

MARCIA OLIVEIRA DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA
EMPREGANDO MARCADOR MICROSSATÉLITE

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
NOVEMBRO – 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MARCIA OLIVEIRA DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA
EMPREGANDO MARCADOR MICROSSATÉLITE

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

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
NOVEMBRO – 2009

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

C837c Costa, Marcia Oliveira da, 1977-
Caracterização genética de porta-enxertos de videira empregando marcador microssatélite. / Marcia Oliveira da Costa. -- Maringá, 2009.
67 f. : il., figs., tabs., retrs.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2009.

1. Videira - Porta-enxerto - Marcador microssatélite. 2. Videira - Polimorfismo. 3. Videira - Genética - Divergência. I. Mangolin, Claudete Aparecida, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed.634.8

Aos meus pais e aos meus irmãos, Gilvan, Raimundo Neto, Venâncio, Joab, Juvenal, Anaíza, Nazaré, Ana Cleide, Luzia e Vera, minha família, meu porto seguro, fonte inesgotável de força e perseverança.

À minha amiga Ivonete Arienti, sempre parte de meus melhores momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador e Mantenedor de minha vida, Deus, autor de toda sabedoria e conhecimento

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento (PGM) e respectivos docentes, que colaboraram para que este trabalho se realizasse, cuja experiência muito contribuiu para minha vida.

À professora, orientadora, mestre e amiga, a quem respeito pela grande sabedoria, doutora Claudete Aparecida Mangolin (a Clau), por sua extrema competência, pelas valiosas orientações, esclarecimentos, carinho e principalmente pela confiança durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

À professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, por quem tenho muito respeito e carinho, pela disponibilidade com que recebe todos que dela necessitam.

À professora doutora Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela segunda chance e pelo voto de confiança.

À professora doutora Sandra de Oliveira Collet, por sua ajuda na execução dos experimentos.

À minha amiga Ivonete Arienti, pelo carinho e paciência nesta caminhada.

À Livia Capel, pela amizade, paciência e dedicação durante o desenvolvimento das técnicas experimentais.

Aos amigos do laboratório, Ana Paula Peron, Denise Alves Lopes, Juliana Franzoni dos Santos, Juliana Bueno Ruiz, Juliana Sala de Farias, Liriana Belizário Cantagalli, Maycon Rodrigo Ruiz Bevilaqua, Sílvia Helena Zequim Maia, Tiara da Silva Coelho, Leila Andréia Frota e Sérgio Luiz Calvi, que tantas vezes contribuíram com as minhas tarefas de laboratório.

Aos professores do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais.

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

BIOGRAFIA

Marcia Oliveira da Costa, filha de Cirilo Marques da Costa e Joana Oliveira da Costa, nasceu em São Luís-MA, no dia 08 de setembro de 1977.

Concluiu o Ensino Fundamental no II Colégio Estadual Professora Maria Pinho, em São Luis - MA, e, no ano de 1995, no Colégio Adventista de São Luís - MA, concluiu o Ensino Médio.

Em 2002, concluiu o Curso de Graduação em Ciências Biológicas, no Centro Universitário Adventista de São Paulo.

Na Universidade Federal de Lavras, em dezembro de 2004, concluiu o Curso de Especialização em Química.

Ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado, no ano de 2007, sob a orientação da professora doutora Claudete Aparecida Mangolin.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. A origem da videira	7
2.2. Classificação botânica	8
2.3. A uva no Brasil e no estado do Paraná	9
2.4. Propagação da videira	10
2.5. Porta-enxertos de uva	12
2.6. Porta-enxertos estudados	14
2.6.1. Variedade Kober 5BB	14
2.6.2. Variedade 420-A	15
2.6.3. Variedade Schwarzmann	16
2.6.4. Variedade IAC-766 Campinas	17
2.6.5. variedade Traviú	18
2.6.6. Variedade IAC-572 Jales	19
2.6.7. Variedade IAC-313 Tropical	20
2.7. Identificação dos porta-enxertos	21
2.7.1. Ampelografia	22
2.7.2. Marcadores celulares	23
2.7.3. Marcadores moleculares	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Variedades de porta-enxertos de uva	26
3.2. Extração do DNA de folhas das variedades de porta-enxerto de uva	27
3.3. Avaliação e quantificação dos DNAs extraídos	28
3.4. Amplificação do DNA e Seleção de primers	29
Reagentes	29
3.5. Análise dos dados	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÕES	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

COSTA, Marcia Oliveira, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, julho, 2009. **Caracterização genética de porta-enxertos de videira empregando marcador microssatélite**. Professora Orientadora: Claudete Aparecida Mangolin. Professores Conselheiros: Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

A identificação das variedades de porta-enxertos de uva por meio de caracteres fenológicos não é segura e tem gerado problemas para os viticultores. Assim, a proposta deste estudo foi caracterizar, por meio do marcador microssatélite, as variedades de porta-enxertos de uva plantadas nas regiões Norte e Noroeste do Paraná, para a obtenção de resultados que possam ser úteis para esclarecer dúvidas quanto à identificação destas variedades e avaliação da diversidade genética. O DNA das variedades dos porta-enxertos 420-A, Schwarzmans, IAC-766 Campinas, Traviú, Kober 5BB, IAC-572 Jales e IAC-313 Tropical foi extraído e avaliado, utilizando-se 12 primers de microssatélites, totalizando 45 alelos com um número médio de alelos igual a 3,75 por *locus*. O valor de H_o estimado para as 7 variedades de porta-enxerto foi de 0,7083. Os parâmetros de diversidade genética apontam para um excesso global de heterozigotos nas sete variedades de porta-enxertos e o valor global de F_{IS} foi -0,4008. A análise da divergência genética (F_{ST}) entre os porta-enxertos Schwarzmans, IAC-572 Jales, IAC-766 Campinas, 420-A, IAC-313 Tropical, Traviú e Kober 5BB resultou em um valor global igual a 0,1838, indicando um nível alto de divergência genética entre as mesmas. A diversidade genética calculada pelos coeficientes de Identidade ou de Distância Genética de Nei mostrou maior identidade genética entre as variedades 420-A e Schwarzmans, com 95,88% de similaridade, e a menor foi encontrada entre as variedades Kober 5BB e IAC-313 Tropical com 56,27% de similaridade genética. A partir dos dados obtidos, utilizando os 12 *loci* de microssatélites, foi construído um dendrograma. Neste, foi identificado: um grupo formado pelas variedades 420-A, Schwarzmans e IAC-766 Campinas, um segundo grupo formado entre IAC-512 Jales e IAC-313 Tropical e os porta-enxertos Traviú e Kober 5BB que não formaram grupo, refletindo assim a maior divergência encontrada entre eles. A sugestão ou proposta do surgimento de

novos alelos por mutações somáticas e/ou por recombinações mitóticas nos porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572 Jales, IAC-766 Campinas, 420-A, IAC-313 Tropical, Traviú e Kober 5BB pode ser constatada em quatro dos *loci SSR* analisados no presente estudo. Para os *loci Udv001, Udv011, Udv108 e Vvmd07*, dependendo da variedade, foram observados fenótipos com um alelo extra, formando um fenótipo de 3 bandas de DNA no gel de agarose. Os alelos extras adicionais formando o fenótipo de 3 bandas nos *loci SSR* constitui um aspecto positivo para aumentar a estimativa da diversidade genética nos porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572 Jales, IAC-766 Campinas, 420-A, IAC-313 Tropical, Traviú e Kober 5BB.

Palavras-chave: *Vitis*, porta-enxertos, microssatélites, quimera em videiras.

ABSTRACT

COSTA, Marcia Oliveira, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, July, 2009. **Genetic characterization of grape vine rootstock by microsatellite markers.** Adviser: Claudete Aparecida Mangolin. Committee Members: Maria de Fátima Pires da Silva Machado and Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

The identification of grape vine rootstock by phenological characteristics is not precise and has caused several problems to grape producers. The varieties of grape vine rootstock in the northern and northeastern regions of the state of Paraná, Brazil have been characterized by microsatellite markers so that results may help in the identification of their varieties and evaluate their genetic diversity. DNA of grape vine rootstock varieties 420-A, Schwarzmann, IAC-766 Campinas, Traviú, Kober 5BB, IAC-572 Jales and IAC-313 Tropical was extracted and evaluated by 12 microsatellite primers, totaling 45 alleles, with a mean number of alleles equal to 3.75 per locus. Estimated H_o rate for the 7 varieties of grape vine rootstocks was 0.7083. Whereas genetic diversity parameters indicate an overall excess of heterozygotes in the seven rootstocks, overall F_{IS} rate reached 0.4008. Genetic divergence analysis (F_{ST}) among rootstocks Schwarzmann, IAC-572 Jales, IAC-766 Campinas, 420 A, IAC-313 Tropical, Traviu and Kober 5BB remeted an overall rate of 0.1838 and showed high genetic divergence level among them. Genetic divergence calculated by Nei's Identity or Genetic Distance Coefficients showed higher genetic identity between 420-A and Schwarzmann, featuring 95.88% similarity. The lowest genetic similarity was found between Kober 5BB and IAC-313 Tropical with 56.27% genetic similarity. A dendrogram, constructed from data given by 12 microsatellite *loci*, identified a group formed by varieties 420-A, Schwarzmann and IAC-766 Campinas, a second group formed by IAC-512 Jales and IAC-313 Tropical and the rootstocks Traviú and Kober 5BB which, failing to form a group, demonstrate the highest divergence among them. The suggestion that new alleles may be produced by somatic mutations and/or mitotic recombinations in rootstock Schwarzmann, IAC-572 Jales, IAC-766 Campinas, 420 A, IAC-313 Tropical, Traviu, and Kober 5BB may be detected in four *SSR loci* analyzed in current research. Depending on type, phenotypes with an extra allele were reported

for *loci Udv001, Udv011, Udv108* and *Vvmd07* which formed a phenotype with 3 DNA bands in agar gel. Additional extra alleles which form the 3 band phenotype in *SSR loci* contributes towards an increase in genetic diversity estimates in rootstocks Schwarzmann, IAC-572 Jales, IAC-766 Campinas, 420-A, IAC-313 Tropical, Traviu and Kober 5BB.

Key words: *vitis*, grape vine rootstock, microsatellites, chimera in grapevines.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Vitis* é diverso, consistindo de 40 a 60 espécies na Ásia, aproximadamente 25 espécies na América do Norte e só uma espécie na Europa – *Vitis vinifera*. Esta é a principal espécie cultivada hoje, enquanto as outras espécies de *Vitis* são usadas para crescimento de porta-enxertos e cultivares resistentes a fungos. Estima-se a existência de cerca de 6.000 cultivares de *V. vinifera* (Alleweldt e Dettweiler, 1994) das quais menos de 400 são de importância comercial (Galet, 2000). Entretanto, hoje, muito dos recursos genéticos de *V. vinifera* estão mantidos em coleções de germoplasma.

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

As videiras são propagadas por mudas e os clones resultantes de uma determinada população são geneticamente idênticos uns aos outros (exceto para mutações somáticas) e à planta mãe (a semente original das quais as cultivares foram derivadas). A história do crescimento da videira tem determinado um retrato complexo dos quais muitos biótipos, ou mesmo cultivares, são mal interpretados ou chamados por diferentes nomes em diferentes áreas. Isto dificulta frequentemente a identificação genética. Além disso, a origem da maioria das cultivares é desconhecida e a estrutura biológica dependente da complexa variabilidade de *V. vinifera* é complicada por muitos fatores, incluindo eventos de cruzamentos espontâneos, os quais podem ser que tenham ocorrido ao longo da domesticação da espécie (Rita et al., 2002).

Santiago et al. (2007) afirmam que, embora *Vitis vinifera* seja cultivada em muitas partes da Europa, Ásia, África, América e Oceania, todas as variedades crescidas atualmente são originadas dos dois primeiros continentes. Durante 20 séculos, a propagação da videira espalhou-se por todo o mundo. Contudo, o número de variedades atualmente cultivadas torna-se cada vez menor. Uma das causas mais importantes desta perda da diversidade da videira na Europa foi a chegada de doenças provenientes da América no fim do século XIX e início do século XX. O mofo branco foi o primeiro a chegar, seguido da filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch). A consequência destes ataques foi a perda de muitas variedades tradicionalmente crescidas em poucas áreas da Europa, ou seja, aquelas que foram bem adaptadas aos microclimas particulares. Outra consequência em função destas doenças foi que os produtores começaram a enxertar suas vinhas em porta-enxertos americanos.

O porta-enxerto de uva representa um dos mais efetivos mecanismos de controle biológico em pragas da agricultura (de Andrés et al., 2007). O porta-enxerto foi introduzido na viticultura no final do século XIX para controlar a filoxera. Para as uvas européias cultivadas não existe resistência natural contra esta praga, mas esta resistência foi encontrada em espécies norte-americanas relacionadas, região onde a filoxera surgiu. Diferentes cultivares híbridas, derivadas de cruzamentos entre espécies de *Vitis* americanas (tais como *V. berlandieri*, *V. riparia* e *V. rupestris*), ou entre *Vitis* americanas e algumas poucas cultivares de *V. vinifera* foram produzidas e testadas como porta-enxertos. A aceitabilidade deste novo material foi dependente dos bons níveis de resistência à filoxera e da compatibilidade e conservação dos traços de qualidade dos frutos produzidos pelas cultivares enxertadas. Não existe estimativa para o número exato de cultivares de porta-enxerto existente atualmente, mas cada um representa um único genótipo mantido por meio de propagação vegetativa (de Andrés et al., 2007).

Cada porta-enxerto é caracterizado pelo comportamento específico de adaptação ao tipo de solo, à compatibilidade com as cultivares de *V. vinifera* e à resistência a pragas e a doenças (Read e Gu, 2003). A relação enxerto/porta-enxerto em viticultura é avaliada por diversas interações e respostas do potencial vegetativo

e produtivo das plantas, bem como da qualidade dos frutos (Pastena, 1981). Tem sido verificado que videiras enxertadas apresentam maior produção que videiras de “pé-franco”. Segundo Edwards (1988), isso pode ser explicado pelo fato de que os porta-enxertos conferem uma alta densidade de raiz e maior vigor à copa, se comparados ao “pé-franco”. Além disso, plantas enxertadas antecipam a produção, mesmo porque, na região em que foi realizada a enxertia, ocorre um relativo estrangulamento à passagem de seiva nos dois sentidos, podendo promover aumento na relação carbono/nitrogênio na copa (Faust, 1989; Hartmann e Kester, 1990). Entretanto, o número de cultivares de porta-enxertos utilizado no mundo é muito pequeno, porque a indústria da uva confia somente em poucas e historicamente bem caracterizadas cultivares. Por exemplo, 90% das uvas italianas são enxertadas em somente 7 cultivares de porta-enxerto, enquanto somente 6 são usadas na França e na Espanha (de Andrés et al., 2007). Entretanto, há muito mais cultivares de porta-enxertos e estas são conservadas *in situ* em bancos de germoplasma. Este material é uma importante fonte de variabilidade genética para possíveis usos em programas de melhoramento.

Para a proteção dos vinhedos, contra a ação da filoxera, os produtores começaram a transplantar cultivares de *V. vinifera* em porta-enxerto de *Vitis* encontradas na América do Norte e que são resistentes a esta doença. Atualmente, transplantar uva em porta-enxerto resistente continua sendo um dos únicos meios de crescimento da *V. vinifera* onde a filoxera está presente. Porta-enxertos são também usados em solos com problemas de nematóide, de salinidade e solos calcários (Pongrácz, 1983). Desta forma, a maioria dos vinhedos brasileiros é formado por plantio dos porta-enxertos no local do futuro vinhedo, para posterior enxertia no campo das cultivares produtoras (Ribas, 1957).

Segundo dados da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB), entre as espécies frutíferas cultivadas no Paraná, as uvas destinadas à mesa e à vinificação ocupam o 5^o e 6^o lugares em área cultivada, respectivamente (Kishino et al., 2007). Os pólos de produção de uvas finas de mesa no Estado são: Maringá, Cornélio Procópio e Londrina, sendo Marialva, Mandaguari, Uraí e Assai os principais municípios produtores. De acordo com os dados do IBGE, referentes

ao ano de 2004, os 10 maiores municípios produtores de uva do Brasil representavam 50,9% da produção brasileira. Dentre os municípios paranaenses, Marialva alcançou a 10ª colocação com 1.399 ha, produção de 33.413 toneladas e rendimento médio de 23.983 kg/ha, naquele ano. Essa produção representa 34,6% do total alcançado pelo Estado e 2,6% do volume produzido no país. Esses dados foram fornecidos pelo IBGE em 2004 e descritos por Kishino et al. (2007). Nessa região, os porta-enxertos mais usados são: o IAC-766 (em 70% das parreiras) e depois IAC-572, o IAC-313 e o 420-A em menores proporções.

A precisa identificação de cultivares de porta-enxerto é essencial, pois este interfere no comportamento e no tempo requerido para estabelecer a copa sobre ele. A identificação de espécies, variedades, cultivares e híbridos de videiras dependem tradicionalmente de caracteres fenológicos, como características da folha e do fruto. Utilizar estes caracteres para identificação é uma habilidade praticada e fácil, pois estes caracteres são dependentes das condições ambientais e dos estágios de desenvolvimento da planta (Lin e Walker, 1997). A tradicional ampelografia, aquela qual faz uso de características morfológicas para identificação de cultivares, não é suficientemente confiável devido às influências ambientais (Lambow et al., 1998; Sefc et al., 1998, 1999). Segundo de Andrés (2007), a diferenciação de materiais intimamente relacionados é difícil, pois o “pool” gênico que deu origem aos porta-enxertos híbridos é estreito e não há uma detalhada descrição disponível.

Estudos realizados por Bowers et al. (1993) e Sefc et al. (1999) mostram que o uso de marcadores moleculares é uma ferramenta útil para superar as limitações e completar a ampelografia, pois estes permitem a detecção de similaridade e a definição das relações genéticas entre as variedades de videiras. A identificação de cultivares utilizando marcadores de DNA deve ser mais eficiente, pois estes avaliam diretamente o genótipo independente do fenótipo e existe uma maior variabilidade de DNA do que para 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. No caso de porta-enxertos, a situação é mais complicada do que para as uvas de vinho e de mesa. Os porta-enxertos, quando enxertados, não produzem folhas, tornando a

identificação ampelográfica impossível. A influência do genótipo de porta-enxertos no desenvolvimento e crescimento da copa enxertada e na qualidade das uvas colhidas é considerável. Além disso, a escolha da cultivar adequada de porta-enxerto para diferentes condições ambientais é o principal fator econômico na viticultura e a classificação incorreta de cultivares de porta-enxertos pode acarretar desvantagens econômicas para a viticultura (Sefc et al., 2001). Por esta razão, são necessários métodos alternativos para a identificação de cultivares, os quais ilustram de forma mais clara as diferenças em nível de genótipo. Diversas técnicas para a caracterização molecular de um organismo têm sido desenvolvidas nos últimos 20 anos (Karp et al., 1998) e a maior parte delas também tem sido aplicada para a diferenciação de cultivares de uva (Sefc et al., 2001). 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*), (Büscher et al., 1993; Gorgocena et al., 1993; Jean-Jaques 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).

Microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs) são marcadores de DNA com pequenos trechos em repetições em *tandem* de dois, três ou quatro nucleotídeos (Legesse et al., 2006). A combinação de várias características, tais como: abundância no genoma de eucariotos, alto nível de polimorfismo, herança Mendeliana, co-dominantes, *loci* específicos e detecção em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), torna os microssatélites ou *loci* SSR marcadores genéticos eficientes para humanos, animais e para plantas (Olivieri e Morgante, 1993; Powell et al., 1996).

Assim, a identificação e a distinção das variedades de porta-enxertos podem ser baseadas em características genéticas, as quais não são influenciadas por fatores, como o clima ou a qualidade do solo. Por isso, a proposta deste estudo foi

caracterizar através do marcador SSR as variedades de porta-enxertos de uva plantadas nas regiões Norte e Noroeste do Paraná, a fim de obter resultados que possam ser úteis para esclarecer dúvidas quanto à identificação destas variedades e avaliar a diversidade genética presente em cada variedade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A origem da videira

A região entre o Mar Negro e o Mar Cáspio, no Velho Mundo, é considerada por taxonomistas como o local original das videiras, onde ainda hoje se encontram na forma silvestre. No leste europeu, a videira se propagou inicialmente ao redor da região mediterrânea, estendendo-se para o interior e atingindo os vales da França no tempo dos romanos. Em 1.500, a viticultura estabeleceu-se nas ilhas da Madeira e Canárias. Mais tarde difundiu-se na África do Sul, Austrália e América do Sul. Ainda hoje são encontradas novas espécies em regiões inexploradas, como, por exemplo, no México (Reisch e Pratt, 1996).

O gênero *Vitis* parece ter surgido na era Terciária, mais precisamente no período Paleocénico (Amaral, 2000). O mesmo autor indica que o mais antigo fóssil de videira conhecido é o de uma folha existente na Sorbonne, classificado como *Vitis balbiana*, ao qual foi atribuída a idade de 65 milhões de anos. Muitos outros fósseis de folhas, sarmentos e gavinhas das eras Terciária e Quaternária têm sido encontrados na Europa, na América do Norte e até no Japão (Amaral, 2000).

De acordo com Ocete et al. (1999a), a presença de restos fósseis pertencentes à família das Vitáceas na Europa, começa a ser notória na época Eoceno; estes autores definem que os achados paleontológicos mais antigos e classificáveis como *Vitis vinifera* pertencem ao período Pleistocénico. Segundo Winkler (1965), estes registros referem-se mesmo à descoberta de fósseis de folhas e gavinhas pertencentes ao gênero *Vitis*, na América do Norte e na Europa, durante o período Terciário. Contudo, foi na Geórgia que apareceram restos de gavinhas provenientes de videiras cultivadas (*Vitis vinifera ssp vinifera*), tendo-lhes sido atribuída uma data de origem entre 7.000 e 5.000 anos a.C. Assim, admite-se que a passagem da uva selvagem para a uva cultivada tenha tido lugar acerca de 6.000 anos a.C. (Amaral, 2000).

O estudo botânico destes materiais vegetais proporcionou a compreensão da evolução da espécie *Vitis vinifera*. Scossiroli (1988) descreveu que a espécie *Vitis vinifera* divide-se em duas subespécies: *Vitis vinifera* ssp *vinifera*, que engloba a maioria das castas cultivadas, e *Vitis vinifera* ssp *sylvestris* (Gmel) Hegi, que engloba o material não cultivado. As características, mais relevantes na subespécie *sylvestris* são a dioicéia, o seio peciolar aberto e a forma arredondada e achatada das sementes, enquanto que para as *Vitis vinifera* ssp *vinifera* as sementes são menos largas e pontiagudas (Levadoux, 1956; Hidalgo, 1999).

Vitis vinifera é uma das espécies cultivadas mais importantes no mundo, sendo também uma das mais antigas. São plantas lenhosas e comercialmente reproduzem-se assexuadamente por propagação vegetativa. Há um grande número de variedades no mundo (entre 5.000 e 10.000) e muitas delas têm sido cultivadas ao longo de vários séculos. A maior parte são variedades locais, e existem numerosos sinônimos (uma variedade com nomes diferentes) e homônimos (variedades diferentes com o mesmo nome) dentro e entre os países. Para resolver esta problemática, é preciso desenvolver metodologias que facilitem a identificação das variedades de *Vitis vinifera* (Fernández et al., 2008).

Segundo informações de Galet (2000), as diferentes cultivares ou variedades são adaptadas a vários tipos de solo e de clima, o que possibilita o seu cultivo em quase todas as regiões do mundo. Sendo frutas bastante sensíveis às condições do solo e do clima em que se desenvolvem, as uvas variam muito de acordo com essas condições, apresentando características que as distinguem, segundo o sabor, a acidez, a doçura, o formato, a coloração e a resistência da casca, o tamanho, a quantidade de sementes e o formato dos cachos. As uvas que não são cultivadas servem como fonte de material genético e, atualmente, a maioria das fontes genéticas de *Vitis vinifera* é mantida em coleções de germoplasma.

2.2. Classificação botânica

O gênero *Vitis* é o mais importante da família Vitaceae, destacando-se a videira como a cultura de maior expressão econômica. As cultivares que apresentam

melhor qualidade pertencem à espécie *Vitis vinifera*, também conhecidas como videiras européias. No Brasil muitas cultivares são plantadas e destinadas à vinificação e ao consumo *in natura* (Kuhn et al., 1996; Botton et al., 2000).

As videiras pertencem à classe Dicotyledoneae, ordem Rhamnales, família Vitaceae e são compostas de 14 gêneros e mais de 1.000 espécies. O gênero de grande interesse econômico e o único que fornece alimento é o *Vitis*. Outros gêneros, como *Parthenocissus*, *Ampelopsis* e *Cissus*, fornecem importantes espécies ornamentais. O gênero *Vitis* é subdividido em dois subgêneros: Muscadínea, que possui as espécies *Vitis rotundifolia*, *V. munsoniana*; e *V. popenoi* com todas as espécies diplóides $2n=2x=40$ cromossomos e Euvitis, que compreende mais que 50 espécies (Sousa, 1996), também com espécies diplóides $2n=2x=38$ cromossomos. A espécie *Vitis vinifera* faz parte do subgênero Euvitis, sendo a espécie que apresenta as melhores qualidades de frutos e que deu origem a mais de 14.000 cultivares por todo mundo (Reisch e Pratt, 1996).

A videira é uma grande árvore frutífera de clima temperado. Entre todas as espécies dentro da família Vitaceae, *V. vinifera* ($2n = 38$), é a única espécie amplamente utilizada na indústria vinícola. Existem milhares de cultivares de *V. vinifera*, mas o mercado mundial para a produção de vinho é dominado apenas por algumas cultivares, como Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Syrah (Shiraz) e Merlot (This et al., 2006).

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

2.3. A uva no Brasil e no estado do Paraná

No Brasil (Sousa, 1996), a videira foi introduzida em São Paulo, pela expedição colonizadora de Martin Afonso de Souza, em 1532. Em Pernambuco, a primeira expedição capacitada a introduzir a videira foi a de Duarte Coelho, em

1535. Mas, comprovadamente, foi em 1542 que João Gonçalves fomentou o cultivo da uva na ilha de Itamaracá (Albuquerque, 1987).

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

O estado do Paraná é o maior fornecedor nacional de uva de mesa durante o período de dezembro/janeiro e abril/maio, determinando, assim, uma abertura de mercado onde entram poucos fornecedores. No noroeste do estado do Paraná, o município de Marialva, localizado a uma latitude 23°29'06" sul e a uma longitude 51°47'30" oeste, a leste de Maringá, é conhecido como a capital de uva fina de mesa, destacando-se pelo seu povo trabalhador e sua grande produção de uvas finas, contando com 1.400 hectares de parreiras em produção, todas formadas com plantas enxertadas e que ocupam em torno de 5.600 pessoas na atividade. São 675 viticultores que colhem entre 10 e 12 mil toneladas de uvas finas por ano, obtendo uma produtividade média de 27 t/ha/ano (safrão + safrinha). A cultura da uva tem sido o principal fator de desenvolvimento de Marialva-PR e de seus produtores, gerando cerca de quatro empregos por hectare (Kishino et al., 2007).

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

2.4. Propagação da videira

Por ser uma espécie cultivada há milhares de anos, a videira tem evoluído de modo a se adaptar às mais diversas situações de propagação e cultivo. A videira pode ser propagada de forma sexuada (por semente) ou assexuada (por via

vegetativa). As sementes são úteis para o melhoramento genético, para a obtenção de novas variedades (Hidalgo, 1993), pois a elevada segregação genética pode dar origem a indivíduos com características diferentes das características dos parentais, o que é desejado pelos melhoristas. Entretanto, a propagação de videiras através de sementes tem sido desaconselhável, pois as novas plantas apresentam vigor, produtividade e qualidade dos frutos inferiores aos da planta-mãe, além de prolongar o tempo para a formação do vinhedo.

Segundo Crespan (2004), a propagação vegetativa permite a transmissão uniforme das características do material propagado. Também é conhecido que quanto mais antiga a “casta”, maior é a probabilidade de encontrar plantas com genótipos diferentes. Quando tais diferenças são oriundas de uma ampla base genética, a seleção clonal torna-se uma ferramenta eficaz no melhoramento de videiras. Este tipo de reprodução baseia-se na facilidade que os ramos têm de emitir brotos e raízes. Nesse tipo de propagação vegetativa, as plantas obtidas têm as mesmas características da planta-mãe, a não ser que ocorra alguma mutação (Hidalgo, 1993). Para os métodos de propagação vegetativa usam-se os ramos do ano, e as técnicas mais empregadas são as de estaquia e de enxertia (Fachinello et al., 1995; Peruzzo, 1995).

A estaquia e enxertia são usadas para contornar a ocorrência de doenças nas videiras. A filoxera, por exemplo, é uma doença causada pelo pulgão *Daktulosphaira vitifoliae* (Hemiptera: Phylloxeridae), que possui menos que 1 mm de comprimento e se alimenta da parte aérea e de raízes da videira (de Clerk, 1974; Hickel, 1996; Soria e Dal Conte, 2000; Granett et al., 2001). Os maiores prejuízos são observados quando este inseto se alimenta das raízes (forma radícula) de plantas de *V. vinifera* cultivadas como “pé-franco” (Granett et al., 2001). Nestas situações, o ataque do inseto provoca nodosidades resultantes do intumescimento dos tecidos das radículas nos locais de alimentação, reduzindo a capacidade da planta em absorver nutrientes. Como dano secundário, o local de ataque serve como porta de entrada para fungos de solo que são causadores de podridões de raízes, podendo culminar com a morte da planta (Omer e Granett, 2000). Para reduzir estes

prejuízos, os cultivares de *V. vinifera* são obrigatoriamente enxertadas sobre porta-enxertos de origem americana, resistentes à forma radícola da praga (Walker, 1992).

2.5. Porta-enxertos de uva

Atualmente o método de propagação de mudas mais utilizado é o assexuado, pela estaquia dos porta-enxertos e posterior enxertia da cultivar copa (Sousa, 1996; Pires e Biasi, 2003). Existem diversos tipos de porta-enxertos, cada um com sua característica própria, o que permite a sua recomendação para uma região específica e com finalidade específica (Pires e Biasi, 2003).

As condições fundamentais exigidas para um bom porta-enxerto, em viticultura, incluem resistência à filoxera e a nematóides, adaptação ao ambiente, facilidade de propagação, afinidade satisfatória com as cultivares copa e sanidade (Hidalgo, 1993).

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

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

Os porta-enxertos de uva formam um complexo grupo de plantas, onde a maioria deles são híbridos derivados de espécies nativas de *Vitis* Norte Americanas. Estes porta-enxertos norte americanos são usados para conferir resistência à filoxera e também a problemas associados ao solo (de Andres, 2007). A espécie *V. vinifera*, onde se incluem as videiras produtoras dos vinhos atuais, é susceptível à filoxera. Tendo sido constatado que outras *Vitis* eram resistentes a essa praga, estas foram introduzidas em larga escala e hoje é uma prática normal o enxerto do tipo de *V. vinifera* desejado sobre um porta-enxerto resistente.

Além de apresentar resistência à praga, o porta-enxerto influencia o crescimento vegetativo, a produção e a qualidade do cacho da videira. Ele sofre grande interferência edafoclimática e responde diferentemente de acordo com a copa sobre ele enxertada (Hartmann e Kester, 1990; Monteiro, 1999). Atualmente, um número relativamente grande de porta-enxertos encontra-se disponível aos produtores. Porém, cada um deles apresenta suas vantagens e deficiências. Apenas com a experimentação agrícola pode-se determinar com regular precisão qual é o mais adequado para uma determinada cultivar e região (Pommer et al., 1997). Para os vitivinizadores, é importante saber a variedade exata que plantam, pois variedades diferentes têm custos diferenciais; o tipo de viticultura desejada requer variedades específicas; uvas e vinhos produzidos por variedades diferentes têm características qualitativas, quantitativas e preços muito diversos; o viticultor é legalmente responsável por assegurar que as castas declaradas são as que estão plantadas (Ribas, 1957; Monteiro, 1999; Leão, 2003).

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

2.6. Porta-enxertos estudados

2.6.1. Variedade Kober 5BB

Kober 5BB é um porta-enxerto resultante do cruzamento entre *V. berlandieri* x *V. riparia*. Este cruzamento foi realizado por Sigmund Teleki, no final do século XIX, e selecionado por Kober na Áustria no início do século passado. Este porta-enxerto é bastante utilizado no Norte do Paraná e tem sido muitas vezes confundido com o porta-enxerto 420-A. Segundo Camargo (1998), o Kober 5BB foi plantado no Norte do Paraná com denominação errônea de 420-A.

O porta-enxerto Kober 5BB difundiu-se com a cultura da variedade Itália. A difusão deve-se ao bom comportamento da cultivar Itália e seus mutantes, pois este porta-enxerto confere vigor mediano e boa produtividade para as copas nele enxertadas. O Kober 5BB é um porta-enxerto que apresenta um bom enraizamento, boa pega de enxertia e que imprime bom vigor e produtividade à copa. Adapta-se melhor a terrenos fundos, aluviais, frescos e férteis, tolerando bem os solos argilosos e pobres, mas não se adapta a solos muito ácidos. Ele manifesta boa resistência a nematóides e fungos, mas é suscetível à ferrugem, havendo controvérsias quanto a sua resistência à seca.

De acordo com Pereira e Leitão Filho (1973), o Kober 5BB apresenta: lamina foliar verde na face superior e verde-clara na inferior; nervuras primárias pigmentadas de antocianina na base, ocorrendo o mesmo com nervuras secundárias e, mais raramente, com terciárias e seio peciolar (este em caráter constante); pilosidade esparsa, comumente concentrada ao longo das nervuras; folhas com cinco dentes primários em média; folhas distintamente trilobadas, com os lobos correspondentes às três nervuras primárias centrais mais desenvolvidos e agudos; base foliar cortada, com nervuras basais (primárias) retas; pecíolo vermelho-escuro, de seção subcircular, superiormente leve-canaliculado, ao longo dos vértices com pêlos simples curtos e alvo-translúcidos; broto terminal levemente bronzeado, com pilosidade nos ramos e folhas, formada por pêlos curtos simples e pêlos lanuginosos; estípulas bronzeadas, lanceoladas, de ápice agudo ou ovaladas pilosas;

caule adulto verde-claro nos entrenós e avermelhados na altura dos nós, glabro, leve-reluzente e estriado; gavinhas avermelhadas e leve-reluzentes.

A planta da Kober 5BB produz flores femininas e desta forma pode frutificar, mas os cachos formados são pequenos, com bagas pequenas, esféricas e pretas (Sousa e Martins, 2002).

2.6.2. Variedade 420-A

O porta-enxerto 420-A é proveniente do cruzamento entre *V. berlandieri* x *V. riparia*, obtido na França no ano de 1887, por Millardet e De Grasset. Esta variedade possui elevada resistência à filoxera e certa resistência a nematóides, mas é muito suscetível à ferrugem e adapta-se a diferentes solos, exceto àqueles muito ácidos. Em São Paulo, é recomendado como bom porta-enxerto para as variedades de uvas finas de mesa, enquanto no Rio Grande do Sul é pouco difundido (Camargo, 1998; Sousa e Martins, 2002). Em 1978, o Programa Fruticultura do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) introduziu o 420-A da Estação Experimental de Jundiaí, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Esse clone tem conferido vigor mediano e alta produtividade às videiras Itália, Rubi, Benitaka, Kioho, e Beni-fuji. Em Ponta Grossa, no Sudeste do Paraná, tem proporcionado alta produtividade à videira Niágara (Kishino, 2007).

Morfologicamente, as plantas da variedade 420-A possuem ramos com superfície um pouco estriada e glabros de coloração verde escura com nós violáceos até a extremidade, contrastando com os entrenós. As folhas jovens são brilhantes e verde-bronzeadas e as folhas adultas são inteiras; as basais são nitidamente trilobadas, cuneiformes, espessas, brilhantes, verde-escuras na face superior e um pouco mais claras na face inferior, com seio peciolar em U. Esta variedade produz flores masculinas estéreis (Sousa e Martins, 2002). Cosmo (1979) descreveu o 420-A como um porta-enxerto que pode adaptar-se à seca e a solos leves. Porém, não tolera terrenos muito argilosos e compactos.

2.6.3. Variedade Schwarzmann

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

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

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

2.6.4. Variedade IAC-766 Campinas

No grupo de híbridos complexos estão incluídos os porta-enxertos IAC-766 e Traviú. O IAC-766 foi obtido no Instituto Agrônomo de Campinas, através do cruzamento entre Ripária do Traviú x *V. caribaea* realizado por J. R. A. Santos Neto (1958), citado por Pommer et al. (1997) e Camargo, (1998). O IAC-766 é um porta-enxerto menos vigoroso que o IAC-572; isto em alguns casos dificulta a obtenção de plantas com desenvolvimento adequado para a realização da enxertia de inverno, realizada no local definitivo quando o transplante é feito tardiamente (após o mês de dezembro). Em regiões com ocorrência de temperaturas mais baixas, o porta-enxerto IAC-766 tende a entrar em dormência durante o inverno, apresentando intensa queda de folhas. Santos Neto (1973) afirmou que o porta-enxerto IAC-766 é um dos mais indicados para uvas finas de mesa; trata-se de um porta-enxerto vigoroso; o enraizamento das suas estacas é satisfatório, e apresenta boa resistência às doenças (Pereira e Leitão Filho, 1973). O porta-enxerto IAC-766 emite mais brotos “ladrões” que outros porta-enxertos.

O IAC-766 é recomendado para cultivares como Itália, Rubi, Benitaka, Brasil, Red Globe, Centennial Seedless, BRS Clara, BRS Morena e BRS Linda. Entretanto, este porta-enxerto confere menor vigor à variedade copa que o IAC-313. Embora haja necessidade de estudos mais completos, acredita-se que este porta-enxerto seja uma boa alternativa para cultivares de uvas sem sementes e uvas para suco. Apesar deste porta-enxerto proporcionar menor vigor à copa, ele favorece a diferenciação de gemas nas uvas sem sementes e facilita o manejo da copa nas uvas para suco em espaçamentos adensados (Sousa, 1996; Pommer et al., 1997).

As plantas do porta-enxerto IAC-766 possuem folhas com a face superior verde-escura e a inferior um pouco mais clara; nervuras primárias com leve pigmentação de antocianina; pêlos simples hialinos e bem curtos, além de esparsos pêlos lanuginosos em ambas as faces; lobos foliares pouco nítidos e base foliar bem fechada, com os bordos quase se sobrepondo; brotos terminais bronzeados ou verde-bronzeados, com abundante indumentário tanto simples como lanuginoso, ambos brancos; caules adulto verde-amarelados e esporadicamente com estrias

bronzeadas, cilíndricos, glabros e com pigmentação antociânica nos nós (Sousa e Martins, 2002).

2.6.5. Variedade Traviú

A cultivar Traviú é um híbrido e foi produzida a partir do cruzamento entre *V. riparia* x (*V. rupestris* x *V. cordifolia*), também conhecido como Riparia do Traviú ou 106-8 Mgt, obtido por Millardet e De Grasset, na França, em 1882. Segundo Souza (1969), este porta-enxerto apresenta uma adaptação similar à adaptação do porta-enxerto 104-14, preferindo, porém, solos mais frescos. Por outro lado, parece possuir boa resistência à seca e simultaneamente boa adaptação a terrenos argilosos e úmidos. Esta cultivar é muito suscetível à antracnose e à ferrugem. Pereira e Leitão Filho (1973) apresentaram o Traviú como possuindo afinidade para a maioria das cultivares. Este porta-enxerto é utilizado principalmente com as cultivares de Niágara dos estados de São Paulo e Paraná (nos municípios de Rosário do Ivaí, Japira, Ibaiti, Jaboti e Pinhalão), e induz bons rendimentos quando utilizado com as cultivares Patrícia, Soraya, Rainha, Seibel 2 e IAC 138-22. Para a cultivar Itália, o Traviú proporciona menores produções do que quando esta é combinada com o porta-enxerto Kober 5BB. Por outro lado, quando a Itália está associada ao Traviú, ocorre antecipação da maturação em alguns dias e formação de cachos mais soltos. De acordo com as colocações de Pommer et al. (1997) e Simão (1998), desde que sejam respeitadas as exigências naturais e específicas ou adaptações dos porta-enxertos, é possível que as cultivares de Niágara tenham boas possibilidades de responder bem a enxertias realizadas sobre os porta-enxertos *du Lot*, Traviú, ou mesmo o Golia. Isso não acontece com o porta-enxerto Kober 5BB.

As plantas do porta-enxerto Traviú apresentam folhas cuneiformes, de coloração verde-escura na face superior e levemente mais clara e opaca na inferior. Apresentam nervuras primárias pigmentadas de antocianinas em seu terço basal; a pilosidade é esparsa em ambas as faces, constituída por pêlos simples, curtos e brancos, lobos longo-acuminados e bem salientes e seio peciolar em U; pecíolo de

coloração vermelho escura e dotado de pêlos lanuginosos brancacentos. Os brotos terminais são levemente bronzeados e as folhas jovens brilhantes, com pecíolo e lâmina seríceo-pilosos. Os caules adultos são avermelhados, glabros e levemente reluzentes e as gavinhas são avermelhadas, glabras e leve-reluzentes. A planta do Traviú produz flores femininas, que dão origem a poucos frutos (Sousa e Martins, 2002).

2.6.6. Variedade IAC-572 Jales

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

Em 1993, no Vale do São Francisco, o IAC-572, a partir de material proveniente de Tupi Paulista, foi identificado em matrizeiro pela Agropecuária Labrunier Ltda. Atualmente, este é o porta-enxerto mais propagado, substituindo o Tropical em praticamente todos os novos plantios, a partir dos anos 1994/1995, tanto no Vale do São Francisco como no Noroeste de São Paulo e outras regiões. O IAC-572 é um pouco menos vigoroso que o porta-enxerto Tropical, sendo de fácil enraizamento, apresentando bom índice de sobrevivência quando transplantado para o campo e boa afinidade geral com as principais cultivares de uvas finas, como a Itália, Rubi, Benitaka, Brasil, Red Globe, Christmas Rose, Perlette e Centennial. O IAC-572 também tem sido usado com sucesso para a cultivar Niágara Rosada na região de Jales e nos estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Camargo, 1998).

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

2.6.7. Variedade IAC-313 Tropical

O porta-enxerto IAC 313 é um híbrido proveniente do cruzamento de *Golia* x *Vitis cinerea*, obtido por J. R. A. Santos Neto, em 1950, no Instituto Agronômico de Campinas. Este porta-enxerto foi o primeiro criado para as condições tropicais do Brasil. Foi denominado Tropical por ser recomendado para regiões com temperaturas médias anuais elevadas. Além de apresentar vigor e adaptação aos solos ácidos, apresenta boa resistência às doenças fúngicas e às viroses. É de lignificação tardia e seu pegamento na enxertia é bom, devendo, no entanto, serem evitadas estacas com diâmetro superior a 1 cm (Sousa, 1969). Scaranari et al. (1979), Martins et al. (1981) e Terra et al. (1990) obtiveram as maiores produções das copas quando utilizaram esse porta-enxerto.

Desenvolve-se bem em diferentes tipos de solo e confere grande vigor às variedades-copa, o porta-enxerto IAC 313 é o mais difundido no Arenito Caiuá (Noroeste do Paraná), local de solo pouco fértil com ocorrência de nematóides do gênero *Meloidogyne* sp. Sob alta pressão de inóculos, pode ser infectado por antracnose e mancha-da-folha (Kishino et al., 2007).

Segundo Pereira e Leitão Filho (1973), o IAC-313 apresenta lâmina foliar verde-escura e sem pigmentação antociânica na face superior e, na inferior, lâmina mais clara e opaca. Possui pilosidade pronunciada, na face superior lanuginosa e

também pêlos simples sobre as nervuras primárias, secundárias e terciárias. Na face inferior, pilosidade mais abundante. As folhas apresentam cinco dentes primários, lobos curto-acuminados e base reentrante e subcortada; pecíolo verde-claro ou levemente bronzeado, com pilosidade pronunciada brancacenta e lanuginosa ao longo dos vértices e junto à inserção da lâmina foliar. Apresenta broto terminal verde-claro, bronzeado, com pilosidade branca e lanuginosa sobre ramos e folhas jovens. O caule adulto é verde-claro, levemente amarelado, ligeiramente bronzeado e apresenta nós, com esparsos pêlos simples, brancos, longos e raros pêlos lanuginosos. Gavinhas verde-claras, branco lanuginosas ou glabras na base.

2.7. Identificação dos porta-enxertos

A utilização de mudas saudáveis de porta-enxertos é de grande importância na implantação de um vinhedo. Tradicionalmente, no Brasil, a implantação dos mesmos é feita a partir do enraizamento dos porta-enxertos diretamente no campo ou em recipientes com terra para posterior transplante em locais definitivos (Simão, 1998). Após a disseminação da filoxera por toda a área vitícola mundial, o único meio eficiente de se propagar a videira foi pela enxertia, que consiste na união da variedade copa sobre porta-enxertos resistentes ou imunes à filoxera e também aos nematóides, sendo o resultado dessa junção uma única planta (Pommer, 2003).

Além de controlar a filoxera, apresentam-se como principais vantagens do uso da enxertia: maior desenvolvimento inicial das plantas, o que proporciona maiores colheitas nos primeiros anos de produção; maior vigor das plantas, o que assegura maior produtividade do vinhedo; produção de cachos e bagas de tamanho elevado, o que reflete positivamente sobre a produtividade. Em muitas partes do mundo o uso de porta-enxerto no combate à filoxera e no combate a problemas de solo é uma necessidade para a viticultura. Entretanto, muitos dos porta-enxertos são estreitamente relacionados, são muito semelhantes em aparência e isto dificulta a distinção entre eles por meio de técnicas padrões de ampelografia (Lin e Walker, 1998).

De acordo com Monteiro (1999), existem três maneiras para a detecção de polimorfismo entre os porta-enxertos e conseqüentemente para realizar a distinção entre eles: por meio de ampelografia, com o emprego dos marcadores celulares e ainda com o uso dos marcadores moleculares. Para a indústria de vinho, por exemplo, a identificação de videiras é uma necessidade essencial e esta tem sido realizada através de ampelografia de campo. Por meio deste método as cultivares são distinguidas com base em características morfológicas. Mas a propagação vegetativa e a disseminação global dos cortes propagados vegetativamente por centenas de anos têm causado problemas para o sistema de identificação baseado em genótipos (Thomas et al., 1994). O problema da ampelografia é que, embora haja variedades que sejam perfeitamente distinguíveis a olho nu, por exemplo, há distinção entre as variedades brancas e tintas quando o fruto está maduro. Estas duas variedades apresentam características de matéria-prima enológica muito diferentes, mas com aparências muito similares. Ainda quando a isso é acrescida a influência ambiental, estas variedades apresentarão um grande grau de variabilidade fenotípica (o resultado visível da interação entre a herança genética e o ambiente) e isto dificulta ainda mais a identificação correta de certas variedades ou cultivares (Thomas et al., 1994).

2.7.1. Ampelografia

A videira *V. vinifera* é a primeira das mais importantes culturas de plantas do mundo. Nas últimas décadas, tornou-se imprescindível lidar com a grande coleção de germoplasma bem como identificar adequadamente as diferentes cultivares. Caracteres morfológicos, tais como a forma da folha, foram utilizados para a identificação da cultivar, mas algumas vezes esta forma de avaliação conduz a resultados não confiáveis na determinação das variedades ou cultivares. Isso ocorre em função das influências ambientais sobre estes caracteres (Bretting e Wildrlechner, 1995).

A ampelografia é o método usual e de utilização generalizada na identificação de variedades, mas, apesar da sua grande e evidente contribuição para

a viticultura nacional, este método apresenta desvantagens inerentes ao fato de utilizar as características fenotípicas da videira no processo de classificação. Sendo o fenótipo a expressão do genótipo e levando em consideração que, durante o crescimento da videira (fase em que o genótipo se exprime em fenótipo), esta expressão é influenciada pelo ambiente, a ampelografia introduz no processo da classificação, variáveis não controladas e dependentes do ambiente (Wolf, 1976; Dias, 1994).

Vários autores têm considerado que a tradicional ampelografia (do grego ampelos - videira e graphos descrição), analisando e comparando os caracteres morfológicos para identificar cultivares, não é suficientemente confiável e consistente, devido a fatores ambientais, biologia individual da planta e a fase de crescimento do vegetal (Lamboy e Alfa, 1998; Sefc et al., 1998; 1999; Fatahi et al., 2003).

2.7.2. Marcadores celulares

Os métodos bioquímicos, tais como a análise de isoenzimas, têm sido desenvolvidos para complementar e assistir a identificação ampelográfica, determinando o genótipo de cultivares. Muitos autores têm utilizado as isoenzimas como marcadores bioquímicos para identificar videiras (Wolfe, 1976; Weeden et al., 1988; Bachmann 1989; Calò et al., 1989; Parfitt e Arulsekar, 1989; Walters et al., 1989; Boursiquot e Parra, 1992; Walker e Liu, 1995). Entretanto, o uso destes marcadores é limitado em *Vitis*, pois poucos sistemas enzimáticos estão padronizados e disponíveis.

As isoenzimas podem ser usadas para identificar porta-enxertos de uvas, porém a identificação positiva exige que os alelos padrões sejam comparados às isoenzimas de um porta-enxerto conhecido. Os padrões isoenzimáticos podem ser influenciados pelo estágio de desenvolvimento do tecido vegetal das quais as amostras foram extraídas e também podem ser influenciadas pelas condições ambientais. Estas condições podem alterar a intensidade das bandas dentro de uma estação e, além disso, os *loci* de isoenzimas têm um polimorfismo limitado e as

análises destes *loci* podem falhar em fornecer uma distinção conclusiva entre porta-enxertos semelhante (Boursiquot, 1992 e Walter, 1995).

2.7.3. Marcadores moleculares

A superioridade dos marcadores moleculares sobre a ampelografia para a caracterização de cultivares de uvas está bem estabelecida. Em uva, marcadores moleculares como RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) (Bourquin et al. 1993); RAPD (*Random Amplified Polymorphism of DNA*) (Jean Jaques et al., 1993; Grando et al., 1996; Ye et al., 1998; Vidal et al., 1999; Luo e He, 2001; Tamhankar et al., 2001); microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeated*); (Bowers et al. 1993, 1999; Thomas e Scott, 1993; Cipriani et al., 1994; Scott et al., 2000; Pellerone et al., 2001) e AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) (Labra et al., 1999; Cervera et al., 2000; Martinez et al., 2003) são amplamente utilizados para a caracterização de cultivares, análise de parentesco, identificação de clones, que institui a relação genética e mapeamento molecular (Upadhyay et al., 2007).

Os recentes avanços na biologia molecular têm permitido detectar facilmente seqüências polimórficas de DNA e esta informação tem sido aplicada para a identificação de cultivares e estudos filogenéticos para diversas plantas. As seqüências polimórficas de DNA não são influenciadas pelas condições ambientais ou culturais e o uso destas é proposto como uma grande vantagem sobre as características morfológicas ou fisiológicas (Goto - Yamamoto et al., 1998).

O uso de marcadores moleculares é uma metodologia útil para completar a ampelografia, detectar semelhanças e para definir as relações genéticas entre castas (Bowers et al. 1993; Sefc et al. 1999). *Simple sequence repeat* (SSR) ou marcadores microssatélites são atualmente os marcadores moleculares mais utilizados (Bhatramakki e Rafalski 2001). Os marcadores microssatélites foram descritos primeiramente em videira em 1993 por Thomas e Scott e revelaram-se excelentes marcadores para caracterização da videira (Thomas et al., 1994; Bowers et al., 1996; Sefc et al., 1999).

Seqüências de microssatélites consistem na repetição de uma curta seqüência repetitiva, que apresenta um nível relativamente elevado na taxa de mutação, o que dá lugar a um grande número de alelos e, conseqüentemente, a um alto nível de polimorfismo. Os microssatélites polimorfórficos são normalmente avaliados pela extensão do número de repetições, mas os alelos de microssatélites também podem variar em função de uma única base substituída dentro da seqüência repetitiva, ou em regiões flaqueadoras (Orti 'et al., 1997; Makova et al., 2000). Em diferentes espécies, variações foram descritas nas seqüências flaqueadoras de microssatélites (Grimaldi e Crouau-Roy 1997; Brohede e Ellengren 1999; Blankenship et al., 2002; Dettman e Taylor, 2004; Ablett et al., 2006), incluindo as espécies da família Vitaceae (Di Gaspero et al., 2000; Arnold et al., 2002; Rossetto et al., 2002).

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Variedades de porta-enxertos de uva

Para a extração de DNA foram utilizadas folhas jovens e completamente expandidas de 15 a 20 plantas das seguintes variedades de porta-enxertos de uva: 420-A, Schwarzmann, IAC-766, Traviú, Kober 5BB, IAC-572 e IAC-313, cujos cruzamentos que as deram origem estão apresentados no Quadro 1. As folhas foram coletadas em uma área experimental da Cooperativa de Rolândia (COROL), no município de Rolândia-PR, menos para as variedades Kober 5BB e IAC-313. Para a variedade Kober 5BB foram trazidas estacas da Embrapa (Centro Nacional de Pesquisa em Uva e Vinho), de Bento Gonçalves-RS, e para a variedade IAC-313 as folhas foram coletadas em uma propriedade localizada na Estrada Fruteira, Km 4, no município de Marialva-PR.

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

Variedades Porta-enxertos	Cruzamentos
420-A	<i>Vitis berlandieri</i> X <i>V. riparia</i>
Traviú	<i>V. riparia</i> X (<i>V. rupestris</i> X <i>V. cordifolia</i>)
IAC-572 Jales	<i>V. tiliifolia</i> X 101-14 Mgt
IAC-766 Campinas	Traviú X <i>V. Caribaea</i>
IAC-313 Tropical	Golia (<i>V. riparia-carignane</i> X <i>V. Rupestris</i>) X <i>cinerea</i>
Schwarzmann	<i>V. riparia</i> X <i>V. rupestris</i>
Kober 5BB	<i>V. berlandieri</i> X <i>V. riparia</i>

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

As folhas coletadas das seis primeiras variedades foram identificadas, armazenadas em sacos de sombrite e mantidas em gelo desde a coleta até o laboratório, onde foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80⁰C até o momento de extração de DNA. As estacas da variedade Kober 5BB foram plantadas no Jardim Didático da Universidade Estadual de

Maringá e, após a brotação as folhas jovens completamente expandidas, foram coletadas para o processo de extração de DNA.

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

Para a extração do DNA genômico das folhas dos porta-enxertos de uva, foi utilizada a metodologia descrita por Thomas et al. (1993), com algumas modificações (Zequim-Maia, 2003). Foi extraído o DNA de 15 amostras de cada uma das sete variedades. Para facilitar o processo de extração, o protocolo foi dividido em três etapas:

Primeira etapa - 100 mg de folhas de cada amostra foi pulverizada com nitrogênio líquido e o pó obtido foi distribuído em 4 microtubos de 2 mL e homogeneizado com 1250 μ L de tampão de extração 'A' que está descrito no Quadro 2. Após a homogeneização, foi realizada a centrifugação em 4 °C, durante 10 minutos, com 4000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e em cada tubo foi adicionado 700 μ L do tampão 'B' que também está descrito no Quadro 2.

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

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

Após a homogeneização, os tubos foram incubados em banho-maria em 37°C, durante 30 minutos, sendo agitados a cada 5 minutos. Após este período, os tubos foram retirados do banho-maria e mantidos na bancada até atingirem a

temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 700 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (preparado na proporção de 24:1) e os tubos foram agitados durante 3 minutos. Na sequência, foram centrifugados em temperatura ambiente, por 12 minutos, com 16.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e a este foi adicionado 0,54 x volume de isopropanol. Após algumas inversões, os tubos foram novamente centrifugados como anteriormente, obtendo-se o *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco em temperatura ambiente e a este foi adicionado 200 μL de TE (Tris/HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0). O DNA foi ressuspensionado e armazenado em geladeira a 4°C.

Segunda etapa – Em cada tubo foi adicionado 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 com 16.000 x g. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos novos e a eles adicionados 0,54 x volume de isopropanol. Para precipitar o DNA, os tubos foram armazenados *overnight* em um freezer com -20°C.

Terceira etapa – Após o período *overnight*, foi realizada uma centrifugação em temperatura ambiente, por 12 minutos, com 16.000 x g, obtendo-se o *pellet*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 300 μL de etanol 70 % gelado. Após a lavagem, realizou-se uma centrifugação em 4 °C, por 12 minutos, com 16.000 x g. O sobrenadante foi vertido delicadamente e os tubos colocados na estufa em 37 °C até que todo o etanol tenha sido evaporado. O *pellet* foi ressuspensionado em 50 μL de TE e os tubos foram vedados com *parafilm* e armazenados em geladeira a 4°C.

3.3. Avaliação e quantificação dos DNAs extraídos

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

Para quantificar o DNA extraído e avaliar a sua integridade, os DNAs das amostras de folhas de porta-enxerto de uva e soluções de DNA de fago λ de concentrações conhecidas (50, 100, 150, 200 e 250 ng) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8% preparado com tampão TAE com concentração 1X pH 8,0 (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA) – (Hoisington et al., 1994), sob voltagem de 80 V. Para a visualização, o gel foi corado em banho de Brometo de Etídio preparado com 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em seguida, o gel foi fotografado sob luz UV, utilizando o programa KODAK 1D 3.5. As quantificações foram confirmadas com uso do espectrofotômetro.

3.4. Amplificação do DNA e Seleção de primers

Para a escolha dos marcadores polimórficos para as sete variedades, foram testados 38 microssatélites. Os 12 microssatélites polimórficos foram utilizados para amplificar as 84 amostras das sete variedades. As reações de amplificação foram realizadas com DNA extraído de folhas jovens dos diferentes porta-enxertos de uva. Para tanto, foram selecionadas 13 plantas do 420-A, 10 plantas do Schwarzmänn, 12 plantas do IAC-766, 13 plantas do Traviú, 12 plantas do Kober 5BB, 14 plantas do IAC-572 e 10 plantas do IAC-313, totalizando as 84 amostras.

Quadro 3 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação do DNA das diferentes variedades de porta-enxertos

Reagentes	Concentração Estoque dos Reagentes	Concentração Final dos Reagentes/reacção	$\mu\text{L}/20\mu\text{L}$ de reacção
H ₂ O			11,1
Tampão	10 X	1 X	2,0
MgCl ₂	25 mM	2,0 mM	2,0
DNTPs	2,5 mM/cada	0,1 mM/cada	0,8
<i>Primer</i> (F)	10 μM	0,3 μM	0,4
<i>Primer</i> (R)	10 μM	0,3 μM	0,4
Taq-DNA Platinum	5 U/ μL	1 U	0,3
DNA	10 ng/ μL	30ng	3,0
Total			20 μL

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase) foi preparada em microtubos de 0,2 ml, usando um termociclador Techne TC-512 descrito no Quadro 3. Para a reação foi utilizado 30 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 Platinum* (Invitrogen), e 0,4 µM de cada um dos primers F e R específicos para um volume final de 20 µl.

Para a amplificação dos microssatélites, inicialmente foi utilizado o programa *Touchdown PCR* (Don et al., 1991), descrito no Quadro 4. Para os primers que não amplificaram nesta temperatura foi utilizada temperatura de anelamento específica. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose MetaPhor (CAMBREX) 3% usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA) e o gel foi preparado com 50% de agarose MetaPhor e 50% agarose comum. A eletroforese foi realizada com 60 Volts por 5 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados 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).

Quadro 4 - Seqüência das etapas do programa utilizado para amplificação do DNA das plantas das diferentes variedades de porta-enxertos

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	-----	-----
6	Desnaturação	94°C	1 Min.
7	Anelamento	55°C	1 Min.
8	Extensão	72°C	2 Min.
9	Voltar ao passo 6 – 19	-----	-----
10	Extensão Final	72°C	2 Min.
12	Imersão	10°C	Tempo

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 heterozigosidade média esperada (H_e). O afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi examinado para cada *locus*, para cada variedade. O déficit de heterozigotos (F_{IT}) e a diversidade genética entre as sete cultivares de porta-enxertos 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 o complemento aritmético da distância genética de Nei (Nei, 1972).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 38 pares de primers de microssatélites e para os testes foram utilizadas duas amostras do DNA da população a ser avaliada. Todos os primers testados produziram bandas de DNA amplificadas, mas somente 12 pares de primers foram utilizados para a avaliação do genoma das sete variedades de porta-enxerto, tanto para estudar a variabilidade genética como para diferenciá-los. Estes foram escolhidos, pois apresentaram bandas bem definidas e foram polimórficos (Figura 1). Os primers, suas seqüências, o número de alelos e amplificação de quimeras para cada *primer* para os diferentes porta-enxertos estão apresentados no Quadro 5.

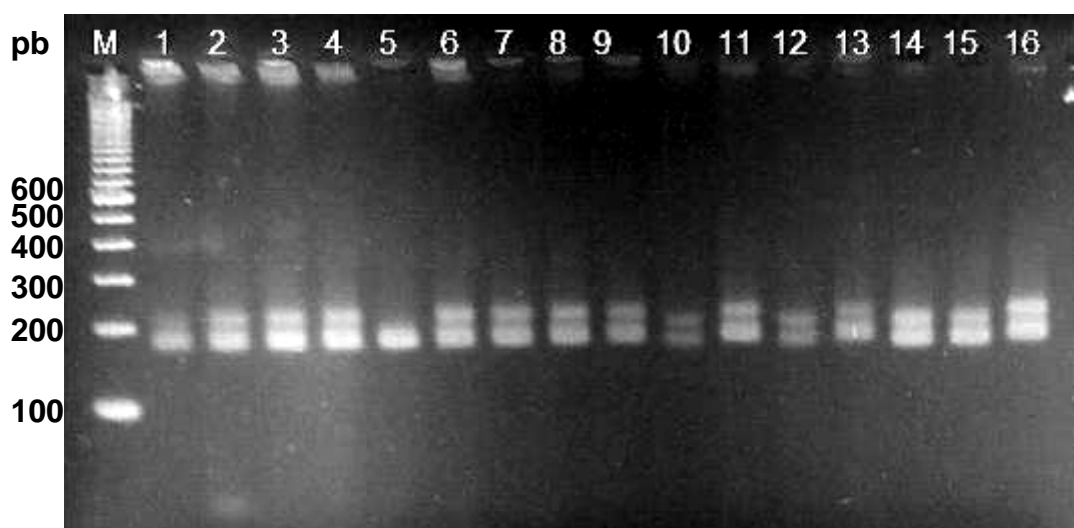


Figura 1 - Gel de agarose concentrado a 3% (50% agarose comum e 50% agarose MetaPhor) para separar o produto da amplificação dos DNAs de diferentes plantas de porta-enxerto de uva com o *primer* *Udv32*. (M) indica o *ladder* 100pb (Invitrogen).

O número máximo de alelos encontrado nas sete variedades de porta-enxerto (420-A, Schwarzmänn, IAC-766, Traviú, Kober 5BB, IAC-572 e IAC-313) foi cinco e este número foi obtido na análise do *locus* *Vvmd07*. Para os demais *loci* estudados foram observados 4 alelos para sete *loci* (*Udv108*, *Vvmd06*, *Udv011*, *Udv001*, *Udv32*, *Udv127* e *Udv34*) e 3 alelos para os quatro *loci* restantes (*Vvmd28*, *Scu14vv*, *Vvmd08* e *Vmc4d4*) (Quadro 5), totalizando 45 alelos nos 12 *loci* SSR.

Quadro 5 - Sequências dos primers de microssatélites, número de alelos detectados por cada *primer* utilizado na estimativa da diversidade genética e o alelo extra presente nas diferentes variedades de porta-enxerto de uva

<i>Locus</i>	Sequências 5' - 3' dos <i>primers</i>	Nº de Alelos	Alelo Quimérico nas Variedades
<i>Udv34</i>	AAGAGACCAAGGATAGATCAAACA ^(F) AAATGCAACGGGAGATGGTA ^(R)	4	
<i>Vmc4d4</i>	GTCTTGTAATGGAACCAACTGC ^(F) AGATTGACCTGGACCTGAAACT ^(R)	3	
<i>Udv127</i>	CGTCAATCGCTTGTAATCTGC ^(F) TGAGCATTTTGCTCCTTCATT ^(R)	4	
<i>Udv32</i>	CATGCGTATGTGTTAGAGAGCA ^(F) CATGGCATGTGCTTTGTTAT ^(R)	4	
<i>Vvmd08</i>	TAACAAACAAGAAGAGGAAT ^(F) AGCACATCCACAACATAATG ^(R)	3	
<i>Udv001</i>	TCATTTTCTTGATCGAAGTCCA ^(F) TGAGCATCAAACAGGAAGC ^(R)	4	<i>D</i> /Schwarzmann, Traviú, IAC-766
<i>Udv011</i>	TTTATGGCAACCCTCCAATC ^(F) TTGATGGTCCACTGGAAGT ^(R)	4	<i>D</i> /Traviú
<i>Vvmd06</i>	ATCTCTAACCCCTAAAACCAT ^(F) CTGTGCTAAGACGAAGAAGA ^(R)	4	
<i>Scu14vv</i>	CTGCACTTGAATACGAGCAGGTC ^(F) TGTTATATGATCCTCCCCCTCCTC ^(R)	3	
<i>Udv108</i>	TGTAGGGTTCCAAAGTTCAGG ^(F) CCTTTTATATGTGGTGGAGCA ^(R)	4	<i>C</i> /IAC-572; <i>D</i> /420- A, Schwarzmann, Traviú, IAC-766
<i>Vvmd28</i>	AACAATTCATGAAAAGAGAGAGAGA ^(F) TCATCAATTTTCGTATCTCTATTTGCTG ^(R)	3	
<i>Vvmd07</i>	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT ^(F) CGAACCTTCACACGCTTGAT ^(R)	5	<i>D</i> /IAC-313, Traviú, IAC-572, IAC-766; <i>E</i> / Schwarzmann, 420-A, Kober 5BB, IAC-766, Traviú,

As evidências são para um número médio de alelos igual a 3,75 alelos por *locus*. Desta forma, o número de alelos encontrados nas sete variedades de porta-enxertos analisadas é menor que o número de alelos descritos em outras cultivares comerciais de uvas usadas para o consumo *in natura* ou, principalmente, para a produção de vinhos.

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) e 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 (Ibañez et al., 2003 e Martín 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 por *locus*. Grassi et al. (2003), estudando diferentes variedades silvestres, domesticadas, e cultivares da Itália, encontraram de 4 a 16 alelos por *locus* e, em 46 cultivares de uvas da Europa, This et al. (2004) detectaram de 13 a 23 alelos por *locus*. Snoussi et al. (2004), estudando 109 cultivares de mesa e variedades silvestres de uma coleção na Tunísia, observaram de 5 a 9 alelos por *locus*. Em 4 cultivares e em um híbrido de uvas da França, Merdinoglu et al. (2005) observaram de 1 a 8 alelos por *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 por *locus* e de 5 a 12 alelos por *locus* respectivamente. Quando 38 cultivares de diferentes espécies do gênero *Vitis* foram estudadas, foram observados de 5 a 12 alelos por *locus* (Fernández et al., 2008).

As referências registradas no parágrafo acima mostram que as variedades comerciais de uva são extensivamente estudadas e analisadas com marcadores moleculares. Entretanto, a caracterização molecular para porta-enxertos é bastante limitada e poucos trabalhos têm sido registrados na literatura especializada (Bauer e Zyprian, 1997; This et al., 1997; Lin e Walker, 1998; Sefc et al., 1998; Wolf et al., 1999; Fatahi et al., 2003; de Andrés et al., 2007 e Upadhyay et al., 2007). Segundo de Andrés et al. (2007), existe pouca informação para a diversidade genética de porta-enxerto. Para as variedades de porta-enxertos a análise de *loci SSR* tem sido pouco investigada, mas os resultados obtidos apontam que os marcadores de *loci SSR* são

altamente polimórficos. Lin e Walker (1998) detectaram um alto número de alelos quando 58 porta-enxertos de Cabernet Sauvignon foram avaliados com 7 *loci SSR*. Estes autores selecionaram os primers plimórficos e registraram 17,6 alelos por *locus*, variando o número de alelos de 6 para 23. Um número menor de alelos foi obtido quando 21 porta-enxertos mantidos na coleção de campo do *National Research Center for Grapes* em Pune na Índia, foram avaliados por Upadhyay et al. (2007). Para esta avaliação, foram utilizados sete *loci SSR* e como resultado foram obtidos 56 alelos. O número médio de alelos observados por *loci* foi 8. Estes autores observaram que, para os *loci* estudados, o número de alelos variou de 5 a 12. Fatahi et al. (2003), utilizando 9 microssatélites, caracterizaram geneticamente 62 acessos de *Vitis* spp. Dentre estes, 4 foram porta-enxertos. O número de alelos observado por estes autores variou de 4 a 16, dependendo do *locus* avaliado. De Andrés et al. (2007) estudaram 83 acessos, incluindo espécies de *Vitis* originalmente utilizadas em programas de melhoramento de porta-enxerto, sendo estas amostras obtidas de diferentes bancos de germoplasmas. Para a análise genotípica destas amostras, foram investigados 9 *loci SSR* e estes apresentaram um alto número de alelos: de 9 a 23 alelos. A média obtida de um total de 154 alelos foi 17,1 alelos por *locus*.

Apesar do menor número de estudos que investigaram os *loci SSR* em porta-enxertos, uma análise preliminar indica que o número de alelos por *locus SSR* em porta-enxertos parece ser superior ao número de alelos por *loci* descritos nas cultivares comerciais de uvas. É também muito maior que o número de alelos encontrados nos porta-enxertos 420-A, Schwarzmann, IAC-766, Traviú, Kober 5BB, IAC-572 e IAC-313. É possível que estes números maiores de alelos por *loci* descritos na literatura especializada seja decorrente do maior número de variedades de porta-enxertos e/ou acessos provenientes de diferentes bancos de germoplasmas, que foram analisados pelos diferentes investigadores (Lin e Walker, 1998; Fatahi et al., 2003; de Andrés et al., 2007 e Upadhyay et al., 2007). Além disso, em muitos trabalhos, após a amplificação, os produtos dos *loci SSRs* são separados em sistemas de gel para seqüenciamento. Segundo Lin e Walker (1998), esta técnica é extremamente poderosa e pode evidenciar diferenças para um só par de bases. Desta forma, sutis diferenças entre genótipos muito similares podem ser evidenciadas e

determinar um número grande de alelos por *locus*. O maior ou menor número de alelos por *loci SSR* em uvas também pode ser dependente da variedade ou cultivar considerada. Poucos alelos por *loci*, por exemplo, têm sido descritos em clones de determinadas cultivares.

Crespan (2004) registrou de 2 a 3 alelos por *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 por *locus* e do surgimento de novos alelos foram descritas por Moncada et al. (2006), analisando 84 *loci SSR* em 59 clones da variedade Cabernet Sauvignon de origens diferentes (Chile, França, Itália, Austrália, Espanha, Hungria e Estados Unidos), e por Moncada e Hinrichsen (2007) em 25 clones da cultivar Carmenère 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 ocorreu a partir dos alelos originais.

A análise da frequência dos alelos em cada um dos *loci SSR* nos porta-enxertos 420-A, Schwarzmann, IAC-766, Traviú, Kober 5BB, IAC-572 e IAC-313, mostrou que a frequência destes é diferente nos diferentes porta-enxertos (Quadro 6). O alelo *D* do *locus Udv127*, por exemplo, foi encontrado somente no porta-enxerto 420-A; o alelo *B* do *locus Udv011* e o alelo *C* do *locus Vvmd06* foram detectados somente em amostras do porta-enxerto Traviú. Desta forma, é possível indicar os referidos alelos como marcadores moleculares dos genótipos 420-A e Traviú e recomendar os primers dos microssatélites *Udv127*, *Udv011*, e *Vvmd06* para discriminar amostras destas duas cultivares de porta-enxertos.

A análise da proporção de heterozigotos nos porta-enxertos 420-A, Schwarzmann, IAC-766, Traviú, Kober 5BB, IAC-572 e IAC-313 mostrou que o maior valor de heterozigosidade média observada foi detectado na variedade Schwarzmann ($H_o = 0,8583$), seguidos pelos valores estimados nas variedades IAC-572 ($H_o = 0,7917$), IAC-766 ($H_o = 0,7153$), 420-A ($H_o = 0,7051$), IAC-313 ($H_o = 0,7000$), Traviú ($H_o = 0,6987$), e Kober 5BB ($H_o = 0,5000$) (Quadro 7).

Quadro 6 - Frequência dos alelos encontrados para os diferentes *loci SSR* analisados para as 7 variedades de porta-enxerto

<i>Loci</i>	420-A	Schwarzmann	Traviú	IAC-766	IAC-572	Kober 5BB	IAC-313
<i>Udv034</i>							
Alelo A	0,1538	0,3000	0,1154	0,2917	0,4643	0,0417	0,5500
Alelo B	0,4615	0,2000	0,3462	0,3750	0,0714	0,3750	*****
Alelo C	0,0385	0,3500	0,4615	0,1667	0,4643	0,5417	0,4500
Alelo D	0,3462	0,1500	0,0769	0,1667	*****	0,0417	*****
<i>Vmc4d4</i>							
Alelo A	0,1923	0,4000	0,5385	0,2917	0,4643	0,9583	0,1500
Alelo B	0,8077	0,6000	0,4615	0,7083	0,2143	*****	0,7000
Alelo C	*****	*****	*****	*****	0,3214	0,0417	0,1500
<i>Udv127</i>							
Alelo A	0,4231	0,5000	0,3846	0,4167	0,5714	0,4167	0,3000
Alelo B	0,1923	0,3000	0,2308	0,4167	0,3571	0,5833	0,7000
Alelo C	0,1538	0,2000	0,3846	0,1667	0,0714	*****	*****
Alelo D	0,2308	*****	*****	*****	*****	*****	*****
<i>Udv32</i>							
Alelo A	0,2692	0,2000	0,5769	0,0833	0,5357	0,2500	0,4500
Alelo B	0,4231	0,4500	0,0385	0,5000	0,0714	0,5417	0,0500
Alelo C	*****	0,0500	0,2692	0,1667	0,3214	0,2083	0,5000
Alelo D	0,3077	0,3000	0,1154	0,2500	0,0714	*****	*****
<i>Vvmd8</i>							
Alelo A	0,1154	*****	*****	0,0833	0,4286	*****	0,5000
Alelo B	0,8462	0,9000	1,0000	0,7917	0,3214	1,0000	*****
Alelo C	0,0385	0,1000	*****	0,1250	0,2500	*****	0,5000
<i>Udv001</i>							
Alelo A	0,3846	0,5000	0,1154	0,4167	*****	*****	*****
Alelo B	0,2308	*****	*****	0,1667	0,5357	0,2083	0,6000
Alelo C	0,2692	0,4500	0,8846	0,3750	0,4643	0,7917	0,4000
Alelo D	0,1154	0,0500	*****	0,0417	*****	*****	*****
<i>Udv011</i>							
Alelo A	0,5000	0,5000	0,5000	0,5417	0,5000	0,5000	0,5500
Alelo B	*****	*****	0,3846	*****	*****	*****	*****
Alelo C	0,3846	0,5000	0,1154	0,4583	0,4286	*****	0,4500
Alelo D	0,1154	*****	*****	*****	0,0714	0,5000	*****
<i>Vvmd6</i>							
Alelo A	0,5000	0,5500	0,3077	0,1667	0,2857	1,0000	0,8500
Alelo B	0,3077	0,1000	0,3846	0,6667	0,3571	*****	0,1000
Alelo C	*****	*****	0,2692	*****	*****	*****	*****
Alelo D	0,1923	0,3500	0,0385	0,1667	0,3571	*****	0,0500
<i>Scu14vv</i>							
Alelo A	0,4615	0,5500	0,8846	0,7917	0,4643	0,2500	0,5000
Alelo B	0,1154	*****	*****	*****	0,0357	0,3333	0,3000
Alelo C	0,4231	0,4500	0,1154	0,2083	0,5000	0,4167	0,2000
<i>Udv108</i>							
Alelo A	0,3846	0,5000	0,1154	0,5000	0,4286	*****	0,5000
Alelo B	*****	*****	*****	0,0833	0,4286	*****	0,3000
Alelo C	0,6154	0,5000	0,5769	0,4167	0,1429	0,8333	0,2000
Alelo D	*****	*****	0,3077	*****	*****	0,1667	*****
<i>Vvmd28</i>							
Alelo A	0,3846	0,5000	0,5000	0,4167	0,0714	0,5000	*****
Alelo B	0,2308	*****	*****	0,0833	0,4286	*****	0,5000
Alelo C	0,3846	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
<i>Vvmd7</i>							
Alelo A	0,5000	0,5000	0,1154	0,5000	0,4643	0,5000	0,5000
Alelo B	*****	*****	0,3846	0,0833	0,4286	*****	0,5000
Alelo C	0,5000	0,5000	0,5000	0,4167	0,1071	0,5000	*****

Quadro 7 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para as 7 variedades de porta-enxertos de uva obtidos com cada um dos 12 primers de microssatélites

<i>Loci</i>	na	ne	H _o	H _e	F _(is)	F _(st)
<i>Udv034</i>	4,0000	3,5763	0,8810	0,7204	-0,4179	0,1353
<i>Vmc4d4</i>	3,0000	2,3093	0,5000	0,5670	-0,2038	0,2686
<i>Udv127</i>	4,0000	2,7763	0,5238	0,6398	0,0883	0,0910
<i>Udv32</i>	4,0000	3,6721	0,7262	0,7277	-0,1917	0,1578
<i>Vvmd8</i>	3,0000	1,8590	0,3929	0,4621	-0,4261	0,4087
<i>Udv001</i>	4,0000	2,6571	0,6310	0,6237	-0,3212	0,2190
<i>Udv011</i>	4,0000	2,6109	0,9762	0,6170	-0,8274	0,1302
<i>Vvmd6</i>	4,0000	2,7238	0,4167	0,6239	0,1358	0,2444
<i>Scu14vv</i>	3,0000	2,2954	0,6667	0,5643	-0,3491	0,1366
<i>Udv108</i>	4,0000	2,8128	0,8214	0,6445	-0,6074	0,1954
<i>Vvmd28</i>	3,0000	2,6353	0,9643	0,6205	-0,7901	0,1284
<i>Vvmd7</i>	3,0000	2,7654	1,0000	0,6384	-0,8679	0,1591
Média	3,5833	2,7245	0,7083	0,6215	-0,4008	0,1834

Número de alelos observados (na), Número efetivo de alelos (ne), Heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e), Coeficientes de fixação F (F_(is), F_(st); Wright, 1978).

A heterozigosidade média observada variou de 0,50 (porta-enxerto da variedade Kober 5BB) a 0,8583 e foi maior na variedade Schwarzmann (H_o = 0,8583). A heterozigosidade média esperada variou de 0,3741 (variedade Kober 5BB) a 0,5840 e foi maior na variedade IAC-572 (H_e = 0,5840). O valor de H_o estimado para as 7 variedades de porta-enxerto foi de 0,7083. Os valores altos de heterozigosidade média podem ser resultado dos cruzamentos entre variedades diferentes que deram origem aos porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572, IAC-766, 420-A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB, mas parecem não estar diretamente associados à complexidade dos cruzamentos no que se refere ao número de espécies

paternais originais. Isso porque os porta-enxertos Schwarzmann e IAC-572 que apresentaram valores maiores de H_o foram originados do cruzamento de apenas duas espécies: *V. riparia* x *V. rupestris* e *V. tiliifolia* x *101-14Mgt*, (Quadro 1), contrastando com o valor intermediário apresentado pelo porta-enxerto IAC-766, cuja origem tem genótipos de quatro espécies envolvidas no cruzamento: *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. cordifolia*, e *V. caribaeae* (Quadro 1).

Estas observações contrastantes sobre a origem parental das variedades e o nível de heterozigosidade apresentada por elas mostram a importância e a necessidade da análise dos marcadores moleculares para estimar a heterogeneidade das variedades formadas. A análise dos *loci SSR* nos porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572, IAC-766, 420-A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB foi importante para indicar os genótipos com maiores proporções de heterozigotos, independentemente do número de genótipos parentais envolvidos na formação de cada variedade.

Os eventos casuais de recombinações genéticas na geração das variedades e/ou eventos de mutações e/ou de recombinações somáticas em cada variedade devem ser os agentes responsáveis pelos níveis, maior e menor, de variabilidade genética estimada nestas sete variedades de porta-enxertos.

Apesar da caracterização molecular para porta-enxertos ser bastante limitada e poucos trabalhos terem sido registrados na literatura especializada, alguns trabalhos têm apresentado informações obtidas com o emprego de marcadores moleculares, mas, segundo de Andrés et al. (2007), existe pouca informação registrando sobre a diversidade genética de porta-enxerto. Sefc et al. (1998) analisaram 10 *loci SSR*, com o objetivo de comparar a presença de alelos comuns entre cultivares de *V. vinifera* e cultivares de porta-enxerto. Estes autores descreveram um déficit de heterozigotos para as 19 cultivares de porta-enxertos avaliadas. Neste trabalho, foi realizada a análise comparativa e somente um indivíduo de cada cultivar foi avaliado, impossibilitando assim o cálculo da heterozigosidade média. Upadhyay et al. (2007) estimaram a heterozigosidade média em 21 porta-enxertos mantidos na coleção de campo do *National Research Centre for Grapes*, Pune, Índia. Para esta estimativa, estes autores utilizaram 7 *loci SSR* e verificaram que a heterozigosidade variou de 0,043 a 0,475. Os valores de

heterozigosidade para os *loci* variaram de 0,617 no *locus* *Vvmd24* a 0,856 no *locus* *Vvmd31*. Estes autores observaram um baixo nível de similaridade quando *loci* *SSR* foram analisados e a variação observada ficou entre 0,13 a 0,36. Os autores justificam esta baixa similaridade em função da origem divergente dos porta-enxertos avaliados e consideram que o uso de porta-enxertos uniformes resulta em uniformidade do crescimento das vinhas e facilita os processos operacionais da cultura.

A análise de 23 porta-enxertos naturalizados em regiões da Suíça e França, utilizando primers para 10 *loci* *SSR*, mostrou que a diversidade genética nestes foi maior que a encontrada em *V. vinifera* ssp. *silvestris*, $H_o = 0,72$ (Arrigo e Arnold, 2007). O número de alelos por *locus* foi de 12,2. Estes autores justificam a alta diversidade encontrada em razão da origem dos porta-enxertos. Segundo eles, os porta-enxertos nativos foram obtidos pela seleção e cruzamentos de espécies de *Vitis* da América, Ásia e Europa, misturando, portanto, um grande conjunto de genes.

Cultivares de uvas iranianas, dentre elas *V. vinifera*, híbridos interespecíficos e porta-enxertos, foram caracterizadas por Fatahi et al. (2003). Para este estudo, estes autores utilizaram 9 *loci* *SSR*. Para estas cultivares foram observados de 4 a 16 alelos dependendo do *locus* avaliado e a média de alelos por *locus* foi de 11,4. O valor da heterozigosidade obtida variou de 0,47 a 0,86 dependendo do *locus* avaliado e a heterozigosidade média encontrada foi de 0,76.

A despeito de um maior ou um menor valor de heterozigosidade descrito na literatura para porta-enxerto em relação ao valor observado neste trabalho (H_o estimado para as 7 variedades de porta-enxerto foi de 0,7083), os altos valores de heterozigosidade média podem ser resultado dos cruzamentos entre um grande número de variedades diferentes utilizadas para dar origem aos porta-enxertos.

Os parâmetros de diversidade genética apresentados no Quadro 7 apontam para um excesso global de heterozigotos nas sete variedades de porta-enxertos (valores negativos de F_{IS} para 11 dos 12 *loci* *SSR* analisados) resultante da origem da variedade, 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 -0,4008.

A análise da divergência genética (F_{ST}) entre os porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572, IAC-766, 420-A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB resultou em um valor global igual a 0,1838, indicando um nível alto de divergência genética entre as mesmas ($F_{ST} = 0,15 - 0,25$; Wright, 1978). No Quadro 8, é possível observar que os *loci* *Udv32*, *Udv01*, *Vvmd6*, *Udv108* e *Vvmd7* apresentaram valores de F_{ST} no intervalo 0,15 – 0,25 ou maior que estes valores e que, de acordo com Wright (1978), corresponde a uma diferenciação genética alta entre as populações. Em contraste, os *loci* *Umc4d4* e *Vvmd8* apresentaram valores de F_{ST} maior que 0,25, indicando uma diferenciação genética muito alta ($F_{ST} > 0,25$) entre as variedades. A alta diferenciação genética observada entre os 7 porta-enxertos reforçam a proposta de que os eventos casuais de recombinações genéticas na geração das variedades e/ou eventos de recombinações somáticas em cada variedade devem ser os agentes responsáveis pelos níveis, maior e menor, de variabilidade genética estimada nestas sete variedades de porta-enxertos. Apesar do genótipo *V. riparia* compor seis dos cruzamentos parentais que originaram os sete porta-enxertos (Quadro 1), a diferenciação genética entre as variedades pode ser considerada alta nos *loci* *SSR* analisados.

Quando as variedades Schwarzmann, IAC-572, IAC-766, 420-A, Traviú e Kober 5BB de porta-enxerto foram avaliadas, utilizando o marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphism of DNA*), a frequência diferencial para os fragmentos observados determinou uma divergência genética entre as seis variedades de 0,7094, indicando um alto nível de divergência interpopulacional ou alto nível de diferenciação genética entre as populações (Capel, 2007). Com o emprego de RAPD, foi possível observar a diferença de polimorfismo entre as variedades, sendo o menor polimorfismo encontrado para a variedade IAC-572 (21,91%). Com o uso de RAPD, a variedade que apresentou o maior polimorfismo foi a 420-A, com 49,24% de fragmentos polimórficos, e a heterozigiosidade desta variedade avaliada no presente trabalho com microssatélite foi de 70,51%.

A diversidade genética calculada pelos coeficientes de Identidade ou de Distância Genética de Nei (1978) mostrou maior identidade genética entre as variedades 420-A e Schwarzmann, com 95,88% de similaridade, e a menor

similaridade genética foi encontrada entre as variedades Kober 5BB e IAC-313, com 56,27 de similaridade genética. Esses resultados estão apresentados na matriz de similaridade (Quadro 8). As diferenças genéticas entre os porta-enxertos poderia ser justificada pela composição genética inicial de cada um deles (os cruzamentos dos quais eles foram originados).

Quadro 8 - Matriz de similaridade construída a partir dos coeficientes de identidade ou distância genética de Nei (1978), obtidos com dados da avaliação de microssatélites para as 7 variedades de porta-enxertos de uva

Variedades	420-A	Schwarzmann	Traviú	IAC-766	IAC-572	Kober 5BB	IAC-313
420-A	****	0,9588	0,7840	0,9460	0,7022	0,7490	0,6436
Schwarzmann	0,0421	****	0,8294	0,9484	0,7414	0,8021	0,6504
Traviú	0,2433	0,1870	****	0,8275	0,6940	0,7807	0,5722
IAC-766	0,0556	0,0530	0,1894	****	0,7570	0,6918	0,6686
IAC-572	0,3535	0,2993	0,3653	0,2784	****	0,6395	0,8916
Kober 5BB	0,2891	0,2205	0,2475	0,3685	0,4471	****	0,5627
IAC-313	0,4406	0,4302	0,5582	0,4026	0,1147	0,5750	****

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

Entretanto, as variedades 420-A e Kober 5BB, que possuem a mesma origem, ou seja, são resultantes do cruzamento entre *V. berlandieri* x *V. riparia* e que são freqüentemente confundidas por serem morfológicamente não distinguíveis, com o emprego de microssatélites, podem ser distinguidas como dois grupos distintos de porta-enxerto, com uma similaridade de 74,90% (Quadro 8). A partir dos dados obtidos utilizando os 12 *loci* de microssatélites, foi construído um dendrograma (Figura 2), onde é possível a identificação de um grupo formado pelas variedades 420-A, Schwarzmann e IAC-766. Um segundo grupo foi formado entre IAC-512 e IAC-313. Os porta-enxertos Traviú e Kober 5BB não formaram grupos, refletindo assim a maior divergência encontrada entre eles. As variedades 420-A, Schwarzmann e IAC- 766 formaram um grupo no dendrograma, da mesma maneira

que IAC-313 e IAC-512 formaram o segundo grupo, apesar da composição genética dos parentais dentro de cada um destes grupos serem diferentes.

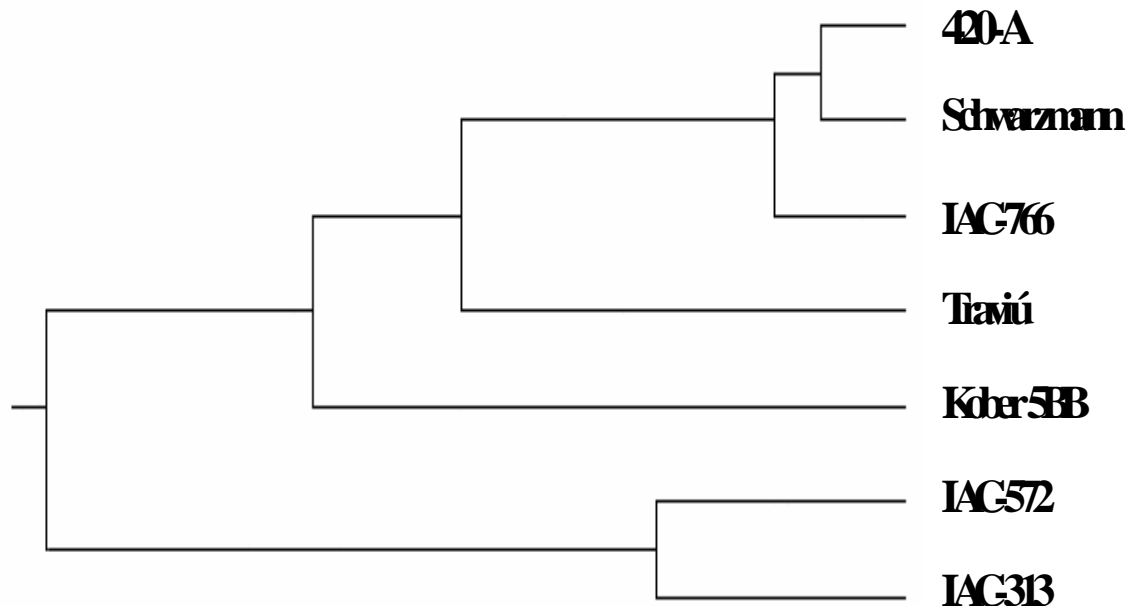


Figura 2 - Similaridade entre as sete variedades de porta-enxertos de uva e as distâncias genéticas entre elas. A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA, empregando o programa POPGENE 1.32.

O fato de variedades originadas a partir do mesmo cruzamento parental, os porta-enxertos Kober 5BB e 420-A, por exemplo, que foram originados do cruzamento entre *Vitis berlandieri* x *V. riparia*, apresentaram diferenças genéticas em nível molecular. Soma-se a este fato, de que os eventos casuais de recombinações genéticas na geração das variedades e/ou os eventos de mutações e/ou de recombinações somáticas, que podem ocorrer independentemente em cada variedade, devem ser os agentes responsáveis pela geração da diversidade genética encontrada dentro de cada cultivar.

Mutações somáticas e eventos de recombinação somática têm sido descritos com relativa frequência em uvas (Oliveira-Collet et al., 2005; Orasmo et al., 2007) e têm sido inclusive determinantes da geração de novas cultivares. Os porta-enxertos Kober 5BB e 420-A não apresentam diferenças morfológicas registradas na literatura

especializada que os possam caracterizar como variedades diferentes. O contrário, são freqüentemente confundidas e, neste sentido, a evidência de marcadores microssatélites específicos de uma ou outra variedade é um aspecto muito importante do presente estudo. Além do alelo *D* no *locus Udv127* que foi exclusivamente detectado na variedade 420-A, a freqüência dos alelos nos *loci Vmc4d4*, *Vvmd8*, *Vvmd6* e *Udv108* (Quadro 6) podem ser usadas como referencial para discriminar os porta-enxertos Kober 5BB e 420-A. Desta forma, mais de 40% dos *loci SSR* (41,66%) analisados no presente estudo são adequados para discriminar os porta-enxertos Kober 5BB e 420-A.

Apesar da similaridade morfológica entre as duas variedades que apresentaram a mesma origem genética, as performances destas também são diferentes. Quando comparados à performance, a variedade 420-A apresenta pouco vigor, difusão restrita e dificuldade de enraizamento (Camargo, 1998). Quando o produtor, em vez de utilizar a variedade Kober 5BB, utiliza a 420-A, os resultados obtidos quanto à produtividade são muito inferiores ao esperado. Neste sentido, a análise dos *loci Udv127*, *Vmc4d4*, *Vvmd8*, *Vvmd6* e *Udv108* podem ser um procedimento adequado para certificar uma e outra variedade.

A sugestão ou proposta do surgimento de novos alelos por mutações somáticas e/ou por recombinações mitóticas nos porta-enxertos Schwarzmans, IAC-572, IAC-766, 420-A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB pode ser constatada em pelo menos quatro dos *loci SSR* analisados no presente estudo. Para os *loci Udv001*, *Udv011*, *Udv108* e *Vvmd07*, dependendo da variedade, foram observados fenótipos com um alelo extra, formando um fenótipo de 3 bandas de DNA no gel de agarose (Quadro 9). No *locus Udv001*, o alelo *D* foi o alelo segregante nas plantas das variedades 420-A, Schwarzmans e IAC-766, com uma freqüência de 0,0500, 0,0417 e 0,1154, respectivamente. Mas, nas plantas das variedades dos porta-enxertos Schwarzmans, Traviú e IAC-766, este alelo *D* foi observado como um alelo extra, determinando um fenótipo de 3 bandas no gel em 70%, 15,38% e 16,66% das plantas avaliadas (Figuras 3 e 4).

Quadro 09 - Frequências dos alelos segregantes nas diferentes variedades e a proporção de plantas onde cada alelo foi encontrado como um alelo extra, formando um padrão de 3 bandas no gel de agarose que caracteriza um tecido quimérico

Primers		420-A	Schwarzmann	Traviu	IAC-766	IAC-572	Kober 5BB	IAC-313	Total ¹
<i>Udv001</i>									
Alelo D	Segregação	0,1154	0,5000	---	0,0417	---	---	---	---
	Extra	---	70%	15,38%	16,66%	---	---	---	13,09%
<i>Udv011</i>									
Alelo D	Segregação	0,1154	---	---	---	0,0714	0,5000	---	---
	Extra	---	---	76,9%	---	---	---	---	11,90%
<i>Udv108</i>									
Alelo C	Segregação	0,6154	0,5000	0,5769	0,4167	0,1429	0,8333	0,2000	---
	Extra	---	---	---	---	50%	---	---	8,30%
Alelo D	Segregação	---	---	0,3017	---	---	0,1667	---	---
	Extra	23,07%	70%	15,38%	25%	---	---	---	19,04%
Alelo C+D									27,34%
<i>Vvmd07</i>									
Alelo D	Segregação	---	---	---	---	---	---	---	---
	Extra	---	---	61,53%	16,66%	85,71%	---	100%	38,09%
Alelo E	Segregação	---	---	---	---	---	---	---	---
	Extra	100%	90%	15,38%	83,33%	14,28%	91,66%	---	55,95%
Alelo D+E									94,04%

¹ Número de plantas com alelo extra entre as 84 plantas de porta-enxerto analisadas

No *locus Udv011*, o alelo *D* é um dos alelos que segrega nas plantas dos porta-enxertos 420-A, IAC-572 e Kober 5BB, com freqüências de 0,1154, 0,0714 e 0,5000, respectivamente. Mas, nas plantas do porta-enxerto Traviú, este alelo foi observado como um alelo extra, determinando um fenótipo de 3 bandas no gel em 76,92% das plantas estudadas para este porta-enxerto.

No *locus Udv108*, o alelo *C* que segrega com freqüências de 0,6154, 0,5000, 0,5769, 0,4167, 0,1429, 0,8333 e 0,2000, nas variedades de porta-enxertos 420-A, Schwarzmann, Traviú, IAC-766, IAC-572, Kober 5BB e IAC-313, respectivamente, foi observado como um alelo extra, compondo o fenótipo de 3 bandas em 50% das plantas do porta-enxerto IAC-572. Este mesmo alelo foi detectado em homozigose em 14,29% das plantas deste mesmo porta-enxerto. Para este mesmo *locus (Udv108)*, o alelo *D* foi observado em fenótipos de 2 alelos para a variedade Traviú com uma freqüência de 0,3017 e para a variedade Kober 5BB com freqüência de 0,1667. Este alelo também foi observado em fenótipos de 3 bandas, portanto, como alelo extra para as variedades 420-A, Schwarzmann, Traviú e IAC-766, com freqüências de 23,07%, 70%, 15,38% e 25% respectivamente.



Figura 3 - Gel de agarose mostrando a presença dos alelos extras (*C* e *D*) para o *locus Udv108*, encontrados juntamente com os alelos *A* e *B*, formando um fenótipo de 3 bandas (quimérico). O alelo extra *C* foi observado em plantas da variedade IAC-572 - Jales e o alelo *D* foi observado nas variedades 420-A, Schwarzmann Traviú e IAC-766.

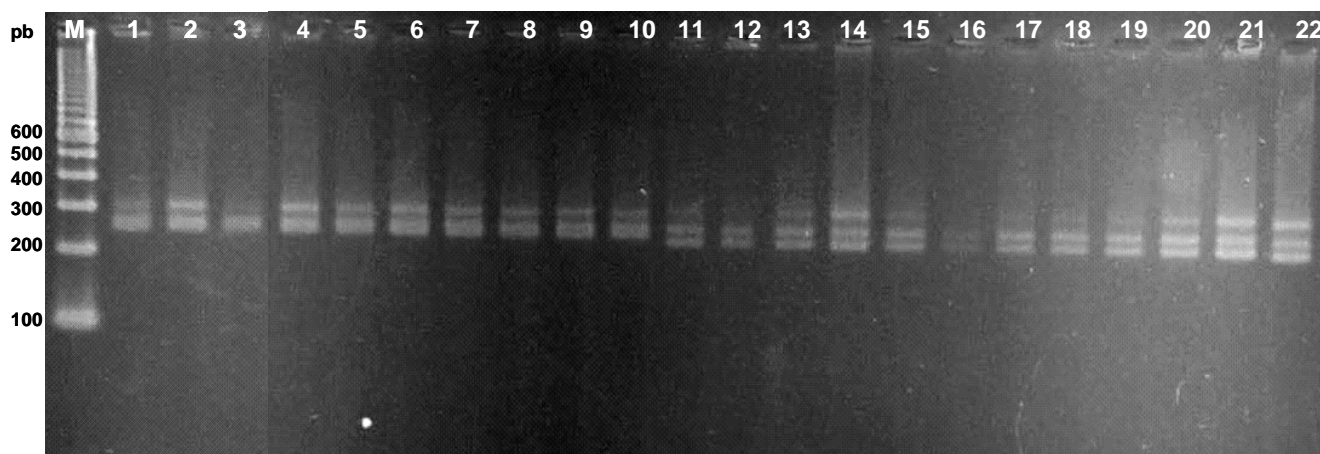


Figura 4 - Gel de agarose mostrando a presença dos alelos extras (*D* e *E*) para o *locus Vvmd7*, encontrados juntamente com os alelos *A*, *B* e *C* formando um fenótipo de 3 bandas (quimérico). O alelo extra *D* foi observado em plantas das variedades IAC-766, IAC-313, IAC-572, Traviú e o alelo *E* foi observado nas variedades 420-A, Schwarzmann, Traviú, IAC-572, IAC-766 e Kobber 5BB.

Das 84 plantas avaliadas com o *locus Vvmd7* para as 7 variedades de porta-enxertos, somente 5 plantas não apresentaram o fenótipo de alelo extra. Portanto, 94,04% das plantas avaliadas com este *locus* apresentaram o fenótipo de quimeras. Os alelos *D* e *E* do *locus Vvmd07* foram observados somente na condição de alelos extras, formando o fenótipo de 3 bandas; o alelo *D* foi observado em 100% das plantas da variedade IAC-313 e o alelo *E* também foi detectado em 100% das plantas da variedade 420-A. O alelo *E* também foi observado em 90% das plantas da variedade Schwarzmann, em 91,66% das plantas da variedade Kober 5BB, em 83,33% das plantas da variedade IAC-766, em 15,38% das plantas da variedade Traviú e em 14,28% das plantas da variedade IAC-572. O alelo *D* do *locus Vvmd7*, além de compor o fenótipo de terceiro alelo em 100% das plantas da variedade IAC-313, também foi observado nesta mesma condição em 61,53% das plantas da variedade Traviú, em 85,71% das plantas da variedade IAC-572 e em 16,66% das plantas da variedade IAC-766.

A proporção de plantas com alelos extras formando fenótipos de 3 bandas no gel pode representar a proporção de plantas quimeras para cada um dos *locus* SSR analisados (*Udv001*, *Udv011*, *Udv108* e *Vvmd7*). A análise do *locus Vvmd07* mostrou que neste *locus* são encontradas as maiores proporções de plantas quimeras

(94,04%). Trata-se de um *locus* que pode ser usado como referência ou como informativo para análise dos fatores relacionados aos eventos determinantes da formação de tecidos quimeras.

O quimerismo (tecidos de folhas com constituições genótípicas diferentes) parece ser mais freqüente no porta-enxerto Traviú, porque neste foram encontrados mais de 33% dos *loci* (4/12) com alelos extras, formando um padrão de 3 bandas no gel e um total de 5 alelos extras distribuídos nos respectivos *loci* (Quadro 9). Nos porta-enxertos IAC-766 e Schwarzmans, foram detectados 4 e 3 alelos extras em 25% dos *loci* (*Udv011*, *Udv108* e *Vvmd07*). Os porta-enxertos Kober 5BB e IAC-313 apresentam apenas o *locus Vvmd07*, contendo os alelos *D* e *E* como alelos extras, formando o fenótipo de 3 bandas no gel.

Os alelos extras não foram contados, nem considerados para a análise da diversidade genética dos porta-enxertos 420-A, Schwarzmans, Traviú, IAC-766, IAC-572, Kober 5BB e IAC-313, mas a evidência destes parece importante para indicar, por exemplo, o potencial de estabilidade genética dos porta-enxertos. Dentre os porta-enxertos, o Kober 5BB e IAC-313 parecem ser mais estáveis porque apresentam apenas 1 *locus* (*Vvmd7*) com dois alelos.

O fenótipo de 3 ou 4 bandas num mesmo *locus* *SSR* foi explicado em uvas 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., 2005; 2006) e a estrutura quimérica dos *loci* *SSR* tem sido apontada como geradora e como justificativa para a existência de divergência genética entre clones das cultivares Cabernet Sauvignon e Pinot (Moncada et al., 2006). Nas variedades Schwarzmans, IAC-572, IAC-766, 420-A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB, a freqüência de fenótipos quiméricos é considerada como relativamente alta. O fato de alelos extras serem detectados também como alelos segregantes em determinadas variedades é um aspecto que estimula a investigação de como novos alelos, produtos de mutações e/ou recombinações somáticas, poderiam ser transferidos para os tecidos embrionários e, conseqüentemente, para os descendentes das plantas

quiméricas, de forma a se tornar um alelo segregante. 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, mas não existem evidências de transferência destas, via cruzamentos.

A grande maioria das videiras plantadas no mundo cresce em porta-enxertos. É conhecido que as videiras são infectadas por um grande número de vírus, sendo o mais comum deles o vírus associado à corrosão em caule de uvas *V. rupestris* (GRSPaV) (Meng e Gonsalves, 2003). O vírus GRSPaV-1 pode ter coexistido com *V. riparia* por longo período, assim como o vírus GRSPaV-SG1 pode ter coexistido com *V. rupestris* há muito tempo. Tanto as videiras *V. riparia* como as *V. rupestris* e seus híbridos vêm sendo utilizadas como porta-enxertos e sobre estes as diferentes variedades de copas crescem. Desta forma, viroses presentes nestes porta-enxertos podem ser transmitidas para as variedades de copas através da enxertia. As diferentes variedades copas podem ter sido enxertadas em diferentes porta-enxertos, em diferentes períodos e em diferentes regiões geográficas. Assim, diferentes vírus são acumulados nas variedades copa e como resultado as variedades de copa comumente utilizadas apresentam múltiplas seqüências variantes de vírus (Meng et al., 2006). O fato da coexistência de um grande número de vírus com as videiras pode também ser uma explicação para formação de alelos extras, pois infecções virais estão associadas aos processos de mutações somáticas e/ou a recombinações mitóticas que são fontes para a origem de novos alelos (Kovalchuk et al., 2003; Boyko et al., 2007).

Apesar de conhecer a forma como determinados alelos que caracterizam tecidos quiméricos em uma determinada variedade, podem ser encontrados como alelos segregantes em outra variedade, a detecção de alelos extras adicionais formando o fenótipo de 3 bandas nos *loci SSR* é um aspecto que contribui para aumentar a estimativa da diversidade genética nos porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572, IAC-766, 420-A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB. Embora a frequência dos alelos extras não tenha sido computada na análise da segregação nas plantas dos porta-enxertos, onde estes alelos formaram o fenótipo de 3 bandas, admitir a

presença dos alelos extras em 4 *loci SSR* implica em admitir a existência de maior número de alelos por *locus* polimórfico nos porta-enxertos analisados, maior proporção de plantas heterozigotas e mais alta diferenciação genética entre as variedades de porta-enxertos analisadas.

5. CONCLUSÕES

- a) Os porta-enxertos Kober 5BB e 420-A podem ser discriminados e certificados geneticamente a partir da análise dos *loci Udv127*, no qual o alelo D foi exclusivamente detectado na variedade 420-A, e pela frequência dos alelos B e C, no *locus Vmc4d4*; dos alelos A e C, no *locus Vvmd8*; do alelo D, no *locus Vvmd6*; e dos alelos A e D, no *locus Udv108*.
- b) Os porta-enxertos Kober 5BB e 420-A, que apresentam a mesma origem genética (os mesmos parentais), são morfologicamente similares, mas possuem performances agrônomicas diferentes e uma divergência genética (distância genética) em torno de 28,90% em *loci SSR*.
- c) Os porta-enxertos Schwarzmann, IAC-766, 420-A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB, apesar de formados por um ou outro genótipo parental comum, de forma simples ou combinada, são geneticamente divergentes, apresentando uma alta diferenciação genética em *loci SSR* (18,34%) entre os seis genótipos.
- d) Os porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572, IAC-766, 420-A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB podem ser considerados como promissores para cruzamentos em programas de melhoramento genético porque apresentam valores altos de heterozigosidade média observada e esperada e em torno de 40% de excesso de heterozigotos.
- e) Os *loci Vvmd7, Udv108, Vvmd6, Udv011, Udv001, Udv32, Udv127, Udv34, Vvmd28, Scu14vv, Vvmd8* e *Vvmd4d4* contêm marcadores moleculares (alelos), que podem ser focalizados para avaliar a estabilidade dos genótipos dos porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572, IAC-766, 420-A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB, durante a propagação vegetativa e preservação dos genótipos, e também orientar cruzamentos quando estes genótipos forem utilizados em programas de melhoramento genético de porta-enxertos.
- f) Os *loci Vvmd8, Vvmd4d4, Vvmd6, Udv001, Udv108, Vvmd7, e Udv32*, em ordem decrescente de potencial para diferenciar genótipos, contêm alelos específicos ou alelos com frequências marcadamente diferentes, que podem ser usados para

discriminar os porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572, IAC-766, 420- A, IAC-313, Traviú e Kober 5BB.

g) Os porta-enxertos Kober 5BB e IAC-313 apresentam um potencial para serem considerados como geneticamente mais estáveis do que os porta-enxertos Schwarzmann, IAC-572, IAC-766, 420-A e Traviú porque apresentam pouco mais de 8% (1/12) de *loci SSR* com alelos extras (alelos *D* e *E* no *locus Vvmd7*).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLETT, G.; HILL, H.; HENRY, R.J. Sequence polymorphism discovery in wheat microsatellite flanking regions using pyrophosphate sequencing. **Mol. Breeding**, 17:281-289, 2006.
- ALBUQUERQUE, T.C.S. **Uva para exportação**: aspectos técnicos da produção. FrupeX-Embrapa-SPI, 1987.
- ALLEWELDT, G.; DETTWEILER, E. **The genetic resources of vitis**: world list of grapevine collections, 2nd edn. Geilweilerhof: Siebeldingen, 1994.
- ALVARENGA, L.R.; NOGUEIRA, D.J.P.; ABRAHÃO, E. **Competição de porta-enxertos de videiras**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1982. 4p. (Relatório do projeto de pesquisa).
- ALVARENGA, A.A.; REGINA, M.A.; FRAGUAS, J.C.; CHALFUN, N.N.J.; SILVA A.L. Influência do porta-enxerto sobre o crescimento e produção da cultivar de videira Niagara rosada (*Vitis labrusca* L. x *Vitis vinifera* L.), em condições de solo ácido. **Cienc. Agrotec.**, edição especial:1459-1464, 2002.
- AMARAL, J. D. **O grande livro do vinho**. Lisboa: Círculo de leitores, 2000. 439p.
- 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.
- BACHMANN, O. Isoenzymes as a tool for grape cultivar identification. **Riv. Viticolt. Enol.**, 42:27-31, 1989.
- BAUER, F.; ZYPRIAN, E. Identification of grapevine rootstock cv. Borner and differentiation of 125 AA from 5 BB and SO 4. **Vitis**, 36:185-189, 1997.
- BELLIN, D.; STEFANINI, M.; VELASCO, R.; STELLA GRANDO, M. Una mappa molecolare del Moscato bianco. Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura Ed Neología, Univ. Torino, Italy. **Theor Appl Genet.** 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.
- BHATTRAMAKKI, D.; RAFALSKI A. Discovery and application of single nucleotide polymorphism markers in plants. In: Henry, R.J. (ed.). **Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants.** Wallingford: CAB International, 2001. p. 179–191.
- 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.
- BOLIANI, A. C. Efeito de seis porta-enxertos sobre a produção e a qualidade dos frutos das videiras ‘Italia’ e ‘Rubi’ (*Vitis vinifera* L.). Disponível em: http://www1.capes.gov.br/estudos/dados/2002/33004099/042/2002_042_33004099079P1_Prod_Tec.pdf XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Belém, PA. 2002.
- BOTTON, M.; HICKEL, E.R.; SORIA, D.J.; TEIXEIRA I. **Bioecologia e controle da pérola-da-terra *Eurhizococus brasiliensis* (Hempel, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira.** Bento Gonçalves: Embrapa-Uva e Vinho, 2000. 23p. (Circular Técnica, 27).
- BOURQUIN, J.C.; TOURNIER, P.; OTTEN, L.; WALTER, B. Identification of sixteen grapevine rootstocks by RFLP and RFLP analysis of nuclear DNA extracted from the wood. **Vitis**, 31:157-162, 1992.
- BOURQUIN, J.C.; SONKO, A.; OTTEN, L.; WALTER, B. Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. **Their. Appl. Genet.**, 87:431-438, 1993.
- BOURSIQUOT, J.M.; PARRA, P. Aplicação de método d’electrophorése pour la caractérisation et al reconnaissance des portegreffe. **Vitis**, 31:189-194, 1992.
- BOWERS, J.E.; BANDMAN, E.B.; MEREDITH, C.P. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. **American Journal of Enology and Viticulture**, 44:266-274, 1993.

- BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, 39:628-633, 1996.
- BOYKO, A.; KATHIRIA, P.; ZEMP, F. J.; YAO, Y.; POGRIBNY, I.; KOVALCHUK, I. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants. **Nucleic Acids Research**, 35:1714-1725, 2007.
- BRETTING, P.K.; WILDRLECHNER, M.P. Genetic markers and horticultural germplasm management. **Hort. Science**, 30:1349–1356, 1995.
- BROHEDE, J.; ELLENGREN, H. Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. **Proc Biol Sci.**, 226:825–833, 1999.
- BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BLAICH, R. Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of Random Amplified Polymorphic DNA techniques using 10mer primers. **Vitis**, 32:187-188, 1993.
- BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BACHMANN, O.; BLAICH, R. On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Vitis**, 33:15-17, 1994.
- CALÒ, A.; COSTACURTA, A.; PALUDETTI, G.; CALÒ, G.; ARULSEKAR, R.; PARFITT, D. The use of isozyme markers to characterize grape cultivars. **Riv. Viticolt. Enol.**, 42:15-22, 1989.
- CAMARGO, U.A. Cultivares para a Viticultura Tropical no Brasil. **EPAMIG**, 19:15-19, 1998. (Informe Agropecuário).
- CAPEL, L. **Caracterização genética de porta-enxertos de *Vitis* empregando marcador RAPD**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2007. 49p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).
- 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.; FRAZZA, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. **Vitis**, 33:211-215, 1994.
- COSMO, I. **Portinnesti della vite**. Bolonha: Edagricole, 1979. 160p.
- CRESPAN, M. Evidence on the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. **Theor. Appl. Genet.**, 108:231-237, 2004.
- DALBÓ, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; STEINKELLNER, H.; SEFC, K.M.; REISCH, B.I.A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. **Genome**, 43:333-400, 2000.
- DE ANDRES, M.T.; CABEZAS, J.A.; CEVERA, M.I.; BORREGO, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; JOUVE, N. Molecular characterization of grapevine rootstocks maintained in germplasm collections. **American Journal of Enology and Viticulture**, 58:75-86, 2007.
- DE CLERK, C.A. Biology of *Phylloxera vitifoliae* (Fitch) (Homoptera: Phylloxeridae) in South Africa. **Phytophylactica**, 6:285-291, 1974.
- DETTMAN, J.R.; TAYLOR, J.W. Mutation and evolution of microsatellite loci in Neurospora. **Genetics**, 168:1231-1248, 2004.
- DIAS, J.E. **O Polimorfismo isoenzimático na identificação de cultivares de *Vitis vinifera* L.** Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 1994. Dissertação (Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia para provas de Doutorado).
- 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. **Nuc. Ac. Res.**, 19:4008-4008, 1991.
- EDWARDS, M. Effects of the type of rootstock on yields of Catarina grapevines (*Vitis vinifera*) and levels of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans* Coob.).

Australian Journal of Experimental Agriculture, Collingwood, 28:283-286, 1988.

EMBRAPA. **Sistema de produção de uva de mesa no norte do Paraná**. Disponível em: <http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/MesaNorteParana/cultivares.htm>. Acesso em: 14, janeiro, 2008.

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

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

FAUST, M. **Physiology of temperate zone fruit trees**. New York: J. Wiley, 1989. 338p.

FERNÁNDEZ, M.P.; NÚÑEZ, Y.; PONZ, F.; HERNÁIZ, S.; GALLEGRO, F.J.; IBÁÑEZ, J. Characterization of sequence polymorphisms from microsatellite flanking regions in *Vitis* spp. **Mol. Breeding**, 22:455-465, 2008.

GOTO-YAMAMOTO, N.; MOCHIOKA, R.; BONIAN, L.; HASHIZUME, K.; UMEDA, N.; HORIUCHI, S. RFLP and RAPD analysis of wild cultivated grapes (*Vitis* spp.). **J. Jap. Soc. Hort. Sci.**, 67:483-490, 1998.

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

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

GRANETT, J.; WALKER, M.A.; KOCSIS, L. Biology and management of grape phylloxera. **Annual Review of Entomology**, 46:387-412, 2001.

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.**, 107:1315-1320, 2003.
- GRIMALDI, M.C.; CROUAU-ROY, B. Microsatellite allelic homoplasmy due to variable flanking sequences. **J. Mol. Evol.**, 44:336-340, 1997.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Propagación de plantas: principios y practicas.** México: Continental, 1990. 760p.
- HICKEL, E.R. **Pragas da videira e seu controle no estado de Santa Catarina.** Videira: Epagri, 1996. 52p. (Boletim Técnico, 77).
- HIDALGO, L. **Tratado de viticultura general.** Madrid: Mundi-Prensa, 1993. 983p.
- HIDALGO, L. **Tratado de viticulture general.** Madrid: Mundi-Prensa, 1999. 1172p.
- HOCQUIGNY, S.; PELS, F.; DUMAS, V.; KINDT, S.; HELOIR, M.C.; MERDINOGLU, D. diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. **Genome**, 47:579-589, 2004.
- HOISINGTON, D.M.; KHAIRALLAH, D.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN. **Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory.** Mexico: CIMMYT, 1994, 50p.
- IBAÑEZ, J.O.; ANDRÉS, M.T.O.; MOLINO, A.O.; BORREGO, J.O. Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellites analysis. **Am. J. Enol. Vitic.**, 54:22-29, 2003.
- JEAN-JAQUES, I.; DEFONTAINE, A.; HALLET, J.N. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Vitis**, 32:189-190, 1993.
- KARP, A.; INGRAM, D.S.; ISAAC, P. **Molecular tools for screening biodiversity plant and animal.** Kluwer Academic Publishers, 1998. 498p.
- KISHINO, A.Y.; CARVALHO, S.L.C; ROBERTO, S.R. **Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná.** Londrina: Iapar, 2007. 362p.

- KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O.; KALCK, V.; BOYKO, V.; FILKOWSKI, J.; HEINLEIN, M.; HOHN, B. Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. **Nature**, 423:760-762, 2003.
- KUHN, G.B.; LOVATEL, J.L.; PREZOTTO, O.P.; RIVALDO, O.F.; MANDELLI, F.; SONEGO, O.R. **O cultivo da videira: Informações básicas**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPV, 1996. 60p. (Circular Técnica, 10).
- LAMBOY, W.F.; ALPHA, C.G. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germ plasmaccessions of grape (*Vitis*. L. species). **J. Am. Soc. Hort. Science**, 123:182-188, 1998.
- LEÃO, P.C.S. Utilização de diferentes tipos de estacas na produção de mudas do porta-enxerto de videira, CV. IAC 572 'Jales'. **Ciência Rural**, 33:165-168, 2003.
- LEGESSE, B.W.; MYBURG, A.A.; PIXLEY, K.V.; BOTHA, A.M. Genetic diversity of African maize inbred lines revealed by SSR markers. **Hereditas**, 00:1-7, 2006.
- LEVADOUX, L. Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. **Annales de l'amélioration des plantes**, 6:59-117, 1956.
- LIN, H.; WALKER, M.A. Extracting DNA from the Cambium Tissue for Analysis of grape Rootstocks. **Hort. Science**, 32:1264-1266, 1997.
- LIN, H.; WALKER, A. Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers. **Am. J. Enol. Vitic.**, 49:403-407, 1998.
- LODHI, M.A.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. Characterization of RAPD markers in *Vitis*. **Vitis**, 36:133-140, 1997.
- 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 aPortuguese grapevine collection. **Theor. Appl. Genet.**, 99:733-739, 1999.

- 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 Biotec.**, 127:34-44, 2006.
- LUO, S.; HE, P. Discrimination of wild grapes native to China by RAPD markers. **Vitis**, 40:163-168, 2001.
- MAKOVA, K.D.; NEKRUTENKO, A.; BAKER, R.J. Evolution of microsatellite alleles in four species of mice (Genus *Apodemus*). **J. Mol. Evol.**, 51:166–172, 2000.
- 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.
- MARTINS, P.F.; SCARANARI, J.H.; RIBEIRO, A.J.I.; TERRA, M.M.; IGUE, T.; PEREIRA, M.F. Valor comparativo de cinco porta-enxertos para cultivo de uva de mesa Patrícia (IAC 871-41). In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Recife, 1981. **Resumos...** Recife: SBF, 1981. p. 1300-1310.
- 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.
- MENG, B.; GONSALVES, D. Rupestris stem pitting-associated virus of grapevines: genome structure, genetic diversity, detection and phylogenetic relationship to other viruses. **Current Topics in Virology**, 3:125-135, 2003.
- 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.
- MONCADA, X.; PELSAY, F.; MERDINOGLU, D.; HINRICHSEN, P. Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers. **Genome**. 49:1459-1472, 2006.

- MONCADA, X.; HINRICHSEN, P. Limited genetic diversity among clones of red wine cultivar 'Carmenère' as revealed by microsatellite and AFLP markers. **Vitis** 46:174-180, 2007.
- MONTEIRO, F.F. Caracterização e identificação genética de castas de videira. **Boletim de Biotecnologia**, 63:5-9, 1999.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant J.**, 3:175–182, 1993.
- NEI, M. Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theor. Pop. Biol.**, 3:460-465, 1972.
- OCETE, R.; LOPEZ, M.A.; PÉREZ, M.A.; DEL TIO, R. **Las poblaciones españolas de vid silvestre**. Madrid: Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1999. 42p.
- 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.
- OMER, A.D.; GRANETT, J. Relationship between grape phylloxera and fungal infections in grapevine roots. **J. Plant. Dis. Prot.**, 107:285-294, 2000.
- ORASMO, G.R.; OLIVEIRA, COLLET S.A.; LAPENTA AS.; 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.
- ORTI, G.; PEARSE, D.E.; AVISE, J.C. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94:10745-10749, 1997.
- PARFITT, D.E.; ARULSEKAR, S. Study of parentage of grape cultivars by genetic interpretation of GPI-2 and PGM-2 isozymes. **Euphytica**, 65:195-202, 1989.
- PASTENA, B. **Trattato di viticoltura italiana**. Bolonha: Edagricole, 1981. 1011p.

- PELLERONE, F.I.; EDWARDS, K.J.; THOMAS, M.R. Grapevine microsatellite repeat: isolation, characterization and use of genotyping grape germplasm from Southern Italy. **Vitis**, 40:179-186, 2001.
- PEREIRA, F.M.; LEITÃO FILHO, H.F. **Caracterização botânica de porta-enxertos de videira**. Campinas: Instituto Agronômico, 1973. 20p. (Boletim técnico, 7).
- PERUZZO, E.L. Método de forçagem para produção de mudas de videira: novas técnicas permitem alcançar melhores resultados. **Agro. Catar.**, 8:17-19, 1995.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. 747 p.
- PIRES, E.J.P.; BIASI, L.A. Propagação da videira. In: POMMER, C.V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 295-350 .
- PONGRÁCZ, D.P. **Rootstocks for grape-vines**. David Philip: Cape Town, 1983. 150p.
- POLLEFEYS, P.; BOUSQUET, J. Molecular genetic diversity of the French-american grapevine hybrids cultivated in North America. **Genome**, 46:1037-1048, 003.
- POMMER, C.V.; PASSOS, I.R.S.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. **Variedades de videira para o estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 59p. (Boletim Técnico, 166).
- POMMER, C.V. **Uva: Tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. 778p.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Mol. Breeding**, 2:225-238, 1996b.

- READ, P.F.; GU, S. A century of American viticulture. **HortScience**, 38:943-951, 2003.
- REISCH, B.I.; PRATT, C.G. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (eds). **Fruit breeding, Vine and small fruit crops**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 1996. p. 287-360.
- 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.
- RIBAS, W.C. Variedades de cavalos de videira e sua melhor época de enraizamento. **Sc. Agric.**, 16:127-138, 1957.
- RITA, V.; MONICA, S.; ELISA, M.; MAURO, C. Genomic variability in *Vitis vinifera* L. “Sangiovese” assessed by microsatellite and non-radioactive AFLP test. **J. Biotech.**, 5:1-11, 2002.
- ROSSETTO, M.; MCNALLY, J.; HENRY, R.J. Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae. **Theor Appl Genet.**, 104:61–66, 2002.
- SANTIAGO, J. L.; BOSO, S.; GAGO, P.; ALONSO, V. V.; MARTÍNEZ, M. C. A contribution to the maintenance of grapevine diversity: The rescue of Tinta Castañal (*Vitis vinifera* L.), a variety on the edge of extinction. **Sci. Hortic.**, 116:199-204, 2007.
- SANTOS JESUS, A.M. **Obtenção antecipada de mudas de videira (*Vitis spp*)**. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1994. 75p. Dissertação Mestrado em Agronomia).
- SANTOS NETO, J.R.A. **A cultura da videira**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1973. 108p.

- SCARANARI, H.J.; MARTINS, F.P.; RIBEIRO, I.J.A.; COELHO, S.M.B.M.; TERRA, M.M.; PEREIRA, F.M. Observações preliminares sobre o comportamento da cultivar de uva de mesa IAC 501-6 (Soraya), em relação a três porta enxertos. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Pelotas, 1979. **Resumos...** Pelotas: UFPL, 1979. p. 969-973.
- SCOSSIROLI, R.E. Origine ed evoluzione della vite. **Atti. Ist. Bot. e Lab. Critt.**, 7:35-55, 1988.
- SCOTT, K.D.; EGGLE, 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.; STEINKELLNER, H.; GLOSSL, J.; KAMPFER, S.; REGNER, F. Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. **Theor. Appl. Genet.**, 97:227-231, 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.; LOPES, M.S.; LEFORT, F.; BOTTA, R.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; IBANEZ, J.; PEJIC, I.; WAGNER, H.W.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, 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.; LEFORT, F.; GRANDO, M.S.; SCOTT, K.D.; STEINKELLNER, H.; THOMAS, M.R. **Microsatellite markers for grapevine: a state of the art.** *Molecular Biology & Biotechnology of Grapevine*. The Netherlands: K.A. Roubelakis-Angelakis Kluwer Academic Publishers, 2001. 435p.
- SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760p.
- 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.

- SORIA, S.J.; DAL CONTE, A.F. Bioecologia e controle das pragas da videira no Brasil. **Entomologia y Vectores**, 7:73-102, 2000.
- SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. São Paulo: Melhoramentos, 1969. 456p.
- SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791p.
- SOUSA, J.S.I.; MARTINS, F.P. **Viticultura Brasileira: principais variedades e suas características**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 368p.
- STIRLING, G.R.; CIRAMI, R.M. Resistance and tolerance of grape rootstocks to south Australian populations of root-knot nematode. **Au. J. Exp. Agric.**, 24:277-282, 1984.
- STRIEM, M.J.; SPIEGEL-ROY, P.; BEN-HAYYIM, G.; BECKMANN, J.; GIDONI, D. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes. **Vitis**, 29:223-227, 1990.
- TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P.; PETTINELLI, A.J.R.; POMMER, C.V.; SABINO, J.C.; PASSOS, I.R. ; COELHO, S.M.B.M.; SILVA, A.C.P. ; RIBEIRO, I.J.A. Productivity of own rooted and grafted IAC wine grape cultivars on different rootstocks. **Bragantia**, 49:345-362, 1990.
- TAMHANTAR, S.A.; PATIL, S.G.; RAO, V.S. Assessment of the genetic diversity of some important grape genotypes in India using RAPD markers. **Vitis**, 40:157-161, 2001.
- 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.; FERRIEIRA-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.

- THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M.R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends Genet**, 22:511–519, 2006.
- THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). **Theor. Appl. Genet.**, 86:985–990, 1993.
- THOMAS, M.R.; CAIN, P.; SCOTT, N.S. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. **Plant Mol. Biol.**, 25:939-949, 1994.
- THOMPSON, M.M.; OLMO, H.P. Cytohistological 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. **Mundi-Prensa**, 2:29-43, 1991.
- UPADHYAY, A.; SABOJI, M.D.; REDDY, S.; DEOKAR, K.; KARIBASAPPA, G.S. AFLP and SSR marker análisis of grape rootstocks in Indian grape germoplasm. **Sci. Hortic.**, 112:176-183, 2007.
- VIDAL, J.R.; COARER, M.; DEFONTAINE, A. Genetic relationships among grapevine varieties grown in different French and Spanish region based on RAPD markers. **Euphytica**, 109:161-172, 1999.
- WALKER, M.A. Future directions of rootstock breeding. In: WOLPERT, J.A.; WALKER, M.A.; WEBER, E. (ed.). **ROOTSTOCK SEMINAR: A WORLDWIDE PERSPECTIVE**, 1992, Reno. **Proceedings...** Reno: The American Society for Enology and Viticulture, 1992. p. 60-68.
- WALKER, M.A.; LIU, L. The use of isozymes to identify 60 grapevine rootstocks (*Vitis* spp). **Amer. J. Enol. Vitic.**, 46:299-305, 1995.
- WALTERS, T.W.; POSLUSZNY, U.; KEVAN, P.G. Isozymes analysis of the grape (*Vitis*). A practical solution. **Can. J. Bot.**, 67:2894-2899, 1989.
- WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I.; MARTENS, M.H.E. Genetic analysis of isozyme polymorphism in grape. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, 113:765-769, 1988.

- WINKLER, A.J. **Viticultura**. México: Compañía Editorial Continental, S.A., 1965. 72p.
- WOLF, W.H. Identification of grape varieties by isozymes banding patterns. **Amer. J. Enol. Vitic**, 27:68-73, 1976.
- WRIGHT. S. Variability within and among populations. In: NEI, M. **Evolution and the genetics of population**. Chicago: University of Chicago Press, 4:79-103, 1978.
- YE, G.N.G.; SOYLEMEZOGLU, G. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprintg. **Vitis**, 37:33-38, 1998.
- YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. **Popgene Version 1.31: Microsoft Window based freeware for population genetic analysis**: quick user guide. University of Albert, Center for International Forestry Research, 1999.
- ZEQUIM-MAIA, S.H. **Diversidade genética em uvas finas de mesa (*Vitis vinifera* L.)**. Maringá: Universidade estadual de Maringá, 2003. 35p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

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](#)