

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANE RUZZA SCHUCK

**HIBRIDAÇÃO INTERESPECÍFICA ENTRE *Vitis labrusca* E *Vitis rotundifolia* E
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

CURITIBA

2012

MARIANE RUZZA SCHUCK

**HIBRIDAÇÃO INTERESPECÍFICA ENTRE *Vitis labrusca* E *Vitis rotundifolia* E
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi

Co-orientador: Prof. Dr. Michael Andrew Walker

Curitiba

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **MARIANE RUZZA SCHUCK**, sob o título "**HIBRIDAÇÃO INTERESPECÍFICA ENTRE *Vitis labrusca* E *Vitis rotundifolia* E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2012.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Professora Dra. Flavia Maia Moreira
Primeira Examinadora

Professor Dr. Edson Perez Guerra
Segundo Examinador

Professor Dr. João Carlos Bessalho Filho
Terceiro Examinador

Professor Dr. Flavio Zanette
Quarto Examinador

Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Presidente da Banca e Orientador

Dedico

A meus pais por tudo e sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, proteção e por ter permitido mais esta vitória.

Ao REUNI pela concessão da bolsa no Brasil, a CAPES pela concessão da bolsa PDEE (sanduiche) e ao CNPq pelo apoio financeiro à execução do projeto.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao professor Luiz Antonio Biasi, pela orientação, incentivo, apoio, paciência e pelos grandes ensinamentos transmitidos, e, sobretudo pela oportunidade de realizar um trabalho gratificante e enriquecedor à minha formação profissional.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia, pelos ensinamentos transmitidos e convivência amigável.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Agronomia, pelo excelente convívio e troca de experiências.

Aos amigos do Laboratório de Micropropagação de Plantas e do Laboratório de Genética de Microorganismos da Universidade Federal do Paraná, pela amizade, convívio e idéias que compartilhamos.

Aos funcionários da EPAGRI e da Universidade Federal do Paraná, que ajudaram na concretização deste trabalho.

Aos meus queridos estagiários, Ada Michele e Bernardo, pela dedicação que tiveram durante a realização deste trabalho.

As amigas Elis, Yohana e Val, pela grande amizade.

Aos professores Flávio Zanette, Juliana Zanetti, João Carlos Bespalhok e Ricardo Augusto de Oliveira que contribuíram muito com seus questionamentos e sugestões durante a realização da banca de pré-defesa.

Ao professor Andrew Walker por ter aceitado me co-orientar e pela ótima convivência que tivemos durante o meu estágio nos EUA.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biotecnologia, da Universidade da Califórnia, Davis, Andrew, Summaira, Rong, Dan, Karl, Rachel, Cecilia O., Cecilia A., Kevin, Jean, Sonet e Claire, pela compreensão, ensinamentos, paciência, amizade e os *Happy hours*.

Ao prof. Ricardo Smith Bressan e sua família pela acolhida na minha chegada a Davis e aos amigos brasileiros, Bia, Luiz Carlos e Alessandra, pelos momentos agradáveis e divertidos que tivemos durante o período em Davis.

A toda minha família, meus irmãos Christian e Guilherme, aos meus pais, Enio e Jane, pelo amor, apoio e tanto incentivo.

Ao Alessandro Dal Pizzol, meu grande amor, pela compreensão, companheirismo e incentivo demonstrado em todos os momentos.

A todos que não foram citados, mas nem por isso esquecidos, e que contribuíram de alguma maneira para o êxito desse trabalho.

RESUMO

A geração de novos porta-enxertos que combinem a resistência a pragas e doenças de *Vitis rotundifolia* com o fácil enraizamento de *Euvitis* spp. tem sido um objetivo de longa data no melhoramento de porta-enxertos de videira. Além disso, o conhecimento da diversidade genética de uma espécie fornece subsídios para o melhoramento genético da mesma. Neste sentido, o presente estudo teve por objetivos analisar o potencial de obtenção de híbridos em cruzamentos controlados envolvendo cultivares de *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca* visando a geração de novos porta-enxertos, confirmar a ocorrência da fecundação cruzada em híbridos interespecíficos e avaliar a diversidade genética entre as cultivares de *Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia*. Marcadores microssatélites foram utilizados para confirmar as hibridizações interespecíficas e a identidade dos parentais, bem como avaliar a diversidade genética. Nos cruzamentos em que *V. rotundifolia* foi utilizada como genitor feminino, nenhum híbrido verdadeiro foi obtido. Nos cruzamentos recíprocos, 114 plântulas foram identificadas como verdadeiros híbridos de *V. labrusca* x *V. rotundifolia*. Foram confirmados os cruzamentos 'Bordo' x 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' e 'Roanoke', e 'Isabel' x 'Bountiful', 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' e 'Roanoke'. A cultivar 'Magoon' apresentou o mesmo perfil genético que 'Regale' deste estudo e da cultivar 'Regale' presente na base de dados de referência para identificação de videira, mantida pela *Foundation Plant Service*, Universidade da Califórnia, Davis, indicando um provável erro de plantio. Quanto aos parâmetros genéticos, foram encontradas diferenças significativas na composição alélica que refletiram tanto sobre a existência de diferentes conjuntos de alelos para *V. rotundifolia* e *V. labrusca* e na existência de alelos privados em cada grupo. Foi encontrado um total de 54 alelos com uma média de 7,25 alelos por loco. A heterozigosidade observada variou de 37,14% (VVMD5) a 97,14% (VVMD27), sem diferenças significativas em relação aos valores esperados para todos os locos, exceto para VVMD5. Foram verificados valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC) superiores a 0,25 em mais de 85% dos locos analisados, sendo que VVMD31 apresentou-se como o mais informativo. Por meio da análise de agrupamento UPGMA foi possível separar os acessos em grupos distintos, *V. rotundifolia* e *V. labrusca*. Dentro de cada grupo, as cultivares mais divergentes foram 'Bountiful' (*V. rotundifolia*) e 'Goethe' (*V. labrusca*), respectivamente. Estas mesmas cultivares também apresentaram o maior número de alelos privados, 4 e 7, respectivamente. Quando comparados os dois grupos, as cultivares mais divergentes foram 'Bountiful' e 'Bordo', com a maior distância de Nei (1972). Pôde-se concluir que o sucesso da hibridização depende principalmente da espécie e da cultivar utilizada como genitor feminino e que há variabilidade genética suficiente nas cultivares utilizadas neste estudo para subsidiar programas de melhoramento genético. Os marcadores microssatélites são importantes ferramentas para confirmar a paternidade de híbridos interespecíficos F1, para determinar a correta identidade de cultivares de *V. rotundifolia* e avaliar a diversidade genética.

Palavras-chaves: *Vitis rotundifolia*, *Vitis labrusca*, identificação híbrida, cruzamentos interespecíficos, SSRs, variabilidade genética.

INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION AMONG *Vitis labrusca* AND *Vitis rotundifolia* AND ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY USING MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

The generation of new rootstocks with pest and disease resistance traits of *Vitis rotundifolia* combined with the ease of rooting of *Euvitis* spp. has been a long-standing goal of grape rootstock breeding. Furthermore, the knowledge about the genetic diversity of a species provides subsidies to a breeding program. Hence, the present study aimed to analyze the potential of obtaining hybrids in controlled crosses involving *Vitis labrusca* and *Vitis rotundifolia* cultivars in order to create new rootstocks, confirm the occurrence of cross-fertilization in interspecific hybrids and evaluate the genetic diversity among *Vitis labrusca* and *Vitis rotundifolia* cultivars. Microsatellite markers were used to confirm interspecific hybridizations and the identity of the parental genotypes and to assess the genetic diversity. In crosses in which *V. rotundifolia* was used as the female parent, no true hybrids were obtained. In the reciprocal crosses, 114 seedlings were identified as true *V. labrusca* x *V. rotundifolia* hybrids. The crossings between 'Bordo' x 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' and 'Roanoke', and between 'Isabel' x 'Bountiful', 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' and 'Roanoke' were confirmed. The cultivar 'Magoon' had the same genetic profile as 'Regale' of this study and as 'Regale' cultivar present in the *Grape DNA Identification Reference Database (Foundation Plant Services, University of California, Davis)*, implicating a likely planting error. About the genetic parameters, there were significant differences in allelic composition that reflected both on the existence of different sets of alleles for *V. rotundifolia* and *V. labrusca* and the existence of private alleles in each group. A total of 54 alleles were found with an average of 7.25 alleles per locus. The observed heterozygosity ranged from 37.14% (VVMD5) to 97.14% (VVMD27), with no significant differences in relation to expected values for all loci, except for VVMD5. The polymorphism information content (PIC) values were observed above 0.25 in more than 85% of the loci analyzed and VVMD31 was the most informative. The UPGMA analysis clustered the cultivars into two distinct groups, *V. rotundifolia* and *V. labrusca*. Within each group, the most divergent cultivars were 'Bountiful' (*V. rotundifolia*) and 'Goethe' (*V. labrusca*), respectively. These cultivars also showed the largest number of private alleles, 4 and 7, respectively. When comparing the two groups, the most divergent cultivars were 'Bountiful' and 'Bordo', with the highest Nei distance (1972). It could be concluded that the success of hybridization depends mainly on the species and on the cultivar used as the female parent and that there is sufficient genetic variability in the cultivars used in this study to support breeding programs. Microsatellites markers are efficient tools to confirm the paternity of interspecific F1 hybrids, to determine the correct identity of *V. rotundifolia* cultivars and assess the genetic diversity.

Key-words: *Vitis rotundifolia*, *Vitis labrusca*, hybrid identification, interspecific crosses, SSRs, genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- FIGURA 1 - Amplificação PCR dos marcadores SSR UDV41 e UDV43 (DI GASPERO *et al.*, 2005) e VVIN75 (MERDINOGLU *et al.*, 2005) em 'Isabel' (1), 'Regale' (2), 'Carlos' (3), 'Roanoke' (4), 'Bountiful' (5) e 'Magnolia' (6) seguido pelos híbridos verdadeiros resultantes de cada cruzamento. H, híbrido..... 46
- FIGURA 2 - Amplificação PCR dos marcadores SSR UDV41 e UDV43 (DI GASPERO *et al.*, 2005) e VVIN75 (MERDINOGLU *et al.*, 2005) em 'Bordo' (1), 'Carlos' (2), 'Roanoke' (3), 'Magnolia' (4) e 'Regale' (5) seguido pelos híbridos verdadeiros resultantes de cada cruzamento. H, híbrido..... 47

Capítulo II

- FIGURA 1 - Dendograma representativo de dez cultivares de videira pelo método hierárquico UPGMA, utilizando os valores da matriz das distâncias genéticas de Nei (1972) em valores admencionais e em porcentagem..... 71

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

TABELA 1 -	Cruzamentos, número de flores polinizadas, vingamento de bagas e número de plântulas na Estação Experimental do Canguiri, Pinhais, PR, Brasil, e na Estação Experimental de Videira, SC, Brasil, em 2008.....	45
TABELA 2 -	Cruzamentos, número de flores polinizadas, vingamento de bagas e número de plântulas na Estação Experimental de Campos Novos e Videira, SC, Brasil, em 2008 e 2009.....	46
TABELA 3 -	Porcentagem de híbridos interespecíficos de <i>Vitis</i> confirmados por meio de marcadores microssatélites.....	47
TABELA 4 -	Tamanho dos alelos (pb) das cultivares de <i>Vitis rotundifolia</i> e <i>Vitis labrusca</i> utilizadas como genitoras nos cruzamentos.....	52

Capítulo II

TABELA 1 -	Descrição das dez cultivares de videira, tipo de inflorescência, cor da baga, espécie ou parentesco e origem geográfica.....	62
TABELA 2 -	Relação dos oito marcadores microssatélites analisados para caracterizar as cultivares de videira, sequência, temperatura de anelamento dos <i>primers</i> e tamanho do alelo em pares de bases.....	64
TABELA 3 -	Perfil genético das cultivares de <i>Vitis</i> spp. com o tamanho dos alelos (pb) observados.....	67
TABELA 4 -	Tamanho do alelo em pares de bases (TA) e a frequência alélica (FA) encontrada nas cultivares de <i>Vitis rotundifolia</i> e de <i>Vitis labrusca</i> em oito locos microssatélite.....	68
TABELA 5 -	Caracterização dos oito locos microssatélites usados neste estudo: número de alelos por locos (N), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), frequência de alelos nulos (r) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) calculados agrupando-se todas as cultivares em um único	

	grupo.....	69
TABELA 6 -	Matriz da distância genética (Nei, 1972) entre as cultivares de <i>Vitis</i> , com base em oito marcadores microsatélites.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Número de alelos
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EUA	Estados Unidos da América
GDA	<i>Genetic Data Analyses</i>
H_e	Heterozigosidade esperada
H_o	Heterozigosidade observada
M	Molar
MAS	<i>Marker assisted selection</i> - Seleção assistida por marcadores moleculares
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Número de alelos por locos
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
Nm	Número médio de alelos
P	Porcentagem de locos polimórficos
p/v	Peso-volume
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIC	Conteúdo de informação polimórfica
PVP	Polivinilpirrolidona
QTLs	<i>Quantitative trait loci</i> - Detecção de locos de características quantitativas
r	Probabilidade de alelos nulos

RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i> - DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Regions</i> – Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequências
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> - Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SSRs	Microssatélites - <i>Simple Sequence Repeats</i> – Repetições de Sequências Simples
STS	<i>Site Tagged Sequence</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris-HCl	Ácido clorídrico
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average</i> – Agrupamento não-ponderado aos pares utilizando médias aritméticas
v/v	Volume-volume
VMC	<i>Vitis Microsatellite Consortium</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> – Sequências Adjacentes que se repetem em Número Variável
W	Watts
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM DA VIDEIRA.....	17
2.1.1 <i>Vitis rotundifolia</i> e <i>Vitis labrusca</i>	18
2.2 PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DE DECLÍNIO DA VIDEIRA NO SUL DO BRASIL.....	19
2.3 IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS NA VITICULTURA	22
2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO DA VIDEIRA.....	24
2.4.1 Híbridação controlada.....	26
2.5. BIOTECNOLOGIA APLICADA AO MELHORAMENTO.....	29
2.5.1 Marcadores moleculares.....	30
2.5.1.1 Marcadores microsatélites em videira.....	33
3 CAPÍTULO I - OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS E ANÁLISE MOLECULAR POR MARCADORES MICROSSATÉLITES EM VIDEIRA.....	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
3.1 INTRODUÇÃO.....	40
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.4 CONCLUSÕES.....	53
3.5 REFERÊNCIAS.....	54
4 CAPÍTULO II - DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE <i>Vitis labrusca</i> e <i>Vitis rotundifolia</i> ANALISADAS POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	57
RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	59
4.1 INTRODUÇÃO.....	60
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
4.2.1 Material genético.....	62

4.2.2 Extração e quantificação do DNA.....	63
4.2.3 Condições de amplificação e detecção do polimorfismo alélico.....	64
4.2.4 Determinação do tamanho dos alelos.....	65
4.2.5 Análises estatísticas.....	66
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.4 CONCLUSÃO.....	74
4.5 REFERÊNCIAS.....	75
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
REFERÊNCIAS GERAIS.....	82
APÊNDICES.....	97

1 INTRODUÇÃO GERAL

A videira é a terceira fruteira em importância econômica no mundo, ocupando atualmente uma área de 7,4 milhões de hectares e com uma produção anual de 67 milhões de toneladas (FAO, 2011). O Brasil ocupa o 12º lugar no ranking de produção vitícola mundial e a 16ª posição na produção de vinhos (IBRAF, 2011). A produção de uvas no Brasil cresceu na ordem de 31,4% nos últimos 10 anos e 40,1% na área plantada, chegando a 83.718 hectares (MELLO, 2011). Essas áreas encontram-se distribuídas, principalmente pelos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Santa Catarina e Bahia, em ordem decrescente. Cabe destacar que a uva *in natura* foi a 6ª fruta mais exportada em 2010, rendendo ao país algo próximo de 134 milhões de dólares (IBRAF, 2011).

Apesar do impacto na economia brasileira, a viticultura passa por muitos problemas, na maioria das vezes relacionadas ao ataque de pragas e doenças, que quando não controladas adequadamente ocasionam o declínio progressivo e morte da planta. Os principais agentes causais identificados associados a este problema e que atualmente vêm causando sérios prejuízos na cultura da videira na região Sul são patógenos que infectam as plantas através do sistema radicular, como os fungos *Cylindrocarpon* sp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* e *Verticillium* sp. (GARRIDO; SONEGO; GOMES, 2004) e a cochonilha pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis*) (BOTTON *et al.*, 2004), e até o momento a forma de controle mais preconizada é o uso de porta-enxertos resistentes ou tolerantes (SCHUCK *et al.*, 2007).

A espécie *Vitis rotundifolia* é resistente aos principais patógenos da videira, sendo utilizada em muitos programas de melhoramento para criação de porta-enxertos resistentes a diversos problemas de solo (KELLOW *et al.*, 2002). *Vitis rotundifolia* (2n=40) não é empregada diretamente como porta-enxerto devido à falta de compatibilidade de enxertia com as cultivares comerciais de *Vitis* spp. (2n=38) (GOLDY; ONOKPISE, 2001) e a incapacidade de formar raízes a partir de estacas dormentes (OLMO, 1971). Entretanto, foram criados híbridos com *Vitis* spp. que apresentam compatibilidade (OLMO, 1986). Alguns híbridos resultantes destes cruzamentos, como VRO39-16 e VRO43-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*), desenvolvidos pelo programa de melhoramento da Universidade da Califórnia, Davis (WALKER *et al.*, 1991) são atualmente os recomendados pela pesquisa em áreas infestadas por pérola-da-terra e *Fusarium* spp. (SCHUCK *et al.*, 2007). No entanto, nas áreas vitícolas da Califórnia, VRO43-43 e VRO39-16 não são mais recomendados para uso como

porta-enxertos devido à quebra de resistência à filoxera (SMITH, 2010). No Brasil, recentes observações indicam que VRO43-43 pode definhando e morrer em poucos anos, dependendo do grau de infestação por pérola-da-terra que o local apresenta (DE CÉSARO, 2008) e, além disso, tem se mostrado extremamente suscetível ao *Cylindrocarpon destructans* (RASERA, 2005). Alguns autores citam que esta quebra de resistência se deve ao fato destes materiais terem em seu parentesco *V. vinifera*, indicando ser esta a fonte de suscetibilidade (SMITH, 2010).

Diante das incertezas em relação à longevidade e resistência destes porta-enxertos, e sabendo-se que a busca de novos genótipos é uma necessidade constante, uma vez que o uso de poucas cultivares pode exercer uma pressão de seleção nas populações do patógeno e que a resistência a filoxera deve estar no *background* de todos os porta-enxertos, verifica-se a necessidade de desenvolver novos porta-enxertos com resistência durável à filoxera e com ampla resistência aos principais agentes causais do declínio da videira, o que pode ser obtido pelo melhoramento genético através de hibridações controladas.

A hibridação de espécies americanas com *Vitis rotundifolia* é uma alternativa à hibridação com *Vitis vinifera*. Entre as muitas espécies americanas, as cultivares de *Vitis labrusca* são bem adaptadas às condições vitícolas do Sul do Brasil, enraizam com facilidade e possuem tolerância a filoxera e a fusariose (ANDRADE *et al.*, 1995), o que as torna importante fonte genética para programas de melhoramento de videira.

Dentre as técnicas utilizadas para identificação de híbridos, os marcadores moleculares têm se destacado por serem mais rápidos e não influenciados pelo ambiente. Os marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) têm sido uma ferramenta bastante utilizada para identificar híbridos em várias culturas, inclusive em espécies de *Vitis* (RIAZ *et al.*, 2007a). Além disso, os microssatélites podem ser utilizados para caracterizar os recursos genéticos disponíveis e fornecer uma identificação direta da diversidade genética e, neste sentido, indicar os genótipos mais divergentes, orientar cruzamentos e aumentar a eficiência dos programas de melhoramento.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivos analisar o potencial de obtenção de híbridos em cruzamentos controlados envolvendo cultivares de *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca* visando a geração de novos porta-enxertos, confirmar a ocorrência da fecundação cruzada em híbridos interespecíficos e analisar a diversidade genética presente entre as cultivares de *Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia* utilizando marcadores microssatélites.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM DA VIDEIRA

A videira pertence ao grupo Cormófitas (plantas com raiz, talo, folha e autotróficas), divisão Spermatophyta (planta com flor e semente), subdivisão Angiospermae (planta com semente dentro de frutos), classe Dicotyledoneae (plantas com dois cotilédones), ordem Rhamnales (plantas lenhosas com um ciclo de estames situados dentro das pétalas), família Vitaceae (flores com corola de pétalas soldadas na parte superior e de pré-floração valvar, com cálice pouco desenvolvido, gineceu bicarpelar e bilocular, com fruto tipo baga) (ALVARENGA *et al.*, 1998). Caracteriza-se por apresentar plantas trepadeiras perenes, monóicas ou dióicas. As inflorescências são opostas às folhas e as flores podem ser hermafroditas perfeitas, masculinas ou femininas. Reproduzem-se sexualmente, por meio de auto-fecundação e fecundação cruzada (QUEIROZ-VOLTAN; PIRES, 2003).

A domesticação da videira ocorreu a cerca de 10.000 anos atrás, no Oriente Médio, mais precisamente na Região do Cáucaso, entre o Mar Negro e o Mar Cáspio, a partir da espécie selvagem *Vitis vinifera caucasica* (SOUZA, 1996).

A família *Vitaceae* compreende dezenove gêneros e 1126 espécies (GALET; SMITH, 1998), sendo que o gênero *Vitis* L. é o mais antigo, de maior importância econômica, o único que possui frutos comestíveis e compreende mais de 70 espécies. Dentro do gênero *Vitis* encontram-se dois subgêneros ou seções: *Muscadinia* Planch e *Euvitis* Planch divididos assim devido às diferenças anatômicas e morfológicas que suas espécies apresentam (POMMER, 2003).

Uma classificação alternativa foi proposta por Small (1913, citado por Olien, 2001). Este autor não concordou com a classificação em subgêneros de Planchon, e separou *Euvitis* e *Muscadinia* em dois gêneros distintos: *Vitis* e *Muscadinia*. Com base nas diferenças citogenéticas, anatômicas, morfológicas, e fisiológicas que suas espécies apresentam, a classificação de Small é atualmente uma taxonomia reconhecida (OLIEN, 2001), mas ainda pouco utilizada cientificamente.

A seção *Muscadinia* agrupa plantas com 40 cromossomos ($n=20$), sendo nativas do Sudeste dos Estados Unidos e México, e possui três espécies conhecidas, *Vitis rotundifolia* Michx., *Vitis munsoniana* Simpson ex Munson e *Vitis popenoei* Fenell (GALET; SMITH,

1998), destacando-se a primeira como a mais importante do ponto de vista de resistência a estresse biótico e abiótico (POMMER, 2003). De acordo com a reclassificação de Small, Olien (2001) considera que esta espécie deveria ser oficialmente reconhecida como *Muscadinia rotundifolia* Michx. Na terminologia popular o termo *muscadinia* é utilizado para se referir tanto a fruta como as três espécies do grupo, *Muscadinia rotundifolia*, *Muscadinia munsoniana* Simpson ex Munson e *Muscadinia popenoei* Fennel (USDA-ARS, 2011).

As espécies da seção Euvitis com 38 cromossomos ($n=19$) são divididas em três grupos, Europeu, Americano e Asiático, sendo os dois primeiros os principais. Entre as espécies européias a *Vitis vinifera* destaca-se pela sua importância econômica e diversidade morfológica e genética, constituindo a base da vitivinicultura mundial. A facilidade de propagação assexuada deu origem a um número estimado em 14.000 cultivares, com diferentes finalidades: consumo *in natura*, passas, sucos e vinho (ALLEWELDT; SPIEGEL-ROY; REISCH, 1990). Podem ser consideradas como a elite das uvas ou castas nobres (SOUZA, 1996). Entre as espécies americanas, *Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, *Vitis berlandieri* e *Vitis labrusca* foram muito utilizadas nos séculos 18 e 19 diretamente como porta-enxertos das cultivares de *Vitis vinifera* devido a tolerância a filoxera.

2.1.1 *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca*

A área de distribuição natural de *Vitis rotundifolia* ou *Muscadinia rotundifolia* se estende ao longo da Costa Leste dos Estados Unidos, do Sul da Flórida para o Norte da Virgínia, e para o Oeste, ao longo do Golfo do México para Leste do Texas (OLIEN, 2001). As cultivares desta espécie são comercialmente importantes para a Região Sudeste dos Estados Unidos, mas pouco conhecidas no Brasil. Esta uva possui um sabor e odor característico e o seu interesse comercial consiste no consumo dos frutos *in natura*, produção de vinhos e sucos (STRIEGLER *et al.*, 2005). Esta espécie tem sido classificada como tendo o mais alto nível de resistência a filoxera (FIROOZABADY; OLMO, 1982a), ao agente causal do mal de Pierce *Xylella fastidiosa* (RUEL; WALKER, 2006), aos nematóides patogênicos *Meloidogyne* spp. (FIROOZABADY; OLMO, 1982b) e *Xiphinema index* (BOUQUET *et al.*, 2000), aos fungos patogênicos *Erysiphe necator* (BARKER *et al.*, 2005) e *Plasmopara viticola* (MERDINOGLU *et al.*, 2003) responsáveis pelo oídio e míldio, respectivamente, a fusariose (SCHUCK *et al.*, 1993) e a pérola-da-terra (BOTTON; COLLETA, 2010), e tem

sido empregada mundialmente nos programas de melhoramento para criação de porta-enxertos resistentes a diversos problemas de solo (KELLOW *et al.*, 2002). Como restrições, apresenta suscetibilidade à podridão negra, sensibilidade ao CaO (óxido de cálcio) e à carência de magnésio (KUNIYUKI, 2003).

As espécies americanas de *Vitis* têm o mesmo conteúdo cromossômico (n=19) que *Vitis vinifera* (PATEL; OLMO, 1955). Nos séculos 18 e 19 começaram os primeiros trabalhos de hibridação controlada de *Vitis vinifera* com as espécies americanas. Estes híbridos eram plantados em pé-franco e foram criados para incorporar a resistência às doenças foliares das uvas americanas com as características dos frutos das videiras européias, o chamado “produtor direto” (POMMER, 2003). As espécies americanas *Vitis labrusca* e *Vitis aestivalis* foram as mais utilizadas nestes cruzamentos (CAMPBELL, 2005). *Vitis labrusca* é nativa da Costa do Oceano Atlântico (GALET; SMITH, 1998). O híbrido mais conhecido de *Vitis labrusca* com *Vitis vinifera* é ‘Concord’, amplamente utilizado na produção de geléias e suco. ‘Concord’ e outros híbridos como ‘Isabel’, ‘Catawba’ e ‘Delaware’ tornaram-se populares em quintais e vinhedos, encontrando-se nichos destes em Cincinnati, ao longo da margem do Lago Erie, e ao norte de Nova York (PINNEY, 2005). A resistência ao frio e a tolerância a doenças destes híbridos fez com que eles fossem os mais adequados para os estados do Norte, onde *Vitis labrusca* era conhecida como a “Uva Foxada do Norte” devido ao aroma intenso de suas uvas (CASSIDY, 2002). No Brasil, as cultivares de *Vitis labrusca* são bem adaptadas às condições vitícolas do Sul, enraizam com facilidade e possuem tolerância a filoxera e a fusariose (ANDRADE *et al.*, 1995).

2.2 PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DE DECLÍNIO DA VIDEIRA NO SUL DO BRASIL

O número de casos de declínio e morte de plantas de videira na região Sul do Brasil tem aumentado de forma acentuada nos últimos anos, causando grande redução de produtividade e de qualidade da uva. Os principais agentes causais identificados associados a este problema são patógenos que infectam as plantas através do sistema radicular, como os fungos *Cylindrocarpon sp.*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* e *Verticillium sp.* (GARRIDO; SONEGO; GOMES, 2004) e a cochonilha *Eurhizococcus brasiliensis* (BOTTON *et al.*, 2004). Cabe destacar que existem muitos outros patógenos associados ao

declínio da videira como as cochonilhas-do-tronco (*Hemiberlesia lataniae* Signoret, *Duplaspidiotus tesseratus* Charmoy e *D. fossor* Newstead), as viroses que causam o complexo rugoso da videira (intumescimento dos ramos e caneluras do tronco da videira), fungos que causam podridão radicular [*Rosellinia necatrix* Prill., *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) P. Kumm e *Phytophthora* sp.], os fungos que causam apodrecimento do tronco e ramos [*Botryosphaeria* sp., *Eutypa lata* (Pers.: fr.) Tul. & C. Tul., *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. e *Stereum* sp.], a filoxera radícula [*Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch, 1854)] (KUHN, 1981) e os fitonematóides *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne arenaria* (GOMES; CAMPOS; COSTA, 2009). Entretanto, devido às atuais medidas de controle empregadas pelos viticultores, estes podem ser considerados de importância secundária.

Eurhizococcus brasiliensis, sinônimo *Margarodes brasiliensis*, pertence à Ordem Hemiptera, Família Margarodidae, Subfamília Margarodinae, é também conhecida como pérola-da-terra, margarodes ou carrapato-da-raiz. É uma cochonilha subterrânea que infesta as raízes de várias plantas numa profundidade de 5 a 30 cm. Várias espécies de plantas entre anuais e perenes são hospedeiras do inseto, destacando-se a videira e fruteiras de clima temperado (HICKEL, 1996). A espécie *E. brasiliensis*, de ocorrência restrita ao Brasil, encontra-se distribuída nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e mais recentemente em Pernambuco (Vale do São Francisco). É responsável pelo declínio da cultura em várias regiões, sendo a principal praga da videira no Sul do Brasil (BOTTON *et al.*, 2004). No Vale do Rio do Peixe (SC), por exemplo, foi um dos fatores que levou a uma expressiva redução da área plantada nas décadas de 80 e 90 (SCHUCK *et al.*, 1993), assim como no Paraná, na Região Centro-Leste, próximo à cidade de Curitiba e no Sul, próximo à divisa com Santa Catarina (SOUZA, 1996). O principal meio de dispersão a longas distâncias é o homem, através de mudas enraizadas hospedeiras da pérola-da-terra e a curtas distâncias são as formigas doceiras, principalmente a espécie *Linepithema humile* (Mayr). A suscetibilidade da videira ao ataque dessa praga pode ser devida a uma maior sensibilidade a toxinas que são injetadas nas raízes e à sucção contínua da seiva, que é altamente prejudicial, provocando um definhamento progressivo, redução da produção e mesmo a morte das plantas. As toxinas, quando injetadas no tecido vascular da planta, têm ação sistêmica, translocando-se a outros pontos, exibindo uma fitotoxemia generalizada, irreversível, exceto se a planta dispuser ainda de reservas suficientes que lhe permitam emitir nova brotação. A formação de lesões radiculares por esta praga também facilita a entrada de fungos como *Fusarium* sp. e *Verticillium* sp. (HAJI *et al.*, 2004). Além disso, em levantamento realizado por Gomes,

Campos e Costa (2009) em parreiral de *Vitis labrusca* em declínio, foi verificado que a pérola-da-terra encontrava-se associada a filoxera e a fitonematóides.

Fusarium oxysporum Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen f. sp. *herbemontis* Tochetto é agente causador da doença conhecida como fusariose. O nome da *forma specialis* é originado da cultivar de videira Herbemont, na qual foi feito o trabalho pioneiro de investigação, identificação e isolamento de *F. oxysporum* por Tochetto (1954). Esse fungo está disseminado nos solos do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (GARRIDO; SONEGO; GOMES, 2004). O declínio e morte de videiras causado por *F. oxysporum* não é exclusividade do Brasil. Em vinhedos da Califórnia, *F. oxysporum* está associado a podridões radiculares (OMER; GRANETT; WAKEMAN, 1999), não sendo agente causal de murcha vascular como é o caso no Brasil. Esses mesmos autores relacionaram a incidência do fungo *F. oxysporum* com a população de filoxera no solo, uma vez que esse inseto pode causar ferimentos nas raízes que servem de ponto de infecção para o fungo. Granett *et al.* (1998) relataram que, mesmo sendo comuns nos solos dos vinhedos Californianos, as espécies de *Fusarium* não eram invasivas, a menos que as raízes estivessem danificadas ou com galhas de filoxera. No entanto, Highet e Nair (1995) confirmaram a patogenicidade de *F. oxysporum* com isolados retirados de raízes de plantas em declínio que foram utilizadas para infectar plantas de videiras em casa-de-vegetação. No Uruguai e África do Sul, *F. oxysporum* foi identificado associado a *Phomopsis viticola* e *Eutypa lata*, respectivamente, fungos que causam podridão do tronco e ramo (FERREIRA; MATTHEE; THOMAS, 1989; ABREO *et al.*, 2008). Este tipo de associação entre patógenos deve acontecer nas condições do Sul do Brasil, entre a pérola-da-terra e *F. oxysporum* f. sp. *herbemontis*, sugerindo a necessidade de estudos.

Além de *Fusarium oxysporum*, outro fungo que causa doença vascular ou murcha é o *Verticillium* spp. (GARRIDO; SONEGO; GOMES, 2004) que invade o sistema vascular das plantas, dificultando o transporte ascendente da água e sais minerais absorvidos pelas raízes. É capaz de crescer em solo seco, embora cause doenças mais severas em solos úmidos, com altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar (KUHN, 1981). Seus sintomas são o amarelecimento e necrose marginal das folhas, que murcham e secam, com posterior queda destas e cachos secos e mumificados, ficando as bagas presas ao pedicelo (POMMER, 2003).

Duas espécies, *Cylindrocarpon destructans* (Zinns.) Scholten e *Cylindrocarpon obtusisporum* Wollenw (Cooke; Harkn), têm sido relatadas como os agentes causais do pé-preto (ALANIZ *et al.*, 2007). *Cylindrocarpon* sp. é uma importante moléstia em inúmeras regiões vitícolas mundiais, constituindo atualmente uma das principais ameaças ao cultivo e a

produção estável da videira. A doença tem sido relatada em alguns países da Europa, nos Estados Unidos e no Chile. *C. destructans* foi registrado em plantas de Bordo no Município de Flores da Cunha/RS por Garrido, Sonogo e Gomes (2004). Esta doença afeta o sistema radicular e é um problema de crescente incidência nos vinhedos da região Sul (SONEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI, 2005). Já *C. obtusisporum* é considerada uma praga exótica, ou seja, não ocorrendo registro em videiras do Brasil (MENDES *et al.*, 2008).

Cabe ressaltar que a extensão dos danos causados por estes patógenos está principalmente associada à resistência e/ou tolerância do porta-enxerto de *Vitis* spp. e também a fatores abióticos como a má soldadura do enxerto, o excesso de umidade no solo, a fitotoxicidade causada por herbicidas ou as misturas de produtos no tanque do pulverizador e por adubações desequilibradas (GARRIDO; SONEGO; GOMES, 2004).

2.3 IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS NA VITICULTURA

Considerada a principal praga da viticultura, a filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) foi responsável pela morte de grande número de vinhedos no Continente Europeu em 1860. A descoberta de que espécies americanas eram resistentes, fez com que os viticultores passassem a utilizar estas diretamente como porta-enxerto das cultivares de *Vitis vinifera*. Neste mesmo período, iniciaram-se os primeiros trabalhos de melhoramento de porta-enxertos, permitindo o ressurgimento dos vinhedos de *Vitis vinifera*. Seleções de *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* e *Vitis berlandieri* foram as mais utilizadas em hibridações. Portanto, resistência a filoxera foi o primeiro critério para seleção de porta-enxertos para a cultura da videira (POMMER, 2003).

Posteriormente, os trabalhos de melhoramento buscaram além da resistência à filoxera, outras qualidades como a resistência a doenças, afinidade com as cultivares copa e adaptação às condições locais de solo e clima (DELAS, 1992). Como a maior parte dos programas de melhoramento foram desenvolvidos na Europa, os porta-enxertos mais difundidos foram selecionados principalmente para tolerância a solos calcáreos, ao déficit hídrico e buscando-se afinidade com as cultivares viníferas plantadas nos principais países produtores.

Reynolds e Wardle (2001) relatam sete principais critérios para a escolha de porta-enxertos na ordem de importância, como: resistência à filoxera, resistência a nematóides, adaptabilidade a solos com pH alto e baixo, adaptabilidade a solos salinos, capacidade de

adaptação a solos mal drenados e capacidade de adaptação à seca. Diversos estudos também provaram que porta-enxertos de videira afetam o crescimento, produtividade, qualidade dos frutos e qualidade do vinho. Esses efeitos ocorrem de uma forma mais ou menos indireta e são consequências das interações entre fatores ambientais e da fisiologia do enxerto e das cultivares de porta-enxertos utilizados (READ; GU, 2003).

Tradicionalmente, durante muitos anos, na viticultura do Brasil, principalmente do Sul, foram usados porta-enxertos de boa afinidade e alta capacidade de enraizamento e pegamento na enxertia. Estes porta-enxertos como Solferino, SO4, Kobber 5BB e 101-14 (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*) são os mais usados na viticultura mundial e por isso foram usados largamente na viticultura brasileira. Entretanto, por serem pouco resistentes aos problemas de solo das condições do Sul do Brasil, ácidos com alto teor de argila e a fusariose (ANDRADE; SCHUCK; DALBÓ, 1993), foram substituídos a partir da década de 80 por porta-enxertos do grupo *Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*, como Paulsen 1103 e R99 (ANDRADE *et al.*, 1995). Todavia, todos estes porta-enxertos são sensíveis a *E. brasiliensis* (BOTTON; COLLETA, 2010), a *Cylindrocarpon* spp. (REGO *et al.*, 2000) e *Verticillium* spp. (GARRIDO; SONEGO; GOMES, 2004).

Os primeiros porta-enxertos comerciais tendo em seu parentesco *Vitis rotundifolia* foram os híbridos de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*, VRO39-16 e VRO43-43. O termo VR foi proposto para descrever os híbridos resultantes da fertilização de *Vitis vinifera* com pólen de *Vitis rotundifolia* (JELENKOVIC; OLMO, 1968). Criados por Olmo em 1948, estes dois porta-enxertos foram lançados pelo programa de melhoramento da Universidade da Califórnia, Davis, e mostraram bons resultados em áreas com problemas de doenças e pragas de solo da videira (WALKER *et al.*, 1991), e são atualmente os recomendados pela pesquisa em áreas infestadas por pérola-da-terra e *Fusarium* spp. (SCHUCK *et al.*, 2007). No entanto, nas áreas vitícolas da Califórnia, VRO43-43 e VRO39-16 não são mais recomendados para uso como porta-enxertos devido à quebra de resistência à filoxera (SMITH, 2010). No Brasil, recentes observações indicam que VRO43-43 pode definhar e morrer em poucos anos, dependendo do grau de infestação por pérola-da-terra que o local apresenta (DE CÉSARO, 2008). Além disso, este “novo” porta-enxerto tem se mostrado extremamente suscetível ao *Cylindrocarpon destructans*, levando à sua morte em pouco tempo depois de plantado (RASERA, 2005).

Em 1989, uma população de porta-enxertos foi desenvolvida por Olmo pelo cruzamento de *Vitis rupestris* com *Vitis rotundifolia* (DOUCLEFF *et al.*, 2004). O porta-enxerto ‘8909-05’ (UCD GRN-1, *Vitis rupestris* ‘A. de Serres’ x *Vitis rotundifolia* ‘Cowart’)

(WALKER; OLMO; EVERIST, 2009) liberado como cultivar nos Estados Unidos, tem demonstrado tolerância ao Mal de Pierce, resistência a filoxera e aos nematóides *Meloidogyne* spp. e *Xiphinema* spp., e atualmente está sendo avaliado por seu potencial como porta-enxerto tolerante ao *Grapevine fanleaf virus* (GFLV).

O Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Uva e Vinho vêm desenvolvendo porta-enxertos híbridos de *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia* que apresentaram compatibilidade para enxertia com espécies comerciais de videira e resistência em campo naturalmente infectado com pérola-da-terra, entretanto estes porta-enxertos ainda não estão disponíveis comercialmente (CAMARGO *et al.*, 2008). Dalbó (2008) testou os porta-enxertos EEV 793-5 (*Vitis labrusca* cv. Isabel x *Vitis rotundifolia*), Dog Ridge (*Vitis champinii*), Salt Creek (*Vitis champinii*), VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) e Paulsen 1103 numa área com histórico de elevada incidência de pérola-da-terra e constatou que a porcentagem de plantas mortas ou com sintomas graves foi de 9, 12, 44, 46 e 88%, respectivamente.

O histórico da viticultura vem mostrando a importância da diversificação de porta-enxertos, além da necessidade de cultivares porta-enxerto melhoradas. A utilização generalizada de um único porta-enxerto para todas as cultivares copa provavelmente não atende às características peculiares de cada cultivar, impedindo que a planta manifeste todo o seu potencial produtivo, além de constituir-se em inconveniente problema no caso de moléstias endêmicas (LEÃO, 2001). Isto leva à preocupação com o melhoramento genético que poderá contribuir para a seleção de porta-enxertos adaptados e com tolerância e/ou resistência, aos principais agentes causais do declínio e morte de plantas de videira.

2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO EM VIDEIRA

O melhoramento genético de plantas com interesse agrônomo visa fundamentalmente obter cultivares capazes de reunir características como resistência a fatores bióticos ou abióticos, associados a condições de adaptação e elevada produtividade. No caso da videira, o melhoramento genético é voltado para o desenvolvimento de novas cultivares copa e de porta-enxerto (CAMARGO, 2000).

As cultivares desenvolvidas em programas de melhoramento seja através de métodos clássicos ou de ferramentas biotecnológicas, precisam atender aos três principais segmentos de uma cadeia produtiva: produtores, distribuidores e consumidores. Os produtores anseiam

por cultivares que apresentem maior produtividade e estabilidade de produção, sejam de fácil manejo nos tratos culturais e adaptadas às condições climáticas adversas da região para onde foi desenvolvida. Os distribuidores desejam cultivares que resistam ao manuseio e ao transporte e, finalmente, os consumidores exigem videiras de melhor qualidade. Portanto, novas cultivares somente serão aceitas se apresentarem, para os diversos segmentos da cadeia produtiva, algumas vantagens em relação às já existentes no mercado.

No melhoramento da videira pode-se dispor de vários métodos, procedimentos e estratégias, os quais podem ser usados isoladamente ou em conjunto, complementando uns aos outros, possibilitando uma maior eficiência nos trabalhos.

A introdução é um método bastante antigo e ainda continua sendo praticado até hoje como fonte para enriquecimento da variabilidade genética. Porém, como método de melhoramento para a obtenção de novas cultivares é muito limitado. A metodologia consiste basicamente em se introduzir materiais genéticos diversos (cultivares, seleções avançadas), que são diretamente avaliados e aqueles que demonstram melhor adaptação às condições da região alvo e apresentam as características desejadas pelo mercado, são lançados como novas cultivares (BORÉM, 2001). Na videira, a introdução tem sido bastante utilizada, não propriamente como método de melhoramento e sim, para a formação de coleções de trabalho para o estabelecimento de programas de melhoramento (CAMARGO, 2000).

A seleção das melhores plantas de *Vitis vinifera* vem ocorrendo desde tempos imemoriais e a maioria das videiras plantadas atualmente para vinho resultam destas seleções antigas, caracterizando o processo de seleção clonal, até hoje utilizado na videira. A seleção clonal baseia-se na ocorrência de mutações somáticas espontâneas que ocorre em tecidos da planta podendo promover variação no formato ou na cor da baga, que podem dar origem a plantas que mantêm as características originais da cultivar, mas oferecem novas características relacionadas à produção, qualidade do fruto ou resistência a doenças, contribuindo também para a descoberta e lançamento de cultivares de videira (LEÃO; BORGES, 2009). Como exemplos, no Brasil: a ‘Niágara Rosada’ é uma mutação de ‘Niágara Branca’; as cultivares ‘Rubi’, ‘Benitaka’ e ‘Brasil’ são mutações da ‘Itália’ (REGINA, 2004) e ‘Goethe Primo’ de ‘Goethe’ (SCHUCK *et al.*, 2010).

O método de seleção fenotípica individual, ou seleção massal, consiste na escolha das melhores progênies e avaliação das mesmas em experimentos com repetições. Após esta etapa realiza-se a seleção das progênies superiores e recombinação entre estas ou com outros tipos de progênies ou genótipos. É o método normalmente aplicado nas primeiras gerações de melhoramento que envolvem hibridações controladas, pois permite a rápida redução no

número inicial de genótipos gerados, tornando as etapas seguintes de avaliação e seleção mais eficientes (BRUCKNER, 2008).

A seleção recorrente geralmente é utilizada para contornar os problemas de base genética restrita e de perda da variabilidade que existe na seleção de clones superiores em espécies de propagação assexuada que são liberados como cultivares comerciais. O método consiste em melhorar o desempenho de populações, através do aumento das frequências dos alelos favoráveis dos caracteres sob seleção. Em síntese, este método envolve a obtenção de progênies através de polinização livre, cruzamentos controlados ou autofecundação, sua avaliação e o intercruzamento das melhores. Em videira, é utilizado na seleção de características de alta herdabilidade, como sabor das bagas, teor de sólidos solúveis e resistência a doenças (BRUCKNER, 2008).

Outro método não convencionalmente utilizado é a indução da poliploidia através de indutores como a colchicina, utilizada sobre gemas e meristemas da planta (POMMER, 2003).

Além dos métodos de seleção, processos que envolvem hibridação em videiras vêm proporcionando a obtenção de cultivares que combinam várias características como adaptação a ambientes específicos, produtividade, resistência a pragas e doenças, e a qualidade compatível com as diferentes exigências de mercado (CAMARGO; RITSCHER, 2008).

2.4.1 Hibridação controlada

A realização da hibridação tem por finalidade combinar, em um mesmo indivíduo, dois ou mais fenótipos desejáveis que se encontram em indivíduos diferentes. Através do cruzamento entre estes indivíduos, é gerada uma população com variabilidade genética. Posterior ao processo de hibridação, a seleção e a clonagem (propagação vegetativa) das melhores combinações, seguidas de avaliação clonal, podem resultar em novas cultivares (BORÉM, 2001).

O melhoramento da videira é baseado principalmente em hibridações controladas (BURGER; BOUQUET; STRIEM, 2009), sendo que os métodos mais utilizados são os cruzamentos biparentais e cruzamentos interespecíficos (LEÃO; BORGES, 2009).

Em fruteiras, uma das limitações deste procedimento, quando comparado às espécies anuais propagadas sexualmente, são o número de combinações híbridas que podem ser avaliadas, o número limitado de indivíduos que podem ser avaliados por ciclo, a baixa

previsibilidade dos resultados dos cruzamentos devido à alta heterozigosidade dos progenitores, além do tempo requerido para se completar um ciclo de seleção e do espaço físico requerido (BRUCKNER, 2008).

Na videira, além das dificuldades supramencionadas e da ocorrência de aborto do embrião em muitas cultivares, os trabalhos de emasculação, polinização manual e cuidados pós-polinização, que são requeridos para o sucesso da hibridação, são também bastante difíceis e de baixa eficiência em termos de pegamento de frutos (ALLEWELDT; POSSINGHAM, 1988). Contudo, estudos têm sido realizados visando simplificar esses procedimentos e aumentar sua eficiência (VALDEZ, 2005; YANG *et al.*, 2007).

No processo de hibridação artificial alguns fatores devem ser levados em consideração como o período de florescimento e a biologia floral dos progenitores e a viabilidade do pólen. Mullins; Bouquet; Williams (1992) comentam que os fatores ambientais influenciam no período de florescimento das cultivares de videira. Foram encontradas diferenças substanciais nos requisitos de temperatura e intensidade luminosa entre cultivares de diferentes origens geográficas (DUNN; MARTIN, 2000; PETRIE; CLINGELEFFER, 2005). As cultivares ‘Riesling Renano’ e ‘Shiraz’ iniciaram a formação de primórdios de inflorescência à temperatura de 20 °C, mas a cultivar ‘Moscatel de Alexandria’ necessitou para esta diferenciação de 25 a 28 °C (SRINIVASAN; MULLINS, 1981). Normalmente, cultivares americanas produzem inflorescências a temperaturas mais baixas (21 a 22 °C) do que cultivares de *Vitis vinifera* (27 a 28 °C) (MULLINS; BOUQUET; WILLIAMS, 1992). Temperaturas amenas entre 20 a 30 °C são necessárias para uma ótima floração (WINKLER *et al.*, 1974). A combinação de temperaturas excessivas e baixa umidade (abaixo de 45%) são prejudiciais para o florescimento. Sob condições de chuva a caliptra não consegue abrir e geralmente fica presa no topo do pistilo, resultando em uma baixa polinização (KOZMA, 2003; MAY, 2004).

Além disso, para que ocorra à deiscência das flores, é necessário que as anteras estejam secas. É importante que as condições ambientais estejam quentes e secas. No entanto, quando as condições ambientais estão muito secas e há muito vento, o fluido do estigma irá secar e o pólen não conseguirá se aderir a ele. Para um ótimo crescimento do tubo polínico, é necessário que as temperaturas estejam suficientemente altas para permitir uma rápida penetração no estilete a fim de alcançar a micrópila. Condições climáticas desfavoráveis estendem o período de florescimento. Chuvas antes e durante o florescimento impedem a liberação da caliptra, causando a queda das flores sem a sua abertura (VASCONCELOS *et al.*, 2009).

Os progenitores masculinos devem produzir pólen viável em quantidade e qualidade para garantir a produção de sementes viáveis (NEVES; MACHADO; OLIVEIRA, 1997). O pólen permanece viável por vários dias após a queda da caliptra (HEAZLEWOOD; WILSON, 2004). As inflorescências são colhidas antes da antese total, retirando-se aquelas abertas, levadas para o laboratório e peneiradas para separar a caliptra das anteras. As anteras devem ser secas à sombra, em temperatura ambiente, para liberação do pólen. Quando usado, até um prazo de aproximadamente 10 dias, o pólen pode ser conservado em dissecador contendo sílica gel e mantido num refrigerador. Para períodos mais longos é indicada a conservação à temperatura de -12 °C, com umidade relativa de 28%. Nestas condições, tem sido possível a conservação do pólen por um período de até quatro anos (CAMARGO, 2000).

Mullins; Bouquet; Williams (1992) relatam que o conhecimento das diferenças entre cultivares, em relação à biologia floral e receptividade do estigma, é essencial para a escolha adequada dos progenitores femininos em um programa de melhoramento, envolvendo hibridação controlada.

Como geralmente os cruzamentos são feitos com genótipos hermafroditas, a emasculação ou castração das flores do progenitor feminino deve ser feita quando as inflorescências apresentarem as primeiras flores abertas, sendo que estas devem ser eliminadas (LEÃO; BORGES, 2009). Além disso, deve-se cuidar para não traumatizar o estigma, fato que pode levar à sua oxidação e perda (POMMER, 2003). A cobertura dos cachos com sacos de celofane ou de papel vegetal logo após a emasculação é um procedimento simples e efetivo para evitar a contaminação por pólen estranho (ALLEWELDT; POSSINGHAM, 1988).

Em videira, Reisch e Pratt (1996) afirmam que o estigma encontra-se receptivo quando seu tecido epidérmico secreta uma solução de açúcar do canal estilar formando uma pequena gotícula na ponta do estigma. Flores que não secretam essa solução não se fecundam e, mais tarde, secam e caem. Segundo Alleweldt e Possingham (1988), normalmente durante dois a três dias após a emasculação os estigmas estão receptivos, sendo recomendável que a polinização seja realizada pelo menos por dois a três dias consecutivos, visando à obtenção de um melhor índice de fecundação. Estes mesmos autores relatam que, o horário de polinização é um dos fatores fundamentais para o sucesso na hibridação controlada.

Hibridações de espécies de *Euvitis* com *Vitis rotundifolia* vem sendo realizadas por muitos anos (JELENKOVIC; OLMO, 1968; OLMO, 1971, 1986; GOLDY, 1992; REISCH; PRATT, 1996; LU; SCHELL; RAMMING, 2000; BOUQUET *et al.*, 2000). Entretanto, o número de plântulas híbridas obtidas tem sido baixo, principalmente quando se utiliza *Vitis*

rotundifolia como o parental feminino (OLMO, 1971). Wylie (1871, citado por Smith, 2010), relatou que *Vitis rotundifolia* não poderia ser fertilizada por pólen de *Vitis vinifera*, mas que o cruzamento recíproco seria possível. Já Jelenkovic e Olmo (1968) afirmaram que é possível a realização destes cruzamentos, sendo necessário pelo menos 10.000 eventos a mais de fertilização com pólen de *Vitis vinifera*. A dificuldade na obtenção destes híbridos pode estar associada a fatores genéticos de incompatibilidade ou a barreiras de pré-fertilização como a inibição do crescimento do tubo polínico, a falta de germinação dos grãos de pólen e a produção de substâncias inibidoras no pistilo das cultivares de *Vitis rotundifolia* que impedem a fertilização (LU; LAMIKANRA, 1996; LU; SCHELL; RAMMING, 2000). Entretanto, a grande resistência de *Vitis rotundifolia* a praticamente todas as pragas e doenças conhecidas e os bons resultados já obtidos com seus híbridos enxertados com algumas cultivares comerciais, fazem com que essa linha de trabalho não seja descartada.

2.5 BIOTECNOLOGIA APLICADA AO MELHORAMENTO

A incorporação de técnicas de biotecnologia, a exemplo da cultura de tecidos, resgate de embriões, fusão de protoplastos, transformação genética, biologia molecular, entre outras, em programas de melhoramento da videira, permite tanto facilitar e acelerar a utilização da variabilidade disponível, como utilizar germoplasma ainda não explorado, criando novas combinações que poderão ser incluídas em programas de melhoramento convencional, ou resultar em cultivares totalmente novas. A regeneração de plantas através de técnicas de cultivo de tecidos ou células *in vitro*, como a organogênese ou embriogênese somática, é um requerimento primário para a utilização de tecnologias em genética molecular em qualquer espécie de planta (BURGER; BOUQUET; STRIEM, 2009).

A técnica de resgate de embriões é utilizada pela maioria dos grupos de pesquisa na área de melhoramento de videira com enfoque na obtenção de cultivares apirênicas, realizando cruzamentos diretos entre genitores apirenos por apresentar alta eficiência e aumentar a frequência de indivíduos sem sementes na progênie (LEÃO; BORGES, 2009). Além disso, também tem sido utilizada para melhorar o rendimento nos cruzamentos interespecíficos *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* (PATEL; OLMO, 1955; XU; LU, 2004).

Segundo Liu, Xu e Deng (2005) a hibridação somática, via fusão de protoplastos tem potencial de aplicação no melhoramento genético em casos de alta incompatibilidade sexual

ou barreiras de reprodução entre as espécies não relacionadas, inclusive pelas combinações dos genomas nuclear e/ou citoplasmático. Dessa maneira, a hibridação somática abriu inúmeras possibilidades para manipulações do genoma tais como: superação de incompatibilidades sexuais, produção de anfidiplóides, transferência de parte do genoma de uma espécie para outra, transferência do DNA citoplasmático para a produção de plantas macho-estéreis, produção de plantas resistentes a estresses ambientais ou pragas e doenças. Para a videira a regeneração de plantas a partir de protoplastos foi obtida para as cultivares de *Vitis vinifera* ‘Seyval Blanc’ (REUSTLE; HARST; ALLEWELDT, 1994), ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Syrah’ (BONA *et al.*, 2006).

A transformação genética é a forma atual mais eficiente para introduzir uma nova característica agrônômica em cultivares elites sem alterar a complexidade genética do genótipo e a identidade varietal. Estes aspectos são especialmente importantes na agroindústria de vinhos que utilizam, em todo o mundo, cultivares antigas e tradicionais de *Vitis vinifera* (LEÃO; BORGES, 2009). Embora alguns pesquisadores façam uso da técnica de biobalística para inserção do gene de interesse (VIDAL *et al.*, 2003), a maioria utiliza a transformação via *Agrobacterium* em videira (BURGER; BOUQUET; STRIEM, 2009). Os primeiros pesquisadores a obter plantas transformadas foram Mullins, Tang e Facciotti (1990) com o porta-enxerto ‘St. George’ (*Vitis rupestris*) e Mauro *et al.* (1995) com a cultivar copa ‘Chardonnay’ (*Vitis vinifera*). Embora cultivares melhoradas tenham sido obtidas, são necessários muitos anos de avaliação em campo após a aprovação dos órgãos e autoridades legais, e a utilização comercial dessas novas cultivares encontra ainda grande resistência por parte dos consumidores e da indústria (LEÃO; BORGES, 2009).

2.5.1 Marcadores moleculares

Existem duas classes de marcadores genéticos: os morfológicos e os moleculares (KUMMAR, 1999). Inicialmente, a identificação de cultivares de videira era baseada na ampelografia que é a análise e comparação de características morfológicas das folhas, ramos, cachos e bagas (INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE, 1997). Entretanto, o número de especialistas em ampelografia é restrito e o tempo de formação nesta área é enorme. Adicionalmente, a expressão das características morfológicas é influenciada por fatores ambientais e pela biologia individual da planta. Além disso, plantas jovens com

quatro a cinco anos de vida são impossíveis de identificar, pois elas não apresentam as típicas características de plantas adultas. Além disso, algumas cultivares geneticamente relatadas são morfologicamente similares e difíceis de diferenciar por comparação visual (ARADHYA *et al.*, 2003).

Por outro lado, o desenvolvimento e aplicação de tecnologias baseadas em marcadores moleculares fornecem ferramentas únicas capazes de revelar polimorfismos ao nível de sequências de DNA, suficientes para discriminar a variação genética existente entre indivíduos e dentro de populações, em função do alto grau de precisão e informação que pode ser obtido pelo *fingerprinting* molecular, superando a maioria das limitações. O *fingerprinting* molecular ou a genotipagem molecular é a impressão digital de um determinado genótipo, que permite a obtenção de seu perfil genético e sua diferenciação inequívoca de outro genótipo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

No melhoramento de plantas, os marcadores moleculares possibilitaram um avanço na identificação de híbridos em várias espécies de plantas cultivadas (OLIVEIRA; CRISTOFANI; MACHADO, 2001; FALEIRO; PIRES; LOPES, 2003; SILVA *et al.*, 2005; BASTIANEL *et al.*, 2006), especialmente porque acessam diretamente o genótipo da planta, evitando, assim, a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre este. Além disso, podem ser analisados a partir de amostras de tecidos de qualquer parte da planta e em qualquer estágio de desenvolvimento, acelerando o processo de obtenção de novas cultivares e reduzindo os custos e a mão-de-obra. O uso de marcadores moleculares para identificar plantas oriundas de cruzamentos é muito importante, pois assim, plantas indesejáveis ou de autopolinização podem ser identificadas e descartadas na primeira geração (CORDEIRO *et al.*, 2006).

Técnicas biotecnológicas, como os marcadores moleculares são de grande utilidade, principalmente no processo de caracterização e seleção precoce de genótipos resistentes a pragas e doenças. Algumas estratégias vêm sendo utilizadas com sucesso para localizar marcadores ligados a genes de importância econômica e posterior utilização destes em programas de melhoramento. Dentre elas pode-se destacar a construção de mapas genéticos, detecção de locos de características quantitativas (QTLs) e a seleção assistida por marcadores (MAS) (DEKKERS; HOSPITAL, 2002).

O potencial de uso de marcadores moleculares para a caracterização de cultivares com fins de proteção é enorme, como têm revelado trabalhos com diversas espécies vegetais (MILACH, 1998).

Os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridação ou amplificação do DNA.

Entre os identificados por hibridação destacam-se: os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), sendo o polimorfismo evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade; e os Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats* – Seqüências Adjacentes que se repetem em Número Variável), onde o princípio de obtenção e detecção deste tipo de marcador é essencialmente o mesmo utilizado para RFLP (MILACH, 1998).

Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* - DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), onde é usado um único *primer*, mais curto, normalmente com dez nucleotídeos, e de seqüência arbitrária, para realizar a amplificação. Esta estratégia elimina a necessidade do conhecimento prévio dos fragmentos a serem amplificados. Suas desvantagens são a baixa reprodutibilidade das informações geradas e o baixo conteúdo informativo por loco. Além disso, a característica dominante deste marcador impede a distinção entre homozigotos e heterozigotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions* – Regiões Amplificadas Caracterizadas por Seqüências) e o STS (*Site Tagged Sequence*), que são amplificados com *primers* específicos, são desenvolvidos com base em seqüências já mapeadas ou caracterizadas. Muitos desses primers são obtidos da conversão de marcadores RAPD e RFLP em SCAR e STS, respectivamente. Essa conversão em geral diminui o nível de polimorfismo obtido por SCAR e STS, podendo ser amenizado com a digestão com enzimas de restrição dos produtos amplificados e sequenciamento de bandas monomórficas. As técnicas de SCAR e STS são muito similares e as diferenças entre elas muito tênues: enquanto SCAR pode amplificar regiões de DNA que contenha seqüências repetitivas a STS amplifica DNA de cópia simples. Com exceção do tipo de primer utilizado, essas técnicas são muito semelhantes à de RAPD, sendo mais consistentes, porém envolve o desenvolvimento de *primers*, o que eleva o custo (MILACH, 1998).

O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), onde a análise é baseada na amplificação seletiva via PCR de um subconjunto de fragmentos genômicos, gerados após digestão com uma enzima de corte raro, combinada com uma enzima de corte freqüente. A principal vantagem desta tecnologia é

o grande número de fragmentos que são gerados simultaneamente, aumentando o poder de detecção de variabilidade genética. Em videira, no caso específico da identificação clonal e seleção assistida das cultivares, faz-se necessário a construção de mapas genéticos altamente saturados. Nestes casos, os AFLPs são ferramentas poderosas devido ao grande número de marcadores que podem ser gerados por indivíduo (DALBÓ *et al.*, 2000). Os dados revelados têm natureza binária (ausência ou presença), portanto, marcadores AFLP são marcadores dominantes e com baixo conteúdo de informação genética por loco (MILACH, 1998).

Os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* - Polimorfismo de Nucleotídeo Único) que constituem os marcadores moleculares mais recentes na análise genética e são resultantes de mutações pontuais que podem ter origem em erros de incorporação de bases durante a replicação do DNA, ou serem induzidas pelas condições ambientais. A elevada frequência de SNPs observadas em regiões codantes e não codantes de videira torna este marcador potencialmente muito útil para o desenvolvimento de mapas físicos e a sua integração com os mapas genéticos (LEÃO, 2008).

E os marcadores microssatélites, também denominados SSRs (*Simple Sequence Repeats* – Repetições de Sequências Simples), que são sequências de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem lado a lado na fita de DNA no genoma dos eucariotos. Os marcadores microssatélites apresentam muitas vantagens: são co-dominantes e podem ser representados pelo tamanho de seus alelos em pares de bases (pb), tornando-os um marcador robusto, cujos dados podem ser comparados entre laboratórios e formatados em bases de dados (SEFC *et al.*, 2001), estão amplamente distribuídos pelo genoma de eucariotos, são multialélicos, de menor custo, não demandam de radioatividade, além de serem geralmente muito polimórficos. Além disso, *primers* marcados com fluorescência possibilitam sistemas múltiplos de detecção (multiplex), e conseqüentemente, permitem a avaliação de um grande número de locos por indivíduo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A principal desvantagem desses marcadores é o alto custo inicial que envolve o desenvolvimento de pares de iniciadores específicos, o qual é um processo elaborado e caro. Mas uma vez que os iniciadores estejam disponíveis, o custo da técnica assemelha-se à de RAPD, com exceção de que os géis para a visualização dos fragmentos de DNA devem ser de poliacrilamida e esses são de custo mais elevado. Além disso, a ocorrência de alelos nulos, resultado de uma mutação no sítio de anelamento do *primer*, pode ser considerada outra desvantagem dos microssatélites. Como consequência não há formação de uma banda e heterozigotos podem ser equivocadamente interpretados como homozigotos (LEÃO, 2008).

Os inúmeros métodos desenvolvidos nas últimas décadas diferem em relação aos requerimentos técnicos, nível de polimorfismo detectado, reprodutibilidade, custo, possibilidade de automação e organização de base de dados (KARP, 2002). Contudo é difícil comparar as diferentes técnicas e determinar qual delas é a melhor e para que propósito, pois cada método apresenta vantagens e desvantagens (KARP *et al.*, 1997).

2.5.1.1 Marcadores microssatélites em videira

Thomas e Scott (1993) foram os primeiros pesquisadores a usar os microssatélites para identificar cultivares de videira. Estes autores mostraram que os microssatélites foram abundantes e continham polimorfismo genético capaz de caracterizar e identificar as cultivares de *Vitis vinifera*. Além disso, os microssatélites se mantiveram conservados para outras espécies de *Vitis* e *Muscadinia* (THOMAS; SCOTT, 1993). Eles também demonstraram através de análises filogenéticas que os microssatélites são co-dominantes e comportam-se de acordo com a herança mendeliana simples, confirmando sua adequação para o mapeamento genético (THOMAS; SCOTT, 1994). A partir daí, outros grupos relacionados à videira iniciaram pesquisas com microssatélites, resultando no desenvolvimento de *primers* específicos para *Vitis* (BOWERS *et al.*, 1996; BOWERS; DANGL; MEREDITH, 1999; SEFC *et al.*, 1999; LEFORT *et al.*, 2002), culminando com a formação em 1997, do *Vitis Microsatellite Consortium* (VMC), composto por 21 grupos de pesquisa em 12 países, e que resultou na identificação de 333 novos marcadores microssatélites obtidos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas (SEFC *et al.*, 2001; RIAZ *et al.*, 2007b). O desenvolvimento de um grupo de marcadores microssatélites de referência para identificação de cultivares foi proposto mediante a utilização de seis locos microssatélites (THIS *et al.*, 2004). Este grupo de marcadores VVS2 (THOMAS; SCOTT, 1993), VVMD5, VVMD7 (BOWERS *et al.*, 1996), VVMD27 (BOWERS; DANGL; MEREDITH, 1999), VrZAG62 e VrZAG79 (SEFC *et al.*, 1999) foram utilizados por esse projeto para a avaliação de 13 cultivares européias de referência e são amplamente recomendados pela Organização Internacional da Uva e do Vinho para a genotipagem de videira (OIV, 2007). Além disso, o VMC permitiu a criação de diversos mapas genéticos (DALBÓ *et al.*, 2000; DOLIGEZ *et al.*, 2002; GRANDO *et al.*, 2003; ADAM-BLONDON *et al.*, 2004; DOUCLEFF *et al.*, 2004; RIAZ *et al.*, 2006; LOWE; WALKER, 2006; DI GASPERO *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2008).

cobrindo a maior parte do genoma da videira. Estes mapas permitiram a identificação e a nomeação de um sistema para os 19 cromossomos da videira.

Em coleções de germoplasma é útil verificar se os genótipos mantidos estão corretamente identificados. A análise de microssatélites pode favorecer a confirmação e definição de sinônimos, ou seja, podem identificar genótipos iguais conhecidos por diferentes nomes. Por exemplo, no perfil dos microssatélites de uvas viníferas italianas foram encontrados sinônimos entre as cultivares ‘Refosco di faedis’ e ‘Refoscone’ (CIPRIANI *et al.*, 1994), assim como entre as cultivares ‘Favorita’, ‘Pigato’ e ‘Vermentino’ (BOTTA *et al.*, 1995). Na parte Oriental-Sul da Áustria, uma cultivar denominada de ‘Morillon’ foi considerada um sinônimo da ‘Chardonnay’, pois o perfil dos microssatélites das duas cultivares mostrou-se idêntico (SEFC *et al.*, 1998). Thomas, Cain e Scott (1994), estudando os porta-enxertos 5A Teleki e 5BB Kober demonstraram que eles possuem o mesmo perfil de DNA, indicando que os dois diferentes nomes foram equivocadamente dados ao mesmo porta-enxerto no passado. Martín *et al.* (2006) analisando 56 tradicionais cultivares da Espanha e Portugal, detectou que a variedade ‘Tinta Roriz’ de Portugal é um sinônimo da ‘Tempranillo’ da Espanha.

No caso de estudos de pedigree de cultivares viníferas, o primeiro e o mais surpreendente dos resultados foi a descoberta de que ‘Cabernet Sauvignon’ descende de ‘Cabernet Franc’ e ‘Sauvignon Blanc’ (BOWERS; MEREDITH, 1997). No exame da cultivar conhecida como ‘Petit Syrah’ na Califórnia, foi demonstrado que a maioria dos acessos com este nome é idêntico ao da cultivar ‘Durif’ (Meredith *et al.*, 1999). Estudos com 25 locos microssatélites confirmaram e identificaram a cultivar ‘Syrah’ como uma provável parente da de ‘Durif’. Boccacci *et al.* (2005) analisando oito locos microssatélites identificou graus de parentesco entre as cultivares ‘Fortana’ e ‘Lambrusco Maestri’ e entre ‘Uva Tosca’ e ‘Lambrusco Montericco’.

Marcadores microssatélites também têm sido utilizados para a diferenciação de clones intravarietais, embora em geral um maior número de locos microssatélites sejam necessários para identificar as variações. Schuck *et al.* (2010) utilizaram 10 locos microssatélites para caracterizar dois clones, denominados como ‘Goethe Primo’ e ‘Goethe Clássica’ do município de Urussanga (SC) e concluíram que estes clones apresentam o mesmo genótipo, apesar das evidentes diferenças fenotípicas entre eles, representando um caso de variação somaclonal.

Em porta-enxertos, os marcadores microssatélites têm sido utilizados efetivamente para caracterizar coleções e identificar acessos com falta de informação (DE ANDRÉS *et al.*,

2007; RIAZ *et al.*, 2007a), analisar relações genéticas (THIS; CUISSET; BOURSIQUOT, 1997) e corrigir erros de parentesco (LAUCOU *et al.*, 2008).

Leão (2008) utilizou marcadores SSRs para caracterizar a variabilidade genética de 47 acessos de uva de mesa e classificou as referidas cultivares em seis grupos distintos. Este mesmo autor, através das distâncias genéticas, elegeu os mais divergentes para serem utilizados em cruzamentos visando o caráter apirenia.

Schuck *et al.* (2009) analisaram também a diversidade genética entre as cultivares de videira de Santa Catarina por meio de marcadores SSRs, o qual possibilitou a separação das cultivares em 3 grupos: i) cultivares européias de origem francesa, como ‘Cabernet Franc’, ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Carmenère’, ‘Merlot’, ‘Sauvignon Blanc’, ‘Pinot Noir’, e ‘Chardonnay’; ii) cultivares italianas, como ‘Sangiovese’, ‘Ancellota’, ‘Syrah’, ‘Marzemino’, ‘Refosco’, ‘Nebbiolo’, e ‘Teroldego’; iii) cultivares e híbridos americanos, como ‘BRS Clara’, ‘BRS Morena’, ‘Centennial’, ‘BRS Linda’, ‘Fantasya’, ‘Isabel’, ‘Bordô’, ‘Marta’, ‘Concord Precoce’, ‘Niágara’, ‘Rubia’, ‘Cristal’, ‘VR043-43’, ‘Paulsen 1103’, ‘Goethe’, ‘Catawba’, ‘IAC-766’, ‘IAC-313’, entre outras.

Os microssatélites podem ser utilizados também como uma importante ferramenta para fornecer uma identificação direta da variabilidade genética e, neste sentido, indicar genitores para a produção de híbridos específicos (CAIXETA *et al.*, 2003). A viabilidade da utilização da divergência genética como critério de seleção de genitores para cruzamentos foi demonstrado em diversas espécies, entre elas, a videira (COSTA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SILVA, 2006).

3 CAPÍTULO I
OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS E ANÁLISE MOLECULAR POR
MARCADORES MICROSSATÉLITES EM VIDEIRA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da hibridação interespecífica entre *Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia* por meio de cruzamentos controlados e confirmar a ocorrência da fecundação cruzada e a identidade dos parentais utilizando marcadores microssatélites. Foram realizadas 60 combinações de cruzamentos. Nos cruzamentos em que *Vitis rotundifolia* foi utilizada como parental feminino, nenhum híbrido verdadeiro foi obtido. Nos cruzamentos recíprocos, 114 plântulas foram identificadas como verdadeiros híbridos de *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*. Foi verificada autofecundação nos cruzamentos diretos e nos recíprocos. Foram confirmados os cruzamentos 'Bordo' x ('Carlos', 'Magnolia', 'Regale' e 'Roanoke'), e 'Isabel' x ('Bountiful', 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' e 'Roanoke'), com 49 e 65 híbridos verdadeiros, respectivamente. Os 15 marcadores avaliados revelaram que dois parentais de *Vitis rotundifolia* apresentaram o mesmo perfil genético, o que indica provável erro de plantio. O sucesso da hibridização depende principalmente da espécie e da cultivar utilizada como parental feminino. Os marcadores microssatélites são excelentes ferramentas para confirmar a paternidade de híbridos interespecíficos F1 e para determinar a correta identidade de cultivares de *Vitis rotundifolia*.

Palavras-chaves: *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis labrusca*, identificação híbrida, cruzamentos interespecíficos, SSRs.

OBTAINING INTERSPECIFIC HYBRIDS AND MOLECULAR ANALYSIS BY MICROSATELLITE MARKERS IN GRAPEVINE

ABSTRACT

The objective of this work was to assess the potential of interspecific hybridization of *Vitis labrusca* and *Vitis rotundifolia* by using controlled crosses and confirm the occurrence of cross-fertilization and the identity of the parental genotypes using microsatellite markers. Sixty cross combination were made. In crosses in which *Vitis rotundifolia* was used as the female parent, no true hybrids were obtained. In the reciprocal crosses, 114 seedlings were identified as true *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia* hybrids. Self-fertilization occurred in direct and in reciprocal crosses. The crossings between 'Bordo' x ('Carlos', 'Magnolia', 'Regale' and 'Roanoke'), and between 'Isabel' x ('Bountiful', 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' and 'Roanoke') were confirmed, with 49 and 65 true hybrids, respectively. The 15 markers evaluated showed that two *Vitis rotundifolia* parental genotypes had the same fingerprint profile, indicating a likely planting error. The success of hybridization depends mainly on the species and on the cultivar used as the female parent. SSR markers are efficient tools to confirm the paternity of interspecific F1 hybrids and to determine the correct identity of *Vitis rotundifolia* cultivars.

Key-words: *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis labrusca*, hybrid identification, interspecific crosses, SSRs.

3.1 INTRODUÇÃO

O uso de porta-enxertos na viticultura já é uma prática bastante generalizada. Desde a introdução da filoxera [*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch, 1855)] no Continente Europeu, os viticultores começaram a enxertar cultivares copa de *Vitis vinifera* em porta-enxertos criados a partir de cultivares americanas resistentes de *Vitis*, particularmente *Vitis rupestris* Scheele, *Vitis riparia* Michx. e *Vitis berlandieri* Planch. Todavia, além da resistência à filoxera, um bom porta-enxerto deve possuir adaptação as condições locais de clima e solo, facilidade de enraizamento, afinidade com o enxerto, bom desenvolvimento vegetativo, grande longevidade e resistência a outras pragas e moléstias de solo (REYNOLDS; WARDLE, 2001).

Nas regiões vitícolas do Sul do Brasil, diferentes porta-enxertos híbridos de espécies americanas têm sido usados, sendo alguns tradicionais, como o Solferino, SO4, Kobber 5BB e 101-14 (*V. berlandieri* X *V. riparia*), e outros de introdução mais recente, como o Paulsen 1103 e R99 (*V. berlandieri* X *V. rupestris*). Embora estes porta-enxertos tenham sido recomendados devido a sua resistência a *Fusarium oxysporum* Schlecht, eles são os mais sensíveis à principal praga de solo da videira desta região, a pérola-da-terra [*Eurhizococcus brasiliensis*, Hempel (Hemiptera: Margarodidae)] (BOTTON; COLLETA, 2010; BOTTON *et al.*, 2010).

Os genótipos de muscadinia [*Vitis rotundifolia* Michx. Syn. *M. rotundifolia* (Michx.) Small] são resistentes a pérola-da-terra (BOTTON; COLLETA, 2010). Esta espécie tem sido classificada como tendo o maior nível de resistência às pragas e doenças da videira (KELLOW *et al.*, 2002) e consequentemente tem sido utilizada mundialmente em muitos programas de melhoramento para criação de porta-enxertos resistentes. *Vitis rotundifolia* (2n=40) não é empregada diretamente como porta-enxerto devido à falta de compatibilidade de enxertia com as cultivares comerciais de *Vitis spp.* (2n=38) (GOLDY; ONOKPISE, 2001) e a incapacidade de formar raízes a partir de estacas dormentes (OLMO, 1971). Entretanto, foram criados híbridos interespecíficos com *Vitis spp.* que apresentam compatibilidade (OLMO, 1986). Alguns híbridos resultantes destes cruzamentos, como VRO39-16 e VRO43-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*), desenvolvidos pelo programa de melhoramento da Universidade da Califórnia, Davis (WALKER *et al.*, 1991) são atualmente os recomendados pela pesquisa em áreas infestadas por pérola-da-terra (DALBÓ; PERUZZO; SCHUCK, 2007). No entanto, VRO43-43 não é mais recomendado em áreas infestadas por filoxera e VRO39-16 tem sido recomendado apenas para uso em áreas infestadas pelo vírus dos

entrenós curtos da videira (*grapevine fanleaf virus*), pois a resistência destes porta-enxertos a filoxera é questionável (SMITH, 2010). Além disso, a resistência do porta-enxerto VRO43-43 a pérola-da-terra foi recentemente colocada em dúvida (DE CÉSARO, 2008). Portanto, sabendo-se que a resistência a filoxera deve estar no *background* de todos os novos porta-enxertos e que o uso de *Vitis vinifera* no desenvolvimento de porta-enxertos tem sido quase invariavelmente decepcionante, verifica-se a necessidade de desenvolver porta-enxertos com ampla resistência a pérola-da-terra e com resistência durável a filoxera, o que pode ser feito por meio do melhoramento genético.

A hibridação de espécies americanas com *Vitis rotundifolia* é uma alternativa à hibridação com *Vitis vinifera*. Entre as muitas espécies americanas, as cultivares híbridas de *Vitis labrusca* são bem adaptadas as condições vitícolas do Sul do Brasil. Estes híbridos são comumente plantados em pé-franco e alguns mostram resistência a patógenos de solo, como *F. oxysporum* (GARRIDO; SÔNEGO; GOMES, 2004), além de resistência a filoxera. Entretanto, estes híbridos não apresentam o mesmo grau de resistência à pérola-da-terra que as cultivares de *Vitis rotundifolia*.

No melhoramento, marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramenta para reduzir o tempo requerido para desenvolver uma nova cultivar. Entre as muitas utilidades dos marcadores moleculares, a identificação de híbridos verdadeiros é uma ferramenta muito útil em programas de melhoramento. Por isso, o uso de marcadores moleculares para identificar plantas oriundas de cruzamentos é muito importante. Assim, plantas indesejáveis ou de autopolinização podem ser identificadas e descartadas na primeira geração (CORDEIRO *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da hibridação interespecífica entre *Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia* por meio de cruzamentos controlados e confirmar a ocorrência da fecundação cruzada e a identidade dos parentais utilizando marcadores microssatélites.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os cruzamentos foram realizados na Estação Experimental do Canguiri, da Universidade Federal do Paraná, Pinhais, PR, Brasil (25°25'S, 49°08"W, a 930 m de altitude), e na Estação Experimental de Videira (27°0'5"S, 51°7'60"W, a 750 m de altitude) e Campos

Novos, SC, Brasil (27°23'60"S, 51°12'0"W, a 947 m de altitude), da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Os cruzamentos controlados foram feitos em ambas as direções entre *Vitis rotundifolia* cultivares ‘Bountiful’, ‘Carlos’, ‘Magnolia’, ‘Magoon’, ‘Regale’ e ‘Roanoke’, e *Vitis labrusca* cultivares ‘Bordo’, ‘Goethe’, ‘Isabel’, ‘Marta’ e ‘Niagara Rosada’, em 2008 e 2009. Foram realizados sessenta combinações de cruzamentos. O número de cruzamentos controlados variou em função da disponibilidade de flores (Tabela 1 e Tabela 2). Foram utilizados marcadores microssatélites para confirmar a paternidade dos possíveis híbridos e a identidade dos genitores.

Os cruzamentos controlados foram realizados de acordo com Leão e Borges (2009). Os genitores femininos foram emasculados antes da antese total e ensacados com sacos de papel para evitar a contaminação com pólen estranho. O pólen foi coletado de inflorescências antes da antese total durante a manhã, eliminando-se as abertas. As anteras foram separadas da caliptra com uma peneira, colocadas em placas de Petri e secas a temperatura ambiente (20 a 25°C) por três dias. O pólen foi colocado em pequenos vidros, identificado e armazenado em um dessecador de vidro com sílica gel a 4°C. A polinização foi realizada com um pincel por três dias consecutivos durante o período da manhã quando o estigma do genitor feminino encontrava-se receptivo, e após as inflorescências foram cobertas com saco de papel.

As bagas foram colhidas individualmente de Janeiro a Abril de ambos os anos, devido a maturação desuniforme das mesmas. As sementes foram extraídas das bagas com auxílio de uma peneira, lavadas para remover a polpa, tratadas com uma solução fungicida de Cercobin 2 g.L⁻¹, colocadas em placas de Petri contendo vermiculita umidecida e estratificadas a 4°C por um período de 75 dias para quebra da dormência. As sementes foram semeadas em caixas contendo um substrato comercial esterilizado, Plantmax[®]. Quando as primeiras folhas verdadeiras começaram a aparecer, as plântulas foram transplantadas para vasos de plástico (125 cm³), contendo uma mistura de 2 Plantmax[®] : 1 solo: 1 húmus : 1 vermiculita, e mantidas em casa-de-vegetação.

O tecido foliar liofilizado dos genitores e híbridos da primeira geração foram homogeneizados com tampão de extração de DNA em sacos plásticos, utilizando-se um homogeneizador mecânico Homes 6 (Bioreba, Longmont, CO, USA). O DNA genômico foi extraído utilizando-se o protocolo CTAB descrito por Riaz *et al.* (2004). Na etapa final, foi adicionado 100 µL 1X Tris-EDTA aos pellets, e em seguida, o DNA foi armazenado a -20°C. A qualidade do DNA foi visualizada em gel de agarose 1,2%.

Para analisar o polimorfismo dos marcadores microssatélites no genótipo dos genitores, um grupo de 20 microssatélites foram testados nas cultivares de *Vitis rotundifolia* e

Vitis labrusca. Foi atribuída uma escala de qualidade, A, B, C ou D, para cada marcador: escala “A” foi atribuída para quatro marcadores (UDV41, UDV43, VrZAG62 e VVIN75) de boa qualidade, que apresentaram bandas visíveis e fáceis de distinguir em ambos os genitores; “B” para quatro marcadores de média qualidade (VVIM11, VVIC72, VVMD5 e VVMD31), que apresentaram bandas fracas e com manchas; “C” para dois marcadores (UDV76 e VVIP16) que apresentaram múltiplas bandas e; “D” para dez marcadores (UDV35, UDV111, VVIV05, VVIV21, UDV32, UDV35, UDV67, UDV124, VVIB68 e NVMCNG1) que apresentaram bandas manchadas e não reproduzíveis ou nenhum produto. Os quatro marcadores com escala “A” foram utilizados na avaliação de todas as populações para confirmar a origem híbrida das progênes. Para confirmar a identidade dos genitores utilizados nos cruzamentos, o perfil genético de cinco cultivares de *Vitis rotundifolia* foi comparado àqueles presentes na base de dados de referência para identificação de videira, mantida pela *Foundation Plant Service*, Universidade da Califórnia, Davis com 15 marcadores microsatélites. Entretanto, a cultivar ‘Roanoke’ não foi analisada devido a ausência do seu perfil genético na base de dados. A genotipagem molecular das cultivares de *Vitis labrusca* foi realizada em um estudo anterior por Schuck *et al.* (2009). Os marcadores microsatélites utilizados no presente estudo encontram-se na Tabela 4. As condições da PCR seguiram o protocolo de Riaz *et al.* (2004) com um volume final de 10 μ L, contendo 5 pmol de cada marcador, 2,5 mmol L⁻¹ de cada dNTP, 1 μ L 10X gold tampão PCR (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, EUA), 0,5U de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, EUA), 2 mmol L⁻¹ de MgCl₂ e 10 ng de DNA genômico. As amplificações foram conduzidas em um termociclador Peltier Thermal Cycler-200 (MJ research, Waltham, MA, EUA) ou Bio Rad iCycler (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O programa PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizado foi: 95 °C por 10 min para desnaturação do DNA e ativação da Taq DNA polimerase; 35 ciclos para amplificação distribuídos em 45 s a 94 °C, 45 s a 56 °C e 1 min a 72 °C; extensão final de 10 min a 72 °C; e resfriamento a 4 °C. Para separar os produtos da amplificação, os produtos PCR foram misturados com tampão de carregamento (98% de formamida, 10 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol e 0,05% xileno cianol) e aquecidos a 94 °C por 2 min antes de aplicar no gel de poliacrilamida 5%. A eletroforese foi realizada a 70 W por 2–3 h dependendo do tamanho dos fragmentos. Após, o gel foi submetido a uma série de lavagens para impregnação com nitrato de prata e revelação com carbonato de sódio, utilizando um kit comercial (Promega, Madison, WI, EUA). Foram considerados híbridos aqueles indivíduos que apresentaram um alelo da mãe e o outro alelo

do pai. Os géis foram analisados colocando-os sob luz branca, digitalizados em *scanner* e armazenados em arquivos digitais. Esta etapa

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 2008, 30 combinações de cruzamentos foram realizadas entre seis cultivares de *Vitis rotundifolia*, ‘Bountiful’, ‘Carlos’, ‘Magnolia’, ‘Magoon’, ‘Regale’ e ‘Roanoke’, e cinco cultivares de *Vitis labrusca*, ‘Bordo’, ‘Goethe’, ‘Isabel’, ‘Marta’ e ‘Niagara Rosada’. Um total de 14.775 flores foram emasculadas e polinizadas com pólen de *Vitis labrusca* e 217 bagas (1,5% vingamento de bagas) foram obtidas. Destas bagas, 427 sementes foram extraídas e 236 germinaram (Tabela 1). O número de bagas obtidas comparadas ao total de flores polinizadas foi extremamente baixo, indicando que estes cruzamentos foram ineficientes. Sendo assim, em 2009 não foram repetidos os cruzamentos utilizando *Vitis rotundifolia* como genitor feminino. Em 2008 e 2009, também foram realizados 30 combinações de cruzamentos recíprocos, *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*, e 9.398 flores de *Vitis labrusca* foram polinizadas produzindo 416 bagas (4,4% vingamento de bagas), 1.040 sementes e 342 plântulas (Tabela 2).

TABELA 1 - Cruzamentos, número de flores polinizadas, vingamento de bagas e número de plântulas na Estação Experimental do Canguiri, Pinhais, PR, Brasil, e na Estação Experimental de Videira, SC, Brasil, em 2008.

Genitor feminino <i>V. rotundifolia</i>	Genitor masculino <i>V. labrusca</i>	Nº de emasculações	Nº de bagas	Vingamento (%)	Nº de sementes	Nº de plântulas
'Bountiful' x	'Bordo'	720	16	2,2	39	32
	'Goethe'	560	1	0,2	1	1
	'Isabel'	560	22	3,9	47	38
	'Marta'	720	12	1,7	29	25
	'Niagara Rosada'	560	7	1,3	13	10
'Carlos' x	'Bordo'	50	0	0,0	0	0
	'Goethe'	300	6	2,0	17	14
	'Isabel'	150	0	0,0	0	0
	'Marta'	100	4	4,0	8	6
	'Niagara Rosada'	100	3	3,0	10	5
'Magnolia' x	'Bordo'	1.200	13	1,1	12	1
	'Goethe'	1.100	7	0,6	11	9
	'Isabel'	1.300	10	0,8	13	2
	'Marta'	1.000	6	0,6	19	9
	'Niagara Rosada'	1.300	12	0,9	8	3
'Regale' ⁽¹⁾ x	'Bordo'	780	33	4,2	74	31
	'Goethe'	645	6	0,9	12	4
	'Isabel'	720	19	2,6	37	13
	'Marta'	630	15	2,4	31	12
	'Niagara Rosada'	480	10	2,1	14	5
'Roanoke' x	'Bordo'	360	4	1,1	8	3
	'Goethe'	360	2	0,6	3	1
	'Isabel'	360	1	0,3	2	2
	'Marta'	360	6	1,7	14	4
	'Niagara Rosada'	360	2	0,6	5	6
Total		14.775	217	1,5	427	236

(1) Os resultados obtidos nos cruzamentos entre as cultivares de *V. labrusca* e 'Magoon' (*V. rotundifolia*) foram adicionados aos de 'Regale', já que o perfil genético de 'Magoon' é o mesmo de 'Regale' em todos os 15 marcadores.

TABELA 2 - Cruzamentos, número de flores polinizadas, vingamento de bagas e número de plântulas na Estação Experimental de Campos Novos e Videira, SC, Brasil, em 2008 e 2009.

Genitor feminino <i>V. labrusca</i>	Genitor masculino <i>V. rotundifolia</i>	Nº de emasculações	Nº de bagas	Vingamento (%)	Nº de sementes	Nº de plântulas
'Bordo' x	'Bountiful'	65	0	0,0	0	0
	'Carlos'	325	21	6,5	48	7
	'Magnolia'	520	52	10,0	120	54
	'Regale' ⁽¹⁾	625	55	8,8	114	52
	'Roanoke'	715	10	1,4	35	30
'Goethe' x	'Bountiful'	94	0	0,0	0	0
	'Carlos'	105	0	0,0	0	0
	'Magnolia'	119	0	0,0	0	0
	'Regale' ⁽¹⁾	243	0	0,0	0	0
	'Roanoke'	86	0	0,0	0	0
'Isabel' x	'Bountiful'	250	4	1,6	5	1
	'Carlos'	300	32	10,6	71	16
	'Magnolia'	550	70	12,7	135	31
	'Regale' ⁽¹⁾	1.501	40	2,7	87	21
	'Roanoke'	450	7	1,6	16	9
'Marta' x	'Bountiful'	150	0	0,0	0	0
	'Carlos'	150	0	0,0	0	0
	'Magnolia'	100	0	0,0	0	0
	'Regale' ⁽¹⁾	750	1	0,1	2	1
	'Roanoke'	100	2	2,0	4	0
'Niagara Rosada' x	'Bountiful'	150	0	0,0	19	0
	'Carlos'	525	25	4,8	145	62
	'Magnolia'	450	52	11,6	110	36
	'Regale' ⁽¹⁾	975	45	4,62	129	22
	'Roanoke'	100	0	0,0	0	0
Total		9.398	416	4,4	1.040	342

(1) Os resultados obtidos nos cruzamentos entre as cultivares de *V. labrusca* e 'Magoon' (*V. rotundifolia*) foram adicionados aos de 'Regale', já que o perfil genético de 'Magoon' é o mesmo de 'Regale' em todos os 15 marcadores.

A genotipagem molecular com os locos microssatélites UDV41, UDV43, VrZAG62 e VVIN75 revelaram que quando cultivares de *Vitis rotundifolia* foram utilizadas como genitor feminino e cultivares de *Vitis labrusca* como o genitor masculino, os cruzamentos falharam, não produzindo híbridos verdadeiros, mas apenas descendentes diretos de *Vitis rotundifolia*. De 342 plântulas, nos cruzamentos recíprocos, 114, provenientes de nove diferentes cruzamentos, foram identificados com os quatro marcadores como verdadeiros híbridos de *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia* (Tabela 3).

TABELA 3 - Percentagem de híbridos interespecíficos de *Vitis* confirmados por meio de marcadores microsatélites.

Cruzamentos		Nº de plantas analisadas	Nº de híbridos verdadeiros	Híbridos verdadeiros (%)
(1) 'Bordo' x	'Carlos'	7	3	42,9
	'Magnolia'	54	16	29,6
	'Regale'	22	15	68,9
	'Roanoke'	30	15	50,0
Total (1)		113	49	43,4
(2) 'Isabel' x	'Bountiful'	1	1	100
	'Carlos'	16	11	68,8
	'Magnolia'	31	27	87,1
	'Regale'	20	17	85,0
	'Roanoke'	9	9	100,0
Total (2)		77	65	84,4
Total		190	114	60

Nos cruzamentos em que 'Isabel' foi o genitor feminino, 65 híbridos verdadeiros foram identificados (Figura 1). Todas as cultivares de *Vitis rotundifolia* utilizadas para polinizar 'Isabel' geraram híbridos verdadeiros, exceto 'Magoon'. A maior população de *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia* é composta por 27 plântulas (87,1% de híbridos verdadeiros) e é resultado do cruzamento de 'Isabel' x 'Magnolia'. Do cruzamento 'Isabel' x 'Regale', 20 plântulas foram avaliadas e 17 híbridos F1 foram confirmados. O cruzamento 'Isabel' x 'Carlos' rendeu 16 plântulas, dos quais 11 eram híbridos verdadeiros (68,8%). A maior porcentagem de híbridos foi observada nos cruzamentos 'Isabel' x 'Roanoke' e 'Isabel' x Bountiful, com 100% de híbridos verdadeiros. Desses cruzamentos, foram avaliados apenas 9 e 1 plântulas, respectivamente (Tabela 3).

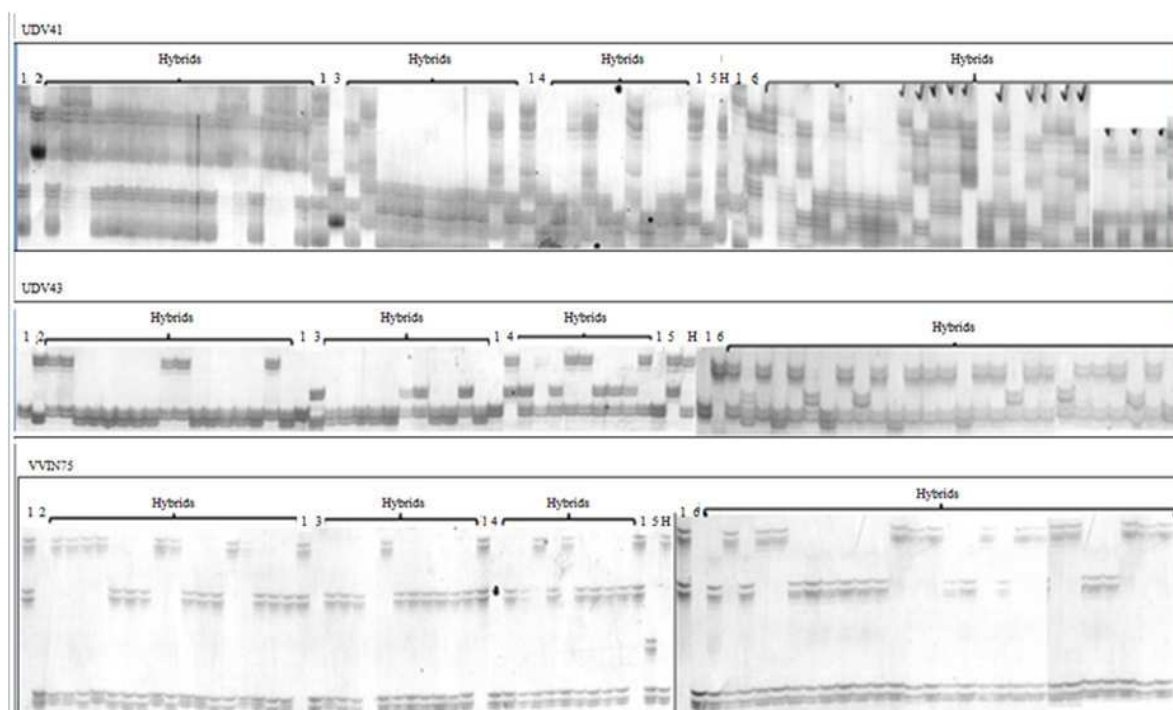


FIGURA 1 - Amplificação PCR dos marcadores SSR UDV41 e UDV43 (DI GASPERO *et al.*, 2005) e VVIN75 (MERCINOGLU *et al.*, 2005) em 'Isabel' (1), 'Regale' (2), 'Carlos' (3), 'Roanoke' (4), 'Bountiful' (5) e 'Magnolia' (6) seguido pelos híbridos verdadeiros resultantes de cada cruzamento. H, híbrido.

Os cruzamentos entre o genitor feminino 'Bordo' com as cultivares de *Vitis rotundifolia* produziram 49 híbridos verdadeiros (43,4%) (Figura 2). Das seis cultivares utilizadas como o genitor masculino com 'Bordo', duas ('Bountiful' e 'Magoon') não produziram progênie com o perfil microssatélite esperado para os híbridos interespecíficos F1. O percentual de formação de híbridos foi maior nos cruzamentos de 'Bordo' x 'Regale' e 'Bordo' x 'Roanoke', com 68,9% e 50% de híbridos verdadeiros, respectivamente. O menor percentual (29,6%) de híbridos verdadeiros é resultante do cruzamento 'Bordo' x 'Magnolia', com 54 indivíduos analisados, e apenas 16 confirmados como híbridos verdadeiros. Do cruzamento 'Bordo' x 'Carlos', sete plântulas F1 foram avaliadas e três híbridos foram confirmados (42,9%) (Tabela 3).

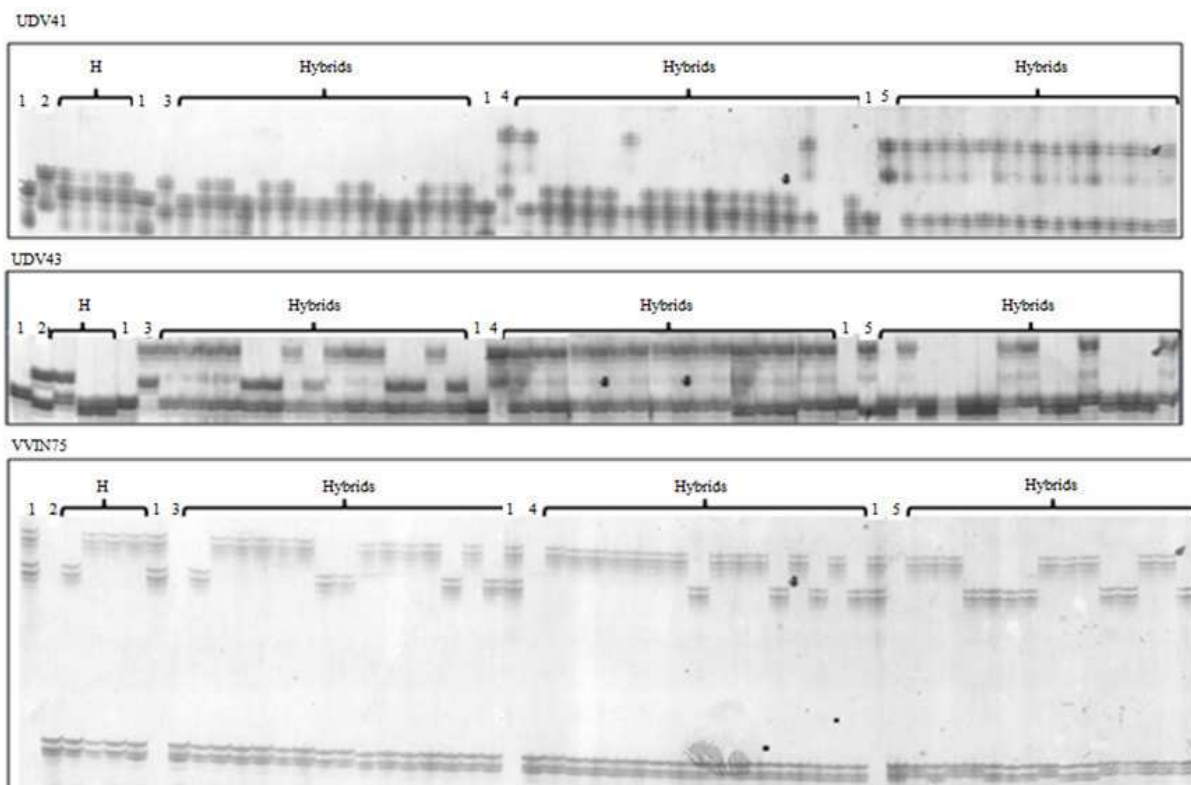


FIGURA 2 - Amplificação PCR dos marcadores SSR UDV41 e UDV43 (DI GASPERO *et al.*, 2005) e VVIN75 (MERCINOGLU *et al.*, 2005) em 'Bordo' (1), 'Carlos' (2), 'Roanoke' (3), 'Magnolia' (4) e 'Regale' (5) seguido pelos híbridos verdadeiros resultantes de cada cruzamento. H, híbrido.

Embora no presente estudo apenas cinco cultivares de *Vitis labrusca* foram utilizadas como genitor feminino, pode-se observar uma diferença expressiva entre elas na sua cruzabilidade com *Vitis rotundifolia*. Estes resultados demonstram que o sucesso dos cruzamentos interespecíficos depende não só da espécie e da direção do cruzamento, mas também dos genótipos da espécie envolvidos nos cruzamentos. Outros autores mostraram que cultivares de *Vitis vinifera* utilizadas como genitor feminino influenciaram na cruzabilidade com *Vitis rotundifolia* (BOUQUET, 1980).

A diferença cromossômica entre *Vitis* spp. ($2n=38$) e *Vitis rotundifolia* ($2n=40$) é considerada a principal razão para o baixo sucesso dos cruzamentos em ambas as direções (GOLDY; ONOKPISE, 2001). No entanto, nos cruzamentos envolvendo *Vitis rotundifolia* como o genitor feminino, as dificuldades na obtenção de híbridos são maiores do que no recíproco (BOUQUET, 1980; OLMO, 1986). O fracasso em se obter plântulas híbridas quando *Vitis rotundifolia* é utilizada como genitor feminino pode ser atribuído a incapacidade do tubo polínico das espécies de *Euvitis* penetrar com sucesso no estilete e fertilizar as células do óvulo de *Vitis rotundifolia* (LU; LAMIKANRA, 1996).

Além da incompatibilidade genética entre estas espécies, fatores fenológicos também limitam o sucesso dos cruzamentos recíprocos. Na região Sul do Brasil, *Vitis labrusca*

floresce de Setembro a Outubro, e *Vitis rotundifolia* de Novembro a Janeiro. Devido a estas diferenças, no presente estudo, as cultivares de *Vitis labrusca* foram podadas duas vezes, sendo a segunda poda realizada durante o período normal de floração, para forçá-las a florescer novamente, assim pólen fresco de *Vitis rotundifolia* pode ser utilizado nas flores de *Vitis labrusca*.

Embora tenha sido utilizado pólen fresco, os cruzamentos em ambas as direções produziram uma alta proporção de plântulas não-híbridas, sendo todas identificadas como resultado de autofecundação. Apesar de sacos de papel terem sido colocados nas inflorescências polinizadas e as inflorescências adjacentes da mesma planta terem sido eliminadas para evitar contaminação de pólen indesejável, o vento pode ter depositado pólen sobre as flores emasculadas durante os poucos segundos que os sacos de proteção foram removidos para realizar a polinização. Portanto, o ensacamento das flores não garante a ausência de polinização indesejada (NEAL; ANDERSON, 2004). Além disso, a posição dos ramos e a localização dos cachos florais nos ramos no dossel em desenvolvimento influenciam o florescimento (VASCONSELOS *et al.*, 2009). No presente estudo, as inflorescências utilizadas nos cruzamentos localizavam-se no meio dos ramos. As temperaturas médias elevadas em ambos os anos (2008 e 2009) nas três regiões aonde os cruzamentos foram realizados (Pinhais, PR – 31 °C; Campos Novos, SC – 26,5 °C; e Videira, SC – 31 °C) podem ter induzido a uma maturação precoce do pólen nas inflorescências localizadas próximas à parte apical do ramo da mesma planta e nas inflorescências vizinhas da mesma cultivar, localizadas a poucos metros de distância. Isto pode ter acelerado a secagem do pólen e aumentado as chances do pólen ter sido levado pelo vento e depositado nas flores ainda desprotegidas e não-emasculadas de *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca*, antes da floração. Além disso, o papel dos insetos como agentes da polinização não pode ser descartado.

O uso dos marcadores microssatélites para a identificação de híbridos verdadeiros na fase inicial de seleção mostrou-se como uma excelente ferramenta. Uma alta proporção de plântulas resultantes de autofecundação foram identificadas, sendo descartadas na geração F1, permitindo uma economia significativa de recursos, principalmente tempo e espaço. Em espécies com ciclo longo de melhoramento, como *Vitis* spp., o processo comum de identificação de híbridos por diferenças morfológicas é lento. As ferramentas moleculares podem superar essas dificuldades e abrir caminho para novas estratégias de melhoramento.

A identificação dos genótipos de *Vitis labrusca* foi realizada em um estudo anterior e o perfil dos microssatélites das cultivares ‘Bordo’, ‘Goethe’, ‘Isabel’, ‘Niagara Rosada’ e

‘Marta’ foi o mesmo que os disponíveis nos bancos de dados para as mesmas cultivares utilizando os marcadores microssatélites VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZag62 e VrZag79. Portanto, estas cultivares foram corretamente identificadas (Tabela 4) (SCHUCK *et al.*, 2009).

Para confirmar a identidade dos genitores de *Vitis rotundifolia*, cinco cultivares foram genotipadas em 15 locos microssatélites (SSRs). Foram obtidos perfis genéticos consistentes e confiáveis para as cinco cultivares em todos os marcadores SSRs. O perfil genético das cultivares de *Vitis rotundifolia*, ‘Bountiful’, ‘Carlos’, ‘Magnolia’ e ‘Regale’ foram idênticos aos da base de dados de referência em todos os 15 locos SSR. No entanto, ‘Magoon’ não correspondeu ao perfil de referência nos mesmos locos SSR, mas foi idêntico a ‘Regale’, indicando que um erro foi cometido no momento da introdução deste material e que o mesmo genótipo foi plantado sob diferentes nomes (Tabela 4).

A correta identificação dos acessos é um requisito básico para o manejo coerente das coleções de germoplasma e para sua utilização nos programas de melhoramento. É essencial identificar a existência de sinônimos, homônimos e erros de denominação para evitar erros futuros de propagação e melhoramento. Estes erros são difíceis de identificar com base em descritores morfológicos, uma vez que são altamente influenciados por fatores ambientais e de desenvolvimento da planta. Em contraste, os marcadores microssatélites têm sido utilizados para resolver problemas de denominação e avaliação da diversidade genética (SEFC *et al.*, 2001), para análise de parentesco (TAPIA *et al.*, 2007) e no desenvolvimento de mapas genéticos (RIAZ *et al.*, 2004).

TABELA 4- Tamanho dos alelos (pb) das cultivares de *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca* utilizadas como genitoras nos cruzamentos.

Locus	<i>Vitis rotundifolia</i>					<i>Vitis labrusca</i> ⁽¹⁾					Referência ⁽²⁾
	'Bountiful'	'Carlos'	'Magnolia'	'Magoon'	'Regale'	'Bordo'	'Goethe'	'Isabel'	'Marta'	'Niagara Rosada'	
VVS2	153-153	147-149	147-147	147-147	147-147	118-130	120-130	118-146	120-146	118-128	a
VVMD5	230-246	230-246	230-230	226-230	226-230	234-234	230-236	236-236	234-234	234-234	b
VVMD7	235-235	243-245	243-245	243-243	243-243	235-239	235-247	235-249	235-249	235-241	b
VVMD27	199-199	197-215	185-215	185-197	185-197	179-181	181-183	175-179	179-181	175-181	c
VVMD31	246-250	168-170	170-210	170-210	170-210	201-213	203-209	201-213	201-203	201-201	c
VVMD32	249-301	249-301	249-301	249-301	249-301	248-248	246-252	248-272	248-248	248-272	c
VrZag62	215-223	199-215	199-215	199-199	199-199	200-202	190-204	200-202	200-202	200-202	d
VrZag79	255-255	257-287	259-287	255-259	255-259	247-247	239-247	237-247	247-264	237-259	d
VMC4f3.1	222-222	202-222	208-222	222-226	222-226	-(³)	-	-	-	-	e
VMC8g9	138-140	136-140	138-140	135-138	135-138	-	-	-	-	-	f
VMC7f2	193-195	193-193	193-193	193-195	193-195	-	-	-	-	-	f
VMC3df	174-178	172-178	172-178	170-172	170-172	-	-	-	-	-	f
VMC5a1	163-170	163-170	170-170	170-170	170-170	-	-	-	-	-	f
VMC5h2	198-200	194-212	194-212	194-212	194-212	-	-	-	-	-	f
UDV108	208-208	208-208	202-202	202-220	202-220	-	-	-	-	-	g

⁽¹⁾Cultivares analisadas em um estudo anterior por Schuck *et al.* (2009). ⁽²⁾a, Thomas; Scott (1993); b, Bowers *et al.* (1996); c, Bowers *et al.* (1999); d, Sefc *et al.* (1999); e, Di Gaspero *et al.* (2000); f, Adam-Blondon *et al.* (2004); g, Di Gaspero *et al.* (2005). ⁽³⁾ - SSRs não analisados.

3.4. CONCLUSÕES

1. O sucesso na hibridação entre *Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia* depende da espécie e da cultivar utilizada como genitor feminino.

2. Cultivares de *Vitis labrusca* podem ser cruzadas com sucesso com pólen de cultivares de *Vitis rotundifolia*, mas todas as combinações recíprocas falham em produzir híbridos verdadeiros.

3. São possíveis os cruzamentos entre *Vitis labrusca* cv. ‘Isabel’ x ‘Bountiful’, ‘Carlos’, ‘Magnolia’, ‘Regale’ e ‘Roanoke’ (*Vitis rotundifolia*), assim como os cruzamentos entre ‘Bordo’ (*Vitis labrusca*) x ‘Carlos’, ‘Magnolia’, ‘Regale’ e ‘Roanoke’ (*Vitis rotundifolia*), indicando que estas espécies podem ser utilizadas em programas de melhoramento.

4. Os marcadores microssatélites são ferramentas eficientes para confirmar a paternidade de híbridos interespecíficos F1 e para determinar a correta identidade das cultivares de *Vitis rotundifolia*.

3.5 REFERÊNCIAS

ADAM-BLONDON, A.-F.; ROUX, C.; CLAUX, D.; BUTTERLIN, G.; MERDINOGLU, D.; THIS, P. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.1017-1027, 2004.

BOTTON, M.; COLLETA, D. Avaliação da resistência de cultivares de *Vitis rotundifolia* à pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.213-216, 2010.

BOTTON, M.; MELO, G.W.B. de; OLIVEIRA, O.L.P. de; ONZI, I. Efeito da cobertura vegetal sobre a pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.681-684, 2010.

BOUQUET, A. *Vitis* x *Muscadinia* hybridization: a new way in grape breeding for disease resistance in France. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GRAPE BREEDING, 3., 1980, Davis. **Proceedings**. Davis: University of California, 1980. p.42-61.

BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; MEREDITH, C.P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.50, p.243-246, 1999.

BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, v.39, p.628-633, 1996.

CORDEIRO, M.C.R.; PINTO, A.C. de Q.; RAMOS, V.H.V.; FALEIRO, F.G.; FRAGA, L.M.S. Utilização de marcadores RAPD e outros parâmetros na determinação de genitores em híbridos de mangueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.164-167, 2006.

DALBÓ, M.A.; PERUZZO, E.L.; SCHUCK, E. Alternativas de manejo para o controle do declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, v.20, p.58-61, 2007.

DE CÉSARO, A. **Caracterizações histológica e fisiológica do ataque de pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Wille, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) em videiras**. 2008. 89p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G.; MARRAZZO, M.T.; ANDREETTA, D.; PRADO CASTRO, M.J.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Isolation of (AC)*n*-microsatellites in

Vitis vinifera L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. **Molecular Breeding**, v.15, p.11-20, 2005.

DI GASPERO, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R.; EDWARDS, K.J.; CIPRIANI, G. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.301-308, 2000.

GARRIDO, L. da R.; SÔNEGO, O.R.; GOMES, V.N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.332-324, 2004.

GOLDY, R.; ONOKPISE, O.U. Genetics and breeding. In: BASIOUNY, F.M.; HIMELRICK, D.G. (Eds.). **Muscadine grapes**. ASHS Press, Alexandria, Virginia, 2001. p.51-90.

KELLOW, A.V.; MCDONALD, G.; CORRIE, A.M.; HEESWIJCK, R.V. *In vitro* assessment of grapevine resistance to two populations of phylloxera from Australian vineyards. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.8, p.109-116, 2002.

LEÃO, P.C. de S.; BORGES, R.M.E. **Melhoramento genético da videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 61p. (Embrapa Semiárido. Documentos, 224).

LU, J.; LAMIKANRA, O. Barriers to intersubgeneric crosses between *Muscadinia* and *Eu vitis*. **HortScience**, v.31, p.269-271, 1996.

MERDINOGLU, D.; BUTTERLIN, G.; BEVILACQUA, L.; CHIQUET, V.; ADAM-BLONDON, A.F.; DECROOCQ, S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. **Molecular Breeding**, v.15, p.349-366, 2005.

NEAL, P.R.; ANDERSON, G.J. Does the 'old bag' make a good 'wind bag'? comparison of four fabrics commonly used as exclusion bags in studies of pollination and reproductive biology. **Annals of Botany**, v.93, p.603-607, 2004.

OLMO, H.P. The potential role of (*vinifera* x *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. **Experientia**, v.42, p.921-926, 1986.

REYNOLDS, A.G.; WARDLE, D.A. Rootstocks impact vine performance and fruit composition of grapes in British Columbia. **HortTechnology**, v.11, p.419-427, 2001.

RIAZ, S.; DANGL, G.S.; EDWARDS, K.J.; MEREDITH, C.J. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.864-872, 2004.

SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; GUERRA, M.P.; VOLTOLINI, J.A.; GRANDO, M.S.; SILVA, A.L. da. Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina, Brazil, using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.487-495, 2009.

SEFC, K.M.; LEFORT, F.; GRANDO, M.S.; SCOOT, K.D.; STEINKELLNER, H.; THOMAS, M.R. Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. (Ed.). **Molecular biology and biotechnology of the grapevines**. Netherlands: Kluwer, 2001. p.433-463.

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**, v.42, p.367-373, 1999.

SMITH, B.P. **Genetic and molecular mapping studies on a population derived from *Vitis vinifera* x *Muscadinia rotundifolia* and genetic diversity of wild *Muscadinia rotundifolia***. 277 p. Dissertation (Doctor of philosophy in Genetics) – University of California, Davis, 2010.

TAPIA, A.M.; CABEZAS, J.A.; CABELLO, F.; LACOMBE, T.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; HINRICHSSEN, P.; CERVERA, M.T. Determining the Spanish origin of representative ancient American grapevine varieties. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.58, p.242-251, 2007.

THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.985-990, 1993.

VASCONCELOS, M.C.; GREVEN, M.; WINEFIELD, C.S.; TROUGHT, M.C.T.; RAW, V. The flowering process of *Vitis vinifera*: a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.60, p.411-434, 2009.

WALKER, M.A.; LIDER, L.A.; GOHEEN, A.C.; OLMO, H.P. VR O39-16 grape rootstock. **HortScience**, v.26, p.1224-1225, 1991.

4 CAPÍTULO II

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE *Vitis labrusca* E *Vitis rotundifolia* ANALISADAS POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO

Considerando que o conhecimento da diversidade genética de uma espécie fornece subsídios tanto para conservação da espécie quanto para o melhoramento genético da mesma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a diversidade genética de dez cultivares de videira (*Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca*) por meio de oito marcadores microssatélites: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD31, VVMD32, VrZAG62 e VrZAG79. Estes marcadores são utilizados internacionalmente como descritores recomendados para identificação de cultivares de videira e permitem a comparação entre trabalhos em diferentes laboratórios. ‘Magoon’ apresentou o mesmo perfil genético que ‘Regale’ deste estudo e da cultivar ‘Regale’ presente na base de dados de referência para identificação de videira, mantida pela *Foundation Plant Service*, Universidade da Califórnia, Davis, indicando um provável erro de plantio. Foram encontradas diferenças na composição alélica que refletiram tanto sobre a existência de diferentes conjuntos de alelos para *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca*, como na existência de alelos privados em cada grupo. Foi encontrado um total de 54 alelos com uma média de 7,25 alelos por loco. A heterozigosidade observada variou de 37,14% (VVMD5) a 97,14% (VVMD27), sem diferenças significativas em relação aos valores esperados para todos os locos, exceto para VVMD5. Foram verificados valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC) superiores a 0,25 em mais de 85% dos locos analisados, sendo que VVMD31 apresentou-se como o mais informativo. Por meio da análise de agrupamento UPGMA foi possível separar as cultivares em grupos distintos, de *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca*. Dentro de cada grupo, as cultivares mais divergentes foram ‘Bountiful’ (*Vitis rotundifolia*) e ‘Goethe’ (*Vitis labrusca*). Estas mesmas cultivares também apresentaram o maior número de alelos privados, 4 e 7, respectivamente. Quando comparados os dois grupos, as cultivares mais divergentes foram ‘Bountiful’ e ‘Bordo’, com a maior distância de Nei (1972). Foi evidenciado que há variabilidade genética suficiente nas cultivares utilizadas neste estudo para subsidiar programas de melhoramento genético.

Palavras-chaves: *Vitis labrusca*; *Vitis rotundifolia*; variabilidade genética; marcador molecular.

GENETIC DIVERSITY AMONG *Vitis labrusca* AND *Vitis rotundifolia* CULTIVARS USING MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

Considering that the knowledge about the genetic diversity of a specie provides subsidies to a breeding program, this study aimed to estimate the genetic diversity among ten grapevine cultivars (*Vitis rotundifolia* and *Vitis labrusca*) using eight microsatellite markers: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD31, VVMD32, VrZAG62 and VrZAG79. These markers are used internationally as recommended descriptors for the identification of grapevine cultivars and allow comparisons between researches in different laboratories. 'Magoon' showed the same genetic profile of 'Regale' of this study and the 'Regale' cultivar present in the Grape DNA Identification Reference Database (Foundation Plant Services, University of California, Davis), implicating a likely planting error. There were differences in allelic composition that reflected both on the existence of different sets of alleles for *Vitis rotundifolia* and *Vitis labrusca* and on the existence of private alleles in each group. A total of 54 alleles were found with an average of 7.25 alleles per locus. The observed heterozygosity ranged from 37.14 (VVMD5) to 97.14% (VVMD27), with no significant differences in relation to expected values for all loci, except for VVMD5. The polymorphism information content (PIC) values were observed above 0.25 in more than 85% of the loci analyzed and VVMD31 was the most informative. The UPGMA analysis clustered the cultivars into two distinct groups, *Vitis rotundifolia* and *Vitis labrusca*. Within each group, the most divergent cultivars were 'Bountiful' (*Vitis rotundifolia*) and 'Goethe' (*Vitis labrusca*). These cultivars also showed the largest number of private alleles, 4 and 7, respectively. When comparing the two groups, the most divergent accessions were 'Bountiful' and 'Bordo', with the highest Nei distance (1972). It was demonstrated that there is enough genetic variability in the cultivars used in this study to support breeding programs.

Key-words: *Vitis labrusca*; *Vitis rotundifolia*; genetic variability; molecular marker.

4.1 INTRODUÇÃO

A videira pertence a família Vitaceae, que é dividida em dezenove gêneros. *Vitis* L. é o único gênero de importância econômica. O gênero *Vitis* L. é dividido em dois subgêneros, *Euvitis* Planch. e *Muscadinia* Planch. O primeiro tem 38 cromossomos e muitas bagas por cacho de modo que o termo geral *bunch grape* é dado a todas as espécies de *Euvitis*. *Muscadinia* tem 40 cromossomos e cachos menores e tem como nome comum uva muscadinia (OLIEN, 2001).

As espécies de *Euvitis*, com centenas de cultivares conhecidas, podem ser divididas em três grupos geográficos: Americano, Asiático e Europeu (MULLINS; BOUQUET; WILLIAMS, 1992). *Vitis vinifera*, a espécie comercial predominantemente cultivada em todo o mundo, é o único membro do grupo Europeu e deu origem a milhares de cultivares. O grupo americano tem cerca de 30 espécies (ALLEWELDT; SPIEGEL-ROY; REISCH, 1990), e dentre estas *Vitis labrusca*, conhecida pelo seu sabor ‘foxado’, foi muito utilizada nos séculos 18 e 19 diretamente como porta-enxerto das cultivares de *Vitis vinifera* devido a tolerância a filoxera e em cruzamentos originando o chamado “produtor direto”. Estes híbridos eram plantados em pé-franco e foram criados para incorporar a resistência às doenças foliares das uvas Norte americanas com as características dos frutos das videiras européias (POMMER, 2003). Já *Muscadinia* é nativa do Sudeste dos Estados Unidos, onde o clima é quente, chuvoso e úmido durante a maior parte do ano. Três espécies, *Vitis rotundifolia* Michx., *Vitis munsoniana* Simpson ex Munson e *Vitis popenoei* Fennell, são encontrados neste subgênero (ALLEWELDT; SPIEGEL-ROY; REISCH, 1990). *Vitis rotundifolia*, normalmente referida como uva muscadinia, é a única espécie dentro do subgênero com valor comercial e tem sido classificada como tendo o mais alto nível de resistência a pragas e doenças da videira, sendo empregada mundialmente nos programas de melhoramento (OLMO, 1986).

O conhecimento relacionado à diversidade genética das espécies traz duas vantagens a um programa de melhoramento: a primeira diz respeito à heterogeneidade genética que limita a vulnerabilidade das espécies às pragas e doenças e; a segunda está relacionada ao fornecimento de um amplo suprimento de variação alélica, que pode ser usada para criar novas combinações de genes favoráveis. A viabilidade da utilização da divergência genética como critério de seleção de genitores para cruzamentos foi demonstrado em diversas espécies, entre elas, a videira (COSTA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SILVA, 2006).

Existem muitas maneiras de se acessar a estrutura genética das populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma determinada espécie (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). O mais simples indicador é a própria variabilidade morfológica. Porém, características morfológicas quase sempre são influenciadas pelo ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade.

Os marcadores moleculares possibilitam várias aplicações e análises genéticas com grandes oportunidades de utilização no melhoramento genético. Esses marcadores apresentam várias vantagens sobre os marcadores morfológicos. Dentre elas, destaca-se o polimorfismo, a independência entre os efeitos ambientais e o estágio fisiológico da planta. Desses marcadores, os microssatélites, também denominados SSRs (*Simple Sequence Repeat*), possibilitam ampla utilização nos programas de melhoramento. A disponibilidade e abundância desses marcadores ao longo do genoma da videira, sua natureza polimórfica, co-dominância e por serem baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), os fazem bastante úteis em estudos de diversidade genética (SCHUCK *et al.*, 2009; RIAZ *et al.*, 2008), identificação de sinonímias, homonímias e identificação de erros de denominação (VOUILLAMOZ; SCHNEIDER; GRANDO, 2007), caracterização molecular de genótipos (BOTTA *et al.*, 1995), identificação de QTLs, seleção assistida, mapeamento genético (RIAZ *et al.*, 2002, 2004) e estudos de pedigree (ORTIZ *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de um grupo de marcadores microssatélites de referência para identificação de cultivares de videira foi proposto pelo projeto europeu GENRES 06 mediante a utilização de seis locos microssatélites (THIS *et al.*, 2004). Este grupo de marcadores VVS2 (THOMAS; SCOTT, 1993), VVMD5, VVMD7 (BOWERS *et al.*, 1996), VVMD27 (BOWERS; DANGL; MEREDITH, 1999), VrZAG62 e VrZAG79 (SEFC *et al.*, 1999) foram utilizados por esse projeto para a avaliação de 13 cultivares européias de referência e são amplamente recomendados pela Organização Internacional da Uva e do Vinho para a genotipagem de videira (OIV, 2007).

Considerando que o conhecimento da diversidade genética de uma espécie fornece subsídios tanto para conservação da espécie quanto para o melhoramento genético da mesma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a diversidade genética entre dez cultivares de *Vitis spp.* por meio de marcadores microssatélites.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material genético

Foram avaliadas dez cultivares de *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca* (Tabela 1), oriundas das Coleções de Germoplasma de Videira da Estação Experimental do Canguiri, Universidade Federal do Paraná, Pinhas (PR) e da Estação Experimental de Videira (SC) e de Campos Novos (SC), da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). Estas cultivares foram selecionadas por apresentarem características agrônômicas desejáveis e potencial para utilização como genitores em um programa de melhoramento genético.

TABELA 1 – Descrição de dez cultivares de videira, tipo de inflorescência, cor da baga, espécie ou parentesco e origem geográfica.

Cultivar	Tipo de inflorescência	Cor da baga	Espécie ou parentesco	Origem geográfica
<i>Vitis rotundifolia</i>				
‘Bountiful’	Hermafrodita	Preta	<i>Vitis rotundifolia</i>	EUA
‘Carlos’	Hermafrodita	Bronze	‘Howard’ x (‘Topsail’ x ‘Tarheel’)	EUA
‘Magnolia’	Hermafrodita	Bronze	(‘Thomas’ x ‘Scuppernong’) x (‘Topsail’ x ‘Tarheel’)	Carolina do Norte (EUA)
‘Magoon’	Hermafrodita	Vermelha-preta	‘Thomas’ x ‘Burgaw’	Mississippi (EUA)
‘Regale’	Hermafrodita	Vermelha-preta	‘Hunt’ x ‘Magnolia’	Carolina do Norte (EUA)
<i>Vitis labrusca</i>				
‘Bordo’	Hermafrodita	Preta	<i>V. labrusca</i> x <i>V. aestivalis</i> x <i>V. vinifera</i>	Ohio (EUA)
‘Goethe’	Hermafrodita	Rosada	‘Muscat of Hamburg (Black Muscat) (<i>V. vinifera</i>) x ‘Carter’ (seedling selecionando de uma variedade híbrida de Isabella)	EUA
‘Isabel’	Hermafrodita	Preta	<i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>	Carolina do Sul (EUA)
‘Marta’	Hermafrodita	Rosada	<i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>	EUA
‘Niagara Rosada’	Hermafrodita	Rosada	Mutação somática de ‘Niagara branca’ (‘Concord’ e ‘Cassady’ <i>V. labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>)	Jundiaí (SP)

4.2.2 Extração e quantificação do DNA

O DNA das cultivares de *Vitis labrusca* foi extraído e quantificado num estudo anterior por Schuck *et al.* (2009) no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, da Universidade Federal de Santa Catarina.

O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de Riaz *et al.* (2004). Folhas jovens liofilizadas de *Vitis rotundifolia* foram homogeneizadas com 5 ml de tampão de extração de DNA (350 mM Sorbitol, 100 mM Tris-base, 5 mM EDTA pH 8,0, bissulfato de sódio, 5% PVP, 0,5% β -mercaptoetanol) em sacos plásticos utilizando um homogeneizador mecânico Homes 6 (Bioreba, Longmont, CO, USA). Após a maceração, uma alíquota de 2 ml foi retirado do saco plástico, transferido para tubo eppendorf e centrifugado a 8500 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se 0,8 ml da solução CTAB (tampão de extração de DNA, 100 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA pH 8,0, 1,4 M NaCl, 2% CTAB [hexadecyltrimethylammonium bromide]) e 0,2 ml de um solução de sarcosil 5%. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 65 °C por 20-45 min em banho-maria com agitador automático.

Os tubos foram retirados do banho-maria e, após atingirem temperatura ambiente, foi realizada a extração pela adição de 0,8 ml de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) a cada tubo, para formar uma emulsão. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 8500 rpm por 5 min. Aproximadamente 950 μ l do sobrenadante foi retirado e transferido para novos tubos, aos quais foram adicionados 90 μ l de 3 M de Acetato de Sódio e 900 μ l de isopropanol. Esses tubos foram homogeneizados e colocados em freezer (-20 °C) por 15 a 20 min para precipitação dos ácidos nucleicos.

Os tubos foram então centrifugados a 14000 rpm por 2 min. Após a formação do *pellet*, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 2 ml de etanol 70%. Os tubos foram gentilmente agitados e centrifugados a 14000 rpm por 2 min e então, o sobrenadante foi descartado novamente e os tubos deixados secar a temperatura ambiente por 30 minutos a 1 hora. Após, foi adicionado ao precipitado 100 μ l TE (Tris-base 10 mM, 0,5 M EDTA pH 8,0) e os tubos ficaram por aproximadamente 12 h a temperatura ambiente para ocorrer a diluição do DNA. As amostras foram então armazenadas a -20 °C.

A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese com gel de agarose 1,2% (p/v) corado com brometo de etídeo (10 mg ml⁻¹). Foi aplicado no mesmo gel um marcador de peso molecular padrão (50, 100 e 200 ng), e em seguida prosseguiu-se com a migração do DNA

por eletroforese. O DNA foi visualizado com trans-iluminador com luz ultravioleta. A determinação da concentração do DNA extraído se deu por comparação visual com os padrões utilizados. Após, o DNA foi diluído em água ultra pura para a concentração final de $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, para ser utilizado nas reações de amplificação. A extração do DNA e quantificação das cultivares de *Vitis rotundifolia* foi realizado no Laboratório de Genética e Melhoramento da Videira, da Universidade da Califórnia, Davis.

4.2.3 Condições de amplificação e detecção do polimorfismo alélico

As amostras de *Vitis rotundifolia* foram genotipadas com os 8 marcadores microssatélites mais difundidos pela comunidade científica internacional: VVS2, VVMD27, VVMD5, VVMD7, VVMD31, VVMD32, VrZAG62 e VrZAG79 (Tabela 2).

TABELA 2 - Relação dos oito marcadores microssatélites utilizados para caracterizar as cultivares de videira, sequência, temperatura de anelamento dos *primers* e tamanho do alelo em pares de bases (pb).

Loco	Sequência	Temperatura de Anelamento (°C)	Tamanho do alelo (pb)	Referência
VVS2	[F]cagccgtaaatgtatccatc [R]aaattcaaaattctaattcaactgg	56	129-155	Thomas; Scott (1993)
VVMD5	[F]ctagagctacgccaatccaa [R]tataccaaaaatcataattcctaaa	56	226-246	Bowers; Dangl; Meredith (1999)
VVMD7	[F]agagttgaggagaacaggat [R]cgaaccttcacacgcttgat	56	232-263	Bowers; Dangl; Meredith (1999)
VVMD27	[F]gtaccagatctgaatacatccgtaagt [R]acgggtatagagcaaacgggtgt	56	173-194	Bowers <i>et al.</i> (1996)
VVMD31	[F]cagtgttttcttaaagtccaagg [R]ctctgtgaaagaggaagagacgc	56	196-224	Bowers; Dangl; Meredith (1999)
VVMD32	[F]tatgatttttaggggggtgagg [R]ggaaagatgggatgactcgc	56	239-273	Bowers; Dangl; Meredith (1999)
VrZag62	[F]ggtgaaatgggcaccgaacacacgc [R]ccatgtctctcctcagcttctcagc	56	185-203	Sefc <i>et al.</i> (1999)
VrZag79	[F]agattgtggaggaggaacaaccg [R]tgccccattttcaaaactcccttc	56	236-260	Sefc <i>et al.</i> (1999)

A reação de amplificação foi preparada segundo Riaz *et al.* (2004) com um volume final de $10 \mu\text{l}$, contendo 5 pmol de cada *primer*, 2,5 mM de cada dNTP, $1 \mu\text{l}$ 10X gold tampão PCR (Perkin Elmer), 0,5U AmpliTaq Gold DNA polimerase (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA), 2 mM MgCl_2 e 10 ng de DNA genômico. As amplificações foram conduzidas em um termociclador Peltier Thermal Cycler-200 (MJ research, Waltham, MA, USA) ou Bio Rad

iCycler (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). O programa utilizado para reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) foi: (i) desnaturação do DNA e ativação da Taq DNA polimerase a 95 °C por 10 min; (ii) 35 ciclos de amplificação distribuídos em 45 s a 94 °C, 45 s a 56 °C, 1 min a 72 °C; (iii) extensão final de 10 min a 72°C e; (iv) resfriamento a 4°C. Uma alíquota de 10 µl de tampão de carregamento (98% de formamida, 10 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol e 0,05% xileno cianol) foi misturado ao produto de PCR. As amostras foram desnaturadas a 94 °C por 2 minutos e alíquotas de 4 µl foram aplicadas em gel de poliacrilamida 5%. A eletroforese foi realizada a 70 W por 2–3 hs dependendo do tamanho dos fragmentos. Após, o gel foi submetido a uma série de lavagens para impregnação com nitrato de prata e revelação com carbonato de sódio com um kit comercial (Promega, Madison, WI, USA). Os géis foram analisados colocando-os sob luz branca e digitalizados em *scanner*.

Esta etapa do projeto foi realizada no Laboratório de Genética e Melhoramento da Videira, da Universidade da Califórnia, Davis.

4.2.4 Determinação do tamanho dos alelos

Para determinar o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos por amplificação dos produtos microssatélites das amostras de *Vitis rotundifolia*, carregou-se no mesmo gel alíquotas de DNA de *Vitis rotundifolia* já diluídas e disponíveis no laboratório. Estas amostras fazem parte da Coleção de Germoplasma de Uva da Universidade da Califórnia e o perfil genético em pares de bases (pb) destas encontra-se na base de dados de referência para identificação de videira, mantida pela *Foundation Plant Service*, Universidade da Califórnia, Davis. O perfil genético das cultivares de *Vitis labrusca* foi obtido em um estudo anterior por Schuck *et al.* (2009) com os mesmos marcadores microssatélites deste estudo (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZag62 e VrZag79).

4.2.5 Análises estatísticas

Para a análise das estatísticas descritivas foram utilizados os programas: GDA - *Genetic Data Analyses* - versão 1.0 (LEWIS; ZAYKIN, 2001) e GENES – versão 2007.0.0 (CRUZ, 2007). No primeiro, analisaram-se as frequências alélicas, o número de alelos por loco (N), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e), calculada como:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2$$

onde, p_i é a frequência do i -ésimo alelo na amostra (NEI, 1973). Enquanto no GENES obteve-se o conteúdo de informação polimórfica (PIC), que fornece uma estimativa do poder discriminatório do marcador por considerar não somente o número de alelos por loco, mas também a frequência relativa desses alelos. Os valores de PIC por loco foram determinados pela expressão:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \sum_{i,j=1(i \neq j)}^a \sum_{j=1(i \neq j)}^a p_i^2 p_j^2$$

onde, p_i e p_j são as frequências relativas do i -ésimo alelo e do j -ésimo alelo na amostra (BOTSTEIN *et al.*, 1980). A probabilidade de alelos nulos (r) foi calculada para cada loco segundo Brookfield (1996):

$$r = (H_e - H_o) / (1 + H_e)$$

onde, H_e é a heterozigosidade esperada e H_o é a heterozigosidade observada.

A distância genética entre as cultivares foi estimada pelo coeficiente de Nei (1972), obtido pela expressão:

$$D = -\ln(I)$$

onde, $\ln$ é o logaritmo neperiano e (I) é a medida da identidade genética, calculada pela expressão:

$$I = \frac{J_{PQ}}{\sqrt{J_P J_Q}}$$

onde, $J_P = \sum p_i^2$, $J_Q = \sum q_i^2$ e $J_{PQ} = \sum p_i q_i$, considerando p_i e q_i as frequências do alelo i na cultivar P e Q . A matriz de distância genética de Nei (1972) foi utilizada para gerar o

dendograma pelo critério de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average* – Agrupamento não-ponderado aos pares utilizando médias aritméticas), sendo que o ajuste entre a matriz de distâncias e o dendograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r) (SOKAL; ROHLF, 1962), com auxílio do programa GENES (CRUZ, 2007).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cinco cultivares de *Vitis rotundifolia* genotipadas com os oito locos microssatélites resultaram em quatro diferentes genótipos. A cultivar ‘Magoon’ apresentou o mesmo perfil genético que ‘Regale’ deste estudo e da cultivar ‘Regale’ presente na base de dados de referência para identificação de videira, mantida pela *Foundation Plant Service*, Universidade da Califórnia, Davis, indicando que um erro foi cometido durante a aquisição deste material e o mesmo genótipo foi plantado com nomes diferentes (Tabela 3). A ocorrência de erros de identificação é comum, principalmente em espécies clonais antigas como *Vitis*, e tem sido observado que 5 a 10% das cultivares mantidas em coleções de videira não estão corretamente identificadas (ANDRÉS *et al.*, 2007). Quanto às cultivares de *Vitis labrusca*, como mencionado anteriormente, estas foram genotipadas num estudo anterior (Schuck *et al.*, 2009) com os mesmos oito locos microssatélites deste estudo.

TABELA 3 - Perfil genético das cultivares de *Vitis* spp. com o tamanho dos alelos (pb) observados.

Locos	<i>Vitis rotundifolia</i>					<i>Vitis labrusca</i> ⁽¹⁾				
	'Bontiful'	'Carlos'	'Magnolia'	'Magoon'	'Regale'	'Bordo'	'Goethe'	'Isabel'	'Marta'	'Niagara Rosada'
VVS2	153-153	147-149	147-147	147-147	147-147	118-130	120-130	118-146	120-146	118-128
VVMD5	230-246	230-246	230-230	226-230	226-230	234-234	230-236	236-236	234-234	234-234
VVMD7	235-235	243-245	243-245	243-243	243-243	235-239	235-247	235-249	235-249	235-241
VVMD27	199-199	197-215	185-215	185-197	185-197	179-181	181-183	175-179	179-181	175-181
VVMD31	246-250	168-170	170-210	170-210	170-210	201-213	203-209	201-213	201-203	201-201
VVMD32	249-301	249-301	249-301	249-301	249-301	248-248	246-252	248-272	248-248	248-272
VrZag62	215-223	199-215	199-215	199-199	199-199	200-202	190-204	200-202	200-202	200-202
VrZag79	255-255	257-287	259-287	255-259	255-259	247-247	239-247	237-247	247-264	237-259

⁽¹⁾ Cultivares analisadas por Schuck *et al.* (2009).

Todos os oito locos microssatélites analisados mostraram-se multialélicos. A Tabela 4 apresenta os alelos e suas frequências para os diferentes locos. Foram amplificados um total de 58 alelos nas nove cultivares, variando de cinco (VVM5) até nove alelos (VVMD31), obtendo-se uma média de 7,25 alelos por loco. Os tamanhos alélicos encontrados variaram entre 118 pb (VVS2) a 301 pb (VVMD32). Estes locos já foram utilizados na caracterização

genética de outras cultivares de videira (BOWERS *et al.*, 1996; LOPES *et al.*, 1999; SEFC *et al.*, 2000). Moreno-Sanz, Suárez e Loureiro (2008) analisaram a diversidade entre 46 acessos de *Vitis vinifera* e obtiveram um total de 37 alelos e uma média de 6,2 alelos por loco utilizando seis dos oitos locos deste estudo. Um maior número de alelos por loco microsatélite foi observado em cultivares espanholas (11) (MARTÍN *et al.*, 2003), híbridas (*Vitis vinifera* x cvs. americanas) (11) (POLLEFEYS; BOUSQUET, 2003) e em porta-enxertos de videira (17,6) (LIN; WALKER, 1998). No caso das cultivares espanholas, é provável que o número ligeiramente superior de alelos detectados seja devido ao maior número de cultivares analisadas (mais de 170). Quanto aos porta-enxertos, quase 65% deles eram de espécies nativas da América do Norte, o que poderia explicar a grande diversidade observada.

TABELA 4 - Tamanho do alelo em pares de bases (TA) e a frequência alélica (FA) encontrada nas cultivares de *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca* em oito locos microsatélite.

VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD27		VVMD31		VVMD32		VrZag62		VrZag79	
TA	FA	TA	FA	TA	FA	TA	FA	TA	FA	TA	FA	TA	FA	TA	FA
118	0,15	226	0,1	235	0,35	175	0,1	168²	0,05	246	0,05	190 ⁴	0,05	237	0,1
120	0,1	230	0,35	239	0,05	179	0,15	170	0,2	248	0,2	199¹	0,3	239 ⁴	0,05
128 ³	0,05	234	0,3	241 ³	0,05	181	0,2	201	0,25	249	0,25	200	0,2	247	0,15
130	0,1	236	0,05	243	0,3	183 ⁴	0,05	203	0,1	252 ⁴	0,05	202	0,2	255	0,2
146	0,1	<u>246</u>	0,1	245	0,1	185	0,15	209 ⁴	0,05	272	0,1	204 ⁴	0,05	257²	0,05
147	0,35			247 ⁴	0,05	197	0,15	210	0,15	301	0,25	215	0,15	<u>259</u>	0,2
149²	0,25			<u>249</u>	0,1	199	0,1	213	0,1			223¹	0,05	264 ⁵	0,05
153¹	0,1					215	0,1	246	0,05					287	0,1
								250¹	0,05						

Alelos em itálico são específicos de *Vitis labrusca*, em negrito são específicos de *Vitis rotundifolia* e sublinhados são comuns entre os grupos. Alelos privados: 1-Bountiful, 2-Carlos, 3-Niagara Rosada, 4-Goethe, 5-Marta.

A Tabela 4 apresenta importantes diferenças na composição alélica que se refletem tanto sobre a existência de diferentes conjuntos de alelos para *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca*, como na existência de alelos privados em cada grupo. Vinte e três alelos foram encontrados apenas no grupo das cultivares de *Vitis rotundifolia*, 32 foram específicos para o grupo *Vitis labrusca* e três alelos (246, 249 e 259 pb) foram comuns entre os grupos. Também foram encontrados alelos privados no grupo *Vitis rotundifolia* nas cultivares ‘Bountiful’ (4) e ‘Carlos’ (3) e no grupo *Vitis labrusca* nas cultivares ‘Niagara Rosada’ (2), ‘Goethe’ (7) e ‘Marta’ (1). Os alelos mais comuns, com frequências alélicas superiores a 20% foram VVS2-147 e 149, VVMD5-230 e 234, VVMD7-235 e 243, VVMD31-201, VVMD32-249 e 301, e VrZAG62-199, enquanto que 18 alelos tiveram frequências inferiores a 10%. Também é interessante notar que dos dez alelos com frequência maior que 20%, sete são exclusivos de *Vitis rotundifolia* enfatizando as diferenças na composição alélica desta espécie.

Os alelos encontrados neste estudo e em outros (RIAZ *et al.*, 2008; SMITH, 2010) indicam que os alelos de *Vitis rotundifolia* são muito diferentes em tamanho e frequência daqueles das espécies *Euvitis*. A presença de alelos exclusivos já havia sido relatada em um estudo de diversidade genética de 57 acessos de *Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia* e híbridos de VR (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) (RIAZ *et al.*, 2008), inclusive com os locos VVMD7-245, VVMD27-197, 199 e 215, e VrZAG62-199 também aqui utilizados. Segundo estes autores, do total de 184 alelos de 14 locos microssatélites utilizados, 88 foram exclusivos de *Vitis rotundifolia*. No presente estudo, verificou-se um número relativamente elevado de alelos (39%) que foram exclusivos das cultivares *Vitis rotundifolia* (Tabela 4). Entretanto, estes alelos foram comuns em todo grupo de *Vitis rotundifolia*, sugerindo que a base genética destas cultivares é limitada. De fato a diferença na época de floração das espécies do subgênero *Euvitis* e *Vitis rotundifolia* (subgênero *Muscadinia*), juntamente com a falta de compatibilidade causada pelas diferenças genéticas, impedem a formação de híbridos naturais (PATEL; OLMO, 1955).

Os parâmetros genéticos como número de alelos por locos, heterozigosidade esperada e observada e o conteúdo de informação polimórfica nos oito locos microssatélites são apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - Caracterização dos oito locos microssatélites usados neste estudo: número de alelos por locos (N), porcentagem de locos polimórficos (P), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), frequência de alelos nulos (r) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) calculados agrupando-se todas as cultivares em um único grupo.

Loco	N	P (%)	H_o	H_e	r	PIC
VVS2	8	100	0,8128	0,8286	0,0086	0,23
VVMD5	5	100	0,3714 ⁽¹⁾	0,7147 ⁽¹⁾	0,2002	0,19
VVMD7	7	100	0,8857	0,7901	-0,0529	0,26
VVMD27	8	100	0,9714 ⁽²⁾	0,8356	-0,0739	0,34
VVMD31	9	100	0,8571	0,8559 ⁽²⁾	-0,0006	0,34
VVMD32	6	100	0,7143	0,7557	0,0236	0,30
VrZag62	7	100	0,9143	0,7983	-0,0645	0,30
VrZag79	8	100	0,8286	0,8174	-0,0062	0,30
Total	58					
Média	7,25	100	0,7944	0,7995		0,2825

⁽¹⁾ menor valor; ⁽²⁾ maior valor

A média da heterozigosidade esperada (H_e) nos oitos locos analisados, foi de 79,95%, variando de 71,47% (VVMD5) a 85,59% (VVMD31). Estes valores foram maiores do que os observados por Sefc *et al.* (2000) em cultivares Européias (68-82%) e Riaz *et al.* (2008) em

cultivares de *Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia* e híbridos de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* (5-85%), mas similares à aqueles encontrados nas coleções de videira de Santa Catarina, composta basicamente por cultivares européias, americanas e híbridas (SCHUCK *et al.*, 2009), em cultivares espanholas e híbridos (*Vitis vinifera* x cvs. americanas) (MARTÍN *et al.*, 2003) e híbridos americanos cultivados nos Estados Unidos (POLLEFEYS; BOUSQUET, 2003).

A heterozigosidade observada (H_o) variou de 37,14% (VVMD5) a 97,14% (VVMD27), com valores superiores à esperada em todos os locos, exceto para VVS2, VVMD5 e VVMD32. Uma possível explicação para os valores obtidos nestes locos ($H_o < H_e$) seria a ocorrência de alelos nulos (não-amplificação) (LOPES *et al.*, 1999). Sendo assim, calculou-se a probabilidade de alelos nulos e para cada um daqueles locos que apresentaram $H_o < H_e$ a ocorrência de alelos nulos foi positiva e alta apenas para VVMD5. No loco VVMD5 a H_e foi alta (71,47%), tal como nos demais locos, mas observou-se uma H_o muito baixa (37,14%). Nos demais locos (VVS2 e VVMD32) o valor de H_e foi ligeiramente superior a H_o e a frequência de alelos nulos foi muito baixa (Tabela 5). Mesmo assim os valores de H_e e H_o foram altos para estes dois locos. Alelos nulos nos locos microsatélites é em geral resultado de mutações pontuais ocorridas nos locais de anelamento dos *primers*. Cipriani *et al.* (2008) relatam que um loco com valor positivo de alelo nulo indica um excesso de homozigotos, mas esta situação não implica necessariamente que um alelo nulo esteja presente. Assim, a suposição de homozigose, em vez de heterozigose com um alelo nulo poderia ser considerada adequada no presente estudo. De fato, o loco VVMD5 apresentou o maior número de cultivares homozigotas em relação aos demais (Tabela 3). Tal tendência também foi observada por Martín *et al.* (2003). Neste estudo, o valor médio da heterozigosidade observada (79,44%) foi maior que o obtido para cultivares de *Vitis vinifera* (70,7%) (IBÁÑEZ *et al.*, 2003) e *Vitis rotundifolia* (60%) (SMITH, 2010), mas está na mesma faixa que o obtido quando cultivares de porta-enxertos são incluídos nas análises (THIS *et al.*, 2004; ANDRÉS *et al.*, 2007). De qualquer forma, verifica-se que neste trabalho na maioria dos locos (93,75%), os valores da heterozigosidade observada e esperada foram superiores a 70%, indicando elevada variabilidade genética dos marcadores analisados. A alta heterozigosidade é comumente encontrada em espécies perenes propagadas vegetativamente como a videira (ARADHYA *et al.*, 2003).

A qualidade dos marcadores foi confirmada pelo conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada loco microssatélite em todas as cultivares (Tabela 5). Foram verificados valores de PIC superiores a 0,25 em mais de 85% dos locos analisados. Os locos VVS2, VVMD27 e VrZAG79, que apresentaram neste estudo oito alelos e VVMD7 e VrZAG62, com sete alelos nesse estudo também foram muito informativos em outros trabalhos (LÓPEZ *et al.*, 1999; MARTÍN *et al.*, 2003; NÚÑEZ *et al.*, 2004). O número de alelos por loco (N), heterozigosidade esperada (H_e) e PIC indicam VVMD31 como o loco com o maior conteúdo informativo com nove alelos, $H_e=85,59\%$ e $PIC=0,34$; enquanto VVMD5 é o menos informativo com $PIC=0,19$. Segundo a classificação de Botstein *et al.* (1980), marcadores com valores de PIC entre 0,25 e 0,50 são considerados mediantemente informativos e os marcadores escolhidos para este trabalho estão de acordo com esse critério. Segundo Carimi *et al.* (2010) os melhores microssatélites são aqueles que exibem alta H_e e PIC. O valor médio de PIC (0,2825) e do número de alelos por loco (7,25) obtidos foram menores do que em estudos anteriores: 0,782 e 11 (MARTÍN *et al.*, 2003) e 0,777 e 7,8 (GONZÁLEZ-ANDRÉS *et al.*, 2007), respectivamente, que utilizaram seis locos microssatélites, sendo cinco (VVS2, VVMD5, VVMD7, VrZAG62 e VrZAG79) iguais ao deste estudo para caracterizar a diversidade genética de 318 e 79 cultivares Espanholas, respectivamente. O menor número de alelos por loco e o baixo valor de PIC para os locos usados no presente estudo pode ser atribuído ao menor número de cultivares analisadas (9).

A matriz de distância genética de Nei (1972) revelou variação de distância mínima de zero entre as cultivares ‘Regale’ e ‘Magoon’, o que já era esperado e de 1,0 entre ‘Marta’ e ‘Bordo’, justificável pela similaridade genética das duas cultivares (Tabela 3), e máxima de 5,75 entre as cultivares ‘Bordo’ e ‘Bountiful’. A partir dos valores da matriz das distâncias genéticas gerou-se um dendograma utilizando o método UPGMA (Figura 1). O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,97, revelando concordância entre o dendograma e a matriz de distâncias. Segundo Sokal e Rohlf (1962) valores de $r \geq 0,8$ indicam um bom ajuste entre a matriz inicial e a matriz dos valores cofenéticos. Os agrupamentos formados a partir da matriz de distância genética mostram que quanto mais próximo de 100% os grupos foram formados, mais divergentes são as cultivares e quanto mais próximo de zero mais similares.

TABELA 6 - Matriz da distância genética (Nei, 1972) entre as dez cultivares de *Vitis*, com base em oito marcadores microssatélites.

	Acessos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	‘Bountiful’	0,00									
2	‘Carlos’	3,75	0,00								
3	‘Magnolia’	4,25	1,50	0,00							
4	‘Magoon’	4,25	2,00	1,25	0,00						
5	‘Regale’	4,25	2,00	1,25	0,00	0,00					
6	‘Bordo’	5,75	4,75	5,25	5,25	5,25	0,00				
7	‘Goethe’	4,75	3,75	4,00	4,25	4,25	3,5	0,00			
8	‘Isabel’	5,25	4,25	4,75	4,75	4,75	2,25	3,50	0,00		
9	‘Marta’	5,50	4,50	5,00	5,00	5,00	1,00	3,25	2,50	0,00	
10	‘Niagara Rosada’	5,50	4,50	4,75	4,75	4,75	2,00	4,00	2,25	2,00	0,00

A análise do dendograma identificou dois grupos principais: no primeiro grupo foram agrupadas as cinco cultivares de *Vitis rotundifolia* (‘Bontiful’, ‘Carlos’, ‘Magnolia’, ‘Regale’ e ‘Magoon’) e, no segundo grupo, as cinco cultivares de *Vitis labrusca* (‘Bordo’, ‘Goethe’, ‘Isabel’, ‘Marta’ e ‘Niagara Rosada’) (Figura 1). Este resultado já era esperado, pois além das diferenças cromossômicas, existem características anatômicas e morfológicas importantes entre as espécies. Por exemplo, nos ramos de espécies do subgênero *Euvtis*, como *Vitis labrusca* há nós com diafragamas interrompendo a medula, a casca é estriada e o número de cromossomos é 38. Em *Vitis rotundifolia* não ocorre esta interrupção, sendo sua medula contínua, há lenticelas sobre a casca lisa, a maturação é desuniforme, existe dificuldade de propagação e o número de cromossomos é 40 (POMMER, 2003)

No grupo *Vitis rotundifolia*, ‘Regale’ e ‘Magoon’ apresentaram distância igual a zero, conforme já era esperado (Figura 1). ‘Magoon’ apresentou o mesmo perfil genético que ‘Regale’ deste estudo e da cultivar ‘Regale’ presente no banco de dados de referência, indicando se tratar da mesma cultivar. A distância de ‘Magnolia’ para ‘Regale’ foi de 26% e de ‘Carlos’ para esse conjunto foi de 38,12% (Figura 1). ‘Magnolia’ e ‘Regale’ têm 74% de alelos comuns, enquanto ‘Carlos’ compartilha com ‘Magnolia’ e ‘Regale’, 67% e 62% dos alelos, respectivamente (Tabela 3). Estas três cultivares têm como origem geográfica a Carolina do Norte e ‘Regale’ tem em seu *background* genético ‘Magnolia’, demonstrando a similaridade genética entre elas (Riaz *et al.*, 2008). ‘Bountiful’ foi a cultivar mais distante de todas as outras do mesmo grupo, com distância de 85,76% (Figura 1). Além disso, ‘Bountiful’ apresentou o maior número de alelos privados dentro do grupo *Vitis rotundifolia* (Tabela 4).

Para *Vitis labrusca*, as cultivares ‘Bordo’ e ‘Marta’ foram separadas por uma distância de 20,8% (Figura 1) e diferem geneticamente apenas em quatro alelos (Tabela 3). ‘Niagara Rosada’ foi separada de ‘Bordo’ e ‘Marta’ por uma distância de 41,58% e, por sua vez,

‘Isabel’ foi separada desse grupo por 48,51%. ‘Goethe’ foi a cultivar mais distante de todas as outras do mesmo grupo, com uma distância de 74,1% (Figura 1) e dentro do grupo *Vitis labrusca* é a mais divergente e a que apresentou o maior número de alelos privados (Tabela 4).

O conhecimento das cultivares mais divergentes é fundamental para orientar o melhorista na escolha das melhores combinações de cruzamento. Entretanto, na escolha dos genitores, deve-se considerar além da divergência genética, as características agrônômicas dos genótipos, bem como, os objetivos do programa de melhoramento. Em um programa de melhoramento visando à criação de porta-enxertos buscam-se aqueles com resistência e/ou tolerância a estresses bióticos e abióticos. Em relação às cultivares caracterizadas neste estudo, sabe-se que as pertencentes à espécie *Vitis rotundifolia* são resistentes a quase todas as pragas e doenças da videira. Cabe destacar aquelas com resistência (‘Bountiful’ e ‘Magnolia’) e tolerância (‘Regale’) à principal praga de solo do Sul do Brasil, a pérola-da-terra (BOTTON; COLLETA, 2010). Quanto as do grupo *Vitis labrusca*, estas são bem adaptadas as condições vitícolas do Sul do Brasil, possuem tolerância a filoxera e a fusariose (ANDRADE *et al.*, 1995), o que as torna importante fonte genética para programas de melhoramento de videira.

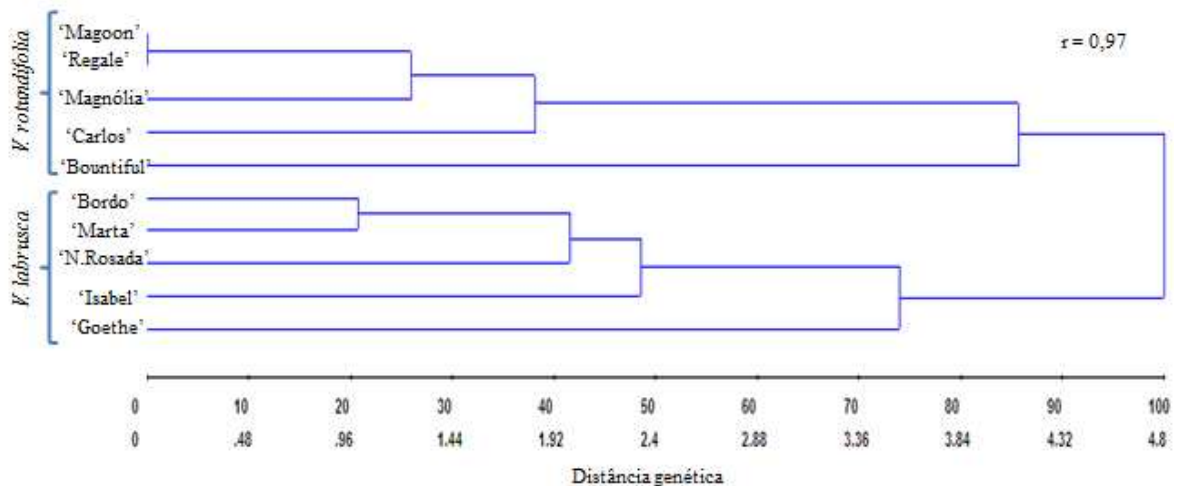


FIGURA 1 - Dendrograma representativo de dez cultivares de videira pelo método hierárquico UPGMA, utilizando os valores da matriz das distâncias genéticas de Nei (1972) em valores adimensionais e em porcentagem.

4.4 CONCLUSÃO

1. A análise com microssatélites das dez cultivares resultou em nove perfis genéticos únicos quando comparados com aqueles encontrados no banco de dados internacional e na coincidência do perfil alélico de ‘Magoon’ com ‘Regale’ deste estudo.

2. Foram encontradas diferenças na composição alélica das cultivares analisadas que refletiram tanto sobre a existência de diferentes conjuntos de alelos para *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca*, como na existência de alelos privados em cada grupo.

3. O dendrograma gerado pelo método UPGMA agrupou as dez cultivares de videira em dois grupos, mostrando-se eficiente na separação das cultivares com base em sua genealogia e classificação botânica, evidenciando relações de parentesco entre cultivares de um mesmo grupo.

4. Os grupos *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca* apresentam elevada diversidade genética, tanto entre quanto dentro dos grupos.

4.5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, E.R. de; DALBÓ, M.A.; SCHUCK, E.; GALLOTTI, G.J.M. Evaluation of grapevine (*Vitis* spp.) resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* in Rio do Peixe Valley, Santa Catarina State, Brazil. **Acta Horticulturae**, v.388, p.65-69, 1995.

ANDRÉS, M.T. de; CABEZAS, J.A.; CERVERA, M.T.; BORREGO, J.; MARTÍNEZ ZAPATER, J.M.; JOUVE, N. Molecular characterization of grapevine rootstocks maintained in germplasm collections. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.58, p.75-86, 2007.

ALLEWELDT, G.; SPIEGEL-ROY, P.; REISCH, B.I. Grapes (*Vitis*). In: MOORE, J.N.; BALLINGTON JUNIOR, J.R. (Eds.). **Genetic resources of temperate fruit and nut crops**. **Acta Horticulturae**, n.290, p.291–337, 1990.

ARADHYA, M.K.; DANGL, G.S.; PRINS, B.H.; BOURSIQUOT, J.M.; WALKER, M.A.; MEREDITH, C.P.; SIMON, C.J. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. **Genetic Research**, v.81, p.179–192, 2003.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

BOTTA, R.; SCOOT, N.S.; EYNARD, I.; THOMAS, M.R. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. **Vitis**, v.34, p.99-102, 1995.

BOTTON, M.; COLLETA, D. Avaliação da resistência de cultivares de *Vitis rotundifolia* à pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.213-216, 2010.

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**, v.39, p.628-633, 1996.

BOWERS, J. E.; DANGL, G. S.; MEREDITH, C. P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.50, p.243–246, 1999.

BROOKFIELD, J.F.Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, v.5, p.453-455, 1996.

CARIMI, F.; MERCATI, F.; ABBATE, L.; SUNSERI, F. Microsatellite analyses for evaluation of genetic diversity among Sicilian grapevine cultivars. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.57, p.703-719, 2010.

CIPRIANI, G.; MARRAZZO, M.T.; DI GASPERO, G.; PFEIFFER, A.; MORGANTE, M.; TESTOLIN, R. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. **BMC Plant Biology**, v.8, n.127, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2625351/pdf/1471-2229-8-127.pdf>. Acesso em: 30/11/2011.

COSTA, A.F. da. **Avaliação de características agronômicas em variedades e de diversidade molecular em variedades, híbridos e espécies de videira**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2004.

CRUZ, C.D. Programa Genes versão 2007.0.0 - Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2007. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/genes/gdown1.htm>. Acesso em: agosto 2010.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1998. 220 p.

GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; MARTÍN, J.P.; YUSTE, J.; RUBIO, J.A.; ARRANZ, C.; ORTIZ, J.M. Identification and molecular biodiversity of autochthonous grapevine cultivars in the 'Comarca del Bierzo', León, Spain. **Vitis**, v.46, p.71-76, 2007.

IBÁÑEZ, J.; DE ANDRÉS, M. T.; MOLINO, A.; BORREGO, J. Genetic study of key Spanish grapevine varieties through microsatellite analysis. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.54, p.22-30, 2003.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analyses of allelic data (software)**. Version 1.0. 2001. Disponível em: <http://alleyn.eeg.uconn.edu/gda>. Acesso em: 03/08/2011.

LIN, H.; WALKER, M. A.; 1998: Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.49, p.403-407, 1998.

LOPES, M. S.; SEFC, K. M.; DIAS, E. D.; STEINKELLNER, H.; LAIMER, da C.M.; MACHADO, A. da C. The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.733-739, 1999.

MARTÍN J.P., BORREGO J., CABELLO F.; ORTIZ J.M. Characterization of the Spanish diversity grapevine cultivars using sequence-tagged microsatellite site markers. **Genome**, v.46, p.10-18, 2003.

MORENO-SANZ P.; SUÁREZ, B.; LOUREIRO M.D. Identification of synonyms and homonyms in grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) from Asturias (Spain). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.83, p.683-688, 2008.

MULLINS, M.G.; BOUQUET, A.; WILLIAMS, L.E. Developmental physiology: flowering and fruiting. In: MULLINS, M.G. (Ed). **Biology of the grapevine**. Cambridge: University Press, 1992. p.112-146.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v.106, p.283-292, 1972.

NUÑEZ, Y.; FRESNO, J.; TORRES, V.; PONZ, F.; GALLEGU, F. J. Practical use of microsatellite markers to manage *Vitis vinifera* germplasm: Molecular identification of grapevine samples collected blindly in D.O. “El Bierzo” (Spain). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.79, p.437-440, 2004.

OIV - ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO. **Estadística: informe del director general sobre la situación de la vitivinicultura em 2007**. Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/info/esstatistiquessecteurvitivinicole>. Acesso em: 05/06/2011.

OLIVEIRA, P.R.D. de; SCOTTON, D.C.; NISHIMURA, D.S.; FIGUEIRA, A. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, 454-457, 2005.

OLIEN, W. Introduction to the Muscadines. In: BASIOUNY, F.M.; HIMELRICK, D.G. (Eds.). **Muscadine Grapes**. Alexandria, VA: ASHS Press. 2001. p.1-13.

OLMO, H.P. The potential role of *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrids in grape variety improvement. **Experientia**, v.42, p.921-26, 1986.

ORTIZ, J. M.; MARTIN, J.P.; BORREGO, J.; CHAVEZ, J.; RODRIGUES, I.; MUNOZ, G.; CABELLO, F. Molecular and morphological characterization of a *Vitis* gene bank for the establishment of a base collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.51, p.403-409, 2004.

PATEL, G.I; OLMO, H. P. Cytogenetics of *Vitis*. 1. The hybrid *Vitis vinifera* X *Vitis rotundifolia*. **American Journal of Botany**, v.42, p.141-159, 1955.

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

POMMER, C.V. **Uva Tecnologia de produção, Pós-colheita, Mercado**. In: POMMER, C.V. (Ed.). Porto Alegre: Cino Continentes, 2003. 778p.

RIAZ, S.; DANGL, G.S.; EDWARDS, K.J.; MEREDITH, C.P. A microsatellite based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.108, p.864-872, 2004.

RIAZ, S.; GARRISON, K. E.; DANGL, G. S.; BOURSQUOT, J. M.; MEREDITH, C. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.127, p.508-514, 2002.

RIAZ, S.; TENSCHER, A.C.; SMITH, B.P.; NG, D.A.; WALKER, M.A. Use of SSR Markers to Assess Identity, Pedigree, and Diversity of Cultivated Muscadine Grapes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.133, p.559-568, 2008.

SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; GUERRA, M.P.; VOLTOLINI, J.A.; GRANDO, M.S.; LIMA DA SILVA, A. Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina State using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.487-495, 2009.

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

SILVA, F.C.C. da. **Avaliação de características dos frutos, diversidade genética, detecção de marcas moleculares associadas ao gene de apirenia em variedades de videira**. 74 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2006.

SMITH, B.P. **Genetic and Molecular Mapping Studies on a Population Derived from *Vitis vinifera* x *Muscadinia rotundifolia* and Genetic Diversity of wild *Muscadinia rotundifolia***. 277 p. Dissertation (Doctor of philosophy in Genetics) – University of California, Davis, 2010.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p.33-40, 1962.

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

THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.985-990, 1993.

VOUILLAMOZ, J. F.; SCHNEIDER, A.; GRANDO, M. S. Microsatellite analysis of Alpine grape cultivars (*Vitis vinifera* L.): alleged descendants of Pliny the Elder's Raetica are genetically related. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.54, p.1095-1104, 2007.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados alcançados no presente trabalho permitiram apontar as seguintes conclusões:

1. O sucesso nas hibridações entre *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca* depende da espécie e da cultivar utilizada como genitor feminino.

2. Cultivares de *Vitis labrusca* podem ser cruzadas com sucesso com pólen das cultivares de *Vitis rotundifolia*, mas todas as combinações recíprocas falham em produzir híbridos verdadeiros.

3. Nos cruzamentos em que *Vitis rotundifolia* foi utilizada como genitor feminino, nenhum híbrido verdadeiro foi obtido, entretanto nos recíprocos foram identificadas 114 plântulas como verdadeiros híbridos de *Vitis labrusca* x *Vitis rotundifolia*.

4. A análise com os marcadores microsatélites demonstrou a coincidência do perfil alélico de ‘Magoon’ com ‘Regale’ deste estudo e da cultivar ‘Regale’ presente na base de dados de referência para identificação de videira, mantida pela *Foundation Plant Service*, Universidade da Califórnia, Davis.

5. Os marcadores microsatélites são ferramentas eficientes para confirmação da paternidade de híbridos interespecíficos F1 e para determinar a correta identificação de cultivares de *Vitis*.

6. Foram encontradas diferenças na composição alélica que refletiram tanto sobre a existência de diferentes conjuntos de alelos para *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca*, como na existência de alelos privados em cada grupo.

7. O dendrograma gerado pelo método UPGMA agrupou as dez cultivares de videira em dois grupos, mostrando-se eficiente na separação das cultivares com base em sua genealogia e espécie botânica, evidenciando relações de parentesco entre cultivares de um mesmo grupo.

8. Os grupos *Vitis rotundifolia* e *Vitis labrusca* apresentam elevada diversidade genética, tanto entre quanto dentro dos grupos, evidenciando que há variabilidade genética suficiente nas cultivares utilizadas neste estudo para subsidiar programas de melhoramento genético.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como as hibridações controladas entre *Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia* apresentam dificuldades em produzir frutos, sugere-se para estudos futuros a realização de testes de germinação *in vivo* dos grãos de pólen, os quais permitirão analisar características associadas à germinação dos tubos polínicos e suas taxas de crescimento, servindo também para analisar hibridações efetivas em programas de melhoramento genético e, assim, elucidar algumas formas de incompatibilidade. Além disso, devido a não-coincidência da floração entre as cultivares destas espécies, muitas vezes os melhoristas necessitam armazenar o pólen colhido em um ano para ser utilizado no ano seguinte. Portanto, sugere-se também estudos testando a viabilidade do pólen.

Com relação às plântulas híbridas obtidas neste estudo, estas já estão sendo micropropagadas *in vitro* e serão futuramente avaliadas quanto ao comportamento agrônomo como porta-enxerto, especialmente em relação à resistência a patógenos de solo como a pérola-da-terra e fusariose. E se estes híbridos apresentarem resistência e ou tolerância a pérola-da-terra será um grande avanço para a viticultura do Sul do país, onde essa praga causa graves prejuízos e inviabiliza as áreas infestadas para a implantação de novos parreirais. Além disso, estudos futuros podem ser realizados no sentido de identificar marcadores ligados a genes de resistência nestes híbridos, através da construção de mapas genéticos, detecção de locos QTLs (*Quantitative trait loci*) e a seleção assistida por marcadores (MAS).

O recurso à caracterização molecular envolvendo marcadores moleculares microsatélites, permitiu estabelecer com maior clareza os vínculos genéticos entre as diferentes cultivares, e, conseqüentemente, uma melhor organização da Coleção de Germoplasma. Permitiu ainda enriquecer o conhecimento para melhorar a estratégia de coleção futura de germoplasma e possibilitar mais eficazmente a utilização desse material em programas de criação de cultivares, proteção de cultivares, produção e certificação de mudas. Além disso, verifica-se que é possível, por meio de dados moleculares, validar a hibridação controlada entre espécies de *Vitis*, sendo, portanto, a aplicabilidade de marcadores microsatélites em distinguir genótipos híbridos, uma metodologia inequívoca e comprovadamente eficaz.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABREO, E.; LUPO, S.; MARTINEZ, S.; BETTUCCI, L. Fungal species associated to grapevine trunk diseases in Uruguay. *Journal of Plant Pathology*, v.90, p.591, 2008. Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/volumes/0308/030824.pdf>. Acesso em: 04/08/2011.

ADAM-BLONDON, A.F.; ROUX, C.; CLAUX, D.; BUTTERLIN, G.; MERDINOGLU, D.; THIS, R. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theoretical Applied Genetics*, v.109, p.1017–1027, 2004.

ALANIZ, S.; LEÓN, M.; VICENT, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P.; ARMENGOL, J. Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, v.91, p.1187–1193, 2007.

ALLEWELDT, G.; POSSINGHAM, J.V. Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, v.75, p.669 -673, 1988.

ALLEWELDT, G.; SPIEGEL-ROY, P.; REISCH, B.I. Grapes (*Vitis*). In: Moore J.R., Ballington J.R. (Eds). Genetic resources of temperate fruit and nut crops, *Acta Horticulture*, v.290, p.291-337, 1990.

ALVARENGA, A.A.; ABRAHÃO, E.; REGINA, M de A.; ANTUNES, L.E.C.; PEREIRA, A.F. Origem e classificação botânica da videira. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.19, n.194, p.5-8, 1998.

ANDRADE, E.R. de; DALBÓ, M.A.; SCHUCK, E.; GALLOTTI, G.J.M. Evaluation of grapevine (*Vitis* spp.) resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* in Rio do Peixe valley, Santa Catarina State, Brazil. *Acta Horticulturae*, n.388, p.65-69, 1995.

ANDRADE, E.R. de; SCHUCK, E.; DALBÓ, M.A. Avaliação da Resistência de *Vitis* spp. a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* em condições controladas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.28, p.1287-1290, 1993.

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

BARKER, C.L.; DONALD, T.; PAUQUET, J.; RATNAPARKHE, M.B.; BOUQUET, A.; ADAM-BLONDON, A.F.; THOMAS, M.R.; DRY, I. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.370-373, 2005.

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A.C. de; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott' avaliada por faFLP e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.779-784, 2006.

BOCCACCI, P.; MARINONI, D.T.; GAMBINO, G.; BOTTA, R.; SCHNEIDER, A. Genetic Characterization of Endangered Grape Cultivars of Reggio Emilia Province. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.56, n.4, p.411-416, 2005.

BONA, C.M.; GOULD, J.H.; MILLER, J.C.; STELLY, J.D.M.; LOUZADA, E.S. Tissue culture of *Vitis sp.* for protoplast isolation. **Horticulturae Science**, v. 41, p.1024, 2006.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. 500 p.

BOTTA, R.; SCOOT, N.S.; EYNARD, I.; THOMAS, M.R. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. **Vitis**, v.34, p.99-102, 1995.

BOTTON, M.; COLLETA, D. Avaliação da resistência de cultivares de *Vitis rotundifolia* à pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.213-216, 2010.

BOTTON, M.; HICKEL, E.R.; SORIA, S.J.; SCHUCK, E. Pérola-da-terra. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M.T.B. (Org.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa, 2004. p.457-476.

BOUQUET, A.; DANGLLOT, Y.; BONGIOVANI, M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ESMENJAUD, D.; DALAMASSO, A.; TORREGOSA, L. Breeding rootstocks resistant to grape fanleaf virus spread using *Vitis x Muscadinia* hybridization. **Acta Horticulturae**, n. 528, p.523-532, 2000.

BOWERS, J. E.; DANGL, G. S.; MEREDITH, C. P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.50, p.243-246, 1999.

BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, v.39, p.628-633, 1996.

BOWERS, J.E.; MEREDITH, C.P. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. **Nature Genetics**, v.16, n.1, p.84-87, 1997.

BRUCKNER, C.H. **Fundamentos do Melhoramento de Fruteiras**. Viçosa: UFV, 2008. 202 p.

BURGER, P.; BOUQUET, A.; STRIEM, M.J. Grape Breeding. In: JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P.M. **Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species**. Springer-Verlag: New York, 2009. p.161-189.

CAIXETA, R.P.; CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S.; TRUGILHO, P.F. Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. **Sociedade de Investigações Florestais**, v.27, p.357-363, 2003.

CAMARGO, U. A. Melhoramento genético da videira. In: LEÃO, P. C. de. S.; SOARES, J. M. **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p.93-128.

CAMARGO, U.A.; RITSCHER, P.S. New table and wine grape cultivars: world scenario with emphasis on Brazil. **Acta Horticulturae**, n.785, p.89-95, 2008.

CAMARGO, U.A.; RITSCHER, P.; OLIVEIRA, P.R.D. de; NACHTIGAL, J.C. Criação de porta-enxertos resistentes à Pérola-da-Terra. In: Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 12, 2008, Bento Gonçalves, RS. **Anais XVII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**, Bento Gonçalves, RS. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 185p, 2008.

CAMPBELL, C. **The Botanist and the Vintner: How Wine was saved for the World**. Chapel Hill, N.C.: Algonquin Books of Chapel Hill, 2005.

CASSIDY, F.G. **Dictionary of American Regional English**. Cambridge, Mass: Belknap Press of Harvard University Press, 2002. 1985p.

CIPRIANI, G.; FRAZZA, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Grapevine application of microsatellite marker fingerprinting using microsatellite repeats. **Vitis**, v.33, p.211-215, 1994.

CORDEIRO, M.C.R.; PINTO, A.C.Q.; RAMOS, V.H.V.; GELAPE, F. Utilização de marcadores RAPD e outros parâmetros na determinação de genitores em híbridos de mangueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.164-167, 2006.

COSTA, A.F. da. **Avaliação de características agronômicas em cultivares e de diversidade molecular em variedades, híbridos e espécies de videira**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2004.

DALBÓ, M. A. Comportamento de porta-enxertos de videira em área com alta incidência de declínio e morte de plantas – Dados preliminares. In: Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 12, 2008, Bento Gonçalves, RS. **Anais XVII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**, Bento Gonçalves, RS. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. p.119.

DALBÓ, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; STEINKELLNER, H.; SEFC, K. M.; REICH, B.I. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. **Genome**, v.43, p.333-340, 2000.

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

DE CÉSARO, A. **Caracterizações histológica e fisiológica do ataque de pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Wille, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) em videiras**. 89p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

DEKKERS, J.C.M; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, n.3, p. 22-32, 2002.

DELAS, J.J. Criteria used for rootstock selection in France. In: Rootstock Seminar: A Worldwide Perspective, 1992, Reno. **Proceedings...** Davis: ASEV, 1992. p.1-14.

DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G.; ADAM-BLONDON, A.F.; TESTOLIN, R. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. **Theoretical and Applied Genetics**, v.114, p.1249-63, 2007.

DOLIGEZ, A.; BOUQUET, A.; DANGLOT, Y.; LAHOGUE, F.; RIAZ, S.; MEREDITH, C.P.; EDWARDS, K.J.; THIS, P. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1213–1224, 2002.

DOUCLEFF, M.; JIN, Y.; GAO, F.; RIAZ, S.; KRIVANEK, A.F.; WALKER, M.A. A genetic linkage map of grape utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.1178–1187, 2004.

DUNN, G.M.; MARTIN, S.R. Do temperature conditions at budburst affect flower number in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon? **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.6, p.116-124, 2000.

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotrópica**, v.15, p.41-46, 2003.

FAO. **FAOSTAT database**. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. 2010. Acesso em: 15/07/2011.

FERREIRA, J.H.S.; MATTHEE, F.N.; THOMAS, A.C. Fungi Associated with Dieback and Pruning Wounds of Grapevines in South Africa. **South Africa Journal of Enology and Viticulture**, v.10, p.62-66, 1989.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FIROOZABADY, E.; OLMO, H.P. Resistance to grape phylloxera in *Vitis vinifera* crossed with *Vitis rotundifolia* grape hybrids. **Vitis**, v.21, p.1-4, 1982a.

FIROOZABADY, E.; OLMO, H.P. The heritability of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* acrita Chit.) in *Vitis vinifera* crossed with *Vitis rotundifolia* hybrid derivatives. **Vitis**, v.21, p.136-144, 1982b.

GALET, P.; SMITH, J. **Grape Varieties and Rootstock Varieties**. Oenoplurimedia: Chaintré, France, 1998. 315p.

GARRIDO, L.R.; SONEGO, O.R.; GOMES, V.N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.3, p.322-324, 2004.

GOLDY, R. Breeding muscadine grapes. In: **Horticulture Reviews**. NJ: Wiley-Interscience, 1992, v.14, p.357-405.

GOLDY, R.; ONOKPISE, O.U. Genetics and Breeding. In: BASIOUNY, F.M. AND HIMELRICK, D.G. (Eds.). **Muscadine grapes**. ASHS Press, Alexandria, Virginia, 2001. p.51-90.

GOMES, C.B.; CAMPOS, A.D.C.; COSTA, F. A. da. **Levantamento de Nematóides Fitoparasitas Associados a Pomares de Videira em Declínio da Serra Gaúcha**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 16 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 110).

GRANDO, M.S.; BELLIN, D.; EDWARDS, K.J.; POZZI, C.; STEFANINI, M.; VELASCO, R. Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1213–1224, 2003.

GRANETT, J.; OMER, A.D.; PESSEREAU, P.; WALKER, M.A. Fungal infections of grapevine roots in phylloxera infested vineyards. **Vitis**, v.37, p.39-42, 1998.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Fusariose da videira – resistência de cultivares, sintomas e controle**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1993. 20p. (EMBRAPA-CNPV, Circular Técnica, 18).

HAIJ, F.N.P.; LIMA, M.P.L.; ALENCAR, J.A. de; BARBOSA, F.R.; FERREIRA, R.C.F; MATTOS, M.A. de A. **Cochonilha-Pérola-da-Terra: praga emergente na cultura da uva, no Submédio do Vale São Francisco**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 2004. 5p. (EMBRAPA- CPATSA, Circular Técnica, 78).

HEAZLEWOOD, J.E.; WILSON, S. Anthesis, pollination and fruitset in Pinot noir. **Vitis**, v.43, p.65-68, 2004.

HICKEL, E.R. **Pragas da videira e seu controle no estado de Santa Catarina**. Epagri, Boletim Técnico 77, 1996. 52

HIGHET, A.S.; NAIR, N.G. *Fusarium oxysporum* associated with grapevine decline in the Hunter Valley, NSW, Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.1, p.48-50, 1995.

IBRAF. Frutas Frescas: exportações. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp. Acesso em: 15/07/2011.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE - IPGRI UPOV AND OIV - **Descriptores para la Vid (*Vitis spp.*)** Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, Gêneve, Switzerland; Oficina Internacional de la Vinã y del Vino, Paris, France; Internacional Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 1997. 47p.

JELENKOVIC, G.; OLMO, H. P. Cytogenetics of *Vitis*. Partially fertile F1 diploid hybrids between *Vitis vinifera* L. X *Vitis rotundifolia* Michx. **Vitis**, v.7, p.281-293, 1968.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K.V; AYAD, W.G.; HODGKIN, T. **Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: a Guide to the Technologies** (IPGRI technical bulletin n.2). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 1997. Disponível em: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNACB166.pdf. Acesso em: 08/05/11.

KARP, A. The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity. In: ENGELS, J.M.M.; RAMANATHA, R.V.; BROWN, A.H.D.; JACKSON, M.T. (Eds.). **Managing Plant Genetic Diversity**. Wallingford and Rome: CAB International and IPGRI, 2002. p.43-56.

KELLOW, A.V.; MCDONALD, G.; CORRIE, A.M.; HEESWIJCK, R.V. *In vitro* assessment of grapevine resistance to two populations of phylloxera from Australian vineyards. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.8, p.109-116, 2002.

KOZMA, P. Exploration of flower types in grapes. In: KOZMA, P.; NYÉKI, J.; SOLTÉSZ, M.; SZABÓ, Z. **Floral Biology, Pollination and Fertilisation in Temperate Zone Fruit Species and Grape**, Budapest: Akadémiai kaidó, 2003. p.75-226.

KUHN, G.B. **Morte de plantas de videira (*Vitis spp.*) devido à ocorrência de fungos causadores de podridões radiculares e doenças vasculares**. Bento Gonçalves: Embrapa-UEPAE, 1981 (Embrapa – UEPAE, Circular Técnica, 6).

KUMMAR, L.S. DNA markers in plant improvement: An overview. **Biotechnology Advances**, v.17, p.143-182, 1999.

KUNIYUKI, H. Viroses. In: POMMER, C.V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p.596-616.

LAUCOU, V.; BOURSIQUOT, J.M.; LACOMBE, T.; BORDENAVE, L.; CROOCQ, S. de; OLLAT, N. Parentage of grapevine rootstock 'Fercal' finally elucidated. **Vitis**, v.47, p.163-167, 2008.

LEÃO, P.C. de S. **O cultivo da uva**. Trabalho apresentado na 8. Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria, FRUTAL, Fortaleza, Ceará, 2001.

LEÃO, P.C. de S. **Recursos genéticos de videira (*Vitis* spp.): análise da diversidade e da caracterização da coleção de germoplasma da embrapa semi-árido**. 126f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

LEÃO, P.C.S.; BORGES, R.M.E. Melhoramento Genético da Videira. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 61p. (Embrapa Semiárido. Série Documentos, 224). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 1/11/2011.

LEFORT, F.; KYVELOS, J.; ZERVOU, M.; EDWARDS, K. J.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, A. Characterization of new microsatellite loci from *Vitis vinifera* and their conservation in some species and hybrids. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.20-21, 2002.

LIU, J.; XU, X.; DENG, X. Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.82, p.19-42, 2005.

LOWE, K.M.; WALKER, M.A. Genetic linkage map of the interspecific grape rootstock cross Ramsey (*Vitis champinii*) x Riparia Gloire (*Vitis riparia*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.1582-1592, 2006.

LU, J.; LAMIKANRA, O. Barriers to intersubgeneric crosses between Muscadinia and Euvitis. **Horticultural Science**, v.31, p. 269-271, 1996.

LU, J.; SCHELL, L.; RAMMING, D.W. Interspecific hybridization between *Vitis rotundifolia* and *Vitis vinifera* and evaluation of the hybrids. **Acta Horticulturae**, n.528, p.479-486, 2000.

MARTÍN, J. P.; SANTIAGO, J. L.; PINTO-CARIDE, O.; LEAL, F.; MARTÍNEZ, M. C.; ORTIZ, J. M. Determination of relationships among autochthonous grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) in the Northwest of the Iberian Peninsula by using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.53, p.1255-1261, 2006.

MAURO, M.C.; TOUTAIN, S.; WALTER, B.; PINCK, L.; OTTEN, L.; COUTOS-THÉVENOT, P.; DELOIRE, A.; BARBIER, P. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFVL coat protein gene. **Plant Science**, v.112, p.97-106, 1995.

MAY, P. **Flowering and Fruitset in Grapevines**. Adelaide : Phylloxera and Grape Industry Board of South Australia in association with Lythrum Press, 2004. 119p.

MELLO, L.M.R de. **Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial Panorama 2010**. Disponível em: www.embrapa.com. Acesso em: 11/05/2011.

MENDES, M.A.S.; URBEN, A.F.; LIMA, M.L.P.; SILVA, V.A.M.; OLIVEIRA, A.S. de. **Fungos exóticos interceptados em estacas de uvas procedentes da Itália**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2008. 8p. (EMBRAPA-CENARGEN. Comunicado Técnico, 186).

MERDINOGLU, D.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; COSTE, P.; DUMAS, V.; HAETTY, S.; BUTTERLIN, G.; GREIF, C. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. **Acta Horticulturae**, n.1, p.451-456, 2003.

MEREDITH, C.P.; BOWERS, J.E.; RIAZ, S.; HANDLEY, V.; BANDMAN, E. B.; DANGL, G.S. The identity and parentage of the variety known in California as Petite Syrah. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.50, p.236-242, 1999.

MILACH, S.C.K. **Marcadores de DNA em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 141 p.

MULLINS, M.G.; BOUQUET, A.; WILLIAMS, L.E. **Biology of the Grapevine**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1992. 239p.

MULLINS, M.G.; TANG, F.C.A.; FACCIOTTI, D. *Agrobacterium*- mediated genetic transformation of grapevines: Transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. *Nature Biotechnology* n.8, p.1041-1045, 1990.

NEVES, T.S.; MACHADO, G.M.E.; OLIVEIRA, R.P. Efeito de diferentes concentrações de carboidratos e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de cubiuzeiro e cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.19, p.207-211, 1997.

OIV - ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO. Estadística: informe del director general sobre la situación de la vitivinicultura em 2007. Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/info/esstatistiquessecteurvitivinicole>. Acesso em: 05/06/2011.

OLIEN, W. Introduction to the Muscadines. In: BASIOUNY, F.M.; HIMELRICK, D.G. (Eds.). **Muscadine Grapes**. ASHS Press, Alexandria, Virginia, 2001. p.1-14.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.477-481, 2001.

OLIVEIRA, P.R.D. de.; SCOTTON, D.C.; NISHIMURA, D.S.; FIGUEIRA, A. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, 454-457, 2005.

OLMO, H.P. The potential role of *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrids in grape variety improvement. **Experientia**, v.42, p.921–26, 1986.

OLMO, H.P. *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrids as wine grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.22, p.87-91, 1971.

OMER, A.D.; GRANETT, J.; WAKEMAN, R.J. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* on different *Vitis* rootstocks. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.433-436, 1999.

PATEL, G. I; OLMO, H. P. Cytogenetics of *Vitis*. The hybrid *Vitis vinifera* X *Vitis rotundifolia*. **American Journal of Botany**, v.42, p.141-159, 1955.

PETRIE, P.R.; CLINGELEFFER, P.R. Effects of temperature and light (before and after budburst) on inflorescence morphology and flower number of Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera* L.). **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.11, p.59-65, 2005.

PINNEY, T. **A History of Wine in America: From Prohibition to the Present**. Berkeley: University of California Press, 2005.

POMMER, C. V. **Uva Tecnologia de produção, Pós-colheita, Mercado.** In: POMMER, C.V. (Ed.). Porto Alegre: Cino Continentes, 2003. 778p.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PIRES, E.J.P. A videira. In: POMMER, C.V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção pós-colheita mercado.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p.37-61.

RASERA, N.G. **Análise da variabilidade genética de *Cylindrocarpon* spp., associados ao pé-preto da videira, com marcadores RAPD.** 25 p. Monografia-Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia, Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, RS, 2005.

READ, P.E; GU, S. A century of American viticulture. **Horticulture Science**, v.38, p.943-951, 2003.

REGINA, M.A. Análise comparativa de organização e metodologia da seleção clonal da videira na França e Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.1, p.206-216, 2004.

REGO, C.; OLIVEIRA, H.; CARVALHO, A.; PHILLIPS, A. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, v.39, p.76-79, 2000.

REISCHT, B.I.; PRATT, C. Grapes. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding: vine and small fruits.** New York: John Wiley, 1996. v.2, p.297-369.

REUSTLE, G.; HARST, M.; ALLEWELDT, G. Regeneration of grapevine (*Vitis* sp.) protoplasts. **Vitis**, v.33, p.173-174, 1994.

REYNOLDS, A.G.; WARDLE, D.A. Rootstocks impact vine performance and fruit composition of grapes in British Columbia. **Horticulture Technology**, v.11, p.419-427, 2001.

RIAZ, S.; DOLIGEZ, A.; HENRY, R.J.; WALKER, M.A. Grape. In: KOLE, C. (Ed.). **Genome mapping and molecular breeding in plants: fruits and nuts.** Berlin: Springer-Verlag, 2007b. p.63-101.

RIAZ, S.; KRIVANEK, A.F.; XU, K.; WALKER, M.A. Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, *PdR1*, and *Sex* on an extended genetic map of *Vitis rupestris* x *Vitis arizonica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.113, p.1317-1329, 2006.

RIAZ, S.; VEZZULLI, S.; HARBERTSON, E.S.; WALKER, M.A. Use of molecular markers to correct grape breeding errors and determine the Identity of novel sources of resistance to *Xiphinema index* and Pierce's Disease. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.58, p.494-498, 2007a.

RUEL, J.J.; WALKER, M.A. Resistance to Pierce's disease in *Muscadinia rotundifolia* and other native grape species. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.57, p.158-65, 2006.

SCHUCK, E.; ANDRADE, E.R. de; GALLOTTI, G.J.M.; DALBÓ, M.A. Novas alternativas na busca de soluções para o controle de declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, v.6, p.48-50, 1993.

SCHUCK, E.; DALBÓ, M.A.; ANDRADE, E.R. de; ROSIER, J.P. Uva. In: EPAGRI. **Avaliação de cultivares para o estado de Santa Catarina 2007/2008**. Florianópolis: EPAGRI, p.139-143, 2007. (EPAGRI, Boletim Técnico n.137).

SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; GUERRA, M.P.; VOLTOLINI, J.A.; GRANDO, M.S.; LIMA DA SILVA, A. Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina State using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.487-495, 2009.

SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; GUERRA, M.P.; VOLTOLINI, J.A.; GRANDO, M.S.; LIMA DA SILVA, A. Identificação molecular da uva 'goethe' de Urussanga-SC por marcadores microssatélites, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, p.825-831, 2010.

SEFC, K.M.; LEFORT, F.; GRANDO, M.S.; SCOOT, K.D.; STEINKELLNER, H.; THOMAS, M.R. Microsatellites markers for grapevine: a state of the art. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. (Ed.). **Molecular biology and biotechnology of grapevine**. Amsterdam: Kluwer, 2001, p.433-463.

SEFC, M.; REGNER, F.; GLOSSL, J.; STEINKELLNER, H. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellites markers. **Vitis**, v.37, p.15-20, 1998.

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

SILVA, M.P.; AMARAL JUNIOR, A.; PEREIRA, M.G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R.F.; POSSE, S.C.P. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, p.531-539, 2005.

SILVA, F.C.C. da. **Avaliação de características dos frutos, diversidade genética, detecção de marcas moleculares associadas ao gene de apirenia em variedades de videira**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2006.

SMITH, B.P. **Genetic and Molecular Mapping Studies on a Population Derived from *Vitis vinifera* x *Muscadinia rotundifolia* and Genetic Diversity of wild *Muscadinia rotundifolia***. 277 p. Dissertation (Doctor of philosophy in Genetics) – University of California, Davis, 2010.

SONEGO, O.R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 32p. (Circular Técnica, 56).

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

SRINIVASAN, C.; MULLINS, M.G. Physiology of flowering in the grapevine—A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.32, p.47-63, 1981.

STRIEGLER, R.K.; CARTER, P.M.; MORRIS, J.R.; CLARK, J.R. THRELFALL, R.T.; HOWARD, L.R. Yield, quality and nutraceutical potential of selected muscadine cultivars grow in Southwestern Arkansas. **HortTechnology**, v.15, p.276-284, 2005.

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

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

THOMAS, M.; CAIN, P.; SCOTT, N.S. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Molecular Biology*, v. 25, p.937-949, 1994.

THOMAS, M.; SCOTT, N.S. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysis as sequenced-tagged sites (STSs). **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.985-990, 1993.

THOMAS, M.; SCOTT, N.S. Microsatellite sequence tagged site markers: simplified technique for rapidly obtaining flanking sequences. **Plant Molecular Biology**, v.12, p.58-64, 1994.

TOCHETTO, A. Fusariose da parreira. **Revista Agrônômica**, Porto Alegre, v.17, p.82-89, 1954.

USDA-ARS. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?41889>. Acesso em: 11/04/11.

VALDEZ, J.G. Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L.) after an extended period of seed trace culture. **Vitis**, v.44, p.17-23, 2005.

VASCONCELOS, M.C.; GREVEN, M.; WINEFIELD, C.S.; TROUGHT, M.C.T.; RAW, V. The Flowering Process of *Vitis vinifera*: A Review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.60, p.411-434, 2009.

VIDAL, J.R.; KIKKERT, J.R.; WALLACE, P.G.; REISCH, B.I. High efficiency biolistic cotransformation and regeneration of Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) containing *nptII* and antimicrobial peptide genes. **Plant Cell Reports**, v.22, p.252-260, 2003.

WALKER, M.A.; LIDER, L.A.; GOHEEN, A.C.; OLMO, H.P. VR 039-16. **Horticulture Science**, v.26, p.1224-1225, 1991.

WALKER, M.A.; OLMO, H.P.; EVERIST, K. **Nematode resistant grape rootstock '8909-05' (*Vitis rupestris* x *Muscadinia rotundifolia*)**. US00PP19981P2, May 12, 2009.
WINKLER, A.J.; COOK, J.A.; KLIEWER, W.M.; LIDER, L.A. **General Viticulture**. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press, 1974. 710p.

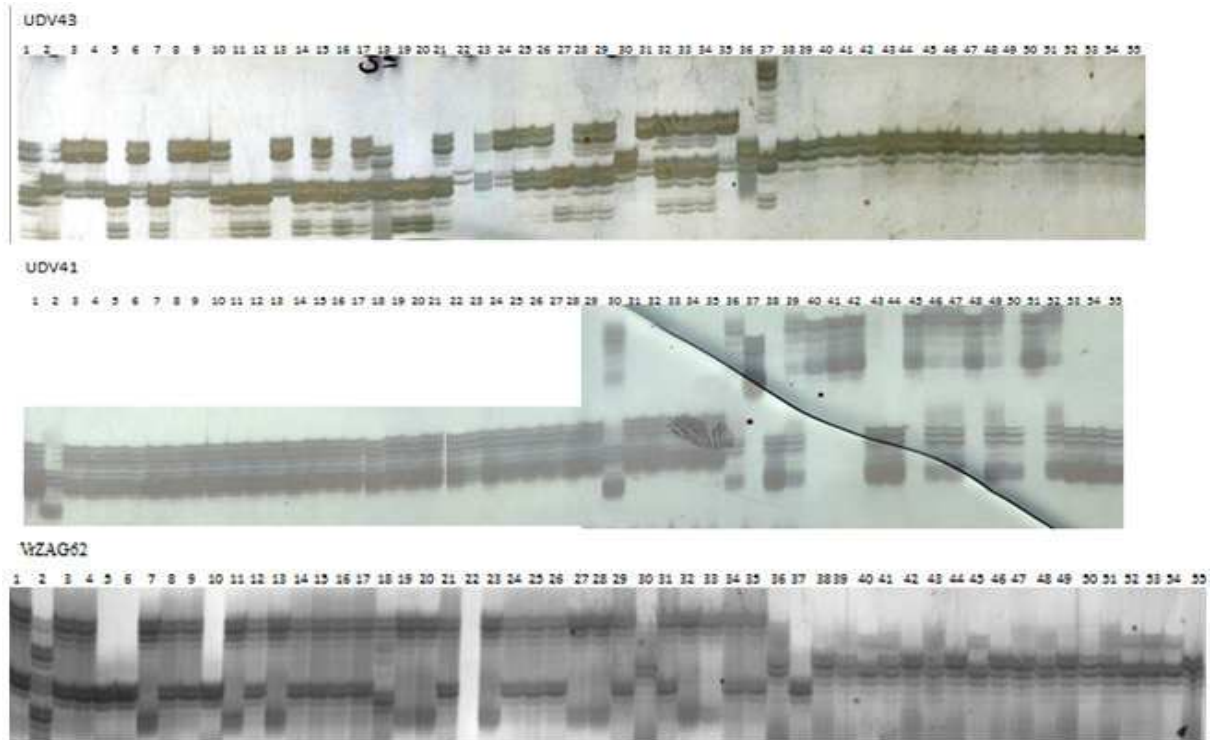
YANG, D.; LI, W.; LI, S.; YANG, X.; WU, J.; CAO, Z. In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. **Plant Growth Regulation**, v.51, p.63-71, 2007.

XU, X.; LU, J. Cytogenetic study of interspecific hybrids between *Vitis rotundifolia* and *Vitis vinifera*. **Acta Horticulturae**, v.640, p.269-273, 2004.

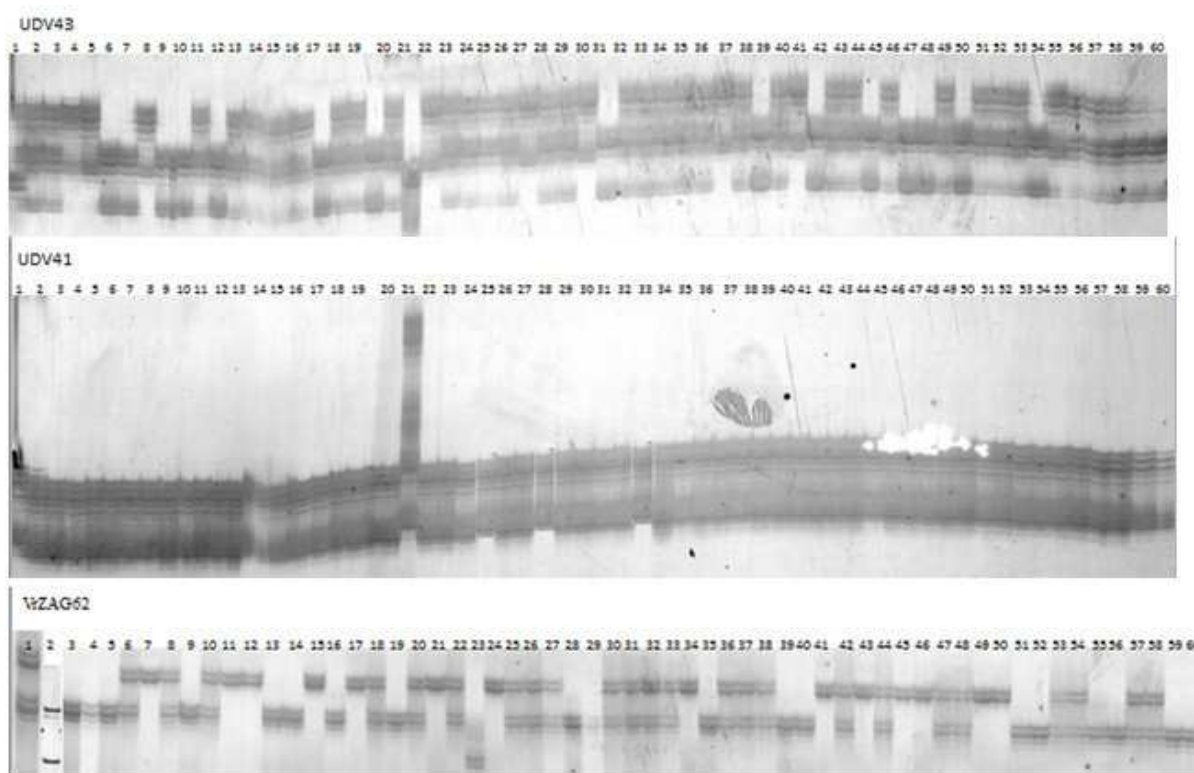
XU, K.; RIAZ, S.; RONCORONI, N.C.; JIN, Y.; HU, R.; ZHOU, R.; WALKER, M.A. Genetic and QTL analysis of resistance to *Xiphinema index* in a grapevine cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v.116, p.305-311, 2008.

APÊNDICES

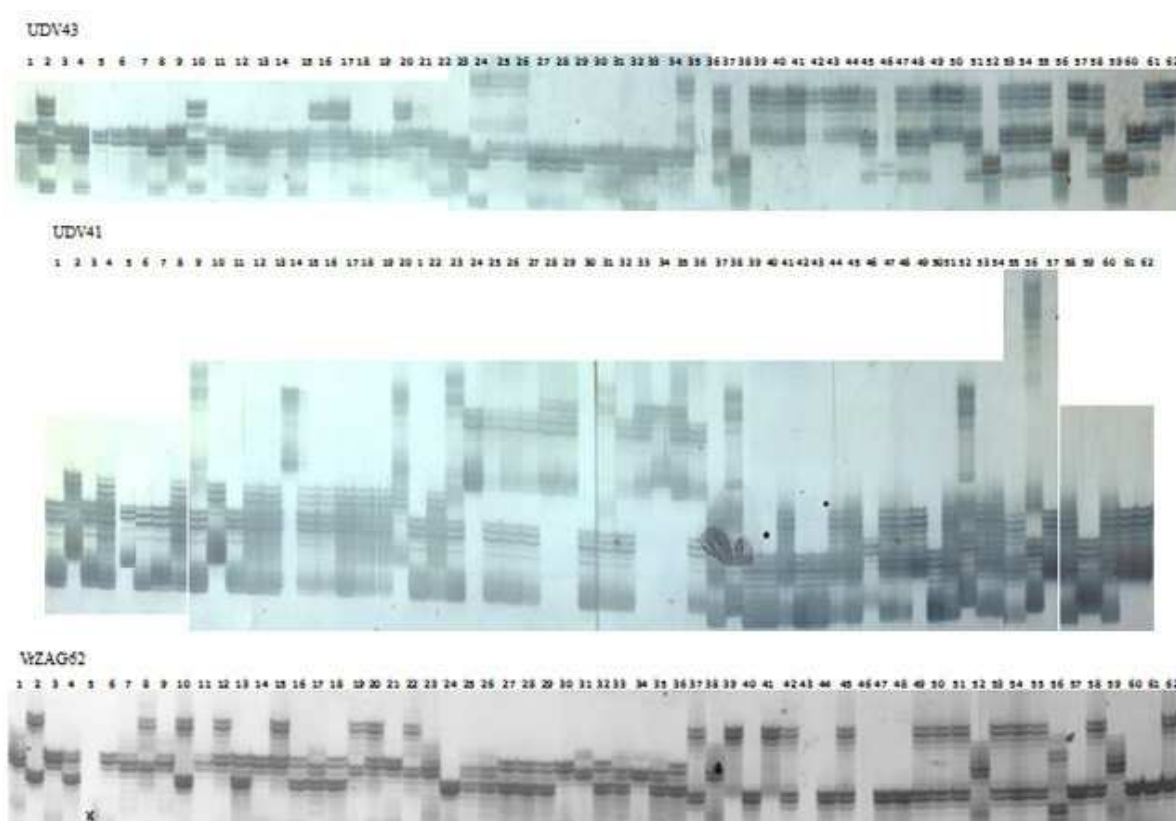
APÊNDICE 2 - Amplificação dos locos UDV43, UDV41 e VrZAG62 nas cultivares ‘Carlos’ (1, 17, 21, 29), ‘Goethe’ (2), ‘IAC 766’ (18), ‘Marta’ (22), ‘Niágara Rosada’ (30, 36) e ‘Regale’ (37). Os demais produtos de amplificação são de plântulas resultantes de autofecundação ou polinização cruzada.



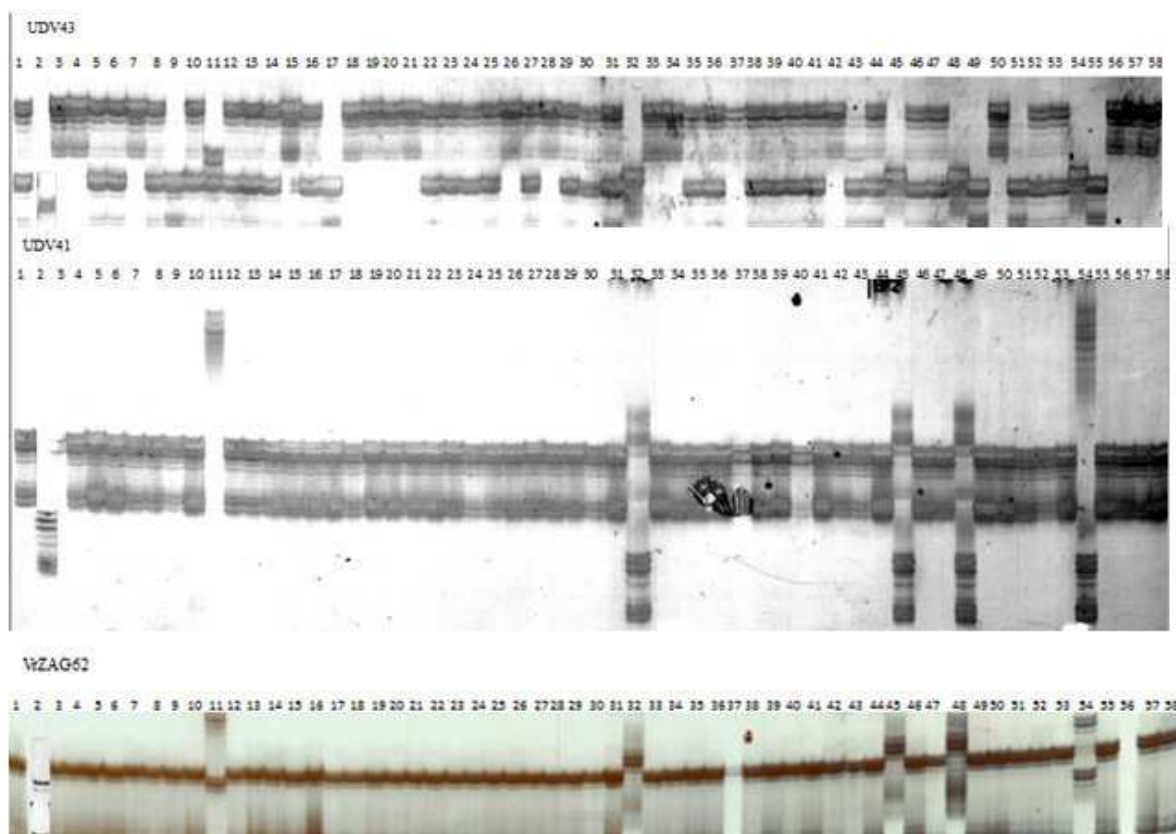
APÊNDICE 3 - Amplificação dos locos UDV43, UDV41 e VrZAG62 em ‘Bontiful’ (1,22), ‘Marta’ (2) e ‘Isabel’ (23). Os demais produtos de amplificação são de plântulas resultantes de autofecundação ou polinização cruzada.



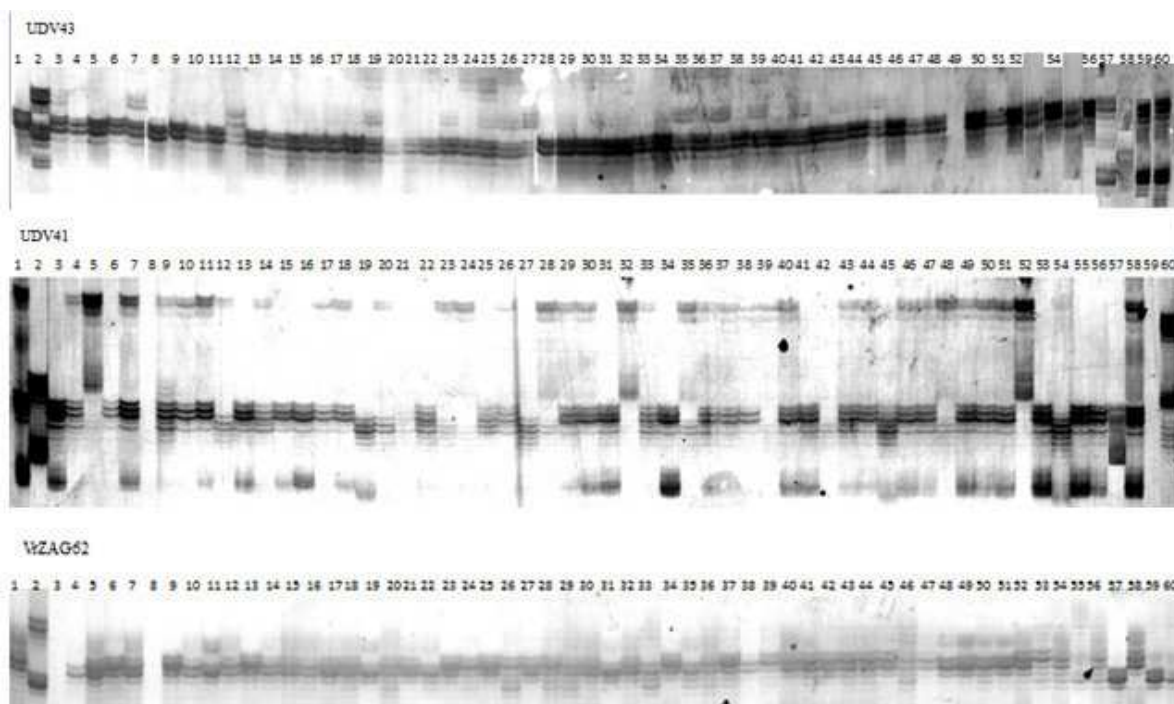
APÊNDICE 4 - Amplificação dos locos UDV43, UDV41 e VrZAG62 em ‘Bordô’ (1,59), ‘Carlos’ (2,10), ‘Isabel’ (9, 23, 52), ‘Regale’ (24), ‘Roanoke’ (37, 45, 51, 55, 58), ‘Niágara Rosada’ (38), ‘Marta’ (46) e ‘Goethe’ (56). Os demais produtos de amplificação são de plântulas resultantes de autofecundação ou polinização cruzada.



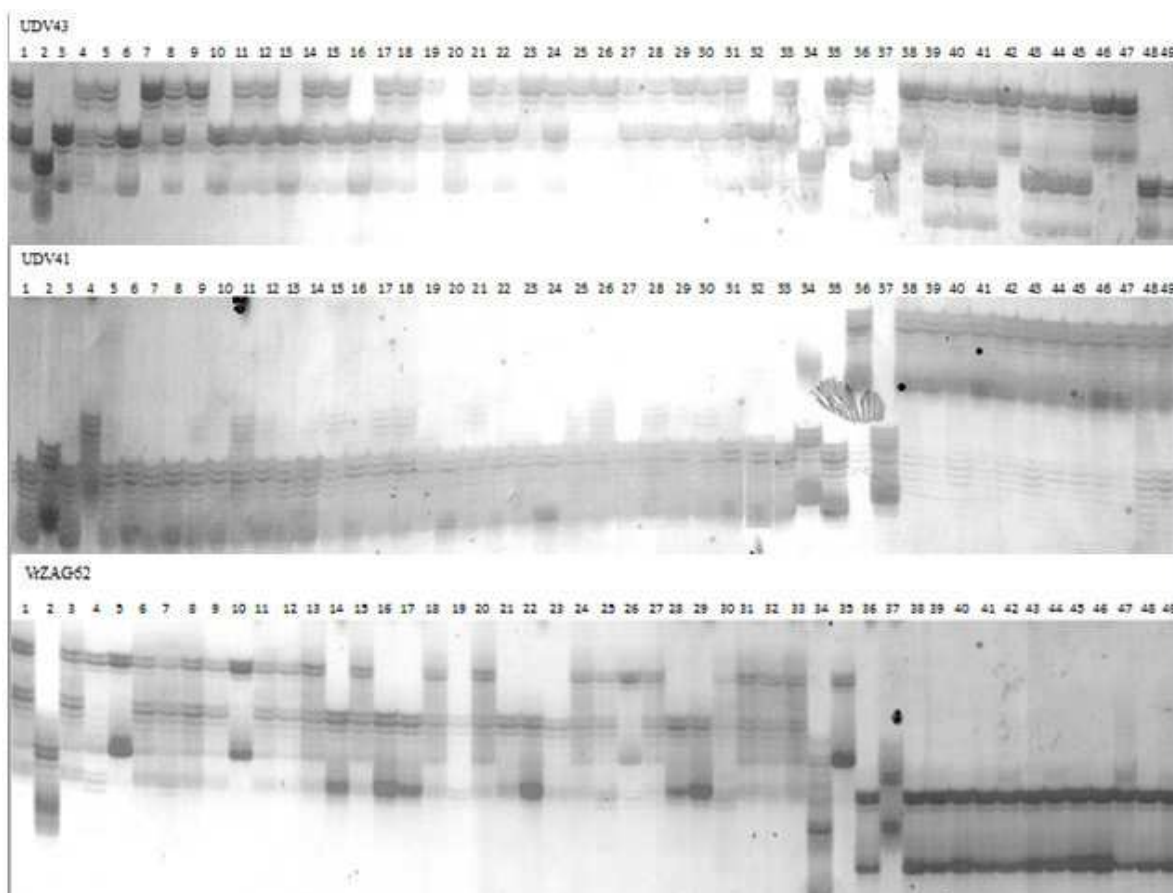
APÊNDICE 5 - Amplificação dos locos UDV43, UDV41 e VrZAG62 em ‘Regale’ (1, 10, 31, 44), ‘Marta’ (2), ‘IAC766’ (11), ‘Isabel’ (32), ‘Niágara Rosada’ (45,48), ‘Magoon’ (47,53) e ‘Goethe’ (54). Os demais produtos de amplificação são de plântulas resultantes de autofecundação ou polinização cruzada.



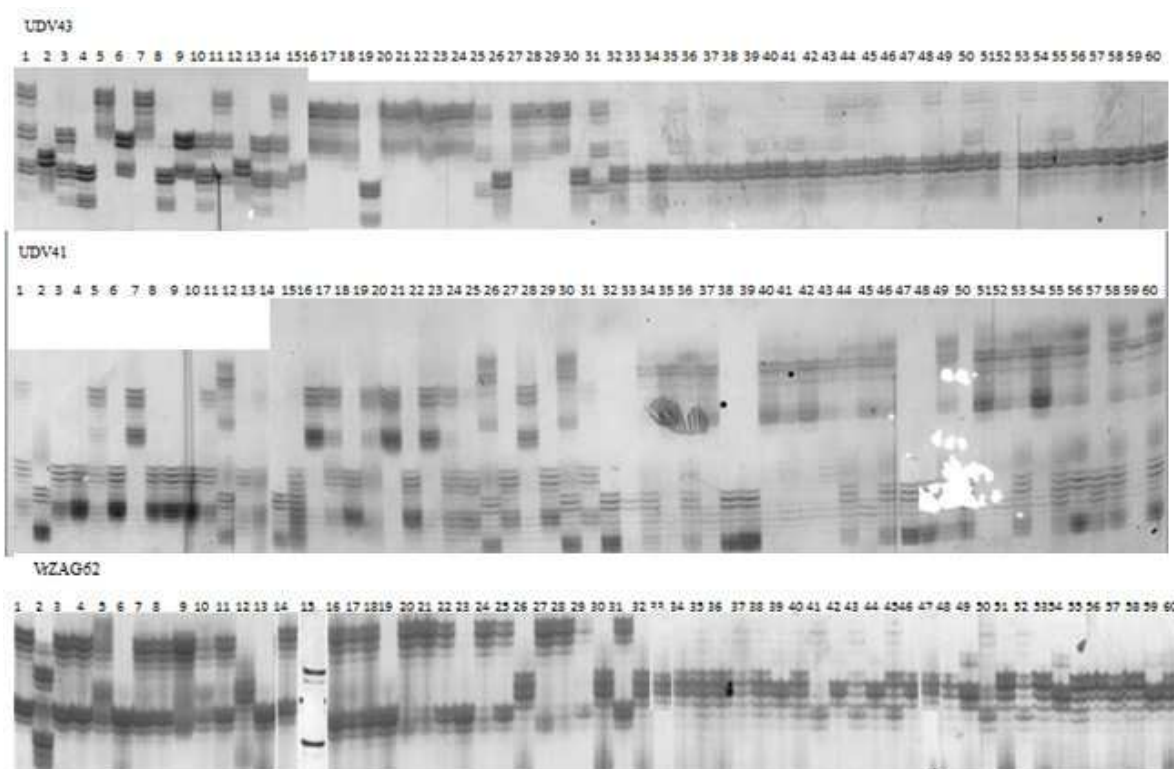
APÊNDICE 6 - Amplificação dos locos UDV43, UDV41 e VrZAG62 em 'Niágara Rosada' (1), 'Carlos' (2), 'Magoon' (57) e 'Isabel' (58). Os demais produtos de amplificação são de plântulas resultantes de autofecundação ou polinização cruzada.



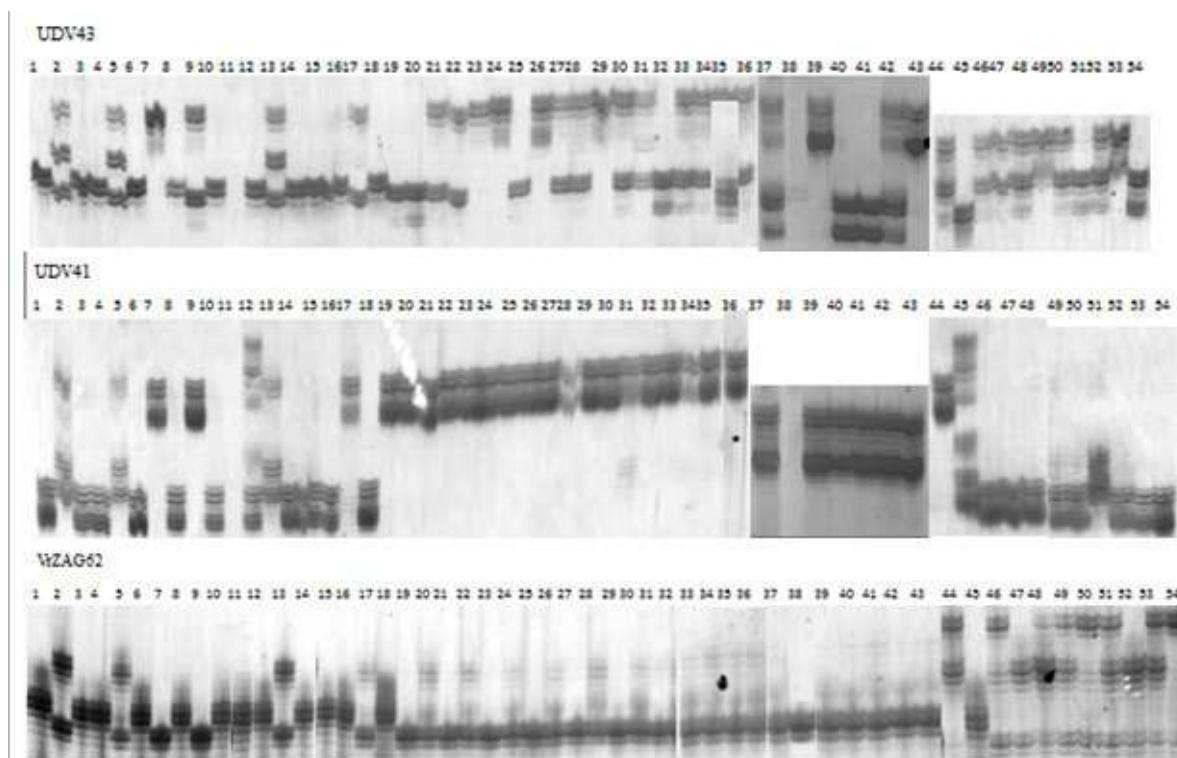
APÊNDICE 7 - Amplificação dos locos UDV43, UDV41 e VrZAG62 em ‘Bontiful’ (1, 33), ‘Bordô’(2, 37), ‘Goethe’ (34), ‘Magoon’ (36) e ‘Niágara Rosada’ (26, 30). Os demais produtos de amplificação são de plântulas resultantes de autofecundação ou polinização cruzada.



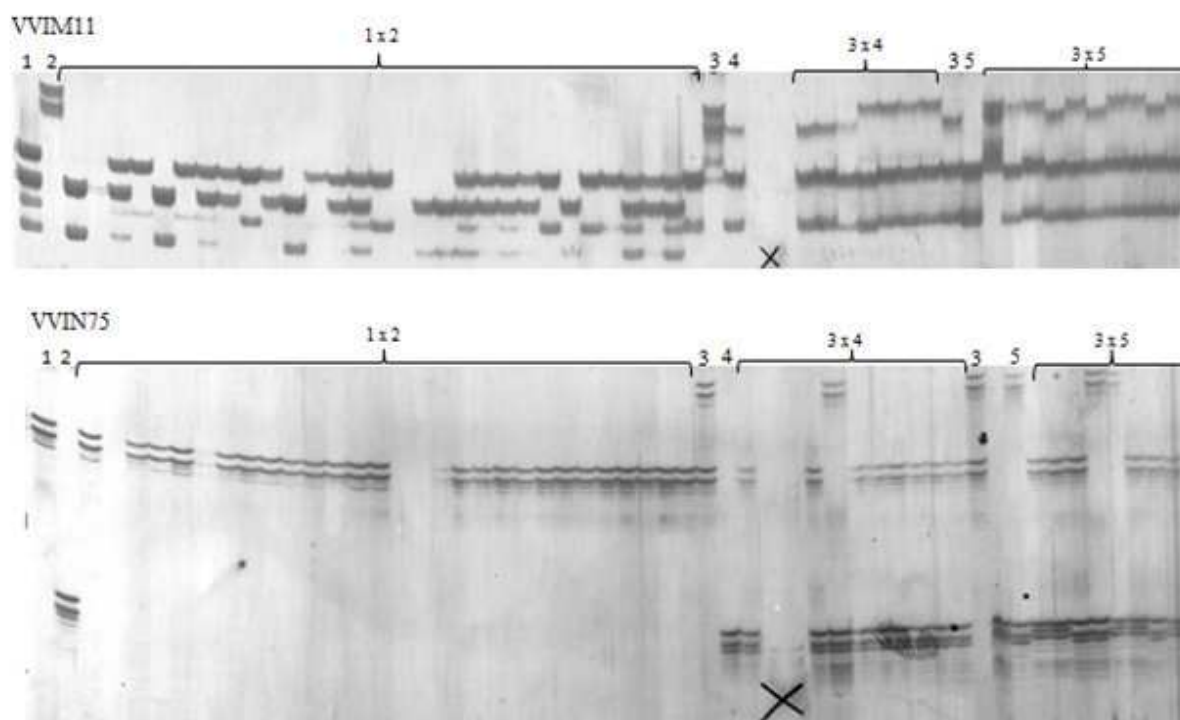
APÊNDICE 8 – Amplificação dos locos UDV43, UDV41 e VrZAG62 em ‘Magnólia’ (1, 11, 14, 25, 31), ‘Goethe’(2), ‘Isabel’ (12), ‘Marta’ (15) e ‘Niágara Rosada’ (26, 30). Os demais produtos de amplificação são de plântulas resultantes de autofecundação ou polinização cruzada.



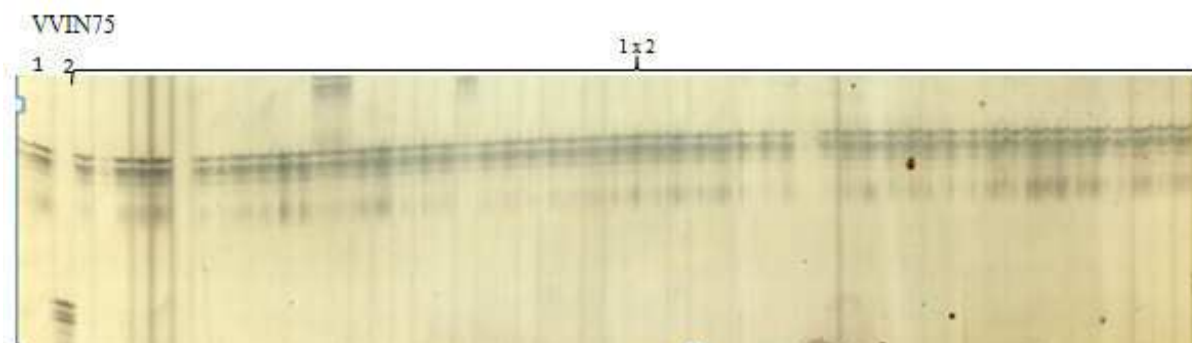
APÊNDICE 9 - Amplificação dos locos UDV43, UDV41 e VrZAG62 em ‘Bordô’ (1, 6, 18), ‘Magnólia’(2, 5, 13), ‘Isabel’ (12), ‘Regale’ (17), ‘Magoon’ (37), ‘Marta’ (38), ‘Bountiful’ (44) e ‘Niagára Rosada’ (45). Os demais produtos de amplificação são de plântulas resultantes de autofecundação ou polinização cruzada.



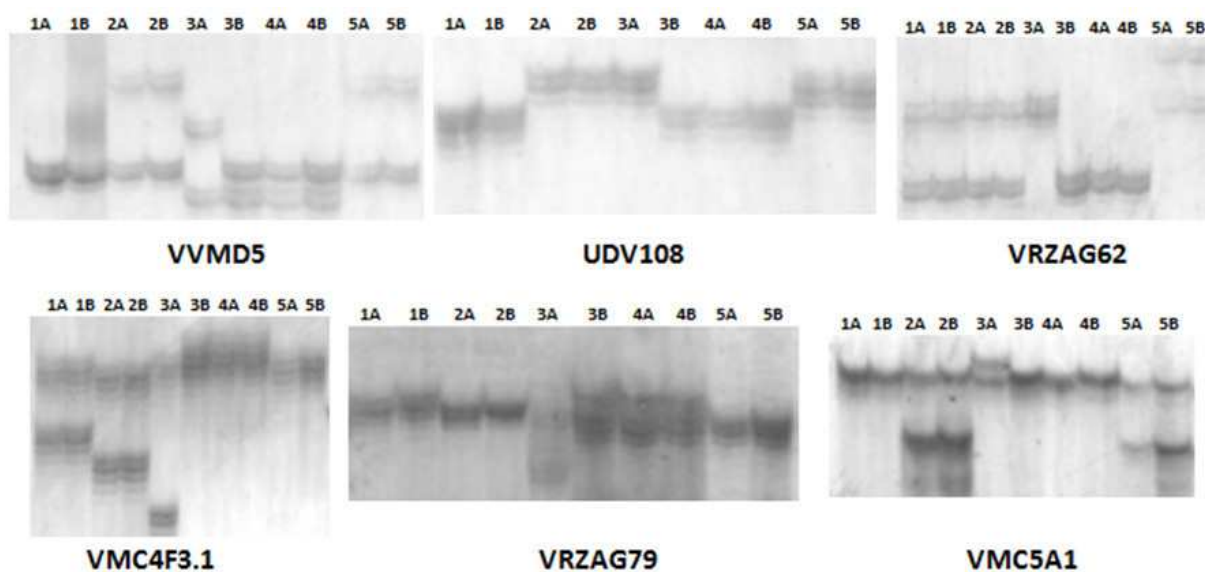
APÊNDICE 10 – Amplificação dos locos VVIM11 e VVIN75 em ‘Niagara Rosada’ (1) (♀) x ‘Magnólia’ (2) (♂) seguido dos indivíduos resultantes apenas de autofecundação de ‘Niagara Rosada’. ‘Isabel’ (3) (♀) x ‘Carlos’ (4) (♂) e ‘Regale’ (5) (♂) seguido dos indivíduos resultantes da hibridação controlada.



APÊNDICE 11 – Amplificação do loco VVIN75 em ‘Niágara Rosada’ (1) (♀) x ‘Carlos’ (2) (♂) seguido dos indivíduos resultantes apenas de autofecundação de ‘Niagara Rosada’



APÊNDICE 12 – Amplificação dos produtos PCR de seis marcadores microssatélites das cultivares de *Vitis rotundifolia* pertencentes as Coleções de Germoplasma de Videira da Estação Experimental do Canguiri (EEC) - UFPR, Pinhas, PR e da Estação Experimental de Videira (EEV)-EPAGRI, Videira, SC e da Coleção de Germoplasma de Uva da Universidade da Califórnia (UCD), Davis, CA. 1A-‘Magnólia’ (UCD); 1B-‘Magnólia’(EEC); 2A-‘Carlos’(UCD); 2B-‘Carlos’(EEV); 3A-‘Magoon’(UCD); 3B-‘Magoon’(EEC); 4A-‘Regale’ (UCD); 4B-‘Regale’ (EEC); 5A-‘Bountiful’ (UCD); 5B-‘Bountiful’ (EEC).



APÊNDICE 13 – Artigo publicado na Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.46, n.11, p.1480-1488, nov., 2011.

Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine

Mariane Ruzza Schuck⁽¹⁾, Luiz Antonio Biasi⁽¹⁾, Ada Michele Mariano⁽¹⁾,
Bernardo Lipski⁽¹⁾, Summaira Riaz⁽²⁾ and Michael Andrew Walker⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, CEP 80035-050 Curitiba, PR, Brazil. E-mail: schuck337@gmail.com, biasiufpr@gmail.com, adamichele@ibest.com.br, bernardolipski@hotmail.com ⁽²⁾University of California, Department of Viticulture and Enology, Davis, CA 95616, USA. E-mail: snriaz@ucdavis.edu, awalker@ucdavis.edu

Abstract – The objective of this work was to assess the potential of interspecific hybridization of *Vitis labruscana* and *Muscadinia rotundifolia* by using artificial cross-pollinations. Microsatellite markers were used to confirm interspecific hybridizations and the identity of the parental genotypes. In crosses in which *M. rotundifolia* was used as the female parent, no true hybrids were obtained. In the reciprocal crosses, 114 seedlings were identified as true *V. labruscana* x *M. rotundifolia* hybrids. Self-pollination occurred in direct and in reciprocal crosses. The crossings between 'Bordo' x 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' and 'Roanoke', and between 'Isabel' x 'Bountiful', 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' and 'Roanoke' were confirmed. The 15 markers evaluated showed that two *M. rotundifolia* parental genotypes had the same fingerprint profile, indicating a likely planting error. The success of hybridization depends mainly on the species and on the cultivar used as the female parent. Microsatellite markers are efficient to confirm the paternity of interspecific F1 hybrids and to determine the correct identity of *M. rotundifolia* cultivars.

Index terms: *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis labruscana*, hybrid identification, interspecific crosses, SSRs.

Obtenção de híbridos interespecíficos e análise molecular por marcadores microssatélites em videira

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da hibridação interespecífica entre *Vitis labruscana* e *Muscadinia rotundifolia* por meio de polinizações cruzadas artificiais. Marcadores microssatélites foram utilizados para confirmar as hibridizações interespecíficas e a identidade dos parentais. Nos cruzamentos em que *M. rotundifolia* foi utilizada como parental feminino, nenhum híbrido verdadeiro foi obtido. Nos cruzamentos recíprocos, 114 plântulas foram identificadas como verdadeiros híbridos de *V. labruscana* x *M. rotundifolia*. Ocorreu autopolinização nos cruzamentos diretos e nos recíprocos. Foram confirmados os cruzamentos 'Bordo' x 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' e 'Roanoke', e 'Isabel' x 'Bountiful', 'Carlos', 'Magnolia', 'Regale' e 'Roanoke'. Os 15 marcadores avaliados revelaram que dois parentais de *M. rotundifolia* apresentaram o mesmo perfil genético, o que indica provável erro de plantio. O sucesso da hibridização depende principalmente da espécie e da cultivar utilizada como parental feminino. Os marcadores microssatélites são eficientes para confirmar a paternidade de híbridos interespecíficos F1 e para determinar a correta identidade de cultivares de *M. rotundifolia*.

Termos para indexação: *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis labruscana*, identificação híbrida, cruzamentos interespecíficos, SSRs.

Introduction

The use of rootstocks in viticulture is a widespread practice. Since the invasion by phylloxera [*Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch, 1856)], grape growers began grafting susceptible *Vitis vinifera* L. fruiting cultivars onto rootstocks bred from resistant North American *Vitis* species, particularly *V. rupestris* Scheele, *V. riparia* Michx., *V. berlandieri* Planch. and *V. labruscana* L.H. Bailey. However, in addition to phylloxera resistance, a good rootstock must show adaptability to the local climate and soil conditions, besides easy rooting, affinity with the scion, good

vegetative growth, longevity and resistance or tolerance to pests and pathogens (Reynolds & Wardle, 2001).

Rootstock usage in the wine regions of Southern Brazil is dominated by different North American hybrid cultivars. Some of these cultivars are considered traditional, such as Solferino, SO4, Kober 5BB and 101-14 Mgt (*V. berlandieri* x *V. riparia*), whereas others were more recently introduced, such as Paulsen 1103 and R99 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). Although these rootstocks have been recommended due to their resistance to *Fusarium oxysporum* Schlecht., they are the most susceptible to the main soil pest of this region,

the Brazilian ground pearl [*Eurhizococcus brasiliensis* Hempel (Hemiptera: Margarodidae)] (Botton & Colleta, 2010; Botton et al., 2010).

The muscadine genotypes [*V. rotundifolia* Michx. Syn. *M. rotundifolia* (Michx.) Small] are resistant to the Brazilian ground pearl (Botton & Colleta, 2010). This species has been classified as having the highest level of resistance to grape pests and disease (Kellow et al., 2002) and has consequently been used in many breeding programs worldwide to create resistant rootstocks. Although *M. rotundifolia* (2n = 40) is not used as a rootstock, due to its graft incompatibility with commercial cultivars of *Vitis* species (2n = 38) and to its inability to form roots from dormant cuttings (Goldy & Onokpise, 2001), interspecific hybrids showing compatibility were created with *Vitis* species (Olmo, 1986). Some hybrids from these crosses, including VR039-16 and VR043-43 (*V. vinifera* x *M. rotundifolia*), released by the grape breeding program at the University of California, Davis, CA, USA (Walker et al., 1991), are currently the main rootstocks used for management of the Brazilian ground pearl (Dalbó et al., 2007). However, 'VR043-43' is no longer recommended for use in phylloxera-infested sites, since the resistance of its rootstock to Brazilian ground pearl was recently placed in doubt (De César, 2008). Its full sibling 'VR039-16' is only recommended for use in grapevine fanleaf virus-infected sites, as its long-term resistance to phylloxera is also questionable (Smith, 2010). Therefore, given that phylloxera resistance should be in the background of all new rootstocks and that the use of *V. vinifera* in rootstock development has almost invariably been disappointing, it is important to develop rootstocks with broader Brazilian ground pearl resistance and durable resistance to phylloxera, which can be obtained through breeding.

The hybridization of North American species with *M. rotundifolia* is an alternative to hybridization with *V. vinifera*. Among the many North American species, *V. labruscana* hybrids are well adapted to the wine regions of Southern Brazil. These hybrids are commonly planted with their own roots and show some resistance to soil pathogens, such as *F. oxysporum* (Garrido et al., 2004), besides adequate phylloxera resistance. However, these hybrids do not exhibit the high level of resistance to *E. brasiliensis* that *M. rotundifolia* cultivars do.

In breeding, molecular markers have been used as a tool to reduce the time required to develop a new cultivar. Among the various uses of molecular markers, the identification of true hybrids is an extremely useful tool in breeding programs. Therefore, the use of molecular markers to identify plants from crosses is highly important, so that plants from self or undesirable crosses can be identified and discarded in the F1 generation (Cordeiro et al., 2006).

The objective of this work was to assess the potential of interspecific hybridization of *V. labruscana* and *M. rotundifolia* by using artificial cross-pollinations.

Materials and Methods

All crosses were done at the Estação Experimental do Canguiri, of Universidade Federal do Paraná, Pinhais, PR, Brazil (25°25'S, 49°08'W, at 930-m altitude), and at the Estação Experimental de Videira, Videira, SC, Brazil (27°05'S, 51°7'60"W, at 750-m altitude) and at the Estação Experimental de Campos Novos, Campos Novos, Santa Catarina, Brazil (27°23'60"S, 51°12'0"W, at 947-m altitude), of Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). The controlled crosses were made in both directions between *M. rotundifolia* cultivars: Bountiful, Carlos, Magnolia, Magoon, Regale and Roanoke, and *V. labruscana* cultivars: Bordo, Goethe, Isabel, Marta and Niagara Rosada, in 2008 and 2009. Sixty crosses were made. The number of controlled artificial pollinations varied among the crosses depending on the availability of flowers (Tables 1 and 2). Simple sequence repeat (SSR) markers were used to confirm the paternity of the putative hybrids and to authenticate the identity of the parental genotypes.

The controlled crosses were performed according to Leão & Borges (2009). The female parents were emasculated before anthesis and bagged with paper bags to avoid contamination from unwanted pollen. The pollen was collected from flower clusters before anthesis in the morning, eliminating open flowers. The anthers were separated from the calyptra with a sieve, placed in petri dishes and dried at room temperature (20 to 25°C) for three days. The pollen was placed in small bottles, labeled and stored in a desiccator with silica gel at 4°C. Pollination was done with a brush for three consecutive days when the stigmas of the female

parents were receptive, and the inflorescences were covered with paper bags.

Due to uneven maturation, the berries were harvested individually from January to April in both years. The seeds were extracted by forcing the fruits through a sieve, washed with water to remove the pulp, treated with a fungicide solution of Cercobin 2 g L⁻¹ and then placed in moist media of sterilized vermiculite in petri dishes and stratified at 4°C for a period of 75 days to break dormancy. Seeds were planted in seedling trays containing a steam-sterilized commercial substrate of Plantmax. When the first true leaves of seedlings appeared, they were transferred to individual pots (125 cm³), containing a mixture of 2 Plantmax:1 soil :1 humus:1 vermiculite, and kept in the greenhouse.

Lyophilized leaf tissue of the parental genotypes and putative F1 hybrids was homogenized with DNA extraction buffer in plastic bags using a Homes 6 mechanical homogenizer (Bioreba, Longmont, CO, USA). DNA was extracted with a modified CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) procedure (Riaz et al., 2004). In the final step, DNA pellets were suspended in 100 µL 1X Tris-EDTA buffer and stored at -20°C. The integrity of the DNA was visualized on 1.2% agarose gel.

To analyze the extent of polymorphism of SSR markers in the parental genotypes, a set of 20 SSRs were tested on the *M. rotundifolia* and *V. labruscana* cultivars. A quality score, A, B, C or D, was given to each marker: Score A was given to four primer pairs (UDV41, UDV43, VrZAG62 and VVIN75) of good quality, displaying clear single band patterns easily scorable in both parents; score B to four medium quality markers (VVIM11, VVIC72, VVMD5 and VVMD31), displaying smears and fainter bands occasionally difficult to read; score C to three markers (UDV76, UDV111 and VVIP16), displaying multiband profiles; and score D to ten markers (UDV35, UDV111, VVIV05, VVIV21, UDV32, UDV35, UDV67, UDV124, VVIB68 and NVMCNG), producing smears, non-reproducible bands or no products. The four markers with score A were run on the entire populations to confirm the hybrid origin of the progenies. To verify the identity of the parental genotypes used in the crosses, the molecular profile of five *M. rotundifolia* cultivars was compared to the Grape DNA Identification Reference Database (Foundation Plant Services, University of California, Davis, CA, USA) with 15 SSR markers.

However, 'Roanoke' was not analyzed due to its absence in the reference database. DNA fingerprinting of the *V. labruscana* cultivars was done in a previous study by Schuck et al. (2009). The SSR markers used in the present study were VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD31, VVMD32, VrZag62, VrZag79, VMC4f3.1, VMC8g9, VMC7f2, VMC3df, VMC5a1, VMC5h2 and UDV108. PCR conditions used were described by Riaz et al. (2004). PCR reactions were carried out in 10 µL reaction mixtures containing 5 pmol of each primer, 2.5 mmol L⁻¹ of each dNTP, 1 µL 10X gold PCR buffer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA), 0.5 unit AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA), 2 mmol L⁻¹ of MgCl₂ solution and 10 ng of genomic DNA. Temperature cycling for PCR was carried out on either a Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA) or on a Bio-Rad iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The following cycling program was used: denaturation of DNA and activation of Taq DNA polymerase at 95°C for 10 min; 35 cycles of amplification distributed in 45 s at 94°C, 45 s at 56°C and 1 min at 72°C; final extension of 10 min at 72°C; and cooling at 4°C. To separate amplification products, PCR reactions were mixed with denaturing dye (98% formamide, 10 mmol L⁻¹ EDTA, 0.05% bromophenol blue and xylene cyanol) and heated at 94°C for 2 min before loading on a 5% polyacrylamide sequencing gel. Gels were run at constant 70 W for 2–3 hours depending on allele sizes. Samples were visualized by silver staining with a commercial kit (Promega, Madison, WI, USA). Assuming Mendelian inheritance of the SSR loci, each of the analyzed progeny genotypes was considered to be a hybrid when one of the two SSR alleles amplified with each locus was common to the alleles in the maternal genotype and the other was the same as one of the SSR alleles found in the paternal genotype. All gels were scanned and stored in a digital archive.

Results and Discussion

In 2008, 30 cross combinations were made between six *M. rotundifolia* cultivars; Bountiful, Carlos, Magnolia, Magoon, Regale and Roanoke, and five *V. labruscana* cultivars: Bordo, Goethe, Isabel, Marta and Niagara Rosada. A total of 14,775 flowers were pollinated with *V. labruscana* pollen and 217 berries

(1.5% fruit set) were obtained. From these berries, 427 seeds were extracted and 236 germinated (Table 1). The number of berries obtained compared to the total flowers pollinated was extremely low, indicating that the crosses were very inefficient. Therefore, crosses using *M. rotundifolia* as the seed parent were not repeated in 2009. In 2008 and 2009, the reciprocals *V. labruscana* x *M. rotundifolia* were also made, and 9,398 *V. labruscana* flowers were pollinated producing

416 berries (4.4% fruit set), 1,040 seeds and 342 seedlings (Table 2).

DNA fingerprinting with the SSR loci UDV41, UDV43, VrZAG62 and VVIN75 indicated that, whenever *M. rotundifolia* was used as the female and *V. labruscana* as the male parent, the crosses were a complete failure, producing no true hybrids but only direct descendants of *M. rotundifolia*. From 342, in the reciprocal crosses, 114 seedlings, originated from nine

Table 1. Number of pollinated flowers, fruit set and number of surviving seedlings from the crosses between six *Muscadinia rotundifolia* cultivars, as the female parent, and five *Vitis labruscana* cultivars, as the male parent, at the Estação Experimental do Canguiri, Pinhais, PR, Brazil, and at the Estação Experimental de Videira, SC, Brazil, in 2008.

<i>Vitis labruscana</i> cultivar as male parent	Nº of emasculations	Nº of berries	Fruit set (%)	Nº of seeds	Nº of seedlings
<i>M. rotundifolia</i> 'Bountiful' as female parent					
Bordo	720	16	2.2	39	32
Goethe	560	1	0.2	1	1
Isabel	560	22	3.9	47	38
Marta	720	12	1.7	29	25
Niagara Rosada	560	7	1.3	13	10
<i>M. rotundifolia</i> 'Carlos' as female parent					
Bordo	50	0	0.0	0	0
Goethe	300	6	2.0	17	14
Isabel	150	0	0.0	0	0
Marta	100	4	4.0	8	6
Niagara Rosada	100	3	3.0	10	5
<i>M. rotundifolia</i> 'Magnolia' as female parent					
Bordo	1,200	13	1.1	12	1
Goethe	1,100	7	0.6	11	9
Isabel	1,300	10	0.8	13	2
Marta	1,000	6	0.6	19	9
Niagara Rosada	1,300	12	0.9	8	3
<i>M. rotundifolia</i> 'Regale' as female parent					
Bordo	780	33	4.2	74	31
Goethe	645	6	0.9	12	4
Isabel	720	19	2.6	37	13
Marta	630	15	2.4	31	12
Niagara Rosada	480	10	2.1	14	5
<i>M. rotundifolia</i> 'Roanoke' as female parent					
Bordo	360	4	1.1	8	3
Goethe	360	2	0.6	3	1
Isabel	360	1	0.3	2	2
Marta	360	6	1.7	14	4
Niagara Rosada	360	2	0.6	5	6
Total	14,775	217	1.5	427	236

⁽¹⁾The results obtained in the crosses between *Vitis labruscana* cultivars and 'Magoon' were added to those of 'Regale', since the genetic profile of 'Magoon' matched with 'Regale' at all 15 markers, indicating that the genotype was misnamed at the time of introduction and that the same genotype was planted with different names.

Table 2. Number of pollinated flowers, fruit set and number of surviving seedlings from the crosses between five *Vitis labruscana* cultivars, as the female parent, and six *Muscadinia rotundifolia* cultivars, as the male parent, at the Estação Experimental de Campos Novos and Videira, SC, Brazil, in 2008 and 2009.

<i>Muscadinia rotundifolia</i> cultivar as male parent	Nº of emasculations	Nº of berries	Fruit set (%)	Nº of seeds	Nº of seedlings
<i>V. labruscana</i> 'Bordo' as female parent					
Bountiful	65	0	0.0	0	0
Carlos	325	21	6.5	48	7
Magnolia	520	52	10.0	120	54
Regale ⁽¹⁾	625	55	8.8	114	52
Roanoke	715	10	1.4	35	30
<i>V. labruscana</i> 'Goethe' as female parent					
Bountiful	94	0	0.0	0	0
Carlos	105	0	0.0	0	0
Magnolia	119	0	0.0	0	0
Regale ⁽¹⁾	143	0	0.0	0	0
Roanoke	86	0	0.0	0	0
<i>V. labruscana</i> 'Isabel' as female parent					
Bountiful	250	4	1.6	5	1
Carlos	300	33	11.0	71	16
Magnolia	550	70	12.7	135	31
Regale ⁽¹⁾	1,501	41	2.7	87	21
Roanoke	450	7	1.6	16	9
<i>V. labruscana</i> 'Marta' as female parent					
Bountiful	150	0	0.0	0	0
Carlos	150	0	0.0	0	0
Magnolia	100	0	0.0	0	0
Regale ⁽¹⁾	150	1	0.6	2	1
Roanoke	100	2	2.0	4	0
<i>V. labruscana</i> 'Niagara Rosada' as female parent					
Bountiful	150	0	0.0	19	0
Carlos	525	25	4.8	145	62
Magnolia	450	52	11.6	110	36
Regale ⁽¹⁾	675	45	6.6	129	22
Roanoke	100	0	0.0	0	0
Total	9,398	416	4.4	1,040	342

⁽¹⁾The results obtained in the crosses between *Vitis labruscana* cultivars and 'Magoon' were added to those of 'Regale', since the genetic profile of 'Magoon' matched with 'Regale' at all 15 markers, indicating that the genotype was misnamed at the time of introduction and that the same genotype was planted with different names.

different crosses, were identified at all four markers as true *V. labruscana* x *M. rotundifolia* hybrids (Table 3).

In the crosses in which 'Isabel' was the female parent, 65 true hybrids were identified (Figure 1). All the *M. rotundifolia* cultivars used to pollinate 'Isabel'

generated true hybrids, except 'Magoon'. The largest population of *V. labruscana* x *M. rotundifolia* consists of 27 seedlings (87.1% true hybrids) and is a cross of 'Isabel' x 'Magnolia'. From the cross 'Isabel' x 'Regale', 20 seedlings were evaluated and 17 F1 hybrids were confirmed. The cross 'Isabel' x 'Carlos' yielded 16 seedlings, of which 11 were true hybrids (68.8%). The highest percentage of hybrid formation was observed in the crosses 'Isabel' x 'Roanoke' and 'Isabel' x 'Bountiful', with 100% true hybrids. From these crosses, only nine and one seedlings were analyzed, respectively (Table 3).

The crosses between the female parent 'Bordo' with *M. rotundifolia* cultivars produced 49 true hybrids (43.4%) (Figure 2). Of the six cultivars used as the male parent with 'Bordo', two ('Bountiful' and 'Magoon') did not produce progenies with the SSR profile expected for F1 interspecific hybrids. The percentage of hybrid formation was highest in the crosses 'Bordo' x 'Regale' and 'Bordo' x 'Roanoke', with 68.9 and 50% true hybrids, respectively. The lowest percentage (29.6%) of true hybrids originated from the cross 'Bordo' x 'Magnolia'. Out of the 54 individuals analyzed, 16 were confirmed as true hybrids. From the cross 'Bordo'

Table 3. Percentage of interspecific *Vitis* hybrids from the crosses between two *Vitis labruscana* cultivars, as female parent, and five *Muscadinia rotundifolia* cultivars, as male parent, confirmed by SSR markers (UDV41, UDV43, VrZAG62 and VVIN75).

<i>Muscadinia rotundifolia</i> cultivar as male parent	Nº of plants evaluated	Nº of true hybrids	True hybrids (%)
<i>V. labruscana</i> 'Bordo' as female parent			
Carlos	7	3	42.9
Magnolia	54	16	29.6
Regale	22	15	68.9
Roanoke	30	15	50.0
Total	113	49	43.4
<i>V. labruscana</i> 'Isabel' as female parent			
Bountiful	1	1	100
Carlos	16	11	68.8
Magnolia	31	27	87.1
Regale	20	17	85.0
Roanoke	9	9	100.0
Total	77	65	84.4
Total	190	114	60

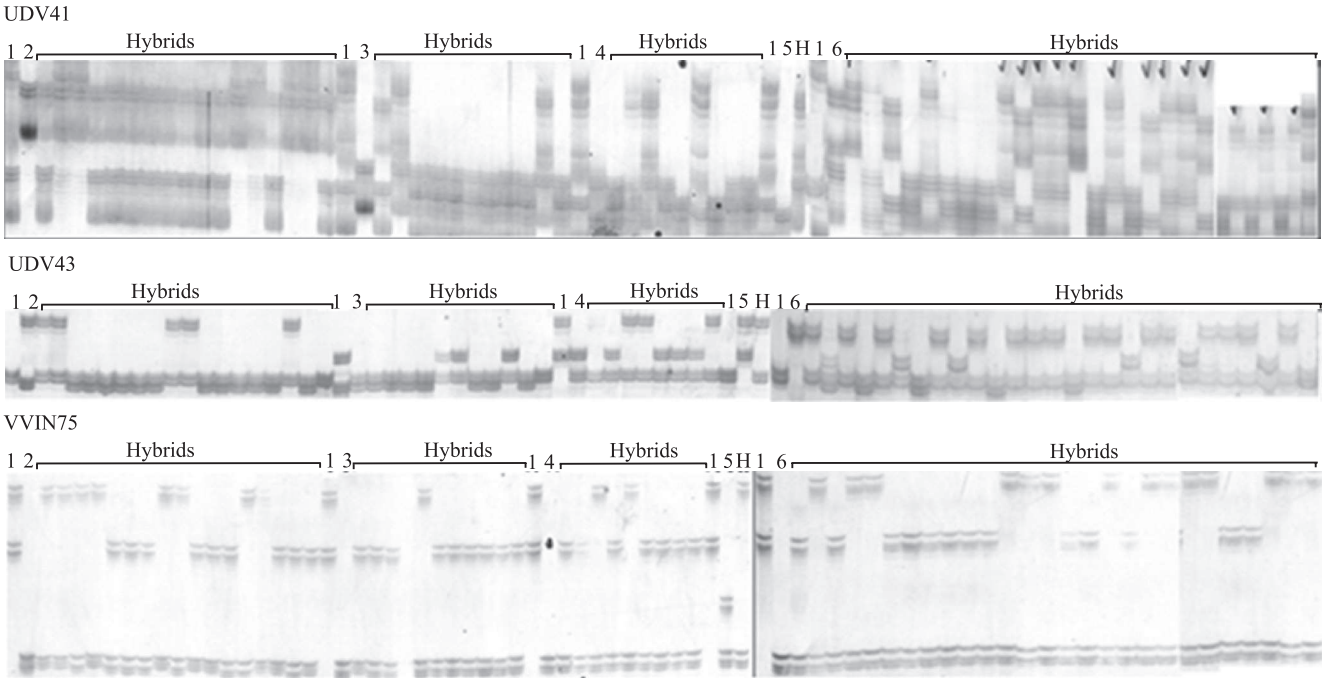


Figure 1. PCR amplification profile of the SSR markers UDV41 and UDV43 (Di Gaspero et al., 2005) and VVIN75 (Merdinoglu et al., 2005) in 'Isabel' (1), 'Regale' (2), 'Carlos' (3), 'Roanoke' (4), 'Bountiful' (5) and 'Magnolia' (6) followed by the true hybrids derived from each cross. H, hybrid.

x 'Carlos', seven F1 plants were evaluated and three hybrids were confirmed (42.9%) (Table 3).

Though only five *V. labruscana* genotypes were used as female parents in the present study, a marked difference was observed between them in their crossability with *M. rotundifolia*. These results clearly indicate that the success of the interspecific crosses depends not only on the species and on the direction of the cross, but also on the genotypes of the species involved in the hybridization. Other authors showed that the *V. vinifera* cultivars used as the female genotype influenced the crossability with *M. rotundifolia* (Bouquet, 1980).

The chromosome difference between *Vitis* spp. ($2n = 38$) and *M. rotundifolia* ($2n = 40$) is considered the main reason for the low success of the crosses in both directions (Goldy & Onokpise, 2001). However, in crosses involving *M. rotundifolia* as the maternal parent, the difficulties in obtaining hybrids are higher than in the reciprocal (Bouquet, 1980; Olmo, 1986). The failure in obtaining hybrid seedlings when *M. rotundifolia* serves as the female parent can be attributed to the inability of *Vitis* spp. pollen tubes to successfully penetrate *M. rotundifolia* styles and to fertilize the egg cells (Lu & Lamikanra, 1996).

In addition to the genetic incompatibility between the species, phenological factors also limit the success of reciprocal crosses. In Southern Brazil, *V. labruscana* blooms from September to October, and *M. rotundifolia* from November to January. Because of this difference, in the present study, *V. labruscana* cultivars were double pruned, during their regular blooming period, to force them to bloom again so that fresh pollen from *M. rotundifolia* could be used in the flowers of *V. labruscana*.

Although fresh pollen was used to make these 60 crosses, crosses in both directions produced a high proportion of non-hybrids, all of which were the result of self-fertilization. Even though paper bags were placed over the pollinated flower clusters and the adjacent clusters on the same plant were eliminated to avoid contamination from unwanted pollen, wind could have deposited pollen on the emasculated clusters during the few seconds that the protective bags were removed to perform pollination. Therefore, bagging of flowers does not guarantee the lack of undesired pollinations (Neal & Anderson, 2004). Moreover, shoot position and bunch location on the shoot in the developing canopy also influence flowering (Vasconcelos et al.,

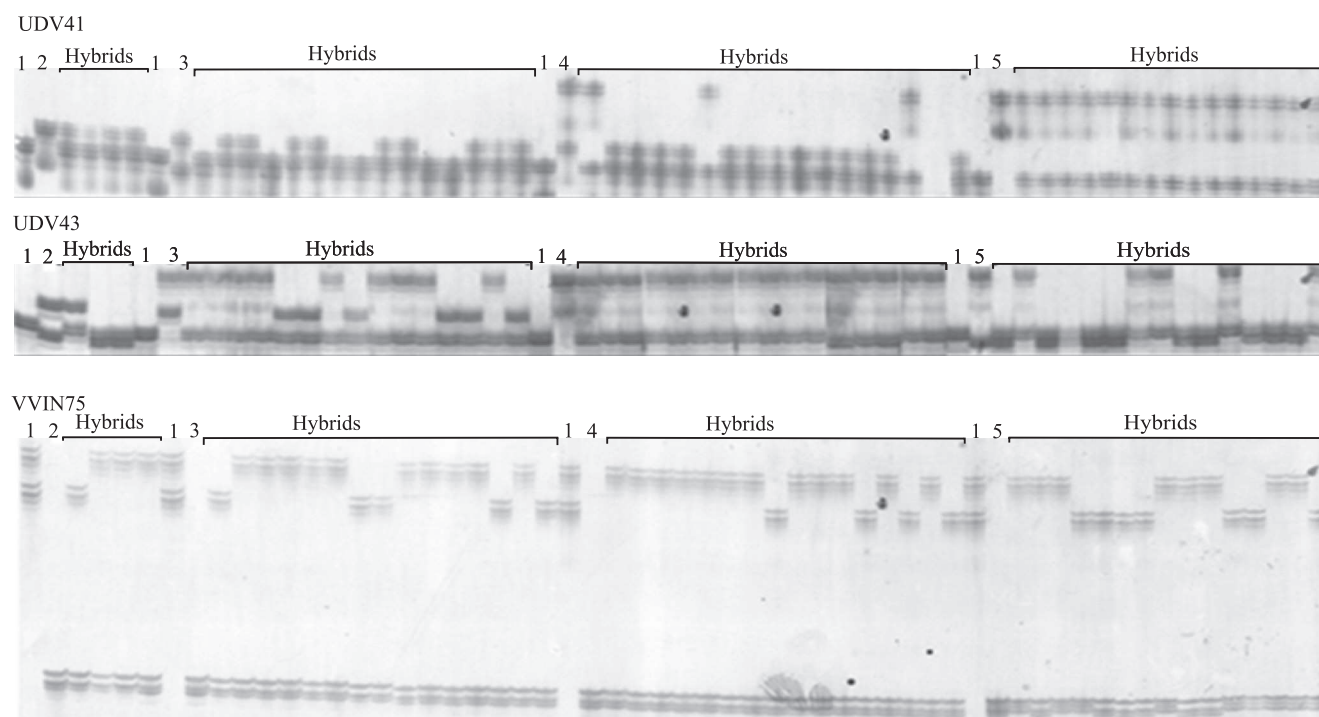


Figure 2. PCR amplification profile of the SSR markers UDV41 and UDV43 (Di Gaspero et al., 2005) and VVIN75 (Merdinoglu et al., 2005) in 'Bordo' (1), 'Carlos' (2), 'Roanoke' (3), 'Magnolia' (4) and 'Regale' (5) followed by the true hybrids derived from each cross. H, hybrid.

2009). In the present study, the inflorescences used in the crosses were from the mid cane of the shoots.

The average high temperatures reported for both years (2008/2009) in the three regions where the crosses were made (Pinhais, PR – 31°C; Campos Novos, SC – 26.5°C; and Videira, SC – 31°C) may have induced early pollen maturation of the flower clusters near the end of the canes of the same plant and in the neighboring inflorescences of the same vine located a few meters away. This could have accelerated pollen drying and increased the chances of pollen being carried by the wind and being deposited on unprotected flowers of *M. rotundifolia* and *V. labruscana* before they bloomed. In addition, the role of insects as pollination agents cannot be rejected.

The use of microsatellite markers for the identification of true hybrids in the early stage of the selection process has shown to be a very useful tool. A high proportion of selfed plants were identified, which were discarded in the F1 generation, allowing for significant savings in resources, particularly time and space. In species with long breeding cycles, such as *Vitis* spp., the conventional process of hybrid identification by morphological differences is slow. Molecular tools may overcome these difficulties and open the way to new strategies for more efficient breeding.

The identification of the *V. labruscana* genotypes was part of a previous study, and the SSR profiles of

the cultivars Bordo, Goethe, Isabel, Niagara Rosada and Marta were the same as those available in the data banks for the same cultivars using SSR markers VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZag62 and VrZag79. Therefore, these cultivars were correctly identified (Table 4) (Schuck et al, 2009).

To confirm the identity of the *M. rotundifolia* parental genotypes, five cultivars were genotyped at 15 SSR loci. Consistent and reliable profiles were obtained for the five cultivars at all SSR markers. The genetic profile of the *M. rotundifolia* cultivars Bountiful, Carlos, Magnolia and Regale were identical to those of the reference database at all 15 SSR loci. However, 'Magoon' did not match the reference profile at the same SSR loci, but matched with 'Regale', indicating that the genotype was misnamed at the time of introduction and that the same genotype was planted under different names (Table 4).

The correct identification of accessions is a basic requirement for the coherent management of germplasm repositories and for the use of the germplasm in ongoing breeding programs. It is essential to identify the existence of synonyms, homonyms and naming errors to avoid future propagation and breeding errors. These mistakes are difficult to detect based on morphological descriptors, since they are highly influenced by environmental and developmental factors (Sefc et al., 2001). In contrast, SSRs markers have been used to solve problematic naming and for genetic diversity assessment (Leão & Motoike,

Table 4. Allele sizes (bp) of *Muscadinia rotundifolia* and *Vitis labruscana* cultivars used as parents.

Locus	<i>M. rotundifolia</i>					<i>V. labruscana</i> ⁽¹⁾					Reference
	'Bountiful'	'Carlos'	'Magnolia'	'Magoon'	'Regale'	'Bordo'	'Goethe'	'Isabel'	'Marta'	'Niagara Rosada'	
VVS2	153–153	147–149	147–147	147–147	147–147	118–130	120–130	118–146	120–146	118–128	Thomas & Scott (1993)
VVMD5	230–246	230–246	230–230	226–230	226–230	234–234	230–236	236–236	234–234	234–234	Bowers et al. (1996)
VVMD7	235–235	243–245	243–245	243–243	243–243	235–239	235–247	235–249	235–249	235–241	Bowers et al. (1996)
VVMD27	199–199	197–215	185–215	185–197	185–197	179–181	181–183	175–179	179–181	175–181	Bowers et al. (1999)
VVMD31	246–250	168–170	170–210	170–210	170–210	201–213	203–209	201–213	201–203	201–201	Bowers et al. (1999)
VVMD32	249–301	249–301	249–301	249–301	249–301	248–248	246–252	248–272	248–248	248–272	Bowers et al. (1999)
VrZag62	215–223	199–215	199–215	199–199	199–199	200–202	190–204	200–202	200–202	200–202	Sefc et al. (1999)
VrZag79	255–255	257–287	259–287	255–259	255–259	247–247	239–247	237–247	247–264	237–259	Sefc et al. (1999)
VMC4f3.1	222–222	202–222	208–222	222–226	222–226	– ⁽²⁾	–	–	–	–	Di Gaspero et al. (2000)
VMC8g9	138–140	136–140	138–140	135–138	135–138	–	–	–	–	–	Adam-Blondon et al. (2004)
VMC7f2	193–195	193–193	193–193	193–193	193–193	–	–	–	–	–	Adam-Blondon et al. (2004)
VMC3df	174–178	172–178	172–178	170–172	170–172	–	–	–	–	–	Adam-Blondon et al. (2004)
VMC5a1	163–170	163–170	170–170	170–170	170–170	–	–	–	–	–	Adam-Blondon et al. (2004)
VMC5h2	198–200	194–212	194–212	194–212	194–212	–	–	–	–	–	Adam-Blondon et al. (2004)
UDV108	208–208	208–208	202–202	202–220	202–220	–	–	–	–	–	Di Gaspero et al. (2005)

⁽¹⁾Cultivars analyzed in previous study by Schuck et al. (2009). ⁽²⁾SSRs not analyzed.

2011), for parentage analysis (Tapia et al., 2007) and to develop genetic maps (Riaz et al., 2004).

Conclusions

1. The hybridization success between *V. labruscana* and *M. rotundifolia* depends on the species and on the cultivar used as the female parent.

2. Cultivars of *V. labruscana* can be successfully crossed with pollen from *M. rotundifolia* cultivars, but all reciprocal combinations fail to produce true hybrids.

3. Crosses between *V. labruscana* cultivar Isabel x *M. rotundifolia* cultivars Bountiful, Carlos, Magnolia, Regale and Roanoke are possible, as well as crosses between *V. labruscana* cultivar Bordo x *M. rotundifolia* cultivars Carlos, Magnolia, Regale and Roanoke, indicating that these species can be used in breeding programs.

4. SSR markers are efficient to confirm the paternity of interspecific F1 hybrids and to determine the correct identity of *M. rotundifolia* cultivars.

Acknowledgments

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, for financial support; to Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais and to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, for scholarships granted; to Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina and to Universidade Federal do Paraná, for support; and to Rong Hu, from the University of California, for assistance with the SSR analysis.

References

- ADAM-BLONDON, A.-F.; ROUX, C.; CLAUX, D.; BUTTERLIN, G.; MERDINOGLU, D.; THIS, P. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.1017-1027, 2004.
- BOTTON, M.; COLLETA, V.D. Avaliação da resistência de cultivares de *Vitis rotundifolia* à pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.213-216, 2010.
- BOTTON, M.; MELO, G.W.B. de; OLIVEIRA, O.L.P. de; ONZI, I. Efeito da cobertura vegetal sobre a pérola-da-terra (Hemiptera: Margarodidae) na cultura da videira. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.681-684, 2010.
- BOUQUET, A. *Vitis* x *Muscadinia* hybridization: a new way in grape breeding for disease resistance in France. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GRAPE BREEDING, 3., 1980, Davis. **Proceedings**. Davis: University of California, 1980. p.42-61.
- BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; MEREDITH, C.P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.50, p.243-246, 1999.
- BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, v.39, p.628-633, 1996.
- CORDEIRO, M.C.R.; PINTO, A.C. de Q.; RAMOS, V.H.V.; FALEIRO, F.G.; FRAGA, L.M.S. Utilização de marcadores RAPD e outros parâmetros na determinação de genitores em híbridos de mangueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.164-167, 2006.
- DALBÓ, M.A.; PERUZZO, E.L.; SCHUCK, E. Alternativas de manejo para o controle do declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, v.20, p.58-61, 2007.
- DE CÉSARO, A. **Caracterizações histológica e fisiológica do ataque de pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasiliensis* Wille, 1922) (Hemiptera: Margarodidae) em videiras**. 2008. 89p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- DI GASPERO, G.; CIPRIANI, G.; MARRAZZO, M.T.; ANDREETTA, D.; PRADO CASTRO, M.J.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Isolation of (AC)*n*-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. **Molecular Breeding**, v.15, p.11-20, 2005.
- DI GASPERO, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R.; EDWARDS, K.J.; CIPRIANI, G. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.301-308, 2000.
- GARRIDO, L. da R.; SÔNEGO, O.R.; GOMES, V.N. Fungos associados com o declínio e morte de videiras no Estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.332-324, 2004.
- GOLDY, R.; ONOKPISE, O.U. Genetics and breeding. In: BASIOUNY, F.M.; HIMELRICK, D.G. (Ed.). **Muscadine grapes**. Blacksburg: ASHA, 2001. p.51-90.
- KELLOW, A.V.; MCDONALD, G.; CORRIE, A.M.; HEESWIJCK, R.V. In vitro assessment of grapevine resistance to two populations of phylloxera from Australian vineyards. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.8, p.109-116, 2002.
- LEÃO, P.C. de S.; BORGES, R.M.E. **Melhoramento genético da videira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 61p. (Embrapa Semiárido. Documentos, 224).
- LEÃO, P.C. de S.; MOTOIKE, S.Y. Genetic diversity in table grapes on RAPD and microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.1035-1044, 2011.
- LU, J.; LAMIKANRA, O. Barriers to intersubgeneric crosses between *Muscadinia* and *Euvitis*. **HortScience**, v.31, p.269-271, 1996.

- MERDINOGLU, D.; BUTTERLIN, G.; BEVILACQUA, L.; CHIQUET, V.; ADAM-BLONDON, A.F.; DECROOCQ, S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. **Molecular Breeding**, v.15, p.349-366, 2005.
- NEAL, P.R.; ANDERSON, G.J. Does the 'old bag' make a good 'wind bag'? comparison of four fabrics commonly used as exclusion bags in studies of pollination and reproductive biology. **Annals of Botany**, v.93, p.603-607, 2004.
- OLMO, H.P. The potential role of (*vinifera* x *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. **Experientia**, v.42, p.921-926, 1986.
- REYNOLDS, A.G.; WARDLE, D.A. Rootstocks impact vine performance and fruit composition of grapes in British Columbia. **HortTechnology**, v.11, p.419-427, 2001.
- RIAZ, S.; DANGL, G.S.; EDWARDS, K.J.; MEREDITH, C.J. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.864-872, 2004.
- SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; GUERRA, M.P.; VOLTOLINI, J.A.; GRANDO, M.S.; SILVA, A.L. da. Molecular characterization of grapevine from Santa Catarina, Brazil, using microsatellite markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.487-495, 2009.
- SEFC, K.M.; LEFORT, F.; GRANDO, M.S.; SCOOT, K.D.; STEINKELLNER, H.; THOMAS, M.R. Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. (Ed.). **Molecular biology and biotechnology of the grapevines**. Netherlands: Kluwer, 2001. p.433-463.
- 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**, v.42, p.367-373, 1999.
- SMITH, B.P. **Genetic and molecular mapping studies on a population derived from *Vitis vinifera* x *Muscadinia rotundifolia* and genetic diversity of wild *Muscadinia rotundifolia***. 2010. 277p. Dissertation (Doctor) – University of California, Davis.
- TAPIA, A.M.; CABEZAS, J.A.; CABELLO, F.; LACOMBE, T.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; HINRICHSSEN, P.; CERVERA, M.T. Determining the Spanish origin of representative ancient American grapevine varieties. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.58, p.242-251, 2007.
- THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.985-990, 1993.
- VASCONCELOS, M.C.; GREVEN, M.; WINEFIELD, C.S.; TROUGHT, M.C.T.; RAW, V. The flowering process of *Vitis vinifera*: a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.60, p.411-434, 2009.
- WALKER, M.A.; LIDER, L.A.; GOHEEN, A.C.; OLMO, H.P. VR 039-16 grape rootstock. **HortScience**, v.26, p.1224-1225, 1991.

Received on July 22, 2011 and accepted on October 10, 2011