isozyme polymorphism in grape. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, 113:765-769, 1988.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix pairwise combinations of primers. **Nucleic Acids Research**, 19:5275-5279, 1991.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.
- WOLFE, W.H. Identification of grape varieties by isozymes banding patterns. **American Journal of Enology and Viticulture**, 27:68-73, 1976.
- WRIGHT, S. Variability within and among populations. In: **Evolution and the genetics of population**. Chicago: University of Chicago Press, 4:79-103, 1978.

WU, L.; LIN, H. Identifying buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt) Englem.] cultivar breeding lines using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, 119:126-130, 1994.

YE, G.N.G, SOYLEMEZOGLU, E. 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 free ware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

ZEQUIM-MAIA, S.H. **Diversidade genética em Uvas finas de Mesa (*Vitis vinifera* L.)**. Maringá: Universidade estadual de Maringá, 2003. 35p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).