

SILVIA HELENA ZEQUIM MAIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA NA VIDEIRA ITÁLIA (*Vitis vinifera L.*),
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO – 2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SILVIA HELENA ZEQUIM MAIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA NA VIDEIRA ITÁLIA (*Vitis vinifera L.*),
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO – 2009**

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

M217d Maia, Silvia Helena Zequim
Diversidade genética na videira Itália (*Vitis vinifera* L.), utilizando marcadores microssatélites/
Silvia Helena Zaquim Maia - Maringá, 2009.
45f. : il., figs. (algumas color)

Orientadora : Prof. Dr. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2009.

1. *Vitis vinifera* - Diversidade genética - Paraná - Brasil. 2. Uva (*Vitis vinifera* L.) - Genética - Paraná - Brasil. 3. Diversidade genética - Uva (*Vitis vinifera* L.). 4. Plantas - Genética. 5. Microssatélites (Marcador molecular). I. Machado, Maria de Fátima Pires da Silva, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós - Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed.581.35

Aos amores de minha vida, Marcos Antonio, Júlia Beatriz e Davi Emanuel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador do céu e da terra pelo seu infinito amor!

A Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), aos docentes e secretário do PGM, Francisco José da Cruz.

À minha orientadora, professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela competência, dedicação e tanto carinho em vários momentos de minha vida.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela extrema competência, por estar sempre presente, pessoa respeitável, digna de admiração, de todo meu respeito e a quem devo muito deste trabalho.

Aos meus pais, Gervásio Zequim e Dirce Esperendi Zequim, e aos meus irmãos pelo carinho e incentivo.

A meu esposo, Marcos Antônio, pela presença constante, pela paciência, pelo carinho e companheirismo nesta caminhada.

Ao Agrônomo Marcos André Collet, pelo auxílio nos trabalhos de campo e recebimento das estacas de uva.

À Tiara Coelho, pela colaboração na execução dos experimentos.

À Vanda Carvalho, pela amizade, dedicação e ajuda na fotografia dos géis.

À professora doutora Sandra de Oliveira Collet, pelo apoio recebido.

Aos professores do Laboratório de Genética Animal e do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais, doutoras Ana Silvia Lapenta e Maria Claudia Takasusuki, doutores Erasmo Renesto e José Ricardo P. Falco, pelo carinho e amizade. Também à Leila Frota e ao Sérgio Luiz, pela ajuda nas rotinas do laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais e do Laboratório de Genética Animal, Denis, Denise, Carlos, Ana Lúcia, Ana Paula, as Julianas, Liriana e Maycon, por fazerem parte desta caminhada.

Às Diretoras da Escola Notre Dame, Doralice Guimarães Nicolau e Dulce Helena Guimarães Almeida, e à coordenadora Terezinha Jorge pela grande colaboração no cronograma das aulas.

Aos professores do CEEBJA, Alcione Suely Machado dos Santos, Ana Lúcia Domingues, Marli Luiza da Silva Ceole, Natal Hélio Aguiar e Yai Kato Watanabe, pelo apoio indispensável.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

MAIA, Silvia Helena Zequim, filha de Gervásio Zequim e Dirce Esperendi Zequim, nasceu em Maringá, Paraná, aos dezoito dias do mês de junho de 1968.

Concluiu, em 1983, o Ensino Fundamental na Escola Estadual Professora Lúcia Alves de Oliveira Schoffen, em Altonia – PR.

Em 1986, ainda em Altonia – PR, no Colégio Estadual Malba Tahan, conclui o Ensino Médio.

Graduou-se em Ciências Biológicas – Licenciatura Plena, em fevereiro de 1991, na Universidade Estadual de Maringá.

Em dezembro de 2003, concluiu o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, também na Universidade Estadual de Maringá, sob orientação da professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado e, nesta mesma Instituição de Ensino, em março de 2005, iniciou o curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Doutorado.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Origem da videira	4
2.2. A videira no Brasil	5
2.3. Marcadores moleculares	7
2.3.1. Microssatélites	7
2.3.2. Marcadores moleculares em <i>Vitis</i>	9
MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Coleta das folhas da cultivar de uva Itália	14
3.2. Extração do DNA de folhas da cultivar de uva Itália	14
3.2.1. Primeira etapa	14
3.2.2. Segunda etapa	15
3.2.3. Terceira etapa	15
3.3. Quantificação do DNA	16
3.4. Amplificação do DNA	17
3.5 Análise dos dados	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

Maia, Silvia Helena Zequim, Msc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2009. **Diversidade genética na videira Itália (*Vitis vinifera* L.), utilizando marcadores microssatélites.** Orientador: Professora Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Conselheiros: Professora Dra. Claudete Aparecida Mangolin e Professor Dr. Erasmo Renesto.

A proposta do presente estudo foi estimar a diversidade genética em *loci* SSR (*Simple Sequence Repeats*), também chamados de microssatélites, em clones da cultivar Itália (*Vitis vinifera* L.) das localidades de Marialva, Paiçandu e Uraí (Paraná-PR), e das localidades de Jales, Pilar do Sul e São Miguel Arcanjo (São Paulo-SP). Nas seis populações da cultivar Itália, avaliadas com *primers* para 17 *loci* SSR, foram evidenciados 36 alelos e 2,12 alelos/*locus* polimórficos. Nos *loci* *Vvs3* e *Udv96* nas seis populações da cultivar Itália foram encontrados 3 alelos, enquanto nos 15 demais *loci* (*Scu10vv*, *Scu11vv*, *Scu15vv*, *Udv26*, *Udv32*, *Udv34*, *Udv40*, *Udv44*, *Udv74*, *Udv85*, *Udv107*, *Udv108*, *Vvmd05*, *Vvmd06*, *Vvmd07*) foram encontrados apenas 2 alelos diferentes. As frequências variáveis dos alelos em 52,8% dos *loci* SSR conferiram uma proporção alta de plantas heterozigotas nas seis populações. A heterozigosidade média observada variou de 0,70 (população de Paiçandu) a 0,9647 e foi maior na população de São Miguel Arcanjo ($H_o=0,9647$), e a heterozigosidade média esperada variou de 0,4064 (população de Uraí) a 0,4950 e foi maior na população de Jales ($H_e=0,4950$). Os parâmetros de diversidade genética apontam para um excesso global de heterozigotos (valores negativos de F_{IS} para todos os *loci* SSR analisados). O valor global de F_{IS} foi -0,8492 e foi maior ($F_{IS} = -1,0$) nos *loci* *Scu10vv*, *Scu11vv*, *Udv26*, *Udv32*, *Udv34*, *Udv40*, *Udv85*, e *Vvmd27*. O cálculo da divergência genética entre as seis populações da cultivar Itália foi considerado como moderado ($F_{ST} = 0,0648$). Os clones plantados em Jales (SP) e em Uraí (PR) foram considerados como os mais polimórficos (52,9%) porque estes apresentaram as maiores proporções de *loci* SSR com variação nas frequências de alelos e uma maior divergência na frequência dos alelos, além de apresentarem alelos novos. O clone plantado em Marialva (PR) apresentou o menor

número de *loci* SSR com variação na frequência dos alelos (17,6%), indicativo de maior estabilidade genética, porém apresentou a maior proporção de plantas quimeras, indicativo de maior potencial para disseminar por propagação vegetativa clones geneticamente divergentes. Desta forma, o presente estudo mostrou que, apesar de a propagação vegetativa ser a forma de reprodução usada para a formação de pomares de uva Itália, estes não devem ser considerados como geneticamente uniformes. Existe variabilidade genética dentro de cada clone, determinada pelo surgimento de novos alelos (mutações e/ou recombinações mitóticas) e por alterações nas frequências dos alelos originais (recombinações mitóticas).

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, microssatélites, diversidade genética, recombinações mitóticas, plantas quimeras.

ABSTRACT

Maia, Silvia Helena Zequim, Msc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2009. **Genetic diversity in Itália grapevine (*Vitis vinifera* L.), using marcadores microsatellites.** Adviser Professor: Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Committee Members: Dra. Claudete Aparecida Mangolin and Dr. Erasmo Renesto.

Genetic diversity in *Simple Sequence Repeats* (SSR) loci, also known as microsatellites, was estimated in clones of cultivar Italia (*Vitis vinifera* L.) in the regions neighboring Marialva, Paiçandu and Uraí (Paraná, Brazil) and in the regions around Jales, Pilar do Sul and São Miguel Arcanjo (São Paulo, Brazil). Thirty-six alleles and 2.12 alleles/polymorphic loci were registered in six populations of cultivar Italia evaluated by *primers* for 17 SSR loci. Whereas 3 alleles were reported in loci *Vvs3* and *Udv96* in six populations of cultivar Italia, only two different alleles were registered for the other 15 loci (*Scu10vv*, *Scu11vv*, *Scu15vv*, *Udv26*, *Udv32*, *Udv34*, *Udv40*, *Udv44*, *Udv74*, *Udv85*, *Udv107*, *Udv108*, *Vvmd05*, *Vvmd06*, *Vvmd07*). Variable frequencies of alleles in 52.8% of SSR loci provided a high proportion of heterozygote plants in six populations. Although mean heterozygosity ranged between 0.70 (Paiçandu population) and 0.9647, it was highest in the São Miguel population ($H_o = 0.9647$). Expected mean heterozygosity ranged between 0.4064 (Uraí population) and 0.4950; the highest was in the Jales population ($H_e = 0.4950$). Parameters of genetic diversity **show an** overall excess of **heterozygotes** (negative rates of F_{IS} for all SSR loci analyzed). Overall rate of F_{IS} was -0.8492; it was highest ($F_{IS} = -1.0$) in loci *Scu10vv*, *Scu11vv*, *Udv26*, *Udv32*, *Udv34*, *Udv40*, *Udv85* and *Vvmd27*. Genetic divergence among the six populations of the cultivar Italia was slight ($F_{ST} = 0.0648$). Clones cultivated in Jales (SP) and in Uraí (PR) were the most polymorphic ones (52.9%) due to the fact that the clones had the highest proportions of SSR loci with variations in allele frequencies and a higher divergence in allele frequency. They also formed new alleles. Since clone cultivated in Marialva (PR) showed the lowest SSR loci with variation in allele frequency (17.6%), a high genetic stability is evidenced, even though it had the highest proportion of chimera plants. The latter shows a higher

potential to disseminate genetically divergent clones through vegetative propagation. Current analysis showed that in spite of the fact that Italia clones are reproduced by vegetative propagation, they are not genetically uniform. In fact, each clone has genetic variability determined by the rise of new alleles (mutations and/or mitotic recombinations) and by changes in the frequencies of the original alleles (mitotic recombinations)

Key words: *Vitis vinifera*, microsatellites, genetic diversity, mitotic recombinations, chimera plants.

1. INTRODUÇÃO

A cultivar Itália tem sido considerada como a mais importante das uvas finas do Brasil. Sousa (1996) relata que esta cultivar foi desenvolvida pelo melhorista Ângelo Pirovano, na Itália, por meio do cruzamento de Bicane e Moscatel de Hamburgo, realizado em 1911, e foi introduzida no Brasil na década de 20. Nos anos 50, passou a ser cultivada comercialmente no Estado de São Paulo, e na década de 60 foi difundida para o norte do Estado do Paraná e outras regiões desse estado.

O cultivo da uva fina de mesa Itália no noroeste do Paraná foi iniciado pela colônia japonesa. Os primeiros parreirais plantados no município de Marialva (PR) estavam nas propriedades de Yamanaka e Wakita, no ano de 1962, com material propagativo oriundo do município de Ferraz de Vasconcelos (SP) (Oliveira-Collet, 2003).

As plantas da cultivar Itália são descritas por Terra (1993) como vigorosas e férteis, atingindo uma produtividade entre 30 e 40 t/ha⁻¹, quando bem manejadas. Elas apresentam ciclo longo (mais ou menos 130 a 150 dias na região Norte e Noroeste do estado do Paraná). São susceptíveis às doenças fúngicas e necessitam de proteção preventiva contra antracnose, míldio, oídio e *Botrytis*; necessitam também de poda longa (8 a 12 gemas). Os racemos têm forma cilíndrico-cônica, são grandes (400 a 800g), um tanto quanto alongados e naturalmente muito compactos, necessitando de intenso desbaste. Estes racemos apresentam boa resistência ao transporte e ao armazenamento, podendo ser conservados em câmaras frigoríficas. As bagas são grandes (8 a 12g), de cor esverdeada a levemente amarelada quando bem maduras; são ovaladas, com textura trincante e sabor neutro, levemente moscatel, de melhor intensidade quando as uvas são colhidas com pelo menos 14° Brix. A aderência dos frutos ao pedicelo é boa, bem como a resistência às rachaduras.

No Estado do Paraná, o município de Marialva tem sido conhecido como a Capital da Uva Fina de Mesa, porque vem se destacando como o maior produtor dessas uvas, contando com 1.500 ha de parreiras em produção e cerca de 750

produtores que colhem duas safras anuais, dando à região uma produção total de 50.000 toneladas (Dados do Departamento de Economia Rural-Seab-PR, 2009). A cultura da uva tem sido o principal fator de desenvolvimento de Marialva e de seus produtores, gerando cerca de quatro empregos por hectare.

A uva Itália vem sendo mantida por propagação vegetativa, mas a ocorrência de mutações somáticas parece ser um evento freqüente. Kishino e Mashima (1980) descreveram que mutações somáticas em plantas de Itália cultivadas na região de Marialva geraram as cultivares Rubi e Benitaka. A cultivar Rubi foi descrita como originária de mutação somática espontânea na cultivar Itália, ocorrida em um parreiral comercial do produtor Kotaro Okuyama, no município de Santa Mariana, no Norte Estado do Paraná, em 1972 . A cultivar Rubi diferencia-se da cultivar original pela coloração rosada das bagas e pela tonalidade avermelhada das folhas no final do ciclo. As demais características da planta e da uva, inclusive o sabor moscatel, são as mesmas da Itália.

A cultivar Benitaka também foi descrita como originária de uma mutação somática espontânea, encontrada em parreiral de Itália, do viticultor Sadao Takakura, em Floraí, no noroeste do Estado do Paraná, em 1988 (Sousa, 1996). Essa cultivar difere da original Itália e também da Rubi pela intensa coloração rosada-escura, mesmo em estádios ainda imaturos.

A ocorrência de mutação somática também foi verificada em plantas da cultivar Benitaka, que originou a cultivar Brasil, encontrada na propriedade de Hideo Takakura, também em Floraí, no Paraná, no ano de 1991 (Gonçalves, 1995). Essa cultivar difere das outras cultivares de cor (Rubi e Benitaka) pela cor preta da casca e polpa colorida de vermelho; apresenta comportamento similar às demais do grupo Itália, porém, tem demonstrado menor expansão vegetativa, o que pode ser consequência da contaminação por vírus (Camargo, 1998).

A análise de isozimas de 7 sistemas enzimáticos indicou uniformidade genética na cultivar Itália, bem como nas cultivares Rubi, Benitaka e Brasil (Oliveira-Collet, 2005), mas a análise de fragmentos aleatórios de DNA amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia por polimerases) tem indicado um alto polimorfismo. A similaridade genética nas 4

cultivares variou de 61,3% a 95,2% (Maia et al., 2008) indicando que mutações somáticas ocorrem em alta frequência. Outra indicação que contraria a uniformidade genética nos clones de Itália é uma proporção alta de alelos nulos (53,2%) descrito por Orasmo et al. (2007) no *locus Est-3* de uma carboxilesterase. Os resultados dos estudos de Maia et al (2008) e Orasmo et al. (2007) indicam que para uma cultivar que vem sendo mantida por propagação vegetativa, a diversidade genética nas plantas de Itália é alta, contrastando com a uniformidade genética preliminarmente descrita por Oliveira-Collet et al. (2005).

Nesse sentido, a proposta do presente estudo é estimar a diversidade genética em nível de DNA, utilizando a análise de *loci* SSR (*Simple Sequence Repeats*; seqüências simples de DNA repetidas no genoma), também denominadas de microssatélites, em clones da cultivar Itália das localidades de Marialva, Paiçandu e Urai (PR), e também das localidades de Jales, Pilar do Sul e São Miguel Arcanjo (SP). As mutações que geraram as cultivares Rubi e Benitaka foram descritas somente nas localidades de Marialva e Santa Mariana. Entretanto, é possível que mutações que não são facilmente evidenciadas através de características morfológicas possam estar ocorrendo em plantas de Itália cultivadas em diferentes regiões do Estado ou do Brasil. É possível que tais mutações confirmem uma determinada variabilidade genética ao genoma de Itália, e esta variabilidade possa ser detectada com a avaliação de microssatélites.

A análise dos *loci* SSR em clones da cultivar Itália de localidades diferentes é importante para confrontar as propostas de uniformidade ou diversidade genética nos clones de Itália; para estimar a heterozigosidade média e conhecer a estrutura genética das populações (clones) formadas, no sentido de monitorar o manejo e o controle dos clones da referida cultivar para subsidiar programas de preservação e/ou melhoramento genético de cultivares Itália de *Vitis vinifera*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem da videira

Os relatos de Sousa (1996) registram que a videira surgiu no período terciário, milhões de anos antes do aparecimento do homem, provavelmente na atual Groelândia, conforme comprovam os achados arqueológicos e que, a partir de então, foi se dispersando, seguindo duas direções principais: uma américo-asiática e outra euro-asiática .

No centro eurasiático, foi encontrada a mais famosa *Vitis* terciária, conhecida como *V. sezannensis* devido à descoberta de folhas fossilizadas na região de Sezanne (França). Após estudos, porém, chegou-se à conclusão de que aquelas folhas podem ser de plátano, arce, chopo, figueira, etc. Hoje, admitem-se unicamente os fósseis de sementes e pólen como suficientemente inconfundíveis para confirmar a presença da videira (Toda, 1991a). Os restos de sementes e de pólen permitem afirmar que o gênero *Vitis* estava difundido no final da era terciária em todo o hemisfério Norte, representado por duas categorias de sementes: umas rugosas ou estriadas (*V. ludwigii*) e outras lisas (*V. teutonica*), as quais representam, respectivamente, os antecessores das Muscadíneas e das Euvitis atuais.

Sousa (1996) relata que no período quaternário iniciou-se a era glacial, cobrindo a Terra com um enorme manto de gelo, obrigando a videira a refugiar-se em regiões menos atingidas pelo rigoroso inverno, verdadeiros centros de refúgio: um americano, um europeu e um asiático-ocidental. No centro de refúgio americano, a videira espalhou-se pelos Estados Unidos, México e Costa Rica. Nele, originaram-se as atuais espécies americanas: *V. labrusca*, *V. vulpina*, *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. rotundifolia*, *V. tiliaefolia*, *V. smalliana*, *V. lincecumii*, *V. cordifolia*, *V. berlandieri*, etc. O centro de refúgio europeu corresponde, atualmente, às regiões próximas ao mar Mediterrâneo; neste originou-se a *V. vinifera silvestris*.

Quando as condições voltaram a ser favoráveis, a videira iniciou novamente sua expansão. A *V. vinifera silvestris* atingiu a Itália, a França, a Bélgica, a Hungria,

a Suíça, a Alemanha e o sul da Suécia. Enquanto isso, a *V. vinifera caucasica* espalhou-se da região armeno-persa para a Rússia até a Criméia e, na outra direção, atingiu a Pérsia e o Afeganistão, sendo a sua entrada na China bloqueada pelo Himalaia, de onde se dirigiu para a Índia.

Uma observação interessante de Toda (1991a) é que, nas duas grandes massas continentais do hemisfério Norte (América e Eurásia), encontra-se uma abundância de espécies: ao leste das Montanhas Rochosas e México na América; na China e Ásia e ao sul e leste da Eurásia. Para o oeste de cada continente, contudo, encontra-se uma só espécie, *V. californica*, na Califórnia, e *V. vinifera* na Europa. Além disso, as espécies do leste dos dois continentes têm uma certa resistência a parasitas (míldio, oídio, etc.), enquanto as do oeste são sensíveis a eles (Toda, 1991a).

Sousa (1996), Huglin (1986) e Janick e Moore (1975) consideram que, como resultado da separação da videira em diversos centros de refúgios, durante o período glacial, as variedades 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, devem ter sido perdidas em um passado distante (Sousa, 1996; Janick e Moore, 1975). As principais variedades cultivadas na França, por exemplo, são classificadas como: antigas, muito antigas e imemoriais. Cultivares como a Muscat Frontignan já eram conhecidas pelos gregos e romanos; a Sirah ou Petit Sirah foi supostamente trazida pelos romanos de Siracusa para o Vale Rhone; a Chenin Blanc já era conhecida, com certeza, no ano 845 a.C., em Anjou, França.

2.2. A videira no Brasil

De acordo com o histórico de Sousa (1959), a videira doméstica chegou ao continente americano nos séculos XV e XVI. No Brasil, a videira foi inicialmente introduzida em São Paulo, pela expedição colonizadora de Martin Afonso de Souza,

em 1532 (Sousa, 1959). 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 na Ilha de Itamaracá (Albuquerque et al., 1996).

De acordo com Camargo (1998), até a metade do século XX, o cultivo da videira no Vale do Submédio São Francisco restringia-se à pequena exploração familiar. Foi somente por volta de 1950 que surgiram os primeiros empreendimentos de proporções e finalidades comerciais. A viticultura brasileira consolidou-se como atividade econômica, com a produção de uva Itália a partir da década de 60, na região do Vale do São Francisco. Esta cultivar também foi a base na formação dos pólos vitícolas do Norte do Paraná, nos anos 70 e da região Noroeste de São Paulo, na década de 80. Apenas a cultivar Rubi, uma mutação natural da Itália, identificada e multiplicada no Paraná, apresentou crescimento de área plantada até pouco tempo. A partir da década de 90, os produtores, pressionados pela demanda do mercado interno e externo, buscaram diversificar. Além da propagação de mais duas mutações de Itália, a Benitaka e a Brasil, passaram a ser plantadas as cultivares Red Globe, Christmas Rose, Alphonse Lavallée ou Rilver que são coloridas e as cultivares brancas Centennial e Perlette, estas apirênicas. Nos últimos anos, a Niagara rosada, uma cultivar da *Vitis labrusca* com grande aceitação no mercado interno, passou a ser cultivada com sucesso no Noroeste de São Paulo, Norte do Paraná, em pólos emergentes do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Na região do Vale do São Francisco são produzidas as uvas tintas Cabernet Sauvignon e Syrah e as brancas Moscato Canelli e Chenin Blanc destinadas à elaboração de vinho.

Muitos porta-enxertos foram e estão sendo testados para regiões tropicais no Brasil. Os principais foram criados pelo Dr. José Ribeiro Almeida Santos Neto, pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e são: IAC 313 – Tropical, IAC 572 – Jales, IAC 766 – Campinas e Kober 5BB 420A. O IAC 313 – Tropical é resistente ao nematóide e é usado com sucesso para as cultivares Itália, Rubi, Benitaka e Piratininga. O porta-enxerto IAC 766 – Campinas é bastante usado na região Norte do Paraná para a cultivar Itália e suas mutações Rubi e Benitaka. O

porta-enxerto Kober 5BB 420A, bastante utilizado no Norte do Paraná confere pouco vigor à copa. A melhor combinação para porta-enxerto é com a Itália.

As uvas finas de mesa, geralmente cultivares *Vitis vinifera*, são comercializadas durante todo o ano, correspondendo a 50% do volume total de uvas comercializadas pelas Centrais de Abastecimento S/A (CEASA).

2.3. Marcadores moleculares

2.3.1. Microsatélites

Os marcadores moleculares denominados de SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou também conhecidos por microsatélites, tratam-se de uma classe de marcadores moleculares baseada em PCR, e foi desenvolvida por Litt e Luty (1989) e simultaneamente por Weber e May (1989). Os microsatélites têm sido extensivamente usados devido a sua abundância, hipervariabilidade no comprimento de seus alelos, distribuição casual nos diversos genomas e devido à pequena quantidade de DNA que é usada para a amplificação e subsequente análise (Kun-Sheng e Tanksley, 1993). As seqüências simples repetidas de DNA (*loci* SSR) ocorrem freqüentemente e casualmente em toda a extensão do DNA de eucariontes examinados (Beckmann e Soller, 1990), e representam uma vasta fonte de marcadores altamente informativos (Zhao e Kochert; 1992; 1993). A abundância e polimorfismo de microsatélites foram primeiramente demonstrados no genoma humano e de outros eucariontes por Hamada et al. (1982) e Weissenbach et al. (1992).

Os microsatélites são repetições de poucos pares de bases de DNA (2 – 6 pb) em seqüências, onde as repetições mais abundantes são os dinucleotídeos (repetições de 2 pares de bases). Estas seqüências repetidas são distribuídas aleatoriamente através do genoma (Jacob et al., 1991; Agarwall et al, 2008).

As seqüências de DNA que flanqueiam os microsatélites ou *loci* SSRs são conservadas, e são utilizadas para construir as seqüências de *primers*, para serem usados para a amplificação dos *loci* SSRs usando o método de reação de

amplificação em cadeia, mediado por polimerases (PCR). Quando um par de *primers* construído para as regiões flanqueadoras é utilizado para amplificar o *locus* SSR em vários genótipos, este poderá revelar polimorfismo no referido *locus*. Este polimorfismo é observado na forma de diferença no comprimento do segmento de DNA produzido pela reação de amplificação, ou produto amplificado (Weber e May, 1989; Litt e Luty, 1989). Cada segmento ou seqüência de DNA que é produto da amplificação, separado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (Kun-Sheng e Tanksley, 1993), ou em gel de agarose de alta qualidade (Becker e Heun, 1995), representa um alelo do *locus* (Gupta et al., 2001).

As diferenças no tamanho dos microssatélites são atribuídas à variação no número de unidades de repetição em um *locus* de SSR em particular. Os microssatélites são muito importantes para a evolução em função de sua alta taxa de mutação. É 10.000 vezes mais provável um microssatélite ganhar ou perder uma repetição de uma geração para a próxima, do que o gene para hemoglobina sofrer uma mutação em única base, promovendo a desordem anemia falciforme. Os microssatélites podem retornar ao seu estado de comprimento original dentro de poucas gerações (Moxon e Wills, 1999). A hipervariabilidade de microssatélites não é totalmente entendida e pode ser originada através de *crossing-over* desigual ou deslizamento de seqüências durante a replicação do DNA. Durante a duplicação do DNA pode ocorrer um mau pareamento através de deslizamento das fitas e este processo conduz a um acúmulo de mutações muito mais rapidamente do que mutação de ponto. Isso produz um alto número de alelos por *locus* (a taxa de mutação para SSR tem sido estimada em 10^{-2} a 10^{-3} por *locus*, por gameta, por geração; Weber e Wong (1993). Tal comportamento altamente polimórfico é útil para estudar o fluxo gênico, padrões de diferenciação e níveis de endogamia entre populações de muitas espécies. Um microssatélite é um marcador codominante, de modo que diferentes alelos podem ser identificados em uma população; o nível de heterozigosidade para este marcador tem sido considerado como extremamente alto. De acordo com Röder et al. (1995), este marcador é muito importante para o mapeamento genético de espécies com pouco polimorfismo intra-específico, tais como a maioria das espécies endogâmicas. Os estudos realizados indicaram que os

tipos de motivos de repetições abundantes e o grau de polimorfismo podem variar de uma espécie para a outra.

2.3.2. Marcadores moleculares em *Vitis*

A identificação de cultivares usando marcadores de DNA deve ser mais eficiente, pois estes avaliam diretamente o genótipo independente do fenótipo e existe uma maior variabilidade de DNA quando comparado com o nível morfológico (Thomas et al., 1993). Essa identificação é importante para os programas de melhoramento, pois permite mapear características de interesse econômico e isolar genes específicos. Nas últimas décadas, diferentes tipos de marcadores de DNA têm sido desenvolvidos e utilizados para investigar e identificar videiras. Entre os marcadores estão incluídos RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Blaich, 1989; Striem et al., 1990; Bourquin et al., 1992; Bowers et al., 1993; Thomas et al., 1993), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (Jean-Jaques et al., 1993; Gorgocena et al., 1993; Büscher et al., 1993; Büscher et al., 1994; Lodhi et al., 1997), microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) (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 PCR*) (Cervera et al., 2000).

Das muitas técnicas que utilizam o polimorfismo em nível de DNA como marcadores moleculares, a análise de microssatélites ou SSRs tornou-se a mais difundida. Os microssatélites em uva têm sido desenvolvidos e estão sendo aplicados para estudos de mapeamento de características de interesse econômico, genotipagem, monitoramento de cruzamentos e para determinar a relação genética e evolutiva entre as variedades (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). A combinação de dados de *locos* de microssatélites altamente polimórficos, tem resultado em um perfil alélico permitindo a distinção de cultivares, enquanto sua forma de herança co-dominante

permite a análise de parentesco (Thomas et al., 1994; Bowers e Meredith 1997; Sefc et al., 1997).

O genoma de uva tem apresentado repetições do tipo di, tri e tetrâmeros sendo que as repetições dos dinucleotídeos GA e GT são as mais representativas e parecem estar dispersas através do genoma. A abundância de DNA microsatélite no genoma de uva parece variar de acordo com a seqüência repetitiva avaliada. Quando o número de nucleotídeos de uma repetição é maior, o padrão de bandas é mais claro e as informações obtidas poderão ser usadas para distinguir diferentes cultivares e espécies com maior precisão, embora estas seqüências sejam menos freqüentes no genoma de uva (Thomas et al., 1994).

A dificuldade do uso de SSR tem sido a disponibilidade de *locus*. Uma possibilidade para solucionar tal problema foi o uso de *primers* de SSRs desenvolvidos para detectar polimorfismo em *locos* correspondentes em espécies relacionadas. *Primers* flanqueando *loci* de SSRs foram desenhados para *Vitis riparia* (Sefc et al., 1999). Estes *loci* foram utilizados para amplificar alelos em *Vitis vinifera*, para mais 5 espécies de *Vitis* e também para amplificar o DNA de híbridos interespecíficos. Esta técnica de análise é importante, pois um sistema universal de identificação de videiras está sendo desenvolvido. Sefc et al. (1999) testaram *loci* de microsatélites e 15 destes foram usados para amplificação nas espécies estudadas. Estes *loci* exibiram um alto nível de heterozigosidade. Os marcadores selecionados permitiram distinguir 120 cultivares, com exceção da família Pinot. Microsatélites isolados de seqüências alvo expressa (ESTs) foram testados em sete acessos. Dez dos microsatélites testados foram polimórficos para os cultivares analisados, para as espécies *Vitis* e para gêneros relacionados. Os microsatélites derivados de EST em *Vitis*, quando polimórficos e transferíveis, puderam ser aplicados para estudo taxonômico (Scott et al., 2000). Onze microsatélites isolados da videira *Vitis vinifera* foram usados para estudar o grau de conservação destas seqüências através de diferentes espécies de *Vitis*. Os resultados deste estudo mostraram que a atual taxonomia das espécies Americanas, Asiáticas e Européias, que refletem a distribuição geográfica destas, não é clara e que deve ser revista. A variação de nucleotídeos que ocorre em regiões flanqueando

microsatélites tem sido uma importante ferramenta molecular para investigar a evolução das espécies (Di Gaspero et al., 2000).

Thomas e Scott (1993) desenvolveram cinco *loci* de microsatélites, possibilitando diferenciar cultivares de videiras. Para estes *loci*, foram encontrados de cinco a 13 alelos para *Vitis vinifera*, com heterozigosidade variando de 69 a 88%. (Bowers et al., 1993) utilizando quatro microsatélites avaliaram 77 cultivares de *Vitis vinifera*. Para estas cultivares foram obtidos de cinco a onze alelos por *locus*. Através desta avaliação foi possível caracterizar as cultivares, só não foi possível a caracterização das cultivares que tiveram sua origem a partir de mutação somática. Onze *loci* de SSRs foram utilizados para avaliar a relação genética entre 49 cultivares de videiras portuguesas. As informações obtidas por estes *loci*, permitiram o esclarecimento de alguns sinônimos e homônimos de cultivares. Foram detectados 69 alelos para estes 11 *loci*, com uma variação de cinco a nove alelos por *locus*. Estes marcadores foram informativos para avaliação das cultivares portuguesas e apresentaram uma heterozigosidade entre 0,67 a 0,84. Os dados obtidos possibilitaram a elucidação da relação descendente-parental para algumas cultivares (Lopes et al., 1999).

A avaliação das variedades de videiras utilizadas para a produção de vinho do porto vem sendo realizada através da morfologia das folhas e do mosto. Esta forma de caracterização não tem se apresentado como a mais eficiente para caracterizar estas videiras, enquanto que o emprego de microsatélites tem se mostrado bastante eficiente (Faria et al., 2000). O uso de mais que 30 microsatélites também permitiu investigar várias cultivares da família Pinot e descrever a relação entre elas e as cultivares relacionadas com as Pinot. Foi possível assumir que todas as Pinot são descendentes do mesmo genótipo com apenas pequenas diferenças genéticas (Regner et al., 2000). Nove microsatélites foram escolhidos para analisar o conteúdo informacional destes marcadores e estudar a estrutura genética de cultivares de uva entre as videiras de sete países da Europa. Estes marcadores foram altamente informativos em todos os grupos de cultivares avaliados, tornando-se usuais para caracterizar as videiras da Europa. Altos níveis de variabilidade genética foram detectados e a diferenciação genética entre

cultivares de diferentes regiões foi significativa. A diferenciação genética observada sugere que é possível que cultivares possam ser associadas às suas regiões de origem em função do seu genótipo, podendo permitir a determinação da origem geográfica de cultivares com *background* desconhecido (Sefc et al., 2000).

Apesar de o alto polimorfismo de *loci* de SSR em videiras sugerir que muito poucos *loci* seriam necessários para separar todas as cultivares, a importância econômica e legal da identificação destas requer aumento na resolução da avaliação. Este tipo de trabalho já pode ser realizado em função do grande número de *loci* disponível para este gênero. A facilidade com a qual os marcadores SSR e os dados podem ser compartilhados internacionalmente podem encorajar o seu amplo uso, pois poderão ser usados tanto para identificação e análise genética (Bowers et al., 1996).

Uma associação dos marcadores RAPD, microssatélites e caracteres morfológicos, possibilitam a discriminação de uvas de vinho e de mesa. As uvas de vinho puderam ser agrupadas de acordo com sua origem geográfica. Através destes estudos pode-se dizer 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 (Cuisset, 1998).

Um considerável investimento tem sido feito em programas de melhoramento e em estudos genéticos para a uva. Algumas limitações biológicas dificultam o estudo desta espécie. As videiras são plantas relativamente grandes, apresentam um longo ciclo de vida e severa depressão por endogamia (Meredith e Reisch, 1997). Os mais importantes caracteres são herdados quantitativamente, o que dificulta a manipulação destes com o propósito de melhoramento. Para investigar estes caracteres, há a necessidade do desenvolvimento de um mapa genético, utilizando marcadores distribuídos por todo o genoma (Dalbó et al., 2000). Um aumento no número de *locos* de microssatélites em uva (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 à facilidade de emprego deste marcador, tem mostrado que este pode ser utilizado para a construção de mapas genéticos, sendo possível o estudo de

caracteres que apresentam herança quantitativa em uva (Bellin et al., 1999; Dalbó et al., 2000). Estas informações podem contribuir para subsidiar os programas de melhoramento genético em uva, visando tanto à qualidade dos frutos como também à resistência a doenças e às condições climáticas adversas.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das folhas da cultivar de uva Itália

As folhas jovens (recém-expandidas) da cultivar Itália de *Vitis vinifera* L. utilizadas neste estudo para a extração de DNA foram coletadas em parreirais de pequenos e médios produtores dos Estados do Paraná e de São Paulo. As folhas coletadas das localidades de Marialva (PR) e Paiçandu (PR) 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 da extração de DNA. As estacas da cultivar Itália, oriundas das localidades de Jales (SP), Uraí (PR), São Miguel Arcanjo (SP) e Pilar do Sul (SP), foram identificadas e 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 da cultivar de uva Itália

Para a extração de DNA das amostras, foi testado o método descrito por Thomas et al. (1993) com pequenas modificações. A extração foi realizada utilizando-se 100 mg de tecido em vez de 2 g. A extração foi efetuada em microtubos e as concentrações dos reagentes que compõem as soluções de extração A e B e os passos do procedimento foram devidamente mantidos (Quadro 01). Para facilitar o processo de extração, o protocolo foi dividido em três etapas.

3.2.1. 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 μL de solução A, descrito no Quadro 1. Após a homogeneização, foi realizada a

centrifugação a 4 °C, durante 10 minutos, a 4.000 G. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e em cada tubo foram adicionados 700 µL de solução B, descrito no Quadro 1. 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, foram adicionados 700 µL 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 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 foram adicionados 200 µL de TE (Tris/HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0). O DNA foi ressuscitado e armazenado em geladeira a 4°C.

3.2.2. Segunda etapa

Em cada tubo, foram adicionados 2 µL de RNase (20 ng/µL) e estes foram mantidos por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, foi acrescentado 100 µL 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 G. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos novos e a eles foi adicionado 0,54 vezes o volume de isopropanol. Os tubos foram armazenados *over night* em *freezer* a - 20°C.

3.2.3. Terceira etapa

Nesse passo, foi realizada centrifugação em temperatura ambiente por 12 minutos a 16.000 G obtendo-se o *pellet* de DNA. 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 G. O sobrenadante foi vertido delicadamente e os tubos colocados na estufa a 37 °C, até que todo o etanol evaporasse. O *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de TE, os tubos vedados com *parafilme* e armazenados em geladeira a 4°C.

Quadro 01 - Composição das soluções de extração usadas para isolar DNA genômico de amostras de folhas da cultivar de Uva Itália..

Reagentes das Soluções de Extração	Solução A	Solução B
<i>Ethylenediamine- Tetraacetic Acid</i> (EDTA)	50 mM	50 mM
Tris/HCl pH 8.0	0,2 M	0,2M
NaCl	0,25 M	0,5 M
β-Mercaptoetanol	0,1 %	1 %
<i>Polyvinylpyrrolidone - 40</i> (PVP-40)	2,5%	2,5 %
<i>Sarcosil</i>		3%
Etanol		20%

Fonte: Thomas et al. (1993).

3.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi feita por análise através de eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris-HCl 1M, Acetato de Sódio 1M, EDTA 0,5M, pH 8,0) e 80 Volts por aproximadamente 1 h, seguindo o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994). O DNA extraído de cada amostra foi comparado com soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas de 50, 100 e 150 ng, respectivamente. Após a eletroforese, o gel foi evidenciado em solução de brometo de etídio contendo 0,5 µg/mL e a imagem foi capturada com *Ultraviolet Transilluminator High Performance - Edas 290* utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

3.4. Amplificação do DNA

Para a escolha dos marcadores polimórficos entre as populações de diferentes localidades que foram avaliadas, foram testados 38 *primers* microssatélites já mapeados para uva.

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase) foi preparada em microtubos de 0,2 ml, usando um termociclador Techne TC-512. Para a reação foram utilizados 25 ng de DNA, 2,0 µl de tampão de reação 10X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,8 µM de cada dNTP, 1 U de *Taq-DNA Polimerase* (Invitrogen), e 0,4 µM de cada um dos *primers* Forward e Reverse específicos para um volume final de 20 µl de solução.

No Quadro 2 estão apresentadas as concentrações dos reagentes utilizados para as reações de amplificação.

Quadro 2 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação do DNA das diferentes populações da cultivar Itália

Reagentes	Concentração Estoque dos Reagentes	Concentração Final dos Reagentes/reação	µL/20µL de reação
H ₂ O			12,1
Tampão	10 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,0 mM	1,6
DNTPs	2,5 mM/cada	0,1 mM/cada	0,8
<i>Primer</i> (Forward)	10 µM	0,3 µM	0,4
<i>Primer</i> (Reverse)	10 µM	0,3 µM	0,4
Taq-DNA Polimerase	5 U/ µL	1 U	0,2
DNA	10 ng/ µL	25ng	2,5
Total			20 µL

Para a amplificação dos microssatélites, inicialmente foi utilizado o programa *Touchdown PCR* (Don et al., 1991), descrito no Quadro 3. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 4%, preparado com 50% de agarose MS-8 e 50% de agarose comum (ultrapure invitrogens) usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). A eletroforese foi realizada com 60 Volts por 4 horas. Após a eletroforese, os géis foram incubados

em solução com brometo de etídio contendo 0,5 µg/ml e a imagem foi 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 100 pb *DNA Ladder* (Invitrogen).

3.5 Análise dos dados

Os *loci* SSR polimórficos foram analisados para estimar o número médio de alelos por *locus*, a heterozigosidade média observada (H_o) e a esperada (H_e). O afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi examinado para cada *locus* e para cada população. O déficit de heterozigotos (F_{IT}) e a diversidade genética entre os ciclos foram estimados empregando-se o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999).

Usando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) foi gerada uma matriz de similaridade e os agrupamentos foram organizados em um dendrograma. Para essa análise, foi utilizado o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999) e foi utilizado o complemento aritmético da distância genética de Nei (Nei, 1972).

Quadro 3 - Sequência das etapas do programa utilizado para amplificação do DNA das plantas das diferentes populações da cultivar de Uva Itália.

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94°C	1 min.
2	Desnaturação	94°C	1 min.
3	Anelamento	65°C (-1°C/Ciclo)	1 min.
4	Extensão	72°C	2 min.
5	Voltar ao passo 2 – 9 vezes	-----	-----
6	Desnaturação	94°C	1 min.
7	Anelamento	55°C	1 min.
8	Extensão	72°C	2 min.
9	Voltar ao passo 6 – 19 vezes	-----	-----
10	Extensão Final	72°C	2 min.
12	Imersão	10°C	Indeterminado

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação do DNA genômico extraído das folhas das plantas de cada localidade foi realizada pela comparação visual da intensidade das bandas de DNA do fago λ em gel de agarose. Com a metodologia utilizada para a extração do DNA foi possível realizar uma extração de qualidade para a amplificação e com quantidade que variou de 15 a 200 ng/ μ L (Figura 1).

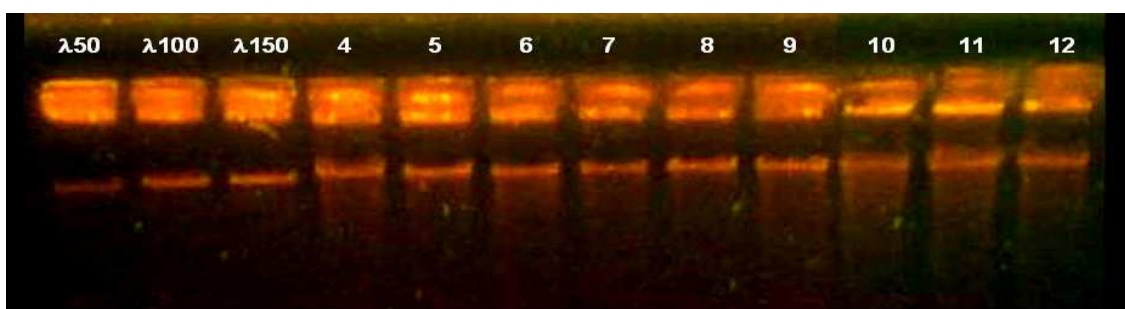


Figura 1 - Gel de Agarose 0,8% utilizado para quantificação das amostras de DNA de *Vitis vinifera* L. Amostras 1, 2 e 3 são DNAs de fago λ utilizadas como padrão de concentração com 50, 100, 150 ng, respectivamente. As amostras 4 a 12 são de DNAs da cultivar Itália extraídos de diferentes plantas das diversas localidades estudadas

Foram testados 38 pares de *primers* de microssatélites. Para os testes foram utilizadas duas amostras do DNA da população avaliada. Todos os *primers* testados produziram alelos, portanto amplificaram os DNAs utilizados para o teste, mas somente 17 foram utilizados para a avaliação do genoma da cultivar Itália para estudar a variabilidade genética desta cultivar de *Vitis vinifera* L. Estes foram escolhidos, pois produziram bandas bem definidas. Estes *primers*, suas seqüências e o número de alelos estão apresentados no Quadro 4.

A análise dos *loci* *Vvs3* e *Udv96* nas seis populações da cultivar Itália mostrou a presença de 3 alelos, enquanto para os 15 demais *loci* (*Scu10vv*, *Scu11vv*, *Scu15vv*, *Udv26*, *Udv32*, *Udv34*, *Udv40*, *Udv44*, *Udv74*, *Udv85*, *Udv107*, *Udv108*, *Vvmd05*, *Vvmd06*, *Vvmd07*) foram encontrados apenas 2 alelos diferentes (Quadro 4). Portanto, as evidências são de um número reduzido de alelos (36 alelos) nos 17 *loci* SSR analisados nas seis populações da cultivar Itália (apenas 2,12 alelos/*locus*

polimórficos), contrastando com o número e a variação no número de alelos em *loci* SSR que tem sido descrito como muito alto em diversas variedades e em cultivares de uvas analisadas.

Quadro 4 - Sequências de nucleotídeos dos *primers* microssatélite e o número de alelos detectados por cada *primer* usado na estimação da diversidade genética na cultivar de Uva Itália.

<i>Loci</i>	Seqüência de Nucleotídeos	Número de Alelos
<i>Vvmd5</i>	CTAGAGCTACGCCAATCCAA ^(F) TATACCAAAAATCATATTCCTAAA ^(R)	2
<i>Vvmd6</i>	ATCTCTAACCCTAAAACCAT ^(F) CTGTGCTAAGACGAAGAAGA ^(R)	2
<i>Vvmd7</i>	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT ^(F) CGAACCTTCACACGCTTGAT ^(R)	2
<i>Udv-026</i>	GGCTTGTGGATGGGTTTT ^(F) GATGTGTGAGTGCATGTTTGC ^(R)	2
<i>Udv-032</i>	CATGCGTATGTGTTAGAGAGCA ^(F) CATGGCATGTGCTTTGTTAT ^(R)	2
<i>Udv-034</i>	AAGAGACCAAGGATAGATCAAACA ^(F) AAATGCAACGGGAGATGGTA ^(R)	2
<i>Udv-040</i>	GTATGGGTGGGTGGGTGTGT ^(F) GGTAACTGGTGTGGGAATCAA ^(R)	2
<i>Udv-044</i>	GGAACATCAACCCGACCAA ^(F) CATTTCCAACACATGGGTCA ^(R)	2
<i>Udv-074</i>	GCCAGGGAAGTTGGTTCTCT ^(F) TGCATGTGTGTTTGCACAAG ^(R)	2
<i>Udv-085</i>	CTCCCCAGTAACCATGGAAG ^(F) CACTGGATGAGATGGCAGAA ^(R)	2
<i>Udv-096</i>	CTTCCCCATGAAGCTCTATTT ^(F) CGGAGAGTTGCGAGTGACTA ^(R)	3
<i>Udv-107</i>	GGAAAAGGACACAAAAGTAGCAA ^(F) CAGAATACCGCCAGTTGGTT ^(R)	2
<i>Udv-108</i>	TGTAGGGTTCCAAAGTTCAGG ^(F) CCTTTTTATATGTGGTGGAGCA ^(R)	2
<i>Vvs-3</i>	TGCCCTATCAATTAGTTCACCTA ^(F) TCGACTTTGATATATTGATGATT ^(R)	3
<i>Scu-10vv</i>	TACCCCAACAACCCTTTTTCCC ^(F) TTCTCCGCCACCTCCTTTTCAC ^(R)	2
<i>Scu-12vv</i>	GAATTCGGCACGAGGAACTA ^(F) ACAGTGGAGAGGTGAATGCA ^(R)	2
<i>Scu-15vv</i>	GCCTATGTGCCAGACCAAAAAC ^(F) TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC ^(R)	2

Em 77 variedades de uvas da Europa foram identificados de 5 a 11 alelos por *locus* SSR (Bowers et al., 1996), em 49 e 46 cultivares portuguesas. Lopes et al., (1999; 2006) identificaram de 5 a 9 e de 5 a 12 alelos, respectivamente, em 11 *loci* SSR; em 9 *loci* SSR avaliados em 164 cultivares de sete países da Europa Central, foram detectados de 4 a 13 alelos por *locus* SSR (Sefc et al., 2000); em 11 *loci* SSR de cultivares de uvas de mesa de diferentes países foram descritos de 4 a 11 alelos; em 6 *loci* SSR foram identificados de 9 a 13 alelos e de 4 a 16 alelos por *locus* em 176 cultivares da Espanha (Martín et al., 2003; Ibañez et al., 2003); em variedades do Irã foram observados de 4 a 16 alelos por *locus* SSR (Fatahi et al., 2003). Pollefeys e Bousquet (2003) descreveram um alto número de alelos por *locus* SSR em 16 cultivares de híbridos de uva Norte Americanos e Franceses. Estes autores observaram de 7 a 11 alelos/*locus*. Grassi et al. (2003), estudando diferentes variedades silvestres, domesticadas e cultivares da Itália, encontraram de 4 a 16 alelos/*locus*; e em 46 cultivares de uvas da Europa, This et al. (2004) detectaram de 13 a 23 alelos/*locus*. Snoussi et al. (2004); estudando 109 cultivares de mesa e variedades silvestres de uma coleção na Tunísia, observaram de 5 a 9 alelos/*locus*; em 4 cultivares e em um híbrido de uvas da França, Merdinoglu et al. (2005) observaram de 1 a 8 alelos/*locus*. Em 25 variedades crioulas do Peru e da Argentina e em 46 cultivares de Portugal, Martínez et al. (2006) e Lopes et al. (2006) observaram de 6 a 13 alelos/*locus* e de 5 a 12 alelos/*locus* respectivamente. Quando 38 cultivares de diferentes espécies do gênero *Vitis* foram estudadas, foram observados de 5 a 12 alelos/*locus* (Fernández et al., 2008).

Em clones de cultivares de *V. vinifera*, a análise de *loci* SSR tem sido menos investigada, mas as evidências estão de acordo com os resultados verificados no presente estudo com os clones da cultivar Itália, cultivadas nas regiões Sul (Paraná) e Sudeste (São Paulo) do Brasil. Crespan (2004) também registrou de 2 a 3 alelos/*locus* SSR, analisando 16 *loci*, em clones de 4 variedades locais da França e da Itália e ressaltaram o surgimento de novos alelos nos clones num período de 3 anos (1998 – 2001). Evidências similares de 2 a 3 alelos/*Locus* e do surgimento de novos alelos foram descritas por Moncada et al. (2006) analisando 84 *loci* SSR em 59 clones da variedade Carbenet Sauvignon de origens diferentes (Chile, França,

Itália, Austrália, Espanha, Hungria e Estados Unidos) e por Moncada e Hinrichsen (2007) em 25 clones da cultivar Carmenére do Chile, França e Itália analisando 20 *loci* SSR. Os autores citados sugerem em seus trabalhos que o surgimento de novos alelos nos clones são decorrentes de variação no número de unidades de repetições nos *loci* SSR, e que o surgimento de novos alelos ocorre a partir dos alelos originais.

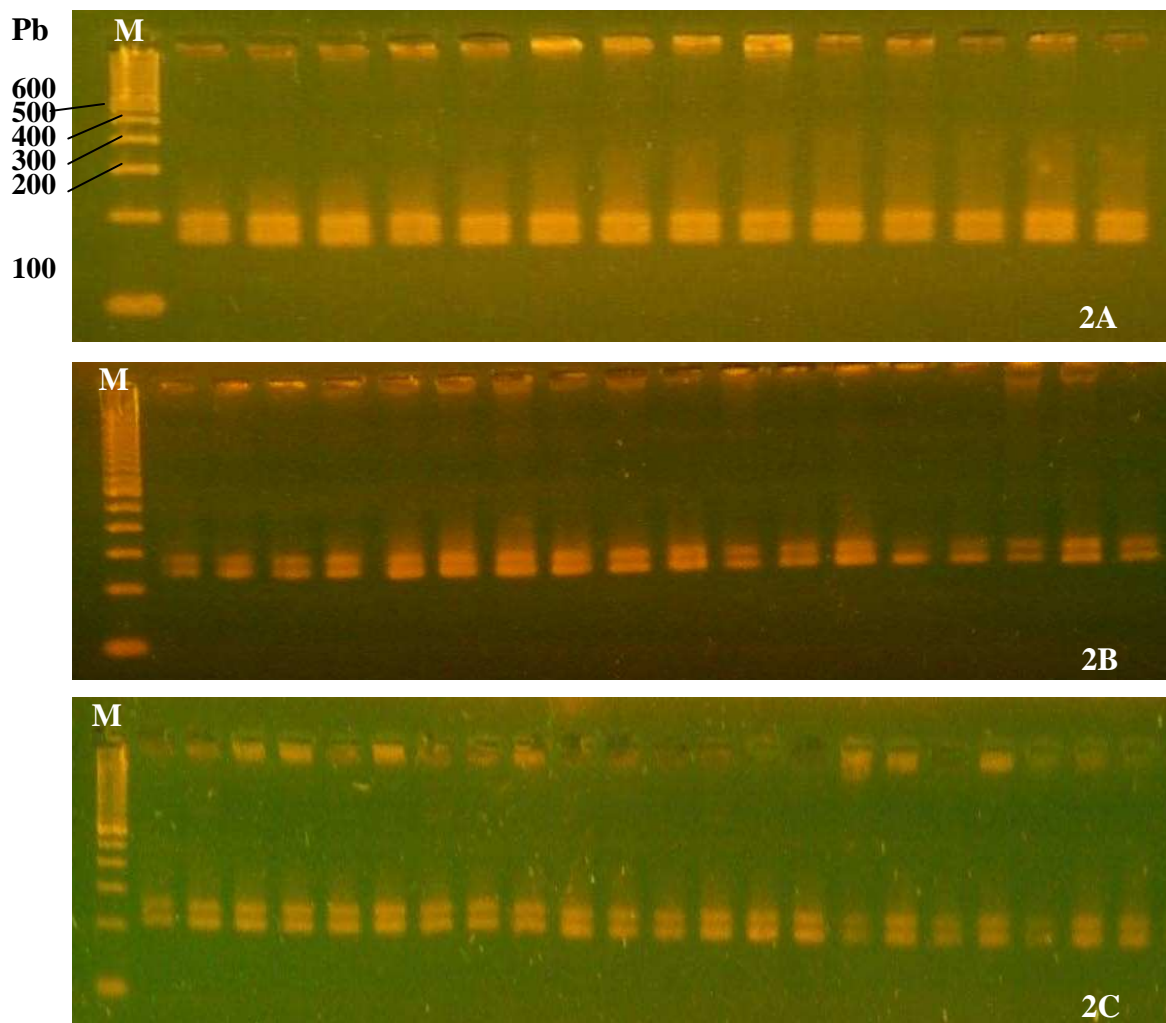


Figura 2 - Géis de agarose concentrados a 4% (50% agarose comum e 50% agarose MS-8) para separar o produto da amplificação dos DNAs de diferentes plantas da cultivar Itália (*Vitis vinifera* L.) com os *primers* *Udv34* (A), *Vvmd5* (B) e *Scu10vv* (C). A primeira amostra (M) de cada gel indica o *ladder* 100pb (Invitrogen).

Nos 17 *loci* SSR analisados na cultivar Itália das seis localidades, foram encontrados os alelos A e B com frequências iguais a 0,50 respectivamente, nos *loci*

Scu10vv, *Scu11vv*, *Udv26*, *Udv32*, *Udv34*, *Udv40*, *Udv85*, e *Vvmd7*, e com frequências diferentes e variáveis nas seis populações nos *loci* *Scu15vv*, *Udv44*, *Udv74*, *Udv96*, *Udv107*, *Udv108*, *Vvmd5*, *Vvmd6*, e *Vvs3* (Quadro 5 e Figuras 2A, B e C). As frequências uniformes e equivalentes a 0,50 dos alelos A e B em 47,1% dos *loci* determinaram uma heterozigiosidade média de 100%, sugestivo de que estes alelos possam ser os alelos originalmente encontrados na geração da cultivar Itália, que é um híbrido formado a partir do cruzamento das variedades Bicane e Moscatel de Hamburgo (Sousa 1996). O terceiro alelo (C) foi detectado com frequências diferentes apenas na população de Paiçandu nos *loci* *Vvs3* (0,80) e *Udv96* (0,10). Desta forma, o polimorfismo no que se refere a alelos diferentes encontrados nos 17 *loci* SSR avaliados na cultivar Itália corresponde a 11,8% de *loci* polimórficos. Este é um valor próximo ao valor descrito nos estudos de Moncada e Hinrichsen (2007) com a análise de 20 *loci* SSR em clones de Carmenère (10% de *loci* polimórficos). Porém é bem menor do que os valores de polimorfismo para 49 *loci* SSR em 145 clones da cultivar Pinot (22,4% de *loci* SSR polimórficos), descritos por Hocquigny et al. (2004), e para os 84 *loci* SSR de 59 clones de Cabernet Sauvignon (21,4% de *loci* polimórficos) descritos por Moncada et al. (2006).

O polimorfismo no que se refere a alelos diferentes encontrados nos 17 *loci* SSR na cultivar Itália corresponde a 11,8% de *loci* polimórficos, mas se os *loci* SSR monomórficos (*Scu8vv*, *Scu12vv*, *Scu14vv*, *Udv1*, *Udv5*, *Udv10*, *Udv11*, *Udv14*, *Udv15*, *Udv18*, *Udv21*, *Udv22*, *Udv27*, *Udv127*, *Vvmd8*, *Vvmd14*, *Vvmd28*, *Vmc466*, *Vmc4a1*, *Vmzag26*, *Vmc4d4*), que geraram fenótipos formados por apenas uma banda no gel de agarose em todas as amostras forem considerados, a proporção de *loci* SSR polimórficos nas populações da cultivar Itália será de 44,7% de *loci* SSR polimórficos. Desta forma, este valor de proporção de *loci* SSR polimórficos estimado na cultivar Itália é maior que os valores registrados na literatura para os clones da cultivar Pinot (Hocquigny et al., 2004) e clones de Cabernet Sauvignon (Moncada et al., 2006), descritos no parágrafo anterior.

As frequências diferentes e variáveis dos alelos A e B nos *loci* *Scu15vv*, *Udv44*, *Udv74*, *Udv107*, *Udv108*, *Vvmd5*, *Vvmd6*, *Vvs3*, e *Udv96* apontam para um polimorfismo, referente às diferentes frequências dos alelos A e B, de 52,9% na

cultivar Itália. Diferentes eventos podem estar relacionados com as frequências diferentes destes alelos em 52,9% dos *loci* SSR analisados nas plantas da cultivar Itália propagada vegetativamente. As plantas identificadas como homozigotas para o alelo A ou B em 5,49% dos *loci* na população de Jales (AA nos *loci* *Scu11vv*, *Udv74*, *Udv96*, *Udv107*, *Vvmd5*, *Vvmd6*, *Vvs3*, e BB nos *locus* *Udv44*); 29,8% na população de Uraí (AA nos *loci* *Scu15vv*, *Udv74*, *Udv96*, *Udv107*, *Udv108*, *Vvmd5*, *Vvmd6*, *Vvs3* e BB nos *loci* *Udv40*, *Udv96*, *Udv108*); 10,9% na população de Pilar do Sul (AA nos *loci* *Udv40*, *Udv96*, *Udv107*, *Udv108*, *Vvmd6*); 3,5% na população de São Miguel Arcanjo (AA nos *loci* *Udv107*, *Udv108*, *Vvmd6*, e BB no *Locus* *Udv96*); 8,4% na população de Marialva (AA nos *loci* *Udv74*, *Udv96*, *Vvmd6*, e BB no *Locus* *Udv96*); e 30% na população de Paiçandu (AA nos *loci* *Scu15vv*, *Udv40*, *Udv107*, *Udv108*, *Vvmd5*, *Vvs3*, e BB nos *loci* *Udv96* e *Udv108*), podem conter alelos nulos que mascaram a identificação do fenótipo original supostamente heterozigoto AB evidenciados em 47,1% dos *loci* analisados nas seis populações da cultivar Itália.

A ocorrência de alelos nulos é um evento já caracterizado em *loci* SSR de variedades e cultivares de uvas de Portugal (Lopes et al., 1999), da Espanha (Martín et al., 2003), em híbridos Norte Americanos e cultivares da França (Pollefeys e Bousquet, 2003). Di Gaspero et al. (2005) descreveram a ocorrência de alelos nulos com uma frequência de 6,6% na cultivar Chardonnay; 11,5% na cultivar Bianca e 22,1% na cultivar Seyval. As evidências dos referidos autores foram fundamentadas pela detecção de um excesso de plantas homozigotas nas diferentes cultivares e para o cálculo da probabilidade de alelos nulos foi empregada a fórmula proposta por Brookfield (1996). Nas seis populações da cultivar Itália analisadas no presente estudo, não foi observado excesso de plantas homozigotas em nenhum dos 17 *loci* SSR examinados que pudesse sugerir a ocorrência de alelos nulos. Entretanto, Fernández et al. (2008) confirmaram, por seqüenciamento, a ocorrência de mutações nas seqüências de “anelamento” de *primers* para *loci* SSR (seqüências “flanqueadoras” dos *loci* SSR), que causam a ausência de amplificação e, conseqüentemente, uma ausência de seqüências de DNA amplificadas (ausência de bandas no gel), ilustrando a ausência de alelos, ou seja, presença de alelos nulos.

Quadro 5 - Frequência dos alelos para os diferentes *loci* de microssatélites analisados para a cultivar de Uva Itália

<i>Loci</i>	Jales	Uraí	Pilar do Sul	São Miguel Arcanjo	Marialva	Paiçandu
<i>Scu10vv</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Alelo B</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Scu11vv</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Alelo B</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Scu15vv</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5667	0,6333	0,5000	0,5000	0,5000	0,7000
<i>Alelo B</i>	0,4333	0,3667	0,5000	0,5000	0,5000	0,3000
<i>Udv26</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Alelo B</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Udv32</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Alelo B</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Udv34</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Alelo B</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Udv40</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Alelo B</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Udv44</i>						
<i>Alelo A</i>	0,4667	0,1667	0,6429	0,5000	0,5000	1,0000
<i>Alelo B</i>	0,5333	0,8333	0,3571	0,5000	0,5000
<i>Udv74</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5333	0,6667	0,5000	0,5000	0,7143	0,5000
<i>Alelo B</i>	0,4667	0,3333	0,5000	0,5000	0,2857	0,5000
<i>Udv85</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Alelo B</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Udv96</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5333	0,2333	0,7143	0,3000	0,3571	0,0500
<i>Alelo B</i>	0,4667	0,7667	0,2857	0,7000	0,6429	0,8500
<i>Alelo C</i>	0,1000
<i>Udv107</i>						
<i>Alelo A</i>	0,6667	0,7333	0,7857	0,5333	0,5000	0,6000
<i>Alelo B</i>	0,3333	0,2667	0,2143	0,4667	0,5000	0,4000
<i>Udv108</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5000	0,8667	0,6429	0,5333	0,5000	0,4000
<i>Alelo B</i>	0,5000	0,1333	0,3571	0,4667	0,5000	0,6000
<i>Vvmd5</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5333	0,5333	0,5000	0,5000	0,5000	0,6000
<i>Alelo B</i>	0,4667	0,4667	0,5000	0,5000	0,5000	0,4000
<i>Vvmd6</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5667	0,9000	0,6429	0,5333	0,7143	1,0000
<i>Alelo B</i>	0,4333	0,1000	0,3571	0,4667	0,2857
<i>Vvmd7</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Alelo B</i>	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Vvs3</i>						
<i>Alelo A</i>	0,5333	0,9667	0,5000	0,5000	0,5000	0,2000
<i>Alelo B</i>	0,4667	0,0333	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Alelo C</i>	0,8000

Estudos prévios de 65 plantas da cultivar Itália da população de Marialva indicou um polimorfismo relativamente freqüente de alelos nulos (52,3%) para uma carboxilesterase do *locus Est-3* (Orasmo et al., 2007). A ocorrência de recombinações somáticas induzidas por elementos de transposição, preliminarmente usadas para explicar o polimorfismo para a coloração de frutos nas cultivares Itália, Rubi, Benitaka e Brasil (Oliveira-Collet et al., 2005), foi usada por Orasmo et al. (2007) para justificar também o polimorfismo de alelos nulos do *locus Est-3*. As recombinações somáticas, por sua vez, foram convencionalmente ilustradas em fungos e algumas espécies de plantas pelo surgimento de homozigotos frente a uma expectativa de fenótipos heterozigotos (Zimmermann, 1992; Franzoni et al., 1997; Baptista e Castro-Prado, 1997). Desde que a recombinação mitótica possa promover a homozigose, é possível considerar a possibilidade de ocorrência de recombinações nos *loci Scu15vv, Udv44, Udv74, Udv107, Udv108, Vvmd5, Vvmd6, Vvs3, e Udv96* que apresentam freqüências dos alelos A e B variáveis e diferentes de 0,50 conforme o esperado para fenótipos originalmente heterozigotos.

A possibilidade de ocorrência de recombinações somáticas, além de mutações em seqüências “flanqueadoras” dos *loci* SSR, podem conduzir a suspeita de alelos nulos em *loci* SSR (apesar de não ter sido detectado déficit de heterozigotos) para explicar as alterações nas freqüências dos alelos A e B devido à detecção de plantas homozigotas (alelos A e B em homozigose em 52,9,1% dos *loci*) nas seis populações na cultivar Itália. A proposta de ocorrência de eventos de recombinação mitótica em determinados *loci* SSR da cultivar Itália pode ser usada para justificar as freqüências diferentes e aparentemente aleatórias dos alelos A e B nos diferentes *loci* e diferentes populações. Isso porque as freqüências de recombinações mitóticas foram descritas como sendo diferentes em diferentes órgãos das plantas e em diferentes estágios de diferenciação (Swoboda et al., 1994). Assim, dependendo das freqüências com que ocorrem e do órgão onde ocorrem, as recombinações mitóticas são muito importantes porque podem ser consideradas como um mecanismo adicional para direcionar a evolução de genomas.

Estudos com plantas e fungos indicam que os eventos de recombinações somáticas têm sido freqüentemente associados às mutações induzidas (Gorbunova

et al., 2000; Baptista e Castro-Prado, 2002). A proposição é de que duplas-quebras em regiões do DNA podem estimular os eventos de recombinações durante a mitose de tecidos somáticos expostos a um determinado agente mutagênico. De acordo com esta proposta, é possível considerar que a exposição das folhas da cultivar Itália a determinados fungicidas, por exemplo, frequentemente aplicados para o controle de doenças comuns em vinhedos da região (Collet, informação pessoal), possam estar induzindo mutações de ponto e/ou quebras cromossômicas, contribuindo, assim, para promover variações nas frequências de alelos em *loci* SSR de folhas da cultivar Itália. A ação de fungicidas inibindo sete carboxilesterases de diferentes *loci* em folhas das plantas da cultivar Itália foi descrita por Orasmo (2007).

As evidências de um número reduzido de alelos por *locus* SSR (2 a 3 alelos) e a detecção de um terceiro alelo (alelo C) em somente 11,8% de *loci* polimórficos poderiam indicar uma reduzida diversidade genética para a cultivar “Itália”. Entretanto, as frequências variáveis dos alelos A e B em 52,8% dos *loci* SSR conferiu uma proporção alta de plantas heterozigotas nas seis populações. A heterozigosidade média observada variou de 0,70 (população de São Miguel) a 0,9647 e foi maior na população de Paiçandu ($H_o = 0,9647$). A heterozigosidade média esperada variou de 0,4064 (população de Uraí) a 0,4950 e foi maior na população de Jales ($H_e = 0,4950$) (Quadro 6). O valor de H_o estimado para as seis populações da cultivar Itália foi de 0,8525 e o intervalo observado nas diferentes populações são próximos aos valores descritos para a análise de 6 a 11 *loci* SSR em cultivares de 7 países da Europa Central ($H_o = 0,776$ a $0,904$; Sefc et al., 2000), cultivares da Espanha ($H_o = 0,756$ a $0,909$; Martín et al., 2003), cultivares de uvas de mesa e variedades silvestres da Tunísia ($H_o = 0,71$ a $0,98$; Snoussi et al., 2004) e até em cultivares de diferentes espécies do gênero *Vitis* ($H_o = 0,68$ a $0,92$; Fernández et al., 2008). Em cultivares de Portugal, Lopes et al. (1999; 2006) têm descrito valores menores e um intervalo maior de heterozigosidade média observada ($H_o = 0,60$ a $0,97$ e $0,55$ a $0,91$; respectivamente). Em cultivares de híbridos Norte Americanos e Franceses, Pollefeys e Bousquet (2003) descreveram o intervalo $H_o = 0,30$ a $1,0$. O intervalo máximo ($H_o = 0,0$ a $1,0$) foi descrito por Merdinoglu et al.

(2005), analisando 169 *loci* SSR de cultivares e de híbridos da França. Para o cálculo da heterozigosidade média observada e heterozigosidade média esperada na investigação de Merdinoglu et al. (2005), os autores consideraram os *loci* SSR monomórficos.

Com relação aos valores de heterozigosidade média esperada nas seis populações da cultivar Itália, estes foram menores que os valores estimados para diversas variedades e cultivares de uvas. Lopez et al. (1999; 2006) registraram o intervalo de 0,67 a 0,84 para a heterozigosidade média esperada em cultivares de Portugal. Em cultivares de sete países da Europa Central, Sefc et al. (2000) descreveram os valores de 0,71 a 0,859 e em cultivares da Espanha, Martín et al. (2003) registraram de 0,734 a 0,859. Pollefeys e Bousquet (2003) e Merdinoglu et al. (2005), analisando os *loci* SSR em cultivares híbridos (América do Norte e França) e cultivares da França, registraram, respectivamente, os maiores intervalos para os valores de heterozigosidade média esperada: H_e de 0,30 a 1,00 e de 0,00 a 1,0. Nas variedades crioulas do Peru e da Argentina, os valores de H_e foram de 0,712 a 0,891 (Martínez et al., 2006). É possível que os valores de H_e registrados pelos referidos autores sejam relativamente maiores que os valores encontrados na cultivar Itália, porque cultivares diferentes e com um número maior de alelos por *Locus* SSR do que o número encontrado na cultivar Itália foram comparadas nos diferentes estudos.

Os valores maiores de heterozigosidade média observada em relação aos valores de heterozigosidade média esperada nas seis populações da cultivar Itália (Quadro 6) são concordantes com o que tem sido descrito para outros grupos de cultivares de uvas analisando *loci* SSR (Sefc et al., 2000; Fernández et al., 2008). A seleção para níveis altos de heterozigosidade, ou seja, para a seleção de plantas heterozigotas, tem sido sugerida para explicar o alto nível de heterozigosidade observado nas cultivares de uvas da Europa (Sefc et al., 2000). Os autores supõem que estes níveis de heterozigosidade tenham se tornado uma condição vital para as plantas, de forma que a seleção de plantas altamente heterozigotas tenha sido intensificada no curso da domesticação e cultivo, enquanto os genótipos foram selecionados de acordo com a sua performance agrônômica.

No que se refere a cultivar Itália, além das suposições dos autores acima citados, existe o fato desta cultivar ter sido formada a partir do cruzamento das variedades Moscatel de Hamburgo e Bicane. Em 82,35% dos *loci* SSR da população de Marialva, em 76,47% dos *loci* SSR da população de São Miguel Arcanjo, em 70,59% dos *loci* SSR da população de Pilar do Sul, em 58,82% dos *loci* SSR da população de Paiçandu e em 47,05% dos *loci* SSR da população de Jales e de Uraí, a proporção de plantas heterozigotas encontradas é de 100%. Desta forma, a maior proporção de *loci* SSR com 100% de heterozigosidade foi detectada na população de Marialva e a menor proporção foi detectada nas populações de Jales e Uraí. Entretanto, considerando que o cultivo ao longo do tempo e a forma de propagação da cultivar contribuíram para a ocorrência de alterações nas frequências de alelos, além do surgimento de novos alelos, o maior valor de heterozigosidade média observada foi detectado na população de São Miguel Arcanjo ($H_o = 0,9647$), seguidos pelos valores estimados nas populações de Jales ($H_o = 0,9451$), Marialva ($H_o = 0,9160$), Pilar do Sul ($H_o = 0,8908$), Uraí ($H_o = 0,7020$), Paiçandu ($H_o = 0,700$). A estimativa da diversidade genética avaliada através da heterozigosidade média observada é uma evidência de que a domesticação e a seleção artificial para características morfológicas e agrônômicas importantes na cultivar Itália tem um efeito marcante na diversidade genética nos *loci* SSR.

Os parâmetros de diversidade genética apresentados no Quadro 7 apontam para um excesso global de heterozigotos nas seis populações da cultivar Itália (valores negativos de F_{IS} para todos os *loci* SSR analisados) resultante da origem da cultivar, das alterações nas frequências dos alelos nos *loci* SSR e de mutações que determinam a geração de novos alelos. O valor global de F_{IS} é -0,8492 e é maior ($F_{IS} = -1,0$) nos *loci* *Scu10vv*, *Scu11vv*, *Udv26*, *Udv32*, *Udv34*, *Udv40*, *Udv85*, e *Vvmd7*.

A análise da divergência genética entre as seis populações (F_{ST}) da cultivar Itália resultou num valor global igual a 0,0648 (Quadro 7), indicando um nível moderado de diversidade genética entre as mesmas ($F_{ST} = 0,05 - 0,15$; Wright 1978). Um nível de diferenciação genética moderado ($F_{ST} = 0,06$) também tem sido descrito para outras cultivares locais e comerciais da Tunísia por Snoussi et al. (2004). O Quadro 7 mostra que os *loci* *Udv108* e *Vvmd6* também apresentaram

valores de F_{ST} no intervalo 0,05 – 0,15 que, de acordo com Wright (1978), corresponde a uma diferenciação genética moderada entre as populações. Em contraste, os *Loci Udv44, Udv96 e Vvs3* apresentaram valores de F_{ST} no intervalo entre 0,15 – 0,25 ou maior que 0,25, indicando uma alta (ou muito alta, $F_{ST} > 0,25$) diferenciação entre as populações.

Para o cálculo da divergência genética entre as populações da cultivar Itália, foram consideradas as frequências dos dois alelos (A e B) presentes em todas as seis populações e também as frequências de um terceiro alelo (C) detectado nos *loci Udv96 e Vvs3* somente na população de Paiçandu. Este procedimento conferiu um valor estimado ($F_{ST} = 0,0648$) que permitiu indicar uma divergência genética moderada entre as populações. Entretanto, é possível que os valores reais de heterozigosidade média observada e divergência genética entre as seis populações sejam maiores porque um terceiro alelo também foi encontrado juntamente com os alelos A e B, formando um fenótipo de 3 bandas de DNA no gel de agarose nos *loci Udv107 e Scu10vv* em plantas das populações de Urai, São Miguel Arcanjo, Marialva e Paiçandu (Figura 3A e 3B). O fenótipo de 3 ou 4 bandas num mesmo *locus* SSR foi explicado como resultado da análise de tecidos quiméricos, formados por camadas de células do meristema que contém alelos diferentes (Thompson e Olmo, 1963). Este tipo de instabilidade alélica em *loci* SSR tem sido descrito em diferentes variedades de uvas (Riaz et al., 2002; Bertsch et al., 2003; Hocquigny et al., 2004; Moncada et al., 2006; 2007). A estrutura quimérica dos *loci* SSR, por sua vez, tem sido apontada como geradora e como justificativa para a existência de divergência genética entre clones das cultivares Cabernet Sauvignon e Pinot (Moncada et al., 2006).

No *locus Udv107* da cultivar Itália, a diferenciação genética foi estimada como sendo baixa ($F_{ST} = 0,0455$) considerando apenas as frequências os alelos A e B. Entretanto, na população de Urai foram detectadas 2 plantas quimeras (13,3%) e, na população de São Miguel Arcanjo, 4 plantas quimeras (26,6%), indicando que o *locus Udv107* também pode ser considerado como informativo da divergência genética entre clones da cultivar Itália. No *locus Scu10vv*, onde a diversidade genética foi estimada como sendo nula ($F_{ST} = 0,00$) considerando apenas a presença

dos alelos A e B, também foram observadas 85,6% plantas quimeras na população de Marialva e 20% na população de Paiçandu e de São Miguel Arcanjo. A observação de um terceiro alelo nos *loci Udv107* e *Scu10vv* confere uma diversidade genética maior que a estimada para os clones das regiões de Uraí, São Miguel Arcanjo, Marialva e Paiçandu. Caracteriza, também, um potencial destes clones em ampliar o número de alelos por *locus* SSR polimórfico e a variabilidade genética da cultivar Itália quando forem propagadas vegetativamente, para formar novos parreirais locais ou regionais. As mutações e/ou recombinações somáticas quando ocorrem estabelecem um mosaico genético (Crespan, 2004; Martínez et al., 2006) e podem ser eventualmente fixadas e transferidas para novas plantas por propagação vegetativa. A alta proporção de plantas quimeras nos clones de Itália cultivados em Marialva (PR) e também em Paiçandu (PR) pode ser usada para justificar a alta variabilidade genética (50% de segmentos de DNA polimórficos) encontrada na análise de RAPD descrita por Maia et al. (2008).

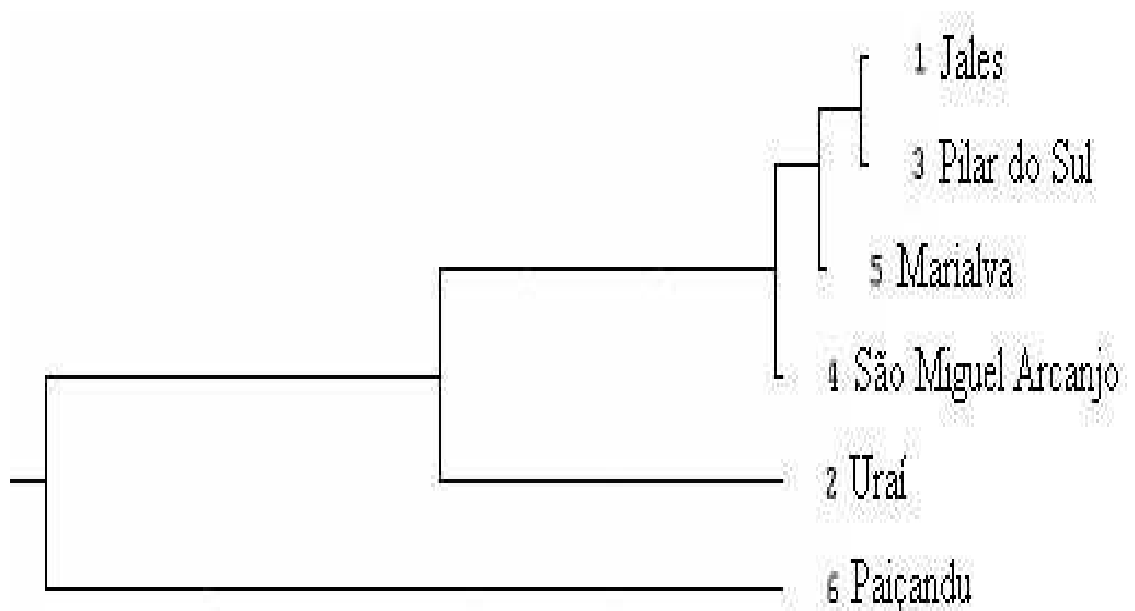


Figura 4 - Agrupamento UPGMA das plantas de *Vitis Vinifera* da cultivar Itália coletadas em (1 - Jales), (2 - Uraí), (3 - Pilar do Sul), (4 - São Miguel Arcanjo), (5 - Marialva) e (6 - Paiçandu).

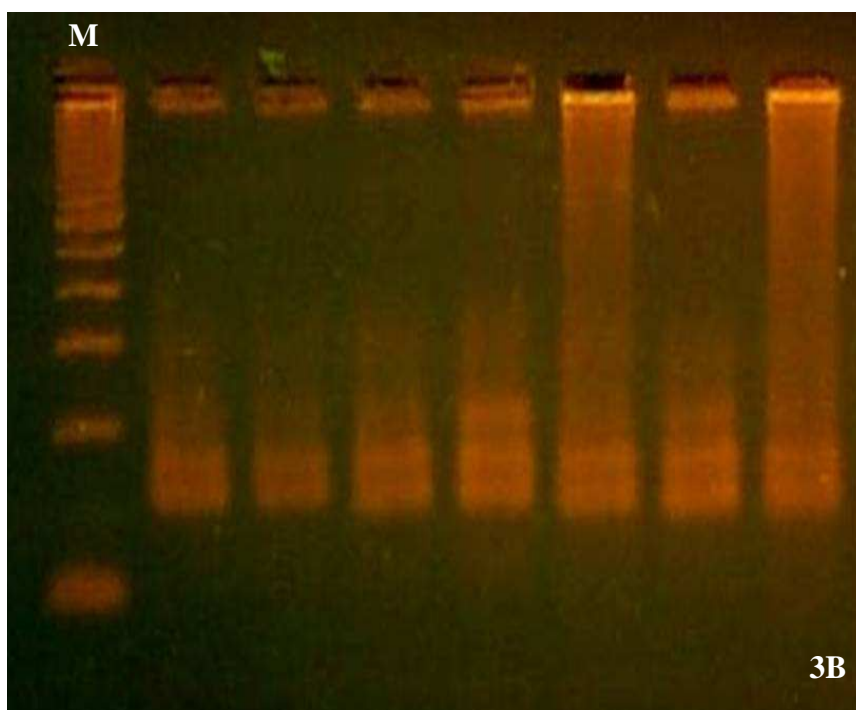
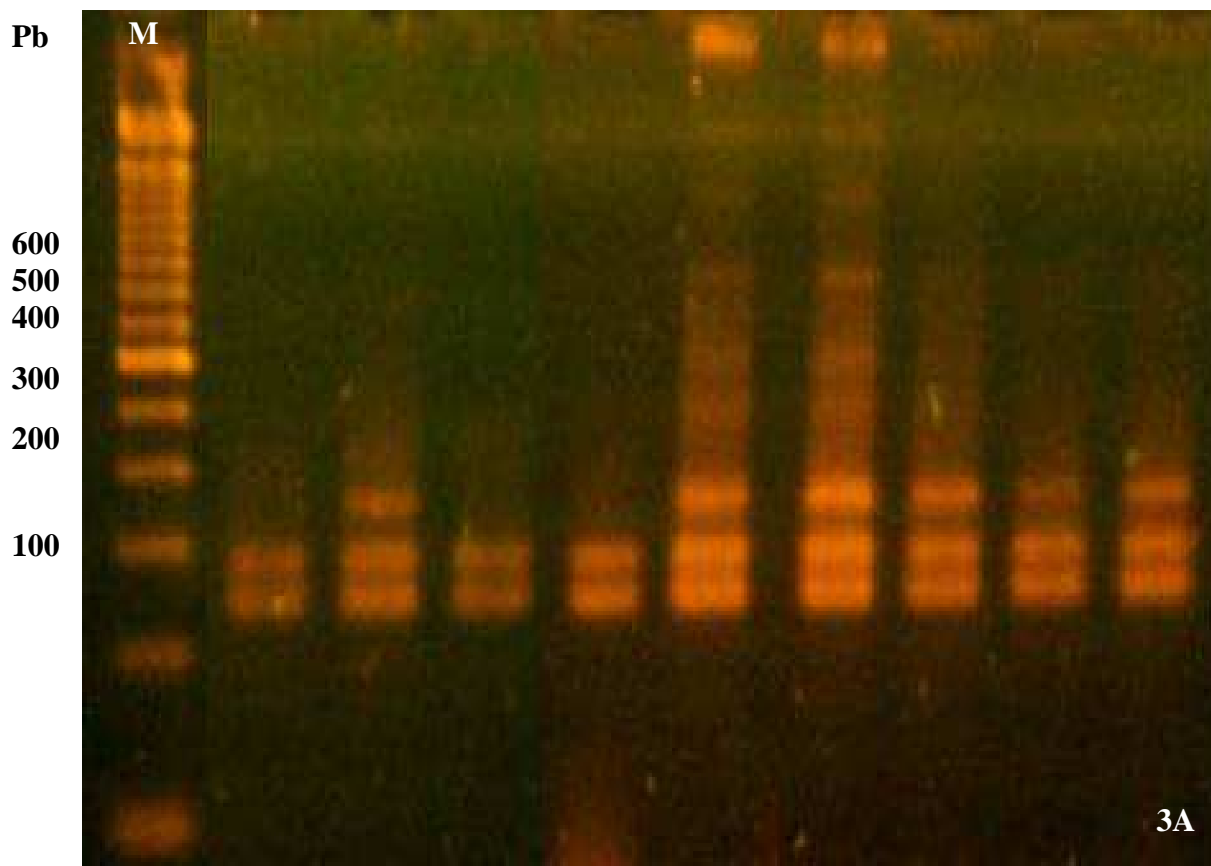


Figura 3 - Géis de agarose mostrando o terceiro alelo (C), encontrado juntamente com os alelos A e B, formando um fenótipo de 3 bandas (quimérico) em plantas das populações da cultivar Itália de Urai, São Miguel Arcanjo, Marialva e Paiçandu nos loci *Scv10vv* (A) e *Udv107* (B).

Quadro 6 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para as seis populações de *Vitis vinifera* L. obtidos com os primers de microssatélite

Locus	Jales				Urai				Pilar do Sul			
	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
<i>Scu10vv</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Scu11vv</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Scu15vv</i>	2,0	1,9650	0,8667	0,4911	2,0	1,8672	0,7333	0,4644	2,0	2,0000	1,0000	0,4592
<i>Udv 26</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 32</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 34</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 40</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,4592
<i>Udv 44</i>	2,0	1,9912	0,9333	0,4978	2,0	1,3846	0,3333	0,2778	2,0	0,8491	0,7143	0,5000
<i>Udv74</i>	2,0	1,9912	0,9333	0,4978	2,0	1,8000	0,6667	0,4444	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 85</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 96</i>	2,0	1,9912	0,9333	0,4978	2,0	1,5571	0,3333	0,3578	2,0	1,6897	0,5714	0,4080
<i>Udv 107</i>	2,0	1,8000	0,6667	0,4444	2,0	1,6423	0,5335	0,3911	2,0	1,5077	0,4286	0,3367
<i>Udv 108</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	1,3006	0,1333	0,2311	2,0	1,8491	0,7146	0,5000
<i>Vvmd5</i>	2,0	1,9912	0,9333	0,4978	2,0	1,9912	0,9333	0,4978	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Vvmd6</i>	2,0	1,9651	0,8667	0,4911	2,0	1,2195	0,2000	0,1800	2,0	1,8491	0,7143	0,4592
<i>Vvmd7</i>	2,0	1,8000	0,6667	0,4444	2,0	2,0000	0,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Vvs3</i>	2,0	1,9912	0,9333	0,4978	2,0	1,0689	0,0667	0,0644	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
Média	2,0	1,9815	0,9451	0,4950	2,0	1,7548	0,7020	0,4064	2,0	1,9261	0,8908	0,4778
Locus	São Miguel Arcanjo				Marialva				Paiçandu			
	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
<i>Scu10vv</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Scu11vv</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Scu15vv</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	1,7241	0,6000	0,4200
<i>Udv 26</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 32</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 34</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 40</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 44</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	1,0	1,0000	0,0000	0,0000
<i>Udv74</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	1,6897	0,5714	0,4082	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 85</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Udv 96</i>	2,0	1,7241	0,6000	0,4200	2,0	1,8491	0,4286	0,4592	3,0	1,3605	0,1000	0,2650
<i>Udv 107</i>	2,0	1,9912	0,9333	0,4978	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	1,9231	0,8000	0,4800
<i>Udv 108</i>	2,0	1,9912	0,9333	0,4978	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	1,9231	0,6000	0,4800
<i>Vvmd5</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	1,9231	0,8000	0,4800
<i>Vvmd6</i>	2,0	1,9912	0,9333	0,4978	2,0	1,6897	0,5714	0,4082	1,0	1,0000	0,0000	0,0000
<i>Vvmd7</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000
<i>Vvs3</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	2,0	1,4706	0,0000	0,3200
Média	2,0	1,9822	0,9647	0,4949	2,0	1,9546	0,9160	0,4868	1,9412	1,7838	0,7000	0,4085

Quadro 7 - Estimativa da Heterozigosidade Observada, Esperada, Diversidade Genética (Fis) e diferenciação das seis populações de *Vitis vinifera* L.

<i>Loci</i>	Na	Ne	Ho	He	Fis	Fst
<i>Scu10vv</i>	2,0	2,0	1,0000	0,5000	-1,0000	0,0000
<i>Scu11vv</i>	2,0	2,0	1,0000	0,5000	-1,0000	0,0000
<i>Scu15vv</i>	2,0	1,9589	0,8551	0,4895	-0,8083	0,0241
<i>Udv 26</i>	2,0	2,0	1,0000	0,5000	-1,0000	0,0000
<i>Udv 32</i>	2,0	2,0	1,0000	0,5000	-1,0000	0,0000
<i>Udv 34</i>	2,0	2,0	1,0000	0,5000	-1,0000	0,0000
<i>Udv 40</i>	2,0	2,0	1,0000	0,5000	-1,0000	0,0000
<i>Udv 44</i>	2,0	1,9996	0,6667	0,4999	-0,7814	0,2487
<i>Udv74</i>	2,0	1,9665	0,8696	0,4915	-0,8143	0,0314
<i>Udv 85</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	-1,0000	0,0000
<i>Udv 96</i>	3,0	1,8945	0,5217	0,4722	-0,2321	0,1708
<i>Udv 107</i>	2,0	1,8590	0,7246	0,4621	-0,6460	0,0455
<i>Udv 108</i>	2,0	1,9413	0,7101	0,4849	-0,6420	0,0908
<i>Vvmd5</i>	2,0	1,9933	0,9420	0,4983	-0,9044	0,0051
<i>Vvmd6</i>	2,0	1,6820	0,5652	0,4055	-0,6136	0,1466
<i>Vvmd7</i>	2,0	2,0000	1,0000	0,5000	-1,0000	0,0000
<i>Vvs3</i>	3,0	2,3011	0,6377	0,4644	-0,6791	0,3241
Média	2,1176	1,9763	0,8525	0,4923	-0,8492	0,0648

Algumas das marcantes aplicações da análise de *loci* SSR em uvas têm sido primariamente para a determinação de parentesco entre variedades ou cultivares para detecção de cultivares sinônimas (Bowers e Meredith, 1997; Bowers et al., 1996; Lopes et al., 1999; Piljac et al., 2002; Selfc et al., 1997; 1998), para investigar as relações taxonômicas entre as espécies (Rossetto et al., 2002) e para a identificação e discriminação de cultivares, no sentido de facilitar o manejo, o controle e proteção legal das coleções de cultivares (Selfc et al., 2000; Dangl et al., 2001; Lopes et al., 2006; Martínez et al., 2006). Desta forma, os *loci* SSR são muito usados para estimar a diversidade genética entre variedades, mas são pouco utilizados (Franks et al., 2002; Riaz et al., 2002) e considerados como pouco informativos para estimar a diversidade entre cultivares muito relacionadas. Porém,

a análise dos *loci* SSR nos clones da cultivar Itália, mantidos em diferentes localidades dos estados de São Paulo e Paraná, mostrou variabilidade genética do DNA e confirma que pode ser usada para explicar a alta diversidade genética previamente encontrada na análise do polimorfismo para alelos nulos no *locus Est-3* (52,3%) (Orasmo et al., 2007). O polimorfismo de DNA em seqüências aleatórias amplificadas (RAPD) de clones nas cidades de Marialva e Paiçandu (65% de segmentos polimórficos) (Maia et al., 2008) e contraria a suposição (Imazio et al., 2002; Schllenbaum et al., 2008) de que os *loci* SSR não são marcadores genéticos adequados para detectar variabilidade genética em clones de uvas.

5. CONCLUSÕES

- a) Alguns dos clones da cultivar Itália das regiões do PR e de SP apresentam um nível moderado de diferenciação genética. Apesar de a propagação vegetativa ser a forma de reprodução usada para a formação dos clones, estes não devem ser considerados como geneticamente uniformes.
- b) Existe variabilidade genética dentro de cada clone da cultivar Itália, determinada pelo surgimento de novos alelos (mutações e/ou recombinações mitóticas) e por alterações nas frequências dos alelos originais (recombinações mitóticas).
- c) A análise dos *loci Vvs3*, *Udv40*, e *Udv96* permite diferenciar as populações de clones da cultivar Itália. Estes *loci* possuem o maior conteúdo de informação genética para a referida cultivar.
- d) Os *loci Uvd107* e *Scu10vv* podem ser considerados como informativos da divergência genética entre clones da cultivar Itália porque evidenciam as diferentes proporções de plantas quimeras. Podem ser analisados para prever o potencial de cada clone em formar novos clones geneticamente uniformes ou divergentes.
- e) Os clones da cultivar Itália cultivados em Jales (SP) e em Urai (PR) podem ser considerados como os mais polimórficos em nível de DNA porque apresentaram alterações nas frequências de alelos em uma maior proporção (52,9%) de *loci* SSR.
- f) O clone da cultivar Itália cultivado em Marialva (PR) apresentou o menor número de *loci* SSR com variação na frequência dos alelos (17,6%) indicativo de uma maior estabilidade genética. Contudo, apresentou a maior proporção de plantas quimeras, indicativo de maior potencial para disseminar por propagação vegetativa clones geneticamente divergentes.
- g) Plantas dos clones da cultivar Itália de Jales (SP) ou de Urai (PR) podem ser cruzadas com plantas do clone de Paiçandu (PR), na expectativa de ampliar a base genética desta cultivar em programas de melhoramento genético. Isso é possível porque estes clones apresentaram as maiores proporções de *loci* SSR com variação nas frequências de alelos e maior divergência na frequência dos alelos, além de alelos novos encontrados no clone de Paiçandu.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWALL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker
- ALBUQUERQUE, T.C.S. **Uva para exportação: aspectos técnicos da produção.** Brasília: Embrapa-SPI, 1996. 53p.
- ARNOLD, C.; ROSSETTO, M.; MCNALLY, J.; HENRY, R.J. The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. **Amer. J. Bot.**, 89:22-28, 2002.
- BAPTISTA, F.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Benlat-induced homozygosis from heterozygous diploid strains in *Aspergillus nidulas*. **Cytologia**, 62:389-396, 1997.
- BAPTISTA, F.; CASTRO-PRADO, M.A.A. *uvsZ1* mutation shows epistatic relations with *uvsD153* and *uvsJ1* mutations without any involvement with checkpoint control in *Aspergillus nidulans*. **Biol. Res.**, 35:441-446, 2002.
- BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatellites: Allele variation and mapping. **Plant Mol. Biol.**, 27:835-845, 1995
- BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Towards unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. **Bio/Tech.**, 8:930-932, 1990.
- BELLIN, D.; STEFANINI, M.; VELASCO, R.; STELLA GRANDO, M. Una mappa molecolare del Moscato bianco. **Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura**, 23:129-132, 1999.
- BERTSHC, C.; KIEFFER, F.; TRIIOULEYRE, C.; BUTTERLIN, G.; MERDINOGLU, D.; WALTER, B. Molecular profiling of *Vitis vinifera* Chardonnay obtained by somatic embryogenesis. **J. Int. Sci. Vigne Vin.**, 34:223-227, 2003.
- BLAICH, R. The analysis of restriction fragment length polymorphism as a tool for the differentiation of grapevine cultivars. **Riv. Viticolt. Enol.**, 42:33-35, 1989.
- 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.
- BOWERS, J.E.; BANDMAN, E.B.; MEREDITH, C.P. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. **Amer. J. Enol. Viticult.**, 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.
- BOWERS, J.E.; MEREDITH, C.P. The parentage of a classic wine grape Chardonnay Sauvignon. **Nature**, 16:84-87, 1997.
- BROOKFIELD, J.F.Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Mol. Ecol.**, 5:453-455, 1996.
- BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BACHMANN, O.; BLAICH, R. On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Vitis**, 33:15-17, 1994.
- BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BLAICH, R. Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of Random Amplified Polymorphic DNA techniques using 10mer primers. **Vitis**, 32:187-188, 1993.
- CAMARGO, U.A. Cultivares para a viticultura tropical no Brasil. **Epamig**, 19:15-19, 1998. (Informe Agropecuário)
- CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; SÁNCHEZ-ESCRIBANO, E.; CENIS, J.L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Characterization of genetic variation within table grape varieties (*Vitis vinifera* L.) based on AFLP markers. **Vitis**, 39:109-114, 2000.
- CIPRIANI, G.; FREZA, G.; PETERLUNGER, E.; TECTOLIN, R. Grapevine fingerprint using microsatellite repeats. **Vitis**, 33:211-215, 1994.
- CRESPAN, M. Evidence on the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. **Theor Appl. Genet.**, 108:231-237, 2004.

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

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.

DANGL, G.S.; MENDUM, M.L.; PRINS, B.H.; WALKER, M.A.; MEREDITH, C.P.; SIMON, C.J. Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species : A tool for managing a grape germplasm collection. **Genome**, 44:432-438, 2001.

DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G.; MARRAZZO, M.T.; ANDREETTA, D.; PRADO CASTRO, M.J.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Isolation of (AC) *n*-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. **Mol. Breed.**, 15:11-20, 2005.

DI GASPERO, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R.; EDWARDS, K.J.; CIPRIANI, G. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. **Theor. Appl. Genet.**, 101:301-308, 2000.

DON, R.H.; COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research.**, 19:4008, 1991.

FARIA, M.A.; MAGALHÃES, R.; FERREIRA, M.A.; MEREDITH, C.P.; FERREIRA MONTEIRO, F. *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR). **J. Agric. Food. Chem.**, 48:1096-110, 2000.

FATAHI, R.; EBADI, A.; BASSIL, N.; MEHLENBACHER, S.A.; ZAMANI, Z. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers. **Vitis**, 42:185-192, 2003.

FERNÁNDEZ, M.P.; NUÑEZ, E.Y.; PONZ, F.; GERNÁIZ, S.; GALLEGO, F.J.; IBÁÑEZ, J. Characterization of sequence polymorphisms from microsatellite flanking regions in *Vitis* spp. **Mol. Breed.**, 22:455-465, 2008.

- FRANK, T.; BOTTA, R.; THOMAS, M.R. Chimerism in grapevine: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. **Theor. Appl. Genet.** 204:192-199, 2002.
- FRANZONI, M.G.M.; CASTRO-PRADO, M.A.A.; GEBARA, J.S. On recombination activity of norfloxacin in a diploid strain of *Aspergillus nidulans*. **Cytologia**, 62:39-47, 1997.
- GONÇALVES, J.A. Paraná descobre nova variedade de uva. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 12 dez. Agrofolha 1, 1995.
- GORBUNOVA, V.; AVIVI-RAGOLSKI, N.; SHALEV, G.; KOVALCHUK, I.; ABBO, S.; HOHNM B.; LEVY, A.A. A new hyperrecombinagenic mutant of *Nicotiana tabacum*. **Plant J.**, 24:601-611, 2000.
- GORGOCENA, Y.; ARULSEKAR, S.; DANDEKAR, A.M.; PARFITT, D.E. Molecular markers for grape characterization. **Vitis**, 32:183-185, 1993.
- GRASSI, F.; LABRA, M.; IMAZIO, S.; SPADA, A.; SGORBATI, S.; SCIENZA, A.; SALA, F. Evidence of a secondary grapevine domestication entre detected by SSR analysis. **Theor. Appl. Genet.**, 107:1315-132, 2003.
- GUPTA, P.K.; ROY, J.K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Curr. Sci.**, 80:524-535, 2001.
- HAMADA, H.; PETRINA, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 79:6465-6469, 1982
- HOCQUIGNY, S.; PELSAY, F.; DUMAS, V.; KINDT, S.; HELOIR, M.C.; MERDINOGLU, D. diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. **Genome**, 47:579-589, 2004.
- HOISINGTON, D.M.; KHAIRALLAH, D.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN. **Laboratory Protocols: Cimmyt Applied Molecular Genetics Laboratory**. Mexico: Cimmyt, 1994. 50p.

- HUGLIN, P. **Biologie et écologie de la vigne**. Paris: Payot Lausanne, 1986, 372p.
- IBAÑEZ, J.; ANDRÉS, M.T.; MOLINO, A.; BORREGO, J. Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellites analysis. **Am. J. Enol. Vitic.** 54:22-29, 2003.
- IMAZIO, S.; LABRA, M.; GRASSI, F.; WINFIELD, M.; BARDINI, M.; SCIENZA, A. Molecular tools for clone identification : The case of the grapevine cultivar Traminer. **Plant Breed.**, 121:531-535, 2002.
- JACOB, H.J.; LINDPAINTER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, YI-PEI; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell.**, 67:213-224. 1991
- JANICK, J.J.; MOORE, J.N. Advances in fruit breeding. **Purdue University Press**, 19:632-632, 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.; MASHIMA, M. Uva: *Vitis vinifera* L. Manual agropecuário do Paraná. **Iapar**, 35:138-177, 1980.
- KUN-SHENG, W.; TANKSLEY, S.D. Abundance, Polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Mol. Gen. Genet.**, 241:225-235. 1993.
- LITT, M.; LUTTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, 44:398-401, 1989.
- LODHI, M.A.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. Characterization of RAPD markers in *Vitis*. **Vitis**, 36:133-140, 1997.
- LOPES, M.S.; SANTOS, M.R.S.; EIRAS DIAS, J.E.; MENDONÇA, D.; CÂMARA MACHADO, A. Discrimination of Portuguese grapevines based on microsatellite markers. **J. of Biotech.**, 127:34-44, 2006.

- LOPES, M.S.; SEFC, K.M.; EIRAS DIAS, E.; STEINKELLNER, H.; LAIMER da CÂMARA MACHADO, M.; da CÂMARA MACHADO, A. The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. **Theor. Appl. Genet.**, 99:733-739, 1999.
- MAIA, S.H.Z.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA-COLLET, S.A. MACHADO, M.F.P.S. Genetic diversity in somatic mutants of grape (*Vitis vinifera* L). cultivar Italia based on random amplified polymorphic DNA. **Gen. Mol. Res.**, 1-11, 2008.
- MARTIN, J.P.; BORREGO, J.; CABELLO, F.; ORTIZ, J.M. Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers. **Genoma**, 46:10-18, 2003.
- MARTINEZ, E.L.; CAVAGNARO, F.P.; MASUELLI, W.R.; ZUNIGA, M. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. **Plant Science**, 170:1036-1044, 2006.
- MERDINOGLU, D.; BUTTERLIN, G.; BEVILACQUE, L.; CHIQUET, A.; ADAM-BLONDON, A-F; DECROOCQ, S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. **Mol. Breed.**, 15:349-366, 2005.
- MEREDITH, C.P.; REISCH, B.I. The new tools of grapevine genetics. **Agric. Expt. Station**, 8:12-18, 1997.
- MONCADA, X.; HINRICHSEN, P. Limited genetic diversity among clones of red wine cultivar Carmenère as revealed by microsatellite and AFLP markers. **Vitis**. 4:174-180, 2007.
- MONCADA, X.; PELS, F.; MERDINOGLU, D.; HINRICHSEN, P. Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers. **Genome**, 49:1459-1472, 2006.
- MOXON, E.R.; WILLS, C. DNA Microsatellites: agents of evolution? **Sci. Am.**, 280:72-77, 1999.

NEI, M.; FELDMAN, M.W.; Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theoretical Population Biology**, 3:460–465, 1972.

OLIVEIRA-COLLET, S.A. **Caracterização isoenzimática de cultivares de uva de mesa *Vitis vinifera* L. (Vitaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2003. 84p. Tese (Doutorado em Agronomia).

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

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

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

PILJAC, J.; MALETIC, E.; KONTIC, J.K.; DANGL, G.S.; PEJIC, I.; MIROSEVIC, N.; MEREDITH, C.P. The parentage of *Posip bijeli*, a major white wine cultivar of Croatia. **Vitis**, 41:83-87, 2002.

POLLEFEYS, P.; BOUSQUET, J. Molecular genetic diversity of the French-american grapevine hybrids cultivated in North America. **Genome.**, 46:1037-1048, 2003.

REGNER, F.; STADLBAUER, A.; EISENHELD, C.; KASERER, H. Genetic Relationships among pinots and related cultivars. **Amer. J. Enol. Vitic.**, 51:7-14, 2000.

RIAZ, S.; GARRISON, K.E.; GANGL, G.S.; BOURSIQUOT, J.M.; MEREDITH, C.P. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, 127:508-514, 2002.

- RÖDER, M.S.; PLASCHKE, J.; KÖNIG, S.U.; BÖRNER, A.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. **Mol. Gen. Genet.**, 246:327-333, 1995.
- ROSSETO, M.; McNALLY, J.; HENRY, J.R. Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the *Vitaceae*. **Theor Appl Genet.**, 104:61-66, 2002.
- SCHELLENBAUM, P.; VANTARD, M.; LAMBERT, A.M. Higher plant microtubule associated proteins (MAPs): A survey. **Biol. Cell.** 76:359-364, 2008.
- 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. **Theor. Appl. Genet.**, 100:723-726, 2000.
- SEFC, K.M.; LOPES, M.S.; LEFORT, F.; BOTTA, R.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; IBANEZ, J.; PEJIC, I.; WAGNER, H.W.; GLÖSSL, J.; STEINKELLER, H. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. **Theor. and Appl. Genet.**, 10:498-505, 2000.
- SEFC, K.M.; REGNER, F.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. **Vitis**, 37:15-20, 1998.
- SEFC, K.M.; REGNER, F.; TURETSCHKE, E.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. **Genome**, 42:367-373, 1999.
- SEFC, K.M.; STEINKELLNER, H.; WAGNER, H.; GLOSSL, J.; REGNER, F. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. **Vitis**, 36:179-183, 1997.
- SNOUSSI, H.; HARBI BEN SLIMANE, H.M.; RUIZ-GARCIA, L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; ARROYO-GARCIA, R. Genetic relationship among cultivated and wild grapevine accessions from Tunisia. **Genome**, 47:1211-1219, 2004.
- SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.
- SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. São Paulo: Melhoramentos, 1959. 456p.

- 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.
- SWOBODA, P.; GAL, S.; HOHN, B.; PUCHTA, H. Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. **Embo. J.**, 13:484-489, 1994.
- techniques and their applications in plant sciences **Plant Cell Rep.**, 27:617-631, 2008.
- TERRA, M.M. **Variedades da videira para o estado de São Paulo**. São Paulo: IAC, 1993. (Boletim Técnico, 166).
- THIS, P.; CUISSET, C.; BOURSIQUOT, J.M. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. **Amer. J. Enol. Vitic.**, 48:492-501, 1997.
- THIS, P.; JUNG, A.; BOCCACCI, P.; BORREGO, J.; BOTTA, R.; CONSTANTINI, L.; CRESPIAN, M.; GANGL, G.S.; EISENHEILD, C.; FERREIRA-MONTEIRO, F.; GRANDO, S.; IBANEZ, J.; LACOMBE, T.; LAUCOU, V.; MAGALHÃES, R.; MEREDITH, C.P.; MILANI, N.; PETERLUNGER, E.; REGNER, F.; ZULINI, L.; MAUL, E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 109:1448-1458, 2004.
- THOMAS, M.R.; CAIN, P.; SCOTT, N.S. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. **Plant Mol. Biol.**, 25:939-949, 1994.
- THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites, STSs. **Theor. Appl. Genet.**, 86:985-990, 1993.
- THOMPSON, M.M.; OLMO, H.P. Cytological studies of cytochimeric and tetraploid grapes. **Am. J. Bot.**, 50:901-906, 1963.
- TODA, F.M. **Biología de la Vid: fundamentos biológicos de la viticultura**. Madrid: Mundi-Prensa, 1991. 346p.

- WEBER, J.L.; MAY, P.E. An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Gen.**, 44:388-396. 1989.
- WEBER, J.L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Hum. Molecul. Genetic**, 2:1123-1128, 1993.
- WEISSENBACH, J.; GYAPAY, G.; DIB., C.; VIGNAL, A.; MORISETTE, J.; MILLASSEAU, P.; VAYSSEIX, G.; LATHROP, M.. A second generation linkage map of the human genome. **Nature**, 359:794-801, 1992.
- WRIGHT. S. Variability within and among populations. In: **Evolution and the genetics of population**. Chicago: University of Chicago Press, 4:79-103, 1978.
- YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. **Popgene Version 1.31**: Microsoft Windows based freeware for population genetic analysis - Quick user guide. University of Albert, Center for International Forestry Research, 1999.
- ZHAO, X.; KOCHERT, G. Characterization and genetic mapping of a short, highly repeat, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). **Mol. Gen. Genet.**, 231:353-359. 1992.
- ZHAO, X.P.; KOCHERT, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC) (n) microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Mol. Biol.** 21:607-614, 1993.
- ZIMMERMANN, F.K. Tests for recombinagens in fungi. **Mutat. Res.** 284:147-158, 1992.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)