

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCAS MOLECULARES LIGADAS
À AUSÊNCIA DE SEMENTES EM VIDEIRA**

Ana Veruska Cruz da Silva

Engenheira Agrônoma, DSc.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

2002

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCAS MOLECULARES LIGADAS
À AUSÊNCIA DE SEMENTES EM VIDEIRA**

Ana Veruska Cruz da Silva

Orientador: Prof. Dr. Antonio Baldo Geraldo Martins

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Abril – 2002
Jaboticabal – São Paulo

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA VERUSKA CRUZ DA SILVA - nascida aos 13 de abril de 1973, em Quixeramobim, Ceará, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Federal do Ceará, em 1996. Durante a graduação, foi monitora das disciplinas Melhoramento Vegetal e Aspectos Sociais da Agricultura, além de bolsista PIBIC/CNPq do Departamento de Fitotecnia. Obteve o grau de Mestre em Agronomia: Fitotecnia pela Escola Superior de Agricultura de Mossoró, em 11 de janeiro de 1999. Durante o curso de Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal na FCAV - UNESP, iniciado em março de 1999, realizou estágio de docência nas disciplinas Fruticultura e Fruticultura especial, foi Diretora Científica da Associação dos Pós-graduandos (1999/2000) e representante discente (suplente) na Congregação da FCAV - UNESP.

"Sorri
Quando a dor te torturar
E a saudade atormentar
Os teus dias tristonhos, vazios

Sorri
Quanto tudo terminar
Quando nada mais restar
Do teu sonho encantador

Sorri
Quando o sol perder a luz
E sentires uma cruz
Nos teus ombros cansados, doridos

Sorri
Vai mentindo tua dor
E ao notar que tu sorris
Todo mundo irá supor
Que és feliz".

Charles Chaplin

Aos meus pais - *Edison e Eliomar* - meu "porto seguro" e meus maiores exemplos de vida, de amor e dignidade.

MINHA HOMENAGEM

Às minhas tias - *Elça e Luiza* - por todas as orações, pelo amor e por fazerem parte de minha vida também como minhas "mães".

Aos meus irmãos - *Paulo e Edison Filho* - pelo companheirismo, cumplicidade e amor que nos une.

Ao meu sobrinho - *Bruno* - pela alegria que dá à minha vida.

DEDICO

Ao *Evandro*, por toda a nossa história e pelo amor que nos fez superar grandes desafios e provações.

Ao *meu Anjo* ... que me permitiu conhecer o mais belo e intenso sentimento - o tão falado - "amor de mãe"...

OFEREÇO

À *DEUS*, pela vida e por estar sempre presente, iluminando meu caminho.

MUITO OBRIGADA!

*"Quando te decidires, segue. Não espere que o vento cubra de flores o caminho.
Cria-o. Faze-o tu mesmo e parte...
Sem deixar de lembrar que outras pessoas ficaram e que outros olhos ficaram te olhando seguir..."*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador - Prof. Dr. *Antonio Baldo Geraldo Martins* - pela disponibilidade em orientar-me, pela confiança, amizade e pelas oportunidades de crescimento profissional que me proporcionou.

À Profa. Dra. *Eliana Gertrudes Macedo Lemos*, que me recebeu em seu laboratório e me forneceu toda estrutura para a realização deste trabalho.

Aos inesquecíveis colegas que me ajudaram a tornar esta tese um sonho REAL, seja fazendo uma PCR (*Ester Wickert e Gisele Ventura Garcia Grilli*), um gel (*Eliamar Pedrinho, Luciana*), doando seus materiais (*Alessandro Luís do Prado e Maria Cândida Bento*), ajudando-me nas análises (*Rodrigo Matheus Pereira*), tendo paciência para ler o que eu escrevia (*Cristina Lacerda Silva*) e aos queridos amigos *Humberto Actis Zaidan e Josélia Marques Oliveira...* Enfim, a todos que me presentearam com sua atenção, boa vontade e incentivo.

*"A vida é uma escuridão, exceto quando há impulso.
E todo impulso é cego, exceto quando há saber.
E todo saber é vazio, exceto quando há trabalho.
E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor..."*

Gibran

AGRADECIMENTOS

A todos os que fazem a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV - UNESP), pela acolhida e estrutura.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal à Pesquisa - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade, atenção, sugestões e valorização dada a este trabalho.

Ao Prof. Dr. *Carlos Ruggiero*, incentivador principal ao meu direcionamento à área de Biologia Molecular e pelas sugestões, sempre valiosas durante todo o curso.

A Profa. Dra. *Leila Trevizan Braz*, pela atenção, sinceridade e pela amizade dedicada ao longo desses anos.

Aos pesquisadores *Patrícia Coelho de Sousa Leão* (CPATSA/EMBRAPA) e *Jair Costa Nastighal* (CNPUV/EMBRAPA), pelo envio do material vegetal.

À *Ana Paula Aukar*, pelos ensinamentos e colaboração na execução do fAFLP.

À amiga *Gisele Ventura Garcia Grilli*, pelo prazer que foi trabalhar ao vosso lado, pela sua incansável boa vontade e amizade preciosa, que terei sempre guardada no coração.

Aos inesquecíveis colegas do Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas: *Luciane Ciapina, Ronaldo Zaccaro, Kerly Pereira, Michelle Mantovani, Vitória Gottardi, Regiane Travensole, Tereza Castellane, Alda Otoboni e Silvana.*

À *Josélia Marques Oliveira e Eliane Cristina C. Alves*, pela ajuda fundamental para a realização dos últimos PCRs e pela constante disponibilidade, torcida e amizade, bem como ao Prof. Dr. *Manuel Vítor Lemos*, Profa. Dra. *Janete Aparecida Sena* e *Viviane Cristina Vieira* pela atenção com que sempre me trataram.

À *Nadia Lynn*, pela torcida, amizade e carinho, ao *Luís Paulo e Marisa* (Produção Vegetal), *Bedin* (Ripado), *João Carlos* (Tecnologia), *Eliane, Sônia e Aldo* (Biologia), *Cristina* (Biblioteca), *Wilson* (UAD) e à seção de PG (*Isabel, Estela, Maria Ermida, Márcia e Valéria*), pelo bom convívio e boa vontade em ajudar-me sempre que precisei.

Aos professores do curso de *Produção Vegetal*, em especial ao Prof. Dr. *Jaime Maia Santos*; Profa. Dra. *Terezinha de Jesus Deléo Rodrigues*; Prof. Dr. *Luiz Carlos Donadio* (e família); Profa. Dra. *Maria Esmeralda Payão Demattê*; Profa. Dra. *Isabel Cristina Leite*; Profa. Dra. *Khátia Fernandes Lopes Pivetta* e ao Prof. Dr. *Antônio de Goes*, pelo respeito, amizade e por todos seus ensinamentos.

Às minhas amigas e companheiras de república: *Débora Andréa Façanha, Maria Aparecida Lima e Leila de Paula Resende; Silvelena Vanzolini e Rosângela Peres Biruel*, por todos os bons momentos...

Aos queridos amigos: *Eloiza Santana Seixas, Daniel Pierre Vitória, José Valmir Feitosa, Tereza Cristina Tarlé Pissarra, Giselle Aparecida Bonacin, Alexsandra Duarte de Oliveira, Antônio Decarlos Neto, Estela Dalpin Castellane, Nicole Maria Marson Donadio e Geraldo Nogueira Filho*, pelo companheirismo constante durante todos esses anos...

Aos inúmeros colegas de PG, pela agradável convivência, em especial à "*turma do mamão 1999*", *Patrícia Unger, Assíria Nóbrega, Inêz Vilar, Tagli Dalpian, Débora Bastos, Luciana Cláudia e Wilson Maruyama, Caciana Costa*, etc...

À *Gilmara Mabel Santos, Edilma Pereira Gonçalves, Nivânia Pereira da Costa e Débora Andréa Façanha*, por estarem ao meu lado no pior dia de minha vida.

À Profa. Dra. *Jane Maria Bertocco Ezequiel* (Produção Animal), pelo convívio familiar que nos ofereceu durante a permanência em Jaboticabal.

Ao Prof. Dr. *Romildo Albuquerque dos Santos* (UFC), responsável pela minha iniciação científica.

Aos pesquisadores *Levi de Moura Barros e José Jaime Vasconcelos Cavalcante* (CNPAT/EMBRAPA), por todo o acompanhamento e amizade, desde a graduação.

Aos meus avós (*Leopoldina Maciel Ribeiro e Paulo Ribeiro da Silva**; *Maicá Salgado e Edmar Salgado**), tios (*Alzira Monteiro Cruz**, *Rosena, Edmar Salgado Filho, Ana Lúcia Salgado, Jacinta Maciel, Amélia Silva, Rosena, José Mário*), primos (*Antônio Carlos da Cruz e Ana Lúcia Cruz*), padrinhos (*Vera Lúcia Salgado e Francisco das Chagas Silva*), cunhada (*Thércya Barroso*), e todos os demais membros de minha "*Família*" e aos meus queridos "*Amigos*", que mesmo à distância, me transmitiram a força de suas orações e a torcida pela realização deste trabalho.

A todos que compartilharam comigo este sonho e acreditaram nesta conquista.

A DEUS, por ter tanto a agradecer...

"É tão bonito quando a gente entende, que se depende de tanta, muita diferente gente, aonde quer que a gente vá... É tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho, por mais que se pense estar..."

Gonzaguinha

*/In Memoriam

ABREVIações

CEASA – Centrais de Abastecimento S/A

CNPAT – Centro Nacional de Pesquisa da Agroindústria Tropical

CNPUV – Centro Nacional de Pesquisa da Uva e Vinho

CTAB – “N-Cetyl N,N,N – trimethyl-ammonium bromide”

cv. – Cultivar

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNase - desoxirribonuclease

DNAzol – Kit para extração de DNA de plantas (GIBCO – BRL[®])

dNTP – desoxinucleotidos trifosfatos

EcoRI – Enzima de restrição isolada de *E. coli*

EDTA - Ácido etileno diaminotetracético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EtOH – Etanol

fAFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados por fluorescência

FAM – iniciadores de síntese (“primers”) marcados por fluorescência azul

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

HCl – Ácido clorídrico

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas

JOE – iniciadores de síntese (“primers”) marcados por fluorescência verde

KCl – Cloreto de potássio

KOAc – Acetato de potássio

LBMP – Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas

MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MseI – Enzima de restrição, isolada de *Micrococcus species*.

NaCl – Cloreto de sódio

NaOAc – Acetato de sódio

NED – iniciadores de síntese (“primers”) marcados por fluorescência amarela

PCR – Reação de amplificação em cadeia

PVP – polivinilpirrolidone

q.s.p. – “quantidade suficiente para...”

RAPD – Amplificação casualizada de DNA polimórfico

RFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

RNase – Enzima Ribonuclease.

ROX – Padrão interno de peso molecular Gene Scan – 500

SCAR - Região Amplificada de uma Sequência Caracterizada

SECEX – Secretaria de Comércio Exterior

Taq – Enzima DNA polimerase

TE – TRIS 10mM + EDTA 1mM, pH 8,0

TEB – TRIS 89 mM + EDTA 2,5mM + ácido bórico 89 mM, pH 8,3

TRIS – “Hydroxymethyl aminomethane”

UBC – University of British Columbia

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UVIBRA – União Brasileira de Viticultura

1kb – Padrão de peso molecular

IDENTIFICAÇÃO DE MARCAS MOLECULARES LIGADAS À AUSÊNCIA DE SEMENTES EM VIDEIRA

RESUMO - A videira é uma frutífera de grande importância mundial e, atualmente, a ausência de sementes tem sido uma característica bastante exigida pelos consumidores de uvas de mesa. O objetivo do presente trabalho foi a identificação de marcas moleculares associadas à ausência de sementes, utilizando as técnicas RAPD e *f*AFLP. O material vegetal foi oriundo dos bancos de germoplasma da EMBRAPA (CPATSA e CNPUV), totalizando 19 cultivares, umas com sementes, outras sem sementes e ainda, três porta-enxertos. Para a análise RAPD foram utilizados 213, onde apenas 30 possibilitaram amplificação de todas as amostras, sendo estes os usados para a obtenção dos dendrogramas. Esses “primers” produziram um total de 337 bandas polimórficas, tendo sido possível encontrar uma marca específica para a ausência de sementes, utilizando o “primer” UBC 443, que poderá futuramente ser utilizada para o desenvolvimento de marcadores SCAR, possibilitando a criação de um “kit” de identificação rápida e precoce de apirenia em videira. A análise *f*AFLP proporcionou a visualização de um dendrograma onde verificou-se que as cultivares foram agrupadas especificamente, ou seja, separados em cultivares com sementes, sem sementes e os porta enxertos. Foi possível identificar uma marca molecular específica para a característica de ausência de sementes, utilizando o marcador RAPD e, com o *f*AFLP, obteve-se um melhor agrupamento das cultivares estudadas.

Palavras-chave: *Vitis*, RAPD, *f*AFLP, apirenia

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED TO THE ABSENCE OF SEEDS IN GRAPEVINE

ABSTRACT - The grapevine is one of the most important fruit world-wide and, actually, the absence of seeds has been a desirable feature by table grapes consumers. This research had as an objective, the identification of molecular marks associated to the absence of seeds, using RAPD and fAFLP techniques. The vegetal material used were proceeding from the germoplasm banks of EMBRAPA (CPATSA and CNPUV). It was used 19 cultivars, with and without seeds, and three different rootstocks. For RAPD analysis it was used 30 primers, producing a total of 337 polymorphics bands, it was also possible to find a specific mark for the absence of seeds, using primer UBC 443, that it could be used in the future for the development of SCAR markers, making possible the creation of a " kit " of fast and precocious identification of absence of seeds in grapevine. The fAFLP analysis provided a visualization of a dendrogram where it was verified that the cultivars were arranged in specific groups, separated in three different cultivars: with seeds, without seeds and the rootstocks. It was possible to identify a specific molecular mark for the feature of absence of seeds, using RAPD marker and, with fAFLP, to obtain a better arrangement of these cultivars.

Keywords: *Vitis*, RAPD, fAFLP, seedlessness

1. INTRODUÇÃO

A videira é uma das mais importantes espécies frutíferas cultivadas no mundo. O continente europeu lidera a produção com 57,5% da oferta total, sendo a Itália, Espanha e França, os principais países produtores. A participação da América do Sul no “ranking” mundial é de apenas 8,0%, destacando-se Chile, Argentina e Brasil (Rosset, 1998). No Brasil, em 2000, havia uma área cultivada de 60.000 hectares, apresentando uma produção anual de 521.757 toneladas (SECEX/MDIC, 2001).

Atualmente, as uvas finas sem sementes são mais procuradas e já possuem um valor diferenciado no mercado, havendo uma grande expectativa em relação ao seu cultivo. Porém, devido à sua baixa fertilidade e às diferentes condições climáticas brasileiras, esses cultivares não garantem uma produtividade efetiva.

O comércio internacional de uva de mesa cresce anualmente, e o Brasil apresenta grandes possibilidades de aumentar sua participação neste mercado. Porém, a nova tendência para consumo de uvas de mesa, ou seja, de cultivares apirenas (sem sementes), tem restringido bastante a exportação brasileira, onde os produtores, principalmente os das regiões Nordeste e Sudeste, por não disporem de cultivares adaptadas, têm perdido boas oportunidades de inserção no mercado internacional.

Nos Estados Unidos, as uvas apirenas representam cerca de 80% do total de uvas de mesa produzidas, sendo a cv. Sultanina, também chamada de Thompson Seedless, a mais difundida. No Brasil, as mais produzidas são ‘Centennial’ (Jales, SP) e ‘Superior Seedless’ (Vale do Rio São Francisco, PE e BA).

Tradicionalmente, os métodos utilizados para identificação de genótipos, bem como para estimar as relações filogenéticas existentes entre eles, são baseados em estudos morfológicos, o que, no caso da viticultura, é chamado de ampelografia (Galet, 1979). No entanto, essas características podem ser alteradas

pela ocorrência de pragas, doenças e características ambientais, além de serem avaliações subjetivas e estarem condicionadas ao critério e experiência do pesquisador.

Esse tipo de problema tem levado a numerosos casos de genótipos mal indexados, principalmente quando se trata de cultivares fenotipicamente muito semelhantes.

A utilização de marcadores moleculares apresenta-se como uma ferramenta fundamental para um melhor entendimento do genoma da videira e um grande avanço para o desenvolvimento de novas cultivares.

Apesar de todo o trabalho do melhoramento genético para obtenção de cultivares de uva apirenas, há na prática, uma grande dificuldade na execução desta pesquisa, pois algumas vezes ocorre que, grande parte do material genético produzido, é de uvas com sementes, e isto apenas pode ser verificado após, no mínimo, quatro anos de idade. Com o aprimoramento do uso de marcadores moleculares no estudo genético da videira, esse problema poderá ser constatado no viveiro, não precisando esperar a produção, evitando assim, grandes desperdícios de tempo e de capital.

Em videira, algumas pesquisas utilizando marcadores moleculares têm sido realizadas, principalmente para identificação de cultivares, de porta-enxertos, de resistência à doenças e caracterização de microrganismos que atacam a cultura, como por exemplo, a *Xylella fastidiosa*, causadora do Mal de Pierce, nos Estados Unidos.

O objetivo do presente trabalho foi a busca de marcas moleculares associadas à ausência de sementes em videira, utilizando as técnicas RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) e *f*AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados por fluorescência).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da viticultura

A produção mundial de uvas de mesa no ano de 1998 foi de aproximadamente 8,2 milhões de toneladas, sendo a Turquia, Itália, Chile e Estados Unidos, os principais produtores (Agrianual, 2000). O Brasil produziu 521.757 toneladas de uva em 2000, totalizando 60.000 hectares de área colhida (SECEX/MDIC, 2001).

Além da pequena participação na exportação de uvas de mesa, o Brasil não produz a quantidade suficiente para atender o mercado interno, sendo necessária a importação em alguns períodos do ano.

A produção de uvas no Brasil localiza-se nas regiões sul, sudeste e nordeste, e é uma atividade bastante consolidada, com grande importância econômica e social nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais, com participação de 63,15%, 18,76%, 5,14%, 6,29%, 3,33%, 1,72% e 1,17% da área colhida em 1996, respectivamente (IBGE, 1998), participando também, na importante função de fixação digna do homem do campo.

As regiões tradicionalmente produtoras (região sul do país) têm apenas mantido sua produção estável, enquanto as regiões tropicais apresentam-se em grande expansão, destacando-se o pólo irrigado de Petrolina, PE (Região do Vale do Rio São Francisco) e o noroeste do estado de São Paulo, em especial a região de Jales.

O Estado de São Paulo apresenta pequena participação na produção da uva destinada para indústria. Porém, se tratando de uva para mesa (tipos comum e fina), o estado responde pela maior parcela da produção brasileira, predominando as cultivares Niágara Rosada, Itália e Rubi (Agrosite, 2001).

As uvas finas de mesa destinadas à exportação são produzidas principalmente nas áreas irrigadas do Vale do Rio São Francisco, em qualquer

época do ano, e também em outras regiões, como Jales e São Miguel Arcanjo (SP), Pirapora (MG) e Maringá (PR).

Segundo o IBRAF (2002), a demanda por uvas sem sementes é crescente, ocasionando a introdução de novas cultivares apirenas, de maneira a atender às exigências dos consumidores.

O mercado europeu já dá preferência pela compra de uvas de mesa sem sementes, fazendo com que os produtores do Vale do Rio São Francisco invistam na produção dessas cultivares. Em São Paulo, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) vem desenvolvendo pesquisas que permitem a produção de uvas de mesa da cv. Itália sem sementes.

As uvas finas de mesa, geralmente cultivares de *Vitis vinifera* L., representam cerca de 50% do volume total de uvas comercializadas pelas Centrais de Abastecimento S/A (CEASA), e estão presentes no mercado interno durante todo o ano (Camargo, 1998).

2.2. Apirenia

Devido às novas exigências de mercado, atualmente a criação de cultivares de uvas de mesa sem sementes é uma das grandes prioridades dos programas de melhoramento da videira em todo o mundo.

O caso da apirenia (ausência de sementes) em videira é bastante interessante, devido à ocorrência de dois tipos - a partenocarpia e a estenoespermocarpia (Varoquaux *et al.* 2000).

Segundo Camargo *et al.* (2001), a partenocarpia se caracteriza pela ausência total de sementes, não havendo fecundação, sendo o fruto desenvolvido exclusivamente a partir de tecidos maternos. Esse tipo de apirenia é característico da cv. Corinto, que é utilizada exclusivamente para ser consumida como uva-passa (Weaver, 1964). Na estenoespermocarpia ocorre a fecundação para formação do fruto, seguida de aborto do embrião ainda imaturo, devido à ausência ou má formação do endosperma. Desse processo, originam-se frutos maduros

com sementes-traço pouco desenvolvidas e macias, imperceptíveis ao consumidor (Stout, 1936), característica encontrada principalmente na cv. Thompson seedless (Varoquaux *et al.*, 2000). Na maioria dos casos, o aborto do embrião ocorre depois de oito semanas da fecundação (Pommer *et al.*, 1995), mas, também pode se dar de 2 a 10 semanas após a polinização (Emershard *et al.*, 1989).

A herança do caráter estenoespermocarpia ainda não está claramente definida e muitos são os modelos de herança sugeridos (Pearl *et al.*, 1998). A necessidade de ampliação da variabilidade genética, por meio de cruzamentos para a seleção de indivíduos apirenos superiores, determinou o abandono da partenocarpia e a adoção da estenoespermocarpia por todos os programas de melhoramento empenhados na obtenção de cultivares de uvas apirenas (Camargo *et al.*, 2001).

Para o desenvolvimento dessas novas cultivares, os métodos de melhoramento tradicionais estão baseados em cruzamentos entre cultivares com e sem sementes, sendo a cultivar Sultanina a principal fonte do caráter “ausência de sementes”. A proporção de genótipos obtidos dessas progênes é baixa (10 – 30%) e depende do parentesco (Loomis e Weinberger, 1979), além de requerer um grande número de plantas. Stout (1936) observou numerosa variação no tamanho, forma e textura de resquícios de sementes de uva de plantas estenoespermáticas. Algumas tinham integumento muito semelhante às sementes verdadeiras, enquanto que outras tinham resquícios indetectáveis, observando que em ambos os casos não havia germinação dessas “sementes”.

Com 54 anos de estudos documentados da cultura de tecidos em *Vitis sp.*, pode-se considerar o resgate de embriões nas hibridações entre genótipos apirenos como uma das mais significativas contribuições para o melhoramento da videira (Mullins, 1990). No Brasil, essa técnica vem sendo utilizada desde o início da década de 1990 (Camargo, 1998). Por meio da cultura de tecidos, embriões viáveis com ausência de sementes podem ser obtidos aumentando para 50% a 80% a proporção de obtenção de genótipos sem sementes (Cain *et al.* 1983).

O cultivo *in vitro* evita o aborto do embrião o qual prossegue com seu desenvolvimento normal, em meio artificial, estando pronto para o transplante em seis semanas. Apesar disso, a técnica de cultura de tecidos é laboriosa e demanda muito tempo, além do que a videira não produz cachos de uvas antes dos quatro anos, não sendo possível, num estágio inicial, selecionar as plantas com ausência de sementes, para promover-se às seleções.

Foi proposto por Bouquet e Danglot (1996) que a estenoespermocarpia poderia ser controlada por três genes recessivos complementares: a1, a2 e a3, herdados independentemente e regulados por um gene dominante l25.

Por estes aspectos, a identificação de marcas moleculares ligadas à ausência de sementes apresenta-se como de grande interesse, criando a possibilidade de excluir as plantas que produzirão frutos com sementes ainda na fase de plântulas, refletindo numa considerável economia de tempo, espaço e custos adicionais. Assim, concordando com Varoquaux *et al.* (2000), há uma urgente exigência em se encontrar marcadores moleculares que possam garantir a apirenia em videira.

2.3. Extração de DNA

Sabe-se que o genoma da videira é relativamente pequeno, quando comparado à outras espécies perenes, e acreditava-se que isso poderia facilitar os estudos em genética molecular (Lodhi *et al.* 1994). Porém, a extração de DNA de videira é bastante delicada, devido a presença de contaminantes, como polifenóis e polissacarídeos, e para obtenção de bons resultados em análises como RAPD, AFLP ou qualquer outro tipo de estudo molecular, o DNA deve ser de boa qualidade. O que se deseja é que as extrações de DNA produzam amostras puras, de maneira a não inibir os tratamentos enzimáticos ou interferir nos padrões de migração e amplificação em gel de eletroforese.

A escolha do tecido vegetal é muito importante para uma boa extração, devendo-se utilizar tecidos jovens, no caso de videira. Segundo Ferreira e

Grattapaglia (1995), esses critérios são ainda mais importantes em espécies que produzam grandes quantidades de metabólitos secundários, que em geral, interferem na extração bem sucedida de DNA.

Já existem várias metodologias para extração de DNA de plantas e microrganismos, e observa-se algumas modificações de uma para outra, visando na maioria das vezes, resolver problemas específicos para cada espécie em estudo. No caso específico da videira, uma metodologia descrita por Lodhi *et al.* (1994), foi utilizado NaCl e PVP (polivinilpirrolidone) para remover polissacarídeos e polifenóis, respectivamente.

Alguns protocolos podem fornecer DNAs degradados ou contaminados, e mesmo possibilitando ampliações PCR, podem comprometer a reprodutibilidade das reações, resultando muitas vezes em falsos negativos (Romano, 1998).

2.4. Marcadores Moleculares

É freqüente o surgimento de dúvidas acerca da definição de material de videira no campo. Segundo Sousa (1996), o gênero *Vitis*, como consequência de sua distribuição em diversos centros de refúgio, as variedades sofreram adaptações climáticas que determinaram o surgimento de novas cultivares. Assim sendo, existem diversas espécies e milhares de cultivares espalhadas por todo o mundo.

A utilização de marcadores moleculares tem sido utilizada extensivamente e vem empregando um papel fundamental na identificação de cultivares, na determinação de diversidade genética, na verificação da pureza genética, no mapeamento genético e principalmente na identificação de marcas que permitem a seleção de caracteres específicos e de interesse (Andreani Júnior, 1998).

Os marcadores moleculares superam as dificuldades encontradas nas caracterizações morfológicas, fenológicas e organolépticas, podendo-se reconhecer diretamente as diferenças genéticas entre indivíduos, obtendo-se um perfil molecular (“fingerprinting”) característico para cada variedade. E, segundo

Johns *et al.* (1997), também permitem obter melhores estimativas da diversidade genética de uma determinada população.

Para isto, um marcador deve reunir determinadas características tais como: alto nível de polimorfismo, herança co-dominante, distribuição freqüente e uniforme em todo o genoma, facilidade de estudo, rapidez nos resultados e baixo custo, ou pelo menos, proporcional à quantidade de informações a serem geradas, e conforme Moreno *et al.* (1995), também deve possuir um nível de reproducibilidade adequado para possíveis comparações entre laboratórios distintos, em diferentes regiões do mundo.

A primeira metodologia molecular aplicada a plantas foi o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição - RFLP (Helentjaris *et al.* 1985). Em videira, o RFLP foi utilizado pela primeira vez usando sondas heterólogas de microsátélites (Strien *et al.* 1990). Esta é uma técnica complexa e de alto custo, um dos motivos que novos métodos têm sido desenvolvidos baseados na amplificação de seqüências genômicas mediante uma reação de amplificação em cadeia (PCR – “Polymerase Chain Reaction”). Assim, segundo Satub *et al.* (1996), pode-se fazer análises partindo-se de uma pequena quantidade de DNA e com protocolos relativamente mais simples.

Uma das formas de caracterização dos recursos biológicos pode ser realizado através da amplificação casualizada do DNA polimórfico (RAPD). Esta técnica é obtida através de PCR e utiliza oligonucleotídeos iniciadores de síntese (“primers”) de seqüência arbitrária, que tendem a produzir uma freqüência relativamente alta de polimorfismo, sendo um método rápido e eficiente (Fairbanks *et al.*, 1993). Os oligonucleotídeos têm sido utilizados para reproduzir segmentos de DNA genômico em várias espécies de plantas (Willians *et al.*, 1993). Com a ajuda de métodos estatísticos apropriados, a técnica RAPD tem sido efetiva em detectar a diversidade de população em vários tipos de organismos (Chen *et al.*, 1995).

Polimorfismo de fragmentos RAPD são visualizados como presença e ausência de bandas em um gel de eletroforese e podem, assim, serem facilmente

interpretados e convertidos em dados diagnósticos de homologia molecular entre indivíduos (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Com o objetivo de caracterizar dez cultivares de mamão, Stiles *et al.* (1993) utilizaram a técnica RAPD e encontraram valores acima de 70% de similaridade, evidenciando uma estreita base genética entre elas.

Ronning *et al.* (1995) estimaram variações entre e dentro de diferentes anonáceas e seus híbridos interespecíficos e verificaram que os produtos das amplificações dos DNAs com os 15 “primers” utilizados mostraram padrões polimórficos, indicando ser o RAPD um método eficiente de determinação genotípica através do “fingerprint” dentro e entre as espécies de Annonaceae.

Nos Estados Unidos, Warburnton e Bliss (1996) desenvolveram um estudo utilizando 94 marcadores RAPD para estimar a distância entre 136 cultivares de pêra oriundas de diferentes regiões do país.

Cassiano (1998), utilizou marcadores RAPD para determinar as variações genéticas entre as espécies de *Passiflora* e verificou que as espécies apresentaram similaridade de 17,30%, sendo que entre *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*, a similaridade foi de 34,35%.

Em abacaxizeiro, Ruas *et al.* (1995) utilizaram 17 primers em reações de RAPD, produzindo 75 marcadores, os quais permitiram a discriminação de quatro cultivares de abacaxi, sendo que os resultados obtidos destas análises de RAPD foram similares àqueles obtidos nas avaliações morfológicas e agrônômicas, levando os autores a concluírem que análises de RAPD podem ser usadas de maneira eficiente para caracterização de recursos genéticos no gênero *Ananas*.

Também em abacaxi, Gottardi (2001) avaliou padrões genotípicos e similaridade dentro da cultivar Smoot Cayenne, utilizando marcadores bioquímicos e moleculares. Foi verificado, através de marcadores RAPD, a existência de variabilidade genética do material cultivado no Brasil, podendo a cultivar em questão, ser considerada como uma coleção de clones em mistura.

A avaliação da diversidade genética de citros utilizando RAPD (Vilarinhos *et al.* 2000) permitiu a distribuição dos 30 acessos do banco Ativo de Germoplasma

de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA) em cinco diferentes grupos, que não diferem da origem e classificação taxonômica.

Embora muito cultivada e de grande importância econômica mundial, ainda há muito o que se pesquisar sobre a genética da videira. Para Reisch e Pratt (1996) este “atraso” deve-se principalmente à alta heterozigose e ao longo período de juvenilidade, características do gênero. Os estudos genéticos em videira intensificaram-se a partir de 1990, coincidindo com o advento da técnica RAPD.

Existem alguns questionamentos sobre a real existência de algumas espécies de videira, devido a ocorrência de vários cruzamentos entre si, resultando em híbridos vigorosos e férteis F₁ (Hancock, 1992). Esta situação cria problemas desde a documentação e preservação de bancos de germoplasma ao cultivo e utilização.

Utilizando marcadores moleculares, descobriu-se que uma variedade chilena de uva tida oficialmente como extinta desde 1880 ('Carmenère') era a então considerada 'Merlot', cultivada no Chile, numa área de 300 hectares, que logo após a descoberta e sua importância para viticultura chilena, transformou-se rapidamente em 2.300 hectares, podendo num futuro próximo, tornar-se a principal uva chilena novamente (Bernardes, 2002).

Esta recente disponibilidade de marcadores moleculares tem gerado diversos estudos com o gênero *Vitis*, devido principalmente à dificuldade de distinção entre cultivares.

Tem-se testado isoenzimas, RFLPs (Strien *et al.*, 1990; Bowers *et al.*, 1993), RAPDs (Ye *et al.*, 1998), AFLPs (Goto-Yamamoto, 1997) e microsátélites (Lambooy e Alpha, 1998), resultando num progresso na compreensão da diversidade do gênero dentro de diferentes bancos de germoplasmas distribuídos em diferentes regiões do mundo.

Uma das principais descobertas, segundo Reisch (1998), foi saber que 'Carbenet Sauvignon' é resultante de um cruzamento entre 'Carbenet Franc' x 'blanc de Sauvignon' (Bowers e Meredith, 1997), e que a 'Müller-Thurgau' é

produto de 'Riesling' x 'Gutedel' (Regner *et al.*, 1996), e não de 'Riesling' x 'Sylvaner', como sempre foi acreditado.

Moreno *et al.* (1995) testaram a viabilidade da técnica RAPD para caracterização de clones e cultivares de videira, avaliando o nível de polimorfismo. Utilizando 14 "primers" (marca 'Operon', kits A e O), obtiveram polimorfismo suficiente para distinguir alguns clones e verificar que alguns materiais eram semelhantes ao clone denominado 'Albillo'.

Em videira, a sensibilidade e a reprodutividade da técnica RAPD na detecção de polimorfismos é relatada por Collins e Symons (1993), onde se utilizando diferentes "primers", foi possível identificação de diversas cultivares e a detecção de polimorfismos, estabelecendo a relação filogenética entre elas.

Grando *et al.* (1996) e Qu *et al.* (1996) informaram que os perfis das diferentes espécies de videira são altamente variáveis dentro e entre espécies.

O uso de marcadores moleculares de DNA para detectar polimorfismos entre cultivares de uva foi demonstrado por Striem *et al.* (1990), que foram os pioneiros na procura de marcas moleculares ligadas à apirenia. A análise genética para detectar polimorfismos, através da técnica da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) revelou a possibilidade do uso desta metodologia para a identificação de várias marcas moleculares correlacionadas à "ausência de sementes", o que contribuiria para a pré-seleção de plantas cujos frutos não produzissem sementes (Gray e Meredith, 1992).

Striem *et al.* (1996) utilizaram progênies obtidas dos cruzamentos entre 'Early Muscat' e 'Flame Seedless', totalizando 39 indivíduos sem sementes e 43 com sementes. Utilizando os "primers" da marca 'Operon' (Kits A, B, C, E, F, G, H, e J), eles obtiveram 400 bandas polimórficas e observaram a presença de marcas moleculares associadas à ausência de sementes. Foi possível a identificação de 12 marcas RAPD relacionadas à apirenia e sugeriram que vários genes podem estar envolvidos na expressão dessa característica, concordando também com os estudos de Bouquet e Danglot (1996).

Bouquet e Danglot (1996) propuseram que a ausência de sementes em videira pode ser controlado por três genes recessivos complementares a1, a2 e a3 controlados por um gene dominante I.

Analisando 42 acessos representando 13 espécies de videira e seus híbridos (havendo inclusive alguns em comum com o presente estudo – ‘Niagara Rosada’, ‘Perlette’ e ‘Thompson Seedless’), Wang *et al.* (1999) obtiveram 210 bandas polimórficas, originadas do uso de 15 “primers” da ‘University of British Columbia’ (UBC). Foi possível a separação das espécies *Vitis rotundifolia* das demais espécies, concordando com o atual sistema de classificação.

A análise de *f*AFLP representa uma técnica ainda mais recente. Uma de suas principais vantagens é a utilização de uma pequena quantidade de DNA, além da possibilidade de amplos estudos de um genoma (Scott *et al.* 2000), uma vez que se obtém um grande número de fragmentos que são gerados e resolvidos em um único gel (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Assim sendo, apresenta-se como um marcador promissor para identificação e caracterização de cultivares e variações clonais. O *f*AFLP, assim como o RAPD, é um marcador do tipo dominante e seu nível de complexidade técnica é maior que no RAPD.

Mesmo sendo uma técnica mais sofisticada e mais recente, também já tem sido desenvolvido alguns trabalhos com *f*AFLP em frutíferas, principalmente para caracterização de variedades, como em macieira (Tignon *et al.*, 2001); pessegueiro e nectarina (Manubens *et al.*, 1999); bananeira (Benatti *et al.*, 2001) e maracujazeiro (Aukar *et al.*, 2001).

Em videira, os estudos com *f*AFLP ainda são escassos, apesar de já terem sido publicados alguns estudos, como o de Cervera *et al.* (1998), que demonstraram o potencial da técnica para diferenciação de clones e de determinadas cultivares.

Regner *et al.* (2000) testaram a eficiência da técnica *f*AFLP para caracterização de cultivares e clones de *Vitis vinifera* (‘Gruner Veltliner’, ‘Chardonnay’ e ‘Blanc de Pinot’), e, além da identificação de 220 cultivares e a relação existente entre eles, ainda propuseram uma definição sobre suas origens.

Comparando os métodos RAPD e *f*AFLP para identificação genética de videira, Narváez *et al.* (2000), concluíram que os dois métodos permitiram diferenciar todas as cultivares analisadas, apresentaram alta reprodutibilidade e propuseram que o *f*AFLP seria uma melhor alternativa para diferenciar clones, devido sua maior reprodutibilidade e maior quantidade de informações por reação, em relação ao RAPD.

Na Espanha, Marínez-Zapater *et al.* (2000), analisaram por *f*AFLP, diferentes acessos de várias coleções existentes no país. Testando 12 combinações de “primers” (FAM/NED/JOE), obtiveram 400 bandas polimórficas, entretanto, concluíram que em alguns casos, apenas uma combinação de “primers” pode resultar numa quantidade suficiente para realização de suas análises, dependendo do objetivo da pesquisa, o que na verdade, é uma das principais vantagens da técnica.

Scott *et al.* (2000), em estudo para caracterização de diferentes cultivares na Austrália, utilizando *f*AFLP, obteve mais de 3.000 marcas, oriundas de 64 combinações de “primers”, destacando o valor potencial da técnica.

Analisando 38 clones e nove variedades (Carbenet Sauvignon, Chardonnay, Merlot, Pinot blanc, Pinot gris, Pinot Noir, Sauvignon, Schiava grossa e Traminer), Bellin *et al.* (2001) verificaram uma maior eficiência da técnica *f*AFLP na distinção entre as variedades do que entre os diferentes acessos (espécies), e deu ênfase à possibilidades futuras de desenvolvimento de marcadores SCAR (Região Amplificada de uma Seqüência Caracterizada) a partir do *f*AFLP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Foram coletadas folhas jovens de diferentes cultivares (Tabela 1) existentes nas coleções de uva do Centro de Pesquisa de Agricultura Tropical do Semi-árido (CNPAT/EMBRAPA), localizado no município de Petrolina, PE e do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (CNPUV/EMBRAPA), localizado em Jales, SP.

Imediatamente após a coleta, as folhas foram identificadas e colocadas em sacos plásticos, mantidas em gelo até a chegada no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas da FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP.

Em seguida, as folhas foram lavadas, secas, cortadas com auxílio de tesoura, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em recipiente plástico com tampa. Todos os extratos foram mantidos a -20°C (freezer) até o momento de uso.

TABELA 1 – Cultivares de *Vitis* sp. utilizadas para identificação de marcas moleculares associadas à ausência de sementes. FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP. 2002.

| UVAS COM SEMENTES | UVAS SEM SEMENTES | PORTA-ENXERTOS |
|-------------------|---------------------|--------------------|
| Itália | Superior seedless | IAC 313 (Tropical) |
| Brasil | Catalunia | IAC 766 (Campinas) |
| Patrícia | Centennial Seedless | IAC 572 (Jales) |
| Christmas Rose | Perlette | |
| Niágara Rosada | Thompson Seedless | |
| Isabel | Vênus | |
| Alphonse Lavalle | Marroo Seedless | |
| Benitaka | Beauty Seedless | |

3.2. Extração do DNA

Foram testados seis diferentes métodos de extração de DNA genômico - Shillito e Saul (1988); Saghai-Marroof *et al.* (1984); Doyle e Doyle (1991); This *et al.* (1997); Lodhi *et al.* (1994) e Lin e Kuo (1998), descritos a seguir:

a) Shillito e Saul (1984): em tubos contendo 350 mg de tecido macerado, adicionou-se 2,0 mL do tampão de extração CTAB-sarcosyl, incubando-os em seguida por 30 minutos a 60°C. Adicionou-se 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 11.953 x g por 8 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 55 µL de CTAB 10% e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugados a 11.953 x g por 8 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, nos quais adicionou-se um volume de tampão de precipitação CTAB e deixados em repouso por uma hora. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14.343 x g por 10 minutos, descartando o sobrenadante. O “pellet” foi dissolvido com 400 µL de TE alto sal a 65°C. O DNA foi precipitado adicionando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, deixando-os em freezer (-20°C) por duas horas e centrifugados a 14.343 x g por 10 minutos a 4°C. A primeira lavagem do DNA foi realizada com etanol 70% , e a segunda, com etanol 100%. O DNA foi dissolvido em 25 µL de TE (1:10) + 1 µL de RNase.

b) Saghai-Marroof *et al.* (1984): em um tubo de centrifuga (vidro/50 mL) foram adicionados 1g de tecido vegetal previamente macerado em nitrogênio líquido e 9 mL de tampão de extração CTAB (TRIS-HCl pH 7,5 1M; NaCl 5M; EDTA pH 8,0 0,5M; CTAB 1% e 140 mM de β-mercaptoetanol), sendo em seguida aquecidos a 65°C. Os tubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria a 65°C durante 1 hora, realizando-se agitação suave a cada 15 minutos. Após retirados da incubação, foram deixados por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 4,5 mL de clorofórmio:octanol (24:1), com agitação suave durante 5 minutos. Os tecidos celulares removidos por centrifugação 1910 x g por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado 50 µL de RNase (10 mg/mL), ficando em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. O DNA foi precipitado por adição de 6 mL de isopropanol, incubado a temperatura ambiente durante a noite. Após este período, o material foi centrifugado a 5860 x g por 10 minutos a 20°C. O

precipitado foi ressuspenso em 1 mL de tampão TE (0,01M TRIS e 0,001M EDTA) por 2 horas. Em seguida foi adicionado 1 mL de fenol equilibrado e centrifugado a 5860 x g por 25 minutos a 20°C. Ao sobrenadante coletado foi adicionado 50 µL de NaCl 5M e 3,5 mL de etanol absoluto, ficando em repouso a temperatura ambiente por 2 horas e após este período, foi centrifugado a 5860 x g por 10 minutos a 20°C. Os tubos foram invertidos sobre papel absorvente para eliminar todo resíduo. Ao precipitado, foram adicionados 3 mL da solução (76% EtOH 0,2M NaOAc, dH₂O) e foram deixados durante 20 minutos à temperatura ambiente. Foram novamente invertidos em papel absorvente, deixando escorrer toda a solução e adicionou-se em seguida, 1 mL da solução: 76% EtOH, 10 mM NH₄OH por 10 segundos. Novamente os tubos foram invertidos em papel absorvente e, finalmente, adicionou-se 1mL de solução TE (TRIS 10Mm, EDTA 1Mm, pH 8,0). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante a noite para dissolução do DNA.

c) Doyle e Doyle (1991) – adaptado: 0,1 g de folhas frescas de cada amostra foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 750 µL de tampão de extração (2% CTAB, NaCl 5M, 0,2% 2- β-mercaptoetanol, 0,5 M EDTA, 100 mM TRIS-HCl-pH 8,0). Após 30 minutos de incubação a 60°C, adicionou-se 450 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e o material foi centrifugado por 10 minutos a 2000 x g a 20°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se 400 µL de isopropanol. Para a recuperação do DNA, fez-se nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 0°C, descartando-se o sobrenadante. O “pellet” foi seco em temperatura ambiente, sendo em seguida, acrescentado 100 µL de TE e 1 µL de RNase. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos e acrescentados de 200 µL de água milli-Q; 100 µL de acetato de amônia e 1000 µL de etanol absoluto. Em seguida, centrifugou-se novamente a 12.000 x g por 10 minutos a 0°C, sendo

posteriormente postos à secar e foram ressuspensos em 20 μ L de TE (10 mM TRIS-HCl, pH 7,5, EDTA 0,1mM) e estocado a -20°C .

d) This et al. (1997): pesou-se 0,2 g de folhas jovens maceradas. Em seguida, foi adicionado 1 mL do tampão de extração (CTAB 2% + NaCl 1,4M + TRIS H-Cl 0,1M pH 8,2 + EDTA 20 mM + 0,5% do volume de β -mercaptoetanol). O material foi agitado suavemente para homogeneizar, e incubado por 45 minutos a 65°C . Em seguida, foi adicionado 800 μ L de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 14.343 x g por 10 minutos. Após a transferência do sobrenadante para novos tubos, foi adicionado 160 μ L CTAB 10% + 800 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido de centrifugação a 14.343 x g por 10 minutos e transferência de sobrenadante novamente. Foi adicionado 750 μ L de isopropanol gelado e os tubos foram colocados em gelo por 30 minutos, sendo agitados suavemente a cada 5 minutos e posteriormente centrifugados a 14.343 x g por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a lavagem do material, utilizando etanol 70% , sendo secos a vácuo. Adicionou-se 250 μ L de TE + 2 μ L de RNase e incubação por 1 hora a 37°C . Foi adicionado 2 μ L de Proteinase K, sendo posteriormente, incubados por 30 minutos a 50°C . A purificação foi realizada em duas etapas: a) com fenol/clorofórmio e clorofórmio (1 hora de agitação e centrifugação por 10 minutos a 11.953 x g 4°C); b) com clorofórmio (20 minutos de agitação e centrifugação por 10 minutos a 11.953 x g, 4°C). Em seguida, foi adicionado 250 μ L de acetato de amônia 5 M + 1,2 mL de etanol absoluto e centrifugou-se por 10 minutos a 14.343 x g. Foi realizada uma lavagem com etanol 70%, seguidos de uma secagem a temperatura ambiente e adição de 100 μ L de TE (10 mM TRIS-HCl, pH 7,5, EDTA 0,1 mM), para ressuspender o “pellet”. As amostras foram mantidas em freezer até o momento de sua utilização.

e) Lodhi et al. (1994): 0,5 g de folhas de cada amostra foram maceradas com nitrogênio líquido e colocadas em tubos de centrífuga, adicionando-se 15mL do

tampão de extração (20 mM EDTA, 100mM TRIS-HCl, pH 8,0, 1,4M NaCl e 2% CTAB); 50 mg de PVP e 0,2% de β -mercaptoetanol e incubados por 25 minutos a 60°C, agitando-os a cada 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2.988 x g por 15 minutos, e o sobrenadante foi acrescido de 5 mL de clorofórmio:octanol (24:1). Após nova centrifugação, foram acrescidos ao sobrenadante, metade do volume de NaCl 5 M e dois volumes de Etanol 95%, mantendo-os em freezer (-18°C) por 2 horas. Após novas centrifugações (1.075 x g por 5 minutos, seguida de uma outra, a 2.988 x g por 5 minutos), o DNA foi lavado com etanol 76%, descartando-se o sobrenadante. O DNA precipitado foi ressuscitado em 300 μ L de TE e 1 μ L de RNase / 100 μ L de DNA, e incubados a 37°C por 15 minutos. Após esse período, foram mantidas em freezer até o momento de uso do material.

f) Lin e Kuo (1998): a 0,1g de tecido vegetal macerado foi adicionado 300 μ L do Kit Plant DNAzol (GIBCO – BRL) e 10 μ g de RNase/mL. Em seguida, as amostras foram agitadas por inversão durante 5 minutos a 25°C. Adicionou-se 300 μ L de clorofórmio e agitou-se por inversão durante 5 minutos a 25°C. O material foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a -4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com adição de 225 μ L de etanol absoluto ao sobrenadante, em seguida as amostras foram agitadas por inversão durante 1 minuto e deixadas em repouso em temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, o DNA precipitado foi centrifugado a 5000 x g por 4 minutos a -4°C e o sobrenadante foi descartado. A solução de lavagem foi preparada com uma mistura de um volume de DNAzol com 0,75 volume de etanol absoluto. Foi adicionado 300 μ L desta solução de lavagem ao DNA precipitado e agitado em vórtex. As amostras ficaram em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente e após este período foram centrifugadas a 5000 x g por 4 minutos a -4°C. A solução de lavagem foi descartada e ao “pellet” de DNA foi adicionado 300 μ L de etanol 70%, agitado vigorosamente e centrifugado a 5000 x g por 4 minutos a -4°C. O etanol foi descartado e os tubos foram invertidos em

papel absorvente por 5 minutos. O “pellet” foi dissolvido em 35 μ L de TE pH 8,0 e levado a geladeira por 3 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 4 minutos a -4°C para retirar polissacarídeos insolúveis.

3.3. Quantificação do DNA

O DNA de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro, medindo absorbância nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, utilizando a relação 1DO = 50 ng/ μ L de DNA (Maniatis *et al.* 1982).

Após a quantificação, foi preparada uma solução de trabalho de 500 μ L, onde o DNA foi diluído em água milli Q filtrada para a padronização da concentração do DNA de cada amostra individual para 20 ng. O DNA original foi mantido em TE e congelado em freezer (-20°C).

3.4. Análise por RAPD

3.4.1. Amplificação do DNA genômico (RAPD – PCR)

Para a reação de amplificação do DNA, foram realizados ensaios de adequação das concentrações de DNA e de “primer”, além de diferentes programas a serem executados no termociclador.

Após esses testes, cada reação foi realizada em tubo tipo “eppendorf” previamente estéril, contendo: 50 ng de DNA, tampão de PCR (GIBCO-BRL) 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 1,0 U Taq DNA polimerase (GIBCO), 30 ng/ μ L de “primer”, água milli-Q filtrada q.s.p. 20 μ L.

Os DNAs foram amplificados utilizando termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controler – MJ Research, Inc.) e submetidos a um ciclo de 94°C por 1 minuto; 92°C por 1 minuto; 35° C por 1 minuto; 92°C por 1 minuto; 35°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos; 40 vezes (92°C por 1 minuto; 35° C por 1

minuto; 92°C por 1 minuto; 35°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos) e, finalmente, um ciclo de 72°C por 5 minutos.

Foram avaliados 213 “primers” de 10 pares de bases das marcas ‘Operon’ (Kits do A ao E, F10, J5, G5, G11 e G17) e da ‘The University of British Columbia’ (“primers” 219, 295 e seqüências de 301 a 350; de 441 a 500).

3.4.2. Eletroforese

Em cada tubo contendo 20 µL do DNA amplificado, foram adicionados 3 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,01%; glicerol 40%). Desta mistura, 10µL foram colocados nas canaletas de gel de agarose 1,5% (dissolvida em TEB 1X – TRIS 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) e submetidos à eletroforese horizontal no sistema Sunrise (Gibco BRL), em tensão de 100 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Adicionou-se 8 µL de Brometo de etídio (5 mg/mL) no gel antes de vertê-lo na cuba e 10 µL no tampão de eletrodo (TEB 1X). Como padrão de peso molecular, utilizou-se o “ladder” de 1Kb (GIBCO), e o controle negativo foi realizado para cada reação de RAPD, verificando-se assim, se as soluções utilizadas não apresentavam contaminação. No controle negativo foram utilizadas todas as soluções anteriormente descritas, com exceção do DNA.

3.4.3. Visualização dos resultados

A visualização dos resultados das amostras, após a eletroforese, foi realizada em equipamento de fotodocumentação (Gel Doc – 1000 – Bio Rad) e gravada para as análises posteriores.

3.5. Análise por *f*AFLP

Para realização da análise utilizando a técnica *f*AFLP, foi utilizado o “kit” da Applied Biosystems® e seguido o protocolo do, descrito a seguir:

3.5.1. Digestão do DNA genômico

A reação consistiu de 500 ng de DNA genômico, acrescidos de 1,25 μL do tampão React I; 0,25 μL da enzima EcoRI e 0,50 μL da enzima MseI. Realizou-se uma corrida em gel de agarose 1% com padrão 1Kb, corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.5.2. Ligação dos adaptadores

Em tubos contendo o DNA digerido, foi acrescentado 0,33 μL de cada adaptador (MseI e EcoRI), que foram aquecidos a 95°C por 5 minutos, deixando-os esfriar por aproximadamente 10 minutos, espinando-os em seguida em uma microcentrífuga por 10 segundos a 1000 x g. O “Máster Mix” foi composto de 1,0 μL de tampão T4 DNA ligase, 0,5 μL de T4 DNA ligase e 0,66 μL dos adaptadores. A 2,6 dessa mistura foi adicionado de 3,67 das amostras digeridas, sendo em seguida levadas ao termociclador por quatro horas a 37°C para inativação das enzimas.

3.5.3. Reação de amplificação pré-seletiva

As seqüências com os adaptadores ligados nas duas extremidades amplificam exponencialmente e predominam no produto final. Todos os reagentes foram mantidos em gelo até serem levados ao termociclador.

A reação constou de 4,0 μL do DNA diluído; 1,0 μL da mistura dos “primers” pré-seletivos (AFLP EcoRI e MseI) e 15 μL do AFLP Core Mix.

Em seguida, as amostras foram colocadas em termociclador a temperatura ambiente conforme programa de PCR constante no Quadro 1:

Quadro 1 - Parâmetros do termociclador para a amplificação pré-seletiva

| Início | 40 Ciclos | | | Fim |
|---------------|------------------|----------------|---------------|-----------------|
| 96°C 2 min | 96°C 10 Seg | 52°C 20 seg | 60°C 4 min | 4°C infinito |

As amostras foram estocadas em freezer por 4 horas e em seguida foi feito um gel de agarose 1% (0,7 g de agarose; 70 mL TEB 1X; 7 µL de brometo de etídio) para verificação da amplificação pré-seletiva. Para isso, foram utilizados 10 µL de cada amostra. O êxito da reação pré-seletiva é a observação de “smear”, que é um arraste, claramente visível.

3.5.4. Amplificação Seletiva

Ao produto da reação de amplificação pré-seletiva (3 µL), foram adicionados 0,5 µL do MseI (Primer – Cxx); 0,5 µL do EcoRI (primer – Axx – marcado por fluorescência) e 7,5 µL do AFLP Core Mix. O material foi estocado a -6°C. Os parâmetros utilizados no termociclador estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 - Parâmetros do termociclador durante a amplificação seletiva.

| Início | Ciclo | | | Nº de Ciclos |
|----------------|---------------|---------------|--------------|---------------------|
| 94°C - 2min | 94°C - 60 seg | 66°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 60 seg | 65°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 60 seg | 64°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 60 seg | 63°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 60 seg | 62°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 60 seg | 61°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 60 seg | 60°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 60 seg | 59°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 60 seg | 58°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 60 seg | 57°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 1 |
| - | 94°C - 30 seg | 56°C - 60 seg | 72°C - 2 min | 20 |
| 60°C - 30 min | | | | 1 |
| 4°C - infinito | | | | 1 |

3.5.5. Amplificação das amostras e eletroforese

Foi preparada uma mistura contendo 1,5 µL do tampão de amostra (0,2 mL 25 mM EDTA, pH 8,0 e 50 mg/mL de “Blue Dextran” adicionados em 1 mL de formamida deionizada) e 0,5 µL do padrão interno de peso molecular Gene Scan – 500 (ROX) marcado por fluorescência com a cor vermelha. Para cada amostra, contendo 0,6µL do produto da amplificação seletiva (DNAs), adicionou-se 1,5µL da mistura.

As amostras foram desnaturadas a 96°C por 5 minutos e colocadas rapidamente em gelo.

Aplicou-se 1,0 µL de cada amostra nas canaletas ímpares com multipipetador (“Kloehn 8 ganged Syringe Gel Loader”) em um gel 5% desnaturante “Long Ranger” (BMA) de 96 canaletas em uma placa de 36 cm no seqüenciador ABI 377 (Perkin-Elmer Corp.). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TEB 1x (TRIS 89 mM, Ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), a 51°C, 3000 V, 60 mA, durante três horas.

3.5.6. Combinações dos Primers

Foram testadas 10 combinações de “primers” (Tabela 2).

Tabela 2. Combinação dos “primers” (NED/JOE/FAM) testados em videira para identificação de marcas moleculares associadas à ausência de sementes. FCAV – UNESP, Jaboticabal – SP, 2002.

| Marcação | Primers EcoRI | Primers Msel | | | | |
|----------|---------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
| | | CTC | CTT | CAT | CTA | CTG |
| NED | ACC | ⊙ | ⊙ | ⊙ | ⊙ | |
| JOE | AAG | ⊙ | | | | |
| FAM | ACT | ⊙ | ⊙ | | ⊙ | ⊙ |
| JOE | AGG | | ⊙ | | | |

⊙- Indica a combinação de “primers” utilizada

3.6. Análise dos dados

Através da análise do bandejamento produzido por cada “primer” utilizado nas análises de RAPD, foram conferidos o parâmetro ‘1’ para a presença de banda e ‘zero’ para a ausência de banda, obtendo assim, uma matriz binária.

No caso do *fAFLP*, após a corrida eletroforética, o gel obtido foi analisado pelo programa Genescan 3.1 (PE Biosystems) gerando eletroferogramas dos fragmentos com seus respectivos tamanhos, de 100 a 500 pares de base, de acordo com o padrão interno (ROX 500), utilizado na corrida das amostras.

Em seguida, com programa Genotyper 2.5 (PE Biosystems) utilizou-se os eletroferogramas nos quais continham os dados dos fragmentos polimórficos marcados com presença (1) e ausência (0) de bandas, também resultando em uma matriz binária.

As matrizes obtidas (RAPD e *fAFLP*), foram analisadas utilizando o programa Phylip 3.2 (Felsenstein, 1989) para gerar o dendrograma.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração de DNA

Através da quantificação por meio de espectrofotometria (Tabela 3), verificou-se que os métodos de extração resultaram em concentrações de DNA consideráveis. Com exceção da metodologia descrita por Shillito e Saul (1988), que sequer possibilitou a leitura, as concentrações de DNA (ng/ μ L) das outras metodologias testadas variaram entre 34,1 (Saghai-Marroof *et al.*, 1984), para cv. Niágara rosada) e 2.611 (DNAzol, para cv. Christmans rose).

A metodologia do DNAzol apresentou as maiores concentrações de DNA. Entretanto, a relação 260/280 foi muito baixa (variando de 1,15 a 1,30), havendo inclusive, algumas amostras que foram de impossível leitura (IAC 313, IAC 766 e IAC 572). O ideal é que essa relação seja superior a 1,7 (Sambrook *et al.* 1989), o que significa que essa metodologia não foi adequada para videira. Em outras frutíferas, como o abacaxizeiro, essa metodologia foi bastante eficiente, sendo possível a obtenção de DNA de excelente qualidade. É, sem dúvida, a metodologia mais rápida de ser executada, além de apresentar outras vantagens como a ausência de compostos tão voláteis e tóxicos, presentes nas outras, como o 2- β -mercaptoetanol.

Quanto à metodologia de Saghai-Marroof *et al.* (1984), a concentração de DNA obtida variou de 34,1 (cv. Niágara Rosada) a 276,8 (cv. Vênus), e a relação 260/280 variou de 1,22 a 1,56. Essa é uma metodologia bastante utilizada para extração de DNA de citros (Vilarinhos, *et al.* 2000), porém, no caso da videira, não foi possível a obtenção de DNA de qualidade, apesar da concentração razoavelmente significativa para algumas cultivares.

TABELA 3. Concentração de DNA extraído de folhas de *Vitis vinifera* em ng/μL de tecido fresco obtida pelos métodos de Lin e Kuo (1998); Saghai-Marrof *et al.* (1984) - SM; This *et al.* (1997); Doyle e Doyle (1991) - DD e Lodhi *et al.* (1994). FCAV - UNESP, Jaboticabal - SP, 2002.

| Cultivar | Lodhi | | SM | | DD | | DNAzol | | This | |
|-------------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|--------|---------|-------|---------|
| | ng/μL | 260/280 | ng/μL | 260/280 | ng/μL | 260/280 | ng/μL | 260/280 | ng/μL | 260/280 |
| Itália | 756,6 | 1,71 | 162,1 | 1,30 | 181,3 | 1,86 | 1286,9 | 1,18 | 178,9 | 1,22 |
| Catalunia | 512,6 | 1,78 | 92,9 | 1,29 | 77,4 | 1,28 | 2104,2 | 1,21 | 192,0 | 1,30 |
| Brasil | 578,3 | 1,73 | 86,5 | 1,26 | 175,5 | 1,24 | 1397,6 | 1,30 | 202,5 | 1,39 |
| Patrícia | 243,9 | 1,47 | 105,4 | 1,29 | 211,6 | 1,57 | 1780,3 | 1,25 | 201,7 | 1,28 |
| Christmas Rose | 195,9 | 1,60 | 108,3 | 1,35 | 169,3 | 1,52 | 2611,1 | 1,22 | 171,4 | 1,35 |
| Niágara rosada | 1.307 | 1,64 | 34,1 | 1,22 | 141,3 | 1,68 | 1330,7 | 1,23 | 102,9 | 1,22 |
| Isabel | 611,4 | 1,61 | 73,8 | 1,31 | 949,3 | 1,84 | 1904,9 | 1,20 | 178,9 | 1,22 |
| Alphonse Lavalley | 481,0 | 1,67 | 126,3 | 1,31 | 99,2 | 1,54 | 1778,5 | 1,20 | 172,6 | 1,25 |
| Benitaka | 165,2 | 1,45 | 169,6 | 1,33 | 110,1 | 1,46 | 878,8 | 1,20 | 155,9 | 1,18 |
| Superior | 247,1 | 1,73 | 109,8 | 1,28 | 115,2 | 1,72 | 1465,5 | 1,27 | 87,0 | 1,26 |
| Perlette | 605,5 | 1,52 | 100,8 | 1,25 | 393,7 | 1,70 | 1841,4 | 1,23 | 111,8 | 1,19 |
| Thompson | 517,9 | 1,82 | 113,6 | 1,34 | 337,4 | 1,55 | 1206,4 | 1,27 | 179,2 | 1,30 |
| Centenial | 330,6 | 1,45 | 87,4 | 1,24 | 80,4 | 1,21 | 1614,7 | 1,15 | 82,0 | 1,11 |
| Vênus | 311,9 | 1,49 | 276,8 | 1,56 | 98,8 | 1,40 | 1328,6 | 1,26 | 114,7 | 1,18 |
| Marroo | 372,8 | 1,59 | 102,5 | 1,28 | 173,6 | 1,43 | 1137,9 | 1,28 | 89,1 | 1,32 |
| Beauty | 252,6 | 1,70 | 157,5 | 1,24 | 410,9 | 1,70 | 1142,9 | 1,21 | 71,0 | 1,23 |
| IAC 313 | 514,0 | 1,81 | 146,8 | 1,28 | 78,1 | 1,40 | s/l | s/l | 119,2 | 1,24 |
| IAC 766 | 327,0 | 1,48 | 157,2 | 1,27 | 246,5 | 1,50 | s/l | s/l | 125,5 | 1,28 |
| IAC 572 | 752,0 | 1,77 | 118,9 | 1,23 | 163,9 | 1,58 | s/l | s/l | 102,5 | 1,27 |

* 260/280 – relação DNA/proteína

* s/l – sem leitura

Em alguns trabalhos realizados com videira, a extração de This *et al.* (1997) é citada como “padrão” (Lahogue *et al.*, 1998; This *et al.*, 2000). Neste estudo, as concentrações de DNA variaram de 71,0 (cv. Beauty seedless) a 202,5 ng/μL (cv. Brasil) e uma relação variando de 1,11 a 1,39.

Sem dúvidas, utilizando as cultivares e os “primers” testados neste trabalho, e tendo como base a quantificação do DNA, as melhores metodologias para extração de DNA da videira foram as descritas por Doyle e Doyle (1991) e Lodhi *et al.* (1994).

A extração pelo método de Doyle e Doyle foi bastante significativa, obtendo-se concentrações de DNA variando de 77,4 (cv. Catalonia) a 949,3 (cv. Isabel) e uma relação 260/280 variando de 1,21 a 1,86. Essa metodologia está sendo bastante utilizada em frutíferas, como maracujazeiro (Aukar *et al.*, 2001), cajueiro e mamoeiro (no prelo – experimentos em andamento no LBPM).

A metodologia de Lodhi *et al.* (1994) é na verdade, uma modificação de Doyle e Doyle (1991). Nela foram acrescentados o NaCl, objetivando a remoção de polissacarídeos, e o PVP, para eliminação dos polifenóis, problemas específicos encontrados na extração de DNA de videira. Essa metodologia também foi utilizada com sucesso na extração de DNA em maçã (*Mallus domestica*), pêra (*Prunus persica*), ameixa (*Prunus domestica*) e framboesa (*Rubus idaeus*). Neste estudo, essa metodologia resultou em amostras, onde se obteve tanto altas concentrações de DNA - que variaram de 165,2 (cv. Benitaka) a 1.307 ng/ μ L (cv. Niágara rosada) – quanto uma relação 260/280 satisfatória (de 1,45 a 1,82).

Para confirmação desses resultados, foi realizada uma quantificação em gel de agarose 0,8%, utilizando 10 μ L de cada amostra, para a visualização do DNA íntegro; o que só foi possível quando se utilizou as amostras resultantes da extração de Lodhi *et al.* (1994).

Para padronização, elegeu-se a cv. Itália e seis “primers” aleatórios de 10 pares de bases da marca ‘Operon’ (B12, B13, C12, D6, E10 e J5), e um “primer” da University of British Columbia (UBC 301) (Quadro 3) para realização de PCR, utilizando os diferentes DNAs obtidos nas diferentes metodologias (Figura 1).

Quadro 3. Relação dos “primers” utilizados para padronização da metodologia a ser seguida durante o experimento para identificação de marcas moleculares associadas à ausência de sementes em videira, com suas respectivas seqüências.

| “Primer” | Seqüência 5’ – 3’ |
|--|-------------------|
| Operon | |
| B12 | CCT TGA CGC A |
| B13 | TTC CCC CGC T |
| C12 | TGT CAT CCC C |
| D6 | ACC TGA ACG G |
| E10 | CAC CAG GTG A |
| J5 | CTC CAT GGG G |
| The University of British Columbia - UBC | |
| 301 | CGG TGG CGA A |

Após os resultados da quantificação e dos testes de padronização de metodologia para RAPD e *f*AFLP, realizou-se também, alguns testes com todas as cultivares, com diferentes “primers” (Figura 2). Verificou-se que, apesar da metodologia de Lodhi *et al.* (1994) ser a melhor para RAPD, no caso do *f*AFLP, a metodologia de Doyle e Doyle (1991) apresentou melhores resultados, pois foi impossível conseguir a realização de digestão e pré-seletiva (primeiros passos do *f*AFLP) quando utilizou-se as amostras de Lodhi *et al.* (1994) (Figura 3). Este fato provavelmente é resultado do uso de PVP na extração de Lodhi *et al.* (1994), já que a técnica de *f*AFLP é mais exigente na integridade do DNA do que o RAPD.

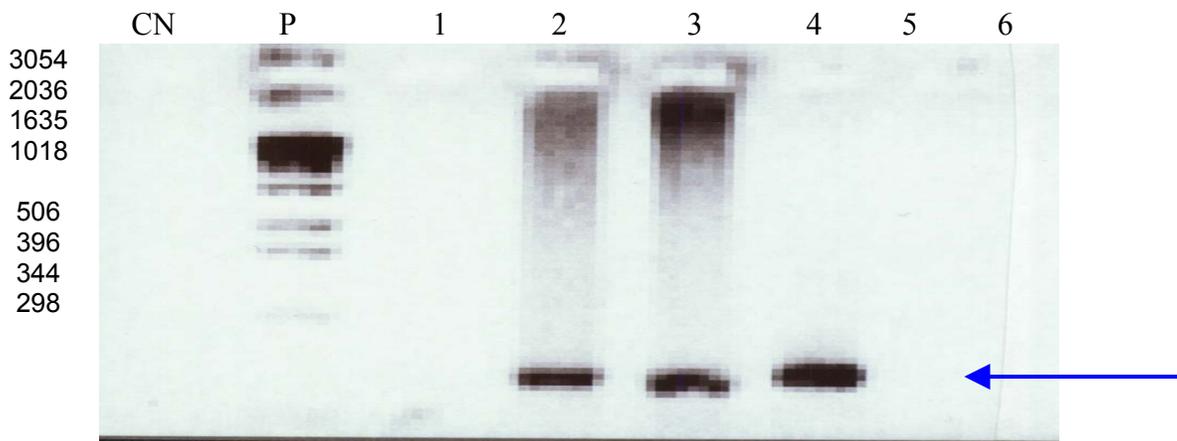


Figura 1. Padrões de bandejamento de fragmentos de DNA amplificados por RAPD da cv. Itália, utilizando-se o “primer” OP J5: (CN) controle negativo, (P) padrão de peso molecular de 1Kb, (1) Shillito e Saul, 1988; (2) This *et al.* 1997; (3) Doyle e Doyle, 1991; (4) Lodhi *et al.* 1994; (5) Saghai-Marroof *et al.* 1984; (6) Lin e Kuo, 1998.

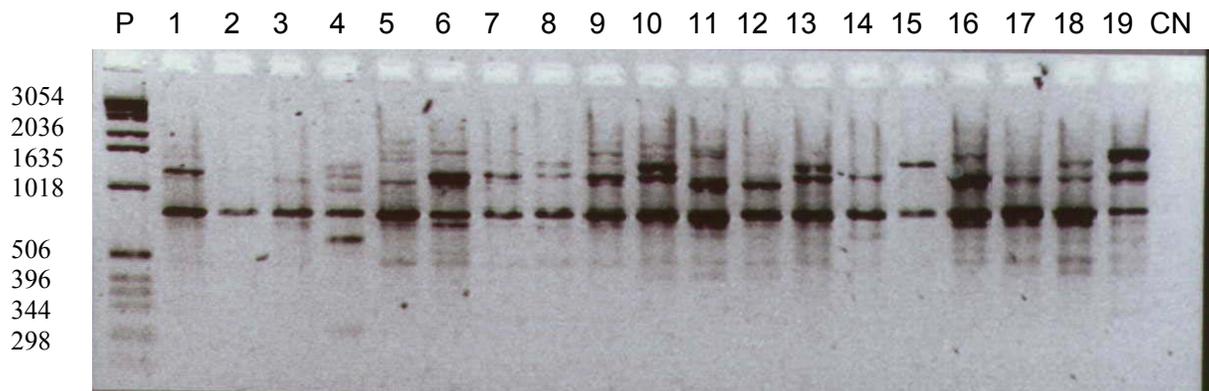


Figura 2. Padrões de bandejamento de fragmentos de DNA amplificados por RAPD, utilizando o “primer” UBC 301 para as amostras resultantes da extração de Lodhi *et al.* 1994: (P) padrão de peso molecular de 1Kb; canaletas com as diferentes cultivares de uva (Thompson Seedless, Patrícia, Beauty Seedless, Brasil, Perlette, Benitaka, Superior Seedless, Christmans Rose, Catalonia, Alphonse Laval, Niagara Rosada, Vênus, Marroo Seedless, Centennial Seedless, Isabel, Itália, IAC 766, IAC 572 e IAC 313); (CN) controle negativo.

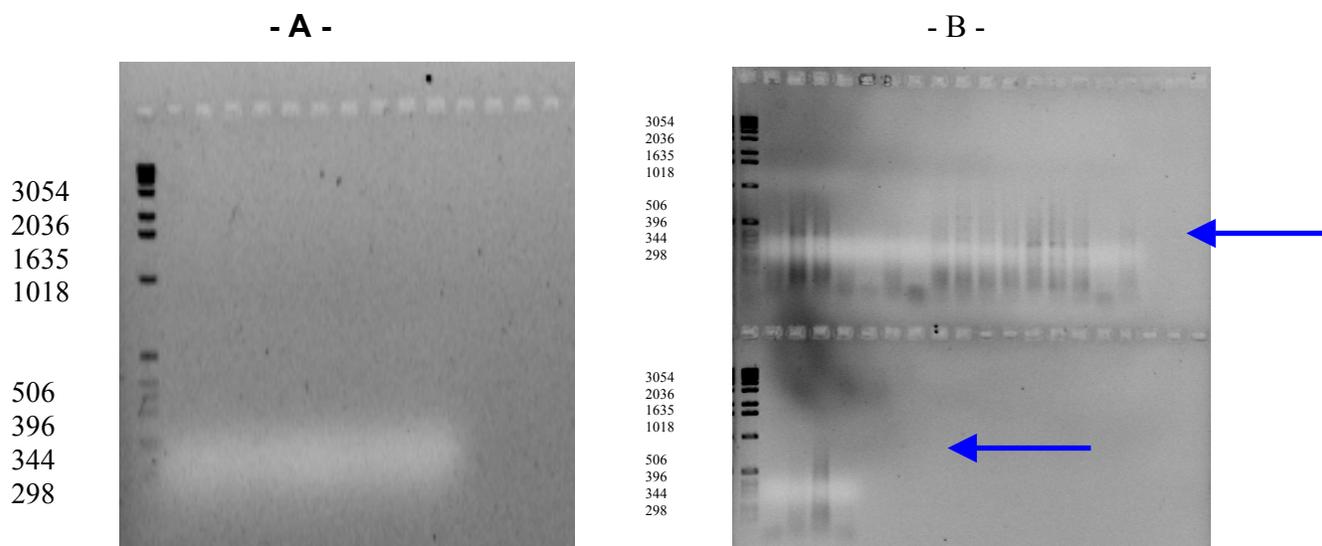


Figura 3. Géis da Pré-seletiva (*f*AFLP) utilizando as extrações de Lodhi *et al.* (1994) – A, e Doyle e Doyle (1991) - B. As setas indicam a observação do “smear”, decorrentes da digestão completa do DNA..

Com base nos resultados obtidos, optou-se por utilizar a metodologia descrita por Lodhi *et al.* (1994), para análises RAPD, e, para *f*AFLP, a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1991).

4.2. RAPD

Sabendo-se que RAPD é muito sensível às condições da reação PCR (Narváez *et al.*, 2000), foram realizados testes utilizando diferentes concentrações de DNA, MgCl₂ e “primer”, assim como diferentes programas de termociclagem. Somente depois da obtenção de melhores padrões de amplificação, foi determinada a concentração ideal de cada componente da PCR e o melhor programa, que foi seguido durante todo o trabalho.

É importante destacar a realização desses testes de otimização das reações, para evitar que diferenças nos padrões de bandeamento ocorram devido à problemas de PCR, e não por refletirem diferenças genéticas.

O emprego da técnica RAPD demonstrou uma grande diferença genética entre as cultivares estudadas. Dentre os 167 “primers” utilizados, apenas 30 proporcionaram eficiência na amplificação de todas as amostras (Quadro 4), gerando um total de 462 bandas, sendo que 377 delas foram polimórficas (81,6%), onde apenas as mais intensas foram analisadas.

Alguns “primers” não proporcionaram amplificação para nenhuma amostra (Operon: B4, B8, B13, B14, C7, D7, D15 e G5; UBC: 306, 308, 315 e 311), indicando não haver uma região de homologia destes com os DNAs das amostras (cultivares), contradizendo alguns autores (Striem *et al.*, 1996) que, utilizando esses mesmos “primers” obtiveram sucesso em seus resultados. Os “primers” do *Kit 'A'* da Operon possibilitaram a amplificação de algumas amostras, mas nunca de todas. A maioria dos trabalhos encontrados (Moreno *et al.*, 1995; Striem *et al.*, 1996), citam esse *kit*. Isto se deve ao fato de que as cultivares analisadas são diferentes e, portanto, não necessariamente deveriam comportar-se da mesma forma geneticamente.

Quadro 4. Relação dos “primers” selecionados, com suas respectivas seqüências e número de fragmentos polimórficos (NPF) gerados.

| “Primer” | Seqüência 5’ – 3’ | NPF |
|--|-------------------|------------|
| Operon | | |
| B7 | GGT GAC GCA G | 9 |
| B12 | CCT TGA CGC A | 19 |
| D11 | AGC GCC ATT G | 19 |
| The University of British Columbia - UBC | | |
| 301 | CGG TGG CGA A | 11 |
| 302 | CGG CCC ACG T | 21 |
| 303 | GCG GGA ACC C | 13 |
| 304 | AGT CCT CGC C | 20 |
| 309 | ACA TCC TGC G | 20 |
| 310 | GAG CCA GAA G | 16 |
| 311 | GGT AAC CGT A | 3 |
| 312 | ACG GCG TCA C | 9 |
| 313 | ACG GCA GTG G | 13 |
| 317 | CTA GGG GCT G | 24 |
| 318 | CGG AGA GCG A | 18 |
| 319 | GTG GCC GCG C | 13 |
| 324 | ACA GGG AAC G | 15 |
| 331 | GCC TAG TCA C | 20 |
| 333 | GAA TGC GAC G | 16 |
| 335 | TGG ACC ACC C | 16 |
| 336 | GCC ACG GAG A | 19 |
| 338 | CTG TGG CGG T | 18 |
| 341 | CTG GGG CCG T | 18 |
| 342 | GAG ATC CCT C | 7 |
| 344 | TGT TAG GCA C | 16 |
| 383 | GAG GCG CTG C | 16 |
| 441 | CTG CGT TCT T | 18 |
| 442 | CTA CTC GGT T | 14 |
| 482 | CTA TAG GCC G | 11 |
| 485 | AGA ATA GGG C | 16 |
| 490 | AGT CGA CCT T | 14 |
| TOTAL DE BANDAS | | 462 |
| TOTAL DE BANDAS POLIMÓRFICAS | | 377 |

Os marcadores moleculares têm particularidade para cada variedade, cultivar e/ou espécie, representando uma ferramenta adicional de grande importância para solucionar problemas específicos de cada cultura, no caso, da possibilidade de verificação precoce (em viveiro) do caráter apirenia em videira.

De um modo geral, os porta-enxertos foram os que mais se destacaram, não tendo sido encontrado problemas de amplificação dos mesmos na maioria dos “primers” testados, tendo também, diferenciado-se dos outros grupos (com e sem

sementes) (Figura 4). Ao utilizar o “primer” OP – B11 (GTA GAC CCG T), obteve-se uma possível banda característica para uvas sem sementes nas cultivares Brasil e Beauty Seedless (Figura 5), entretanto, não foi possível sua repetibilidade nos demais cultivares em questão.

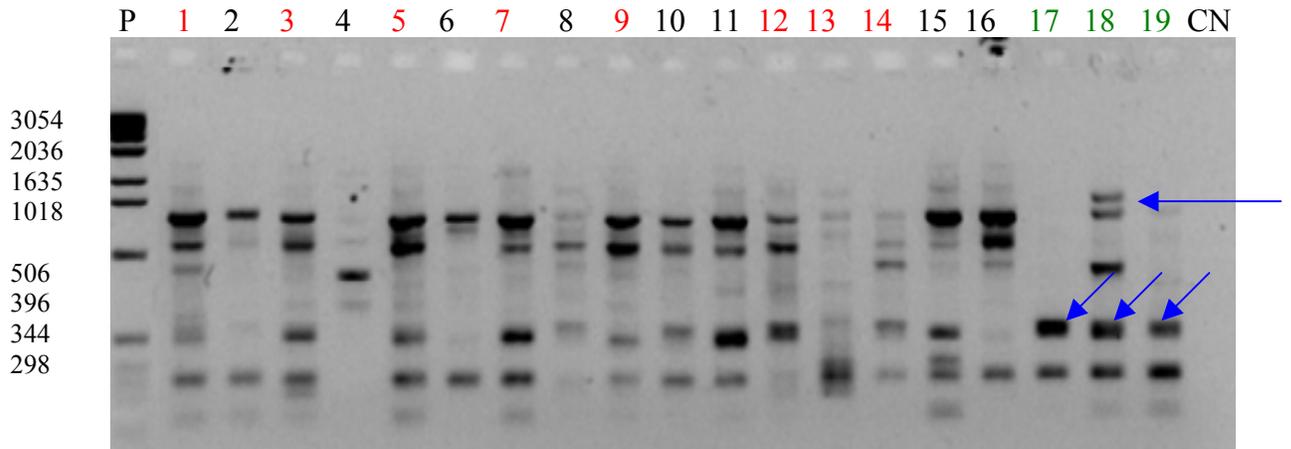


Figura 4. Padrões de bandejamento de todas as cultivares utilizando o “primer” OP – B12, com detalhe (setas) para as bandas presentes nas canaletas 17, 18 e 19 (porta-enxertos). (P): Padrão de peso molecular de 1Kb; (CN): controle negativo. (●) uvas sem sementes; (●) uvas com sementes; (●) porta-enxertos.

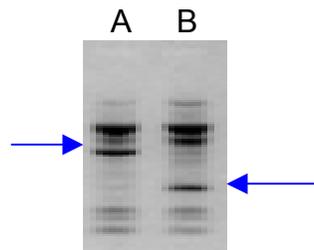


Figura 5. Padrão de bandejamento utilizando o “primer” OP – B11 nas cultivares Brasil - A (com sementes) e Beauty Seedless - B (sem sementes). As setas indicam o polimorfismo.

Empregando-se o “primer” UBC 443, observou-se uma banda bastante intensa, presente apenas nas cultivares sem sementes, o que também pode representar uma característica específica de videiras apirenas (Figura 6). O “primer” UBC 336 também, só amplificou para as cultivares sem sementes (Figura 7). De forma contrária, utilizando o “primer” UBC 340 a amplificação só foi possível

nas cultivares com sementes, porém, sem maiores resoluções de bandas características para o caráter presença de sementes.

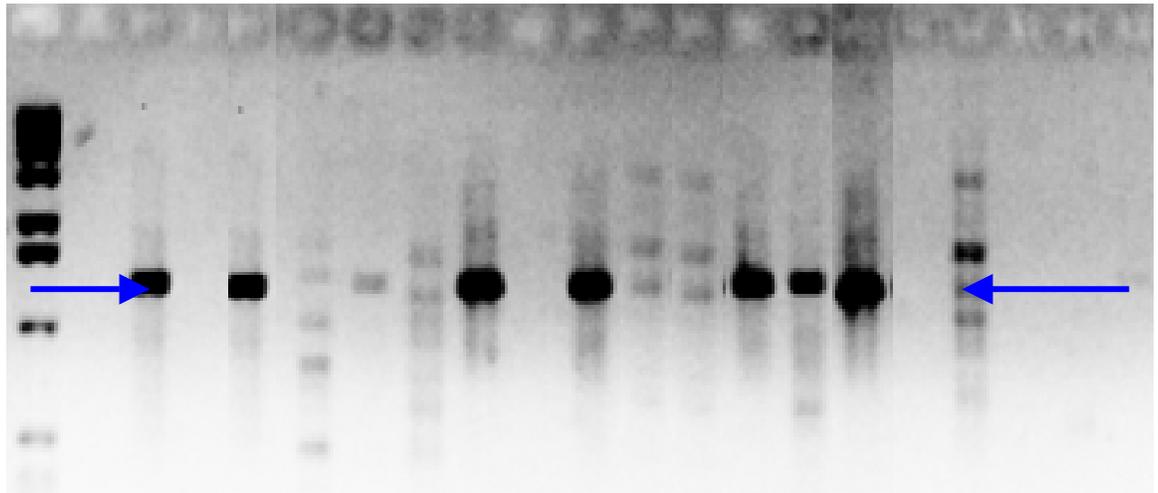


Figura 6. Padrões de bandejamento utilizando o “primer” UBC – 443, com destaque (setas) para as bandas presentes nas cultivares sem sementes (canaletas 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13 e 14). (P) Padrão de peso molecular de 1Kb; (CN) controle negativo. (●) uvas sem sementes; (●) uvas com sementes; (●) porta-enxertos.

O resultado obtido na utilização do “primer” UBC 443 responde claramente ao objetivo deste trabalho, uma vez que a resolução do gel permitiu uma verificação concreta das bandas específicas encontradas nas cultivares sem sementes. Alguns “primers” proporcionaram grande quantidade de bandas monomórficas, exemplo representado na Figura 8, as quais estão presentes em todas as amostras. Isso pode ocorrer com frequência porque mesmo sendo cultivares diferentes, pertencem ao mesmo gênero (Jesovsek, 1995).

A partir deste resultado, pode-se pensar em futuras pesquisas, utilizando um maior número de cultivares apirenos, sendo também interessante utilizar cultivares encontradas tanto no Brasil como oriundas de outros países, para verificar a existência da diversidade e obtenção de marcadores SCAR (Regiões amplificadas de seqüência características), técnica desenvolvida por Paran e

Michelmore (1993), que correspondem à fragmentos de DNA genômico localizado em um loco geneticamente definido e que são identificados por amplificação via PCR utilizando um par de oligonucleotídeos específicos (Travensolo, 2000).

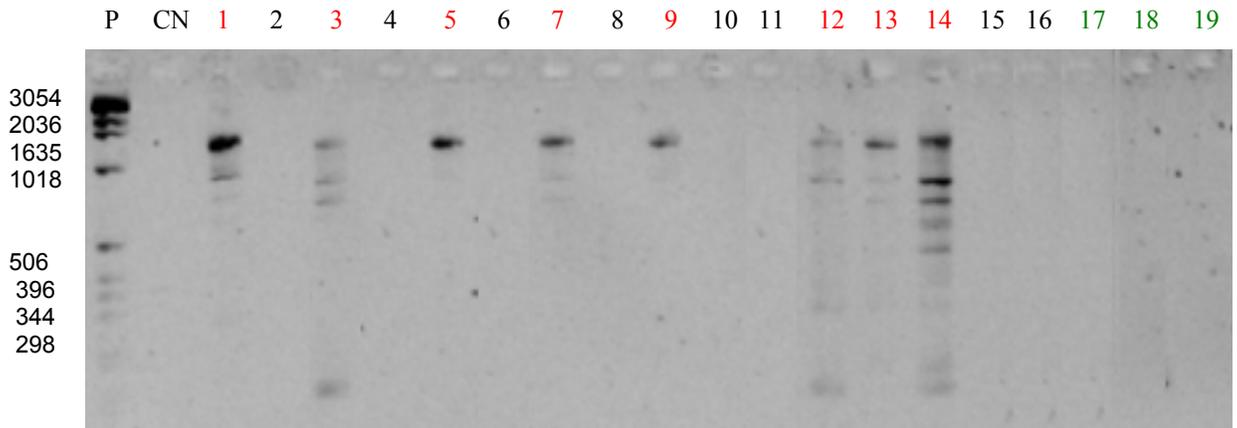


Figura 7. Padrões de bandejamento utilizando o “primer” UBC – 336. Amplificação somente nas canaletas 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13 e 14 (cultivares sem sementes). (P) Padrão de peso molecular de 1Kb; (CN) controle negativo. (●) uvas sem sementes; (●) uvas com sementes; (●) porta-enxertos.

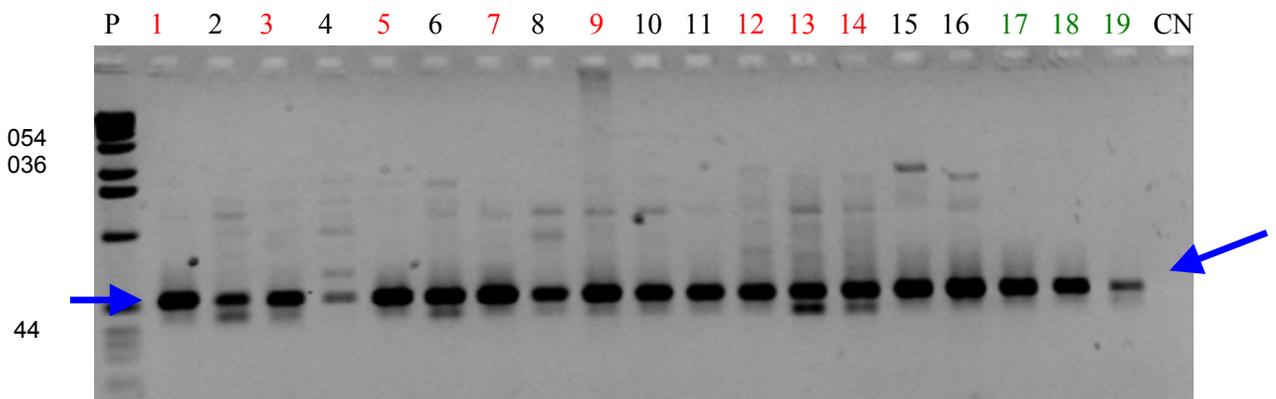


Figura 8. Padrões de bandejamento de todas as cultivares utilizando o “primer” UBC – 482 (canaletas 17, 18 e 19). (P) Padrão de peso molecular de 1Kb; (CN) controle negativo. (●) uvas sem sementes; (●) uvas com sementes; (●) porta-enxertos. Setas indicam banda monomórfica.

Para a realização da análise de similaridade, apenas os “primers” que amplificaram todas as amostras foram utilizados (por exemplo, figuras 9, 10, 11, 12 e 13), construindo-se assim, um dendrograma (Figura 14), que representa graficamente e permite estimar as relações genéticas entre as cultivares.

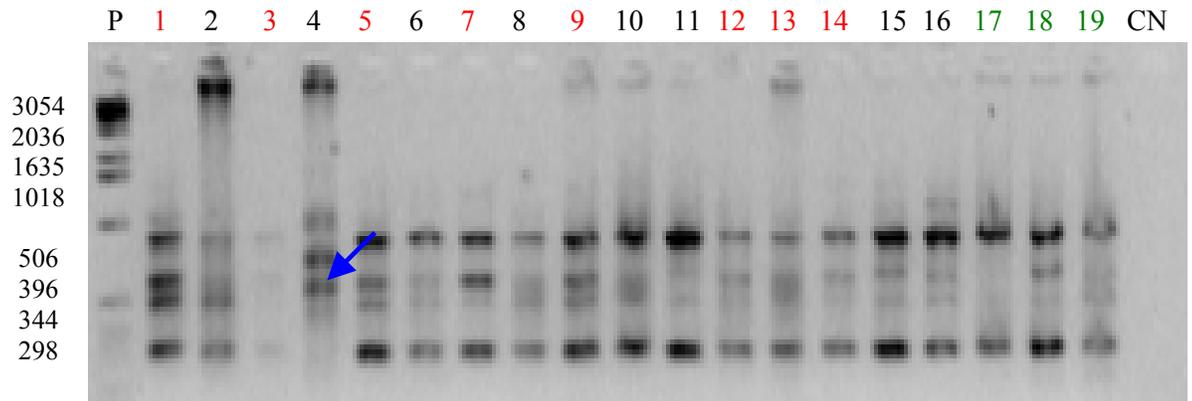


Figura 9. Padrões de bandeamento de todas as cultivares utilizando o “primer” OP – B7. (P): Padrão de peso molecular de 1Kb; (CN): controle negativo. (●) uvas sem sementes; (●) uvas com sementes; (●) porta-enxertos. Seta indica exemplo de banda polimórfica.

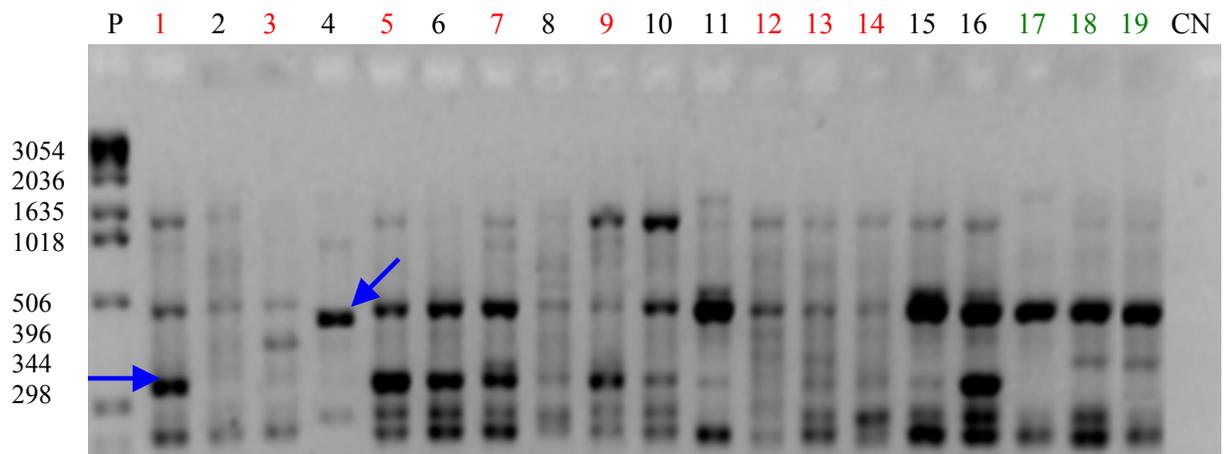


Figura 10. Padrões de bandeamento de todas as cultivares utilizando o “primer” UBC – 310. (P): Padrão de peso molecular de 1Kb; (CN): controle negativo. (●) uvas sem sementes; (●) uvas com sementes; (●) porta-enxertos. Setas indicam exemplos de bandas polimórficas.

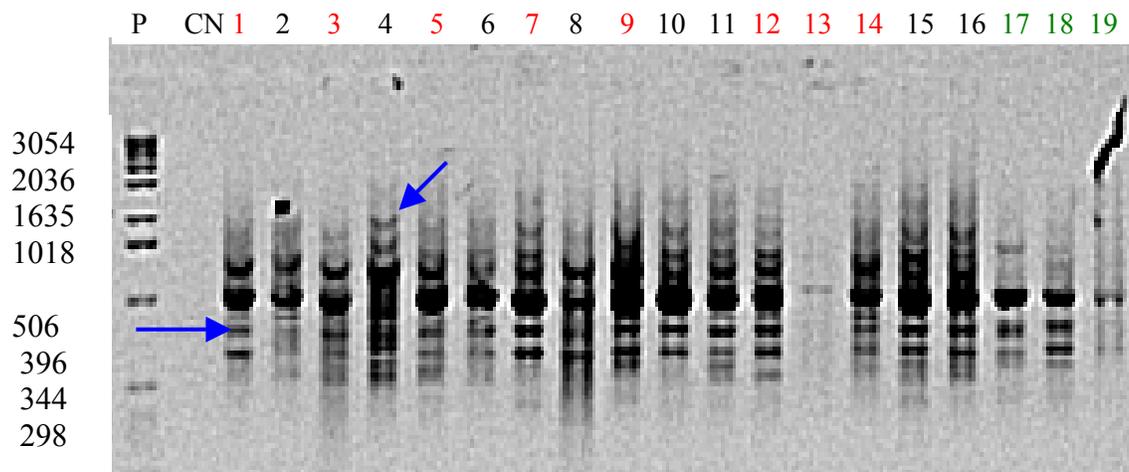


Figura 11. Padrões de bandejamento de todas as cultivares utilizando o “primer” UBC – 335. (P): Padrão de peso molecular de 1Kb; (CN): controle negativo. (●) uvas sem sementes; (●) uvas com sementes; (●) porta-enxertos. Setas indicam exemplos de bandas polimórficas.

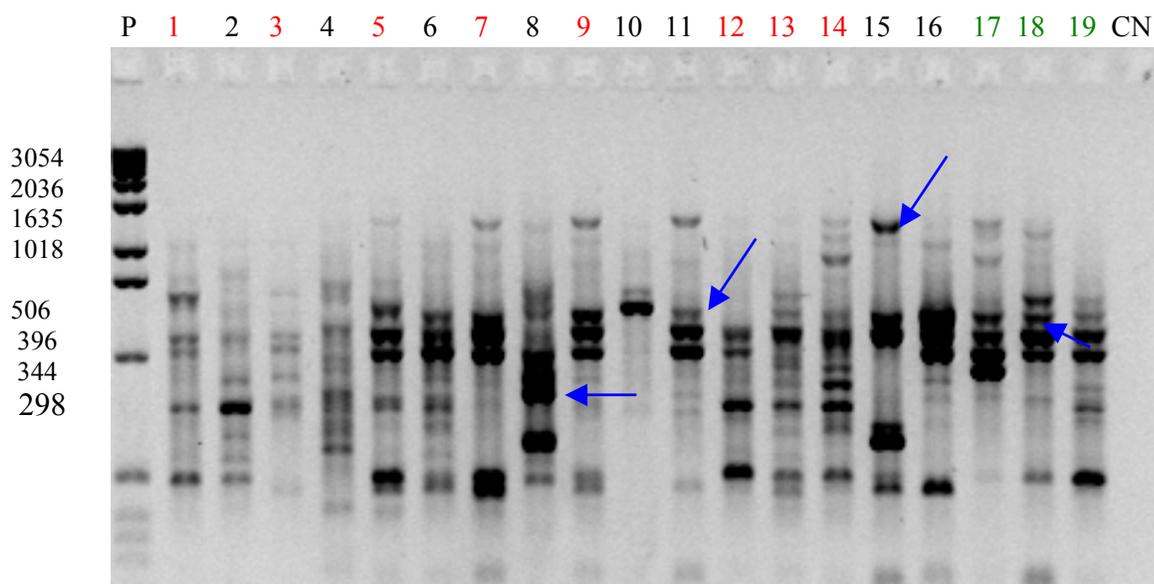


Figura 12. Padrões de bandejamento de todas as cultivares utilizando o “primer” UBC – 302. (P): Padrão de peso molecular de 1Kb; (CN): controle negativo. (●) uvas sem sementes; (●) uvas com sementes; (●) porta-enxertos. Setas indicam exemplos de bandas polimórficas.

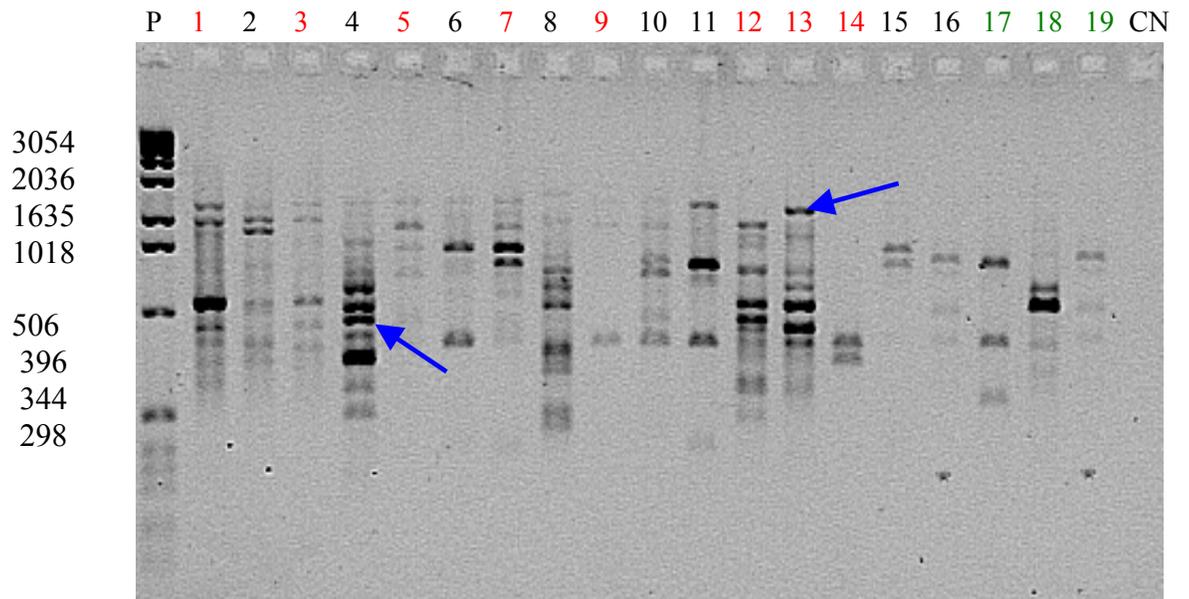


Figura 13. Padrões de bandejamento de todas as cultivares utilizando o “primer” UBC – 309. (P): Padrão de peso molecular de 1Kb; (CN): controle negativo. (●) uvas sem sementes; (●) uvas com sementes; (●) porta-enxertos. Setas indicam bandas polimórficas.

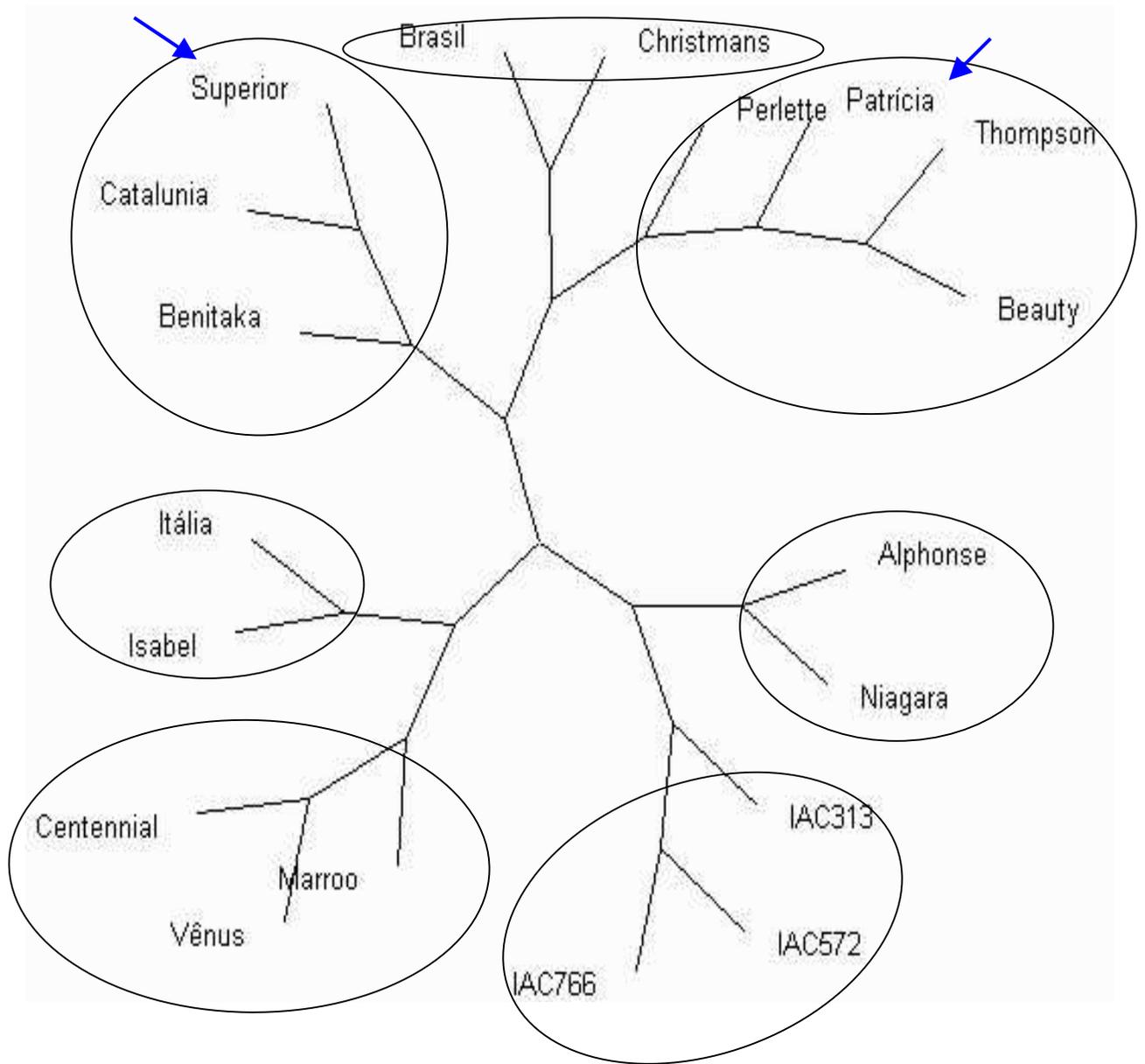


Figura 14. Dendrograma construído pelo programa Phylip versão 3.2, que relaciona todas as cultivares de *Vitis* sp. analisadas com os 30 “primers” selecionados para identificação de marcas moleculares associadas à ausência de sementes em videira.

Ao analisar o dendrograma, percebe-se que não foi possível a separação de grupos distintos, exclusivos para uvas com sementes e sem sementes. Na realidade, obteve-se sete grupos, sendo que três deles são constituídos de uvas com sementes, um, de uvas sem sementes e um específico com os porta-enxertos utilizados. A cv. Patrícia agregou-se ao grupo de uvas sem sementes, formado pelas cultivares Perlette, Thompson Seedless e Beauty Seedless; e a cv. Benitaka, que é uma mutação somática da cv. Itália agregou-se às cultivares Superior Seedless e Catalonia, ambas sem sementes (indicadas por setas na figura 14).

Estes resultados fornecem muitos subsídios para estudos futuros, principalmente pela utilização das principais cultivares de uva de mesa e dos principais porta-enxertos no Brasil, já que a maioria dos trabalhos encontrados com marcadores moleculares em videira, utilizaram outras cultivares, predominando as uvas destinadas à vinicultura, que também é uma atividade econômica de grande importância mundial.

A natureza molecular dos fragmentos amplificados utilizando-se “primers” arbitrários não está completamente elucidada e não se sabe ao certo se cada fragmento no gel pode ser considerado um caráter independente. De fato, tem sido demonstrado que muitos fragmentos RAPDs segregam como herança mendeliana, indicando um único locus por fragmento (Reiter *et al.*, 1992; Tinker *et al.*, 1993). Entretanto, há uma alta probabilidade de estes fragmentos amplificados conterem seqüências repetidas (Devos e Gale, 1992; Paran e Michelmore, 1993) que podem distorcer esta chave taxonômica. A análise de um grande número de fragmentos, pelo uso de vários “primers”, contribui para diminuir este problema.

Ainda, devido a problemas de repetibilidade e dificuldade em acessar a homologia entre as bandas, a técnica RAPD tem sido criticada no uso das relações filogenéticas entre espécies. Entretanto, desde que se obtenha géis de alto nível de definição e se realize uma atribuição meticulosa entre presença e ausência de bandas, não há inconvenientes, exceto na dificuldade de análise do bandamento, mas que, com dedicação, pode ser realizada com êxito.

4.3. *f*AFLP

A qualidade do DNA nas diferentes reações em série que ocorrem no *f*AFLP foi apropriada, observando-se um padrão geral de bandas amplificadas entre as cultivares.

Este é um aspecto bastante relevante, uma vez que várias etapas devem ser rigorosamente cumpridas (digestão, ligação e amplificação), que poderiam apresentar-se afetadas pela presença de compostos fenólicos característicos da videira.

Apenas em uma amostra (cv. Patrícia), não foi possível amplificação em nenhuma das combinações de “primers” testadas, sendo, portanto, excluída das análises posteriores.

Dos 10 “primers” testados preliminarmente, apenas seis foram utilizados para análise (NED - ACC/CAT; NED - ACC/CTA; NED - ACT/CTT; FAM - ACT/CTG; FAM - ACT/CTC e FAM - ACT/CTT). Com os “primers” JOE – AAG/CTC e JOE – AGG/CTT os perfis apresentaram-se bastante confusos, e os “primers” NED – ACC/CAT e FAM – ACT/CTA foram descartados porque para duas amostras (cv. Patrícia e cv. Brasil) apresentaram uma baixa amplificação, podendo prejudicar análises futuras. Sendo assim, preferiu-se eliminá-los.

A utilização das combinações de “primers” EcoRI e MseI selecionados geraram 386 bandas polimórficas, um número superior ao encontrado por Sensi *et al.* (1996), que utilizando 8 “primers”, obtiveram 164 bandas, e também superior ao resultado de Narváez *et al.* (2000), que com 4 “primers”, obtiveram 86 bandas polimórficas.

A partir dos seis “primers” *f*AFLP selecionados, foram gerados 10 dendrogramas, sendo um correspondendo a todos os “primers” (Figura 15), outro correspondendo aos três “primers” FAM (Figura 16) e os demais, correspondentes à cada “primer” isoladamente e de combinações entre eles.

Ao analisar o dendrograma gerado pela análise dos seis “primers” (Figura 16), verifica-se a existência de seis grupos, sendo que apenas em dois deles

encontram-se cultivares com tipos específicos (um, constando de três cultivares sem sementes, e um outro, com os três porta-enxertos), nos demais, observa-se uma grande mistura em relação aos tipos (com e sem sementes).

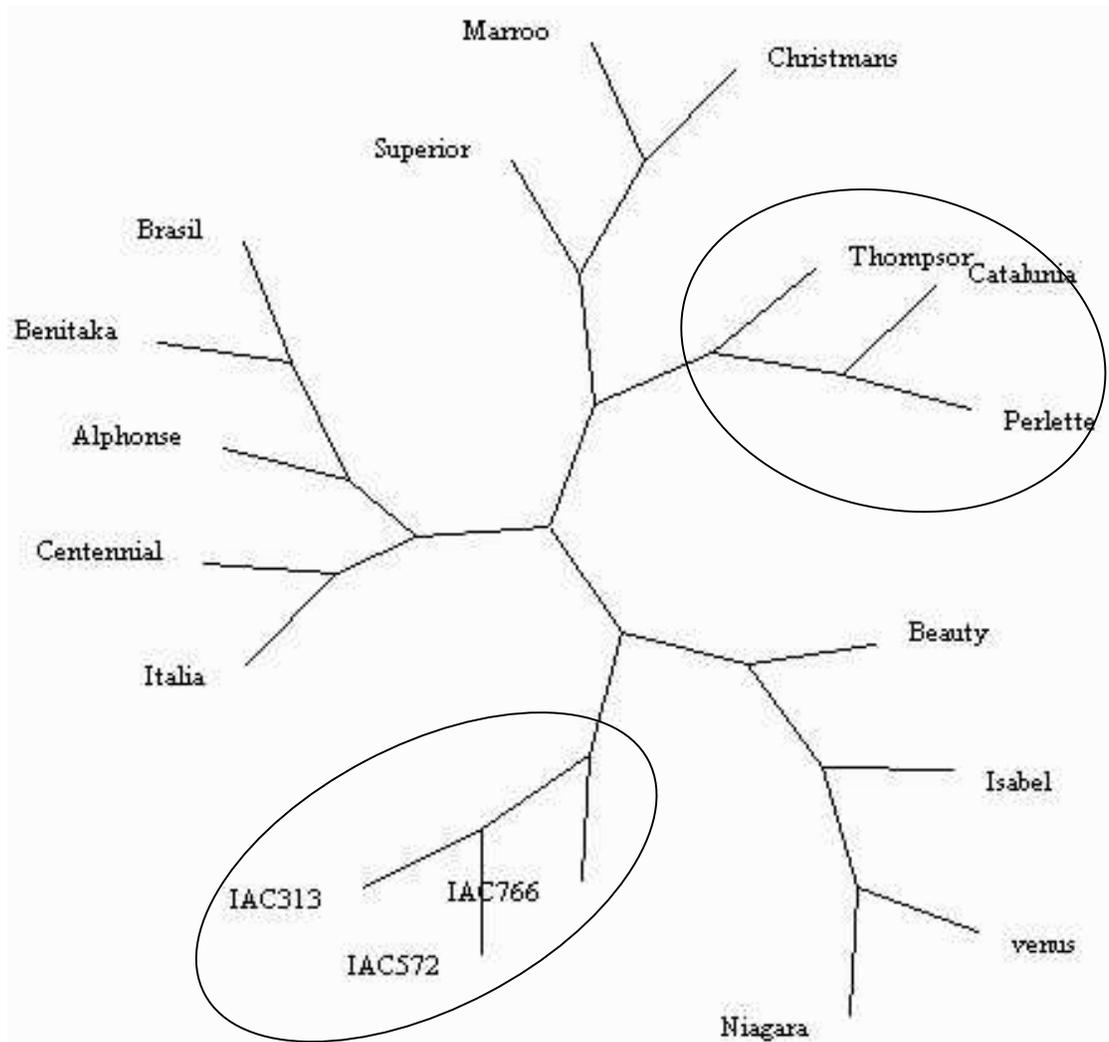


Figura 15. Dendrograma construído pelo programa Phylip versão 3.2, que relaciona todas as cultivares de *Vitis* sp. analisadas com os seis "primers" selecionados para identificação de marcas associadas à ausência de sementes em videira.

Assim sendo, optou-se por analisar “primers” separados e em combinações, e verificou-se que utilizando apenas os três “primers” FAM para a construção do dendrograma (Figura 16), obteve-se o melhor resultado, onde foi possível a distinção de sete grupos (três de uvas com sementes, três de uvas sem sementes e um grupo com os três porta-enxertos), o que nos dá a real possibilidade de um grande avanço na identificação de marcas específicas para apirenia e cultivares de videira.

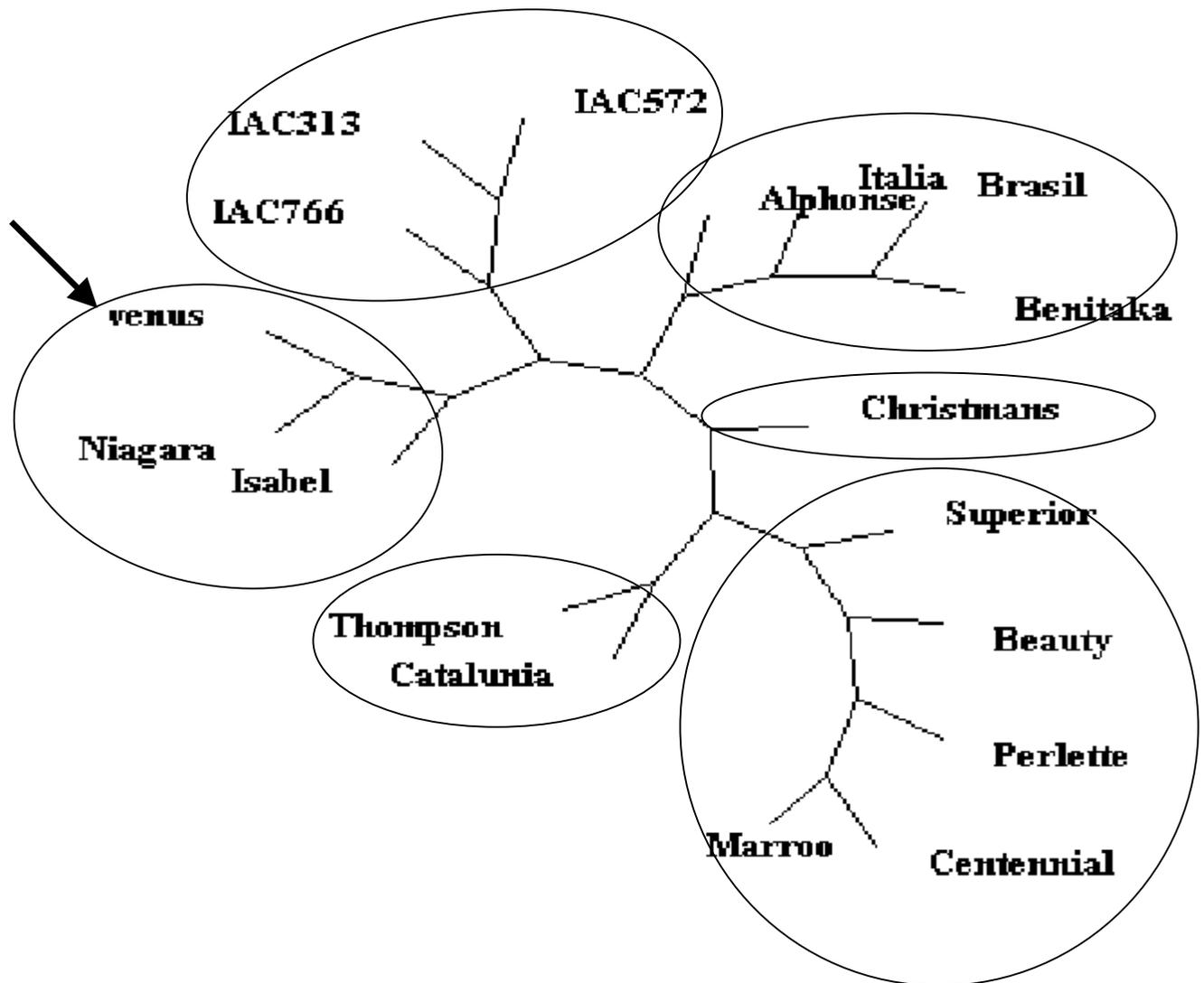


Figura 16. Dendrograma construído pelo programa Phylip versão 3.2, que relaciona todas as cultivares de videira analisadas utilizando os “primers” FAM – ACT-CTT; FAM – ACT-ATT e FAM-ACT-CTG.

Esta representação gráfica permite estimar as relações genéticas entre as cultivares, e verifica-se que a cv. Vênus (sem semente) agrupou-se às cultivares com sementes (Niágara rosada e Isabel). Isso pode ser explicado porque apesar de ser uma cultivar apirena, pertence ao grupo das uvas americanas, que é o mesmo grupo da 'Niágara rosada' e 'Isabel'.

Também foi possível verificar a proximidade genética entre as cultivares Brasil, Benitaka e Isabel, uma vez que a 'Brasil' é uma mutação da 'Benitaka', que por sua vez, é uma mutação da 'Itália', todas pertencentes ao grupo de uvas européias (espécie *Vitis vinifera*).

Além disso, obteve-se grupos específicos para os três porta-enxertos e para uvas sem sementes, sendo sem dúvida, a melhor combinação de "primers" testada, por ter permitido a visualização da similaridade genética entre as cultivares e agrupamento por tipos (com sementes, sem sementes e porta-enxertos).

Com os resultados obtidos, confirma-se a grande vantagem da técnica *f*AFLP citada por Martinez-Zapater *et al.* (2000), que é a possibilidade de obtenção do polimorfismo desejado a partir de uma única combinação de "primers".

Um exemplo de um dos géis *f*AFLP onde correram todas as amostras e foram separadas as bandas usadas na construção das tabelas binárias e dendrogramas pode ser visualizado na Figura 17.

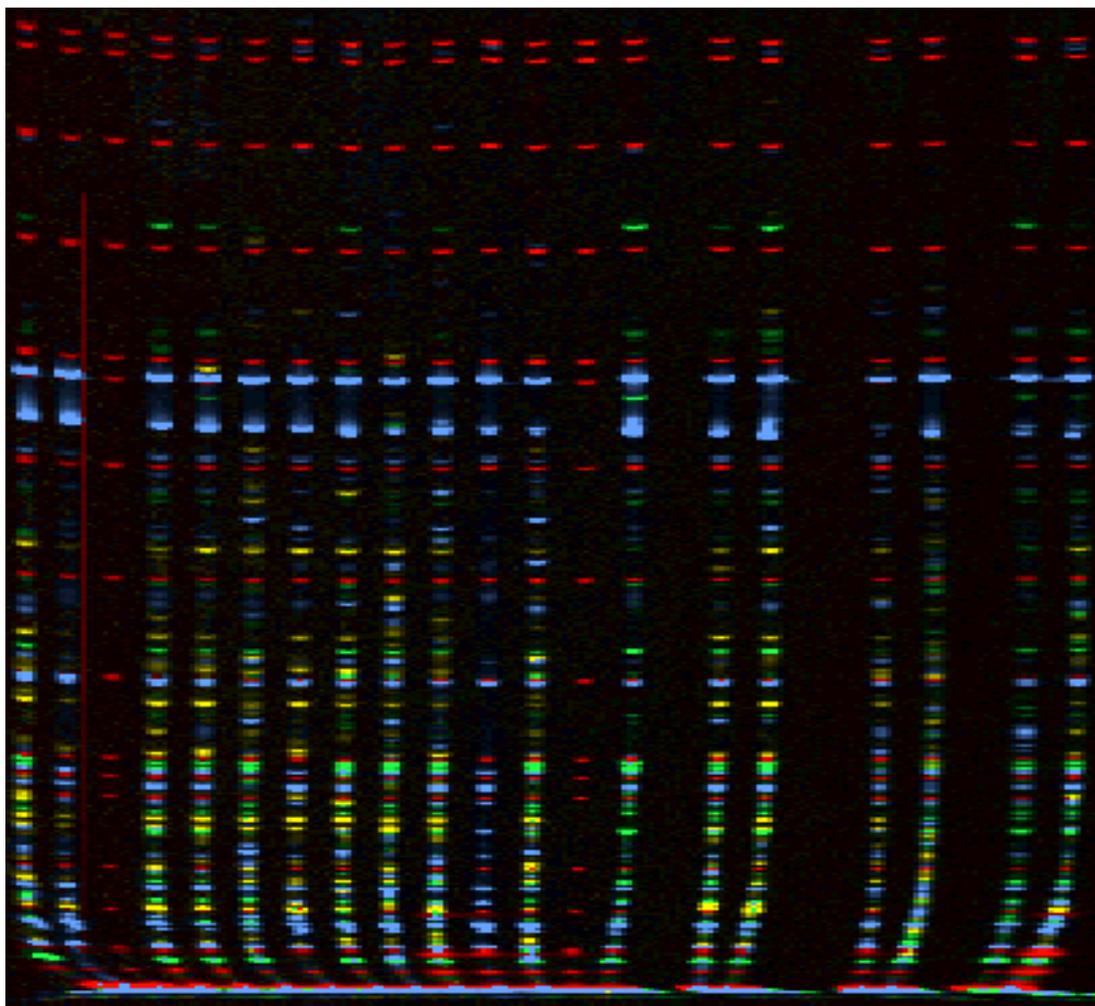


Figura 17. Exemplo de um gel *f*AFLP (Uva 1: “primers” JOE – AAG/CTC; NED – ACC/CAT; FAM – ACT/CTG) onde foram corridas todas as amostras de videira para identificação de marcas moleculares associadas à ausência de sementes.

4.4. RAPD X *f*AFLP

Na tentativa de resolver problemas de caracterização do gênero *Vitis*, mais especificamente em cultivares sem sementes, os marcadores RAPD e *f*AFLP manifestam-se como presença ou ausência de uma determinada banda de DNA, a partir da possibilidade de união de um “primer” ao DNA genômico da videira.

Pela análise específica dos dendrogramas obtidos de cada técnica, verifica-se que pela técnica *f*AFLP as cultivares foram melhor agrupadas, ou seja, foi possível a formação de grupos característicos para uvas com sementes, sem sementes e para os porta-enxertos, mostrando a robusticidade do *f*AFLP quando comparada com o RAPD.

De acordo com Vos *et al.* (1995), o AFLP tem muitas vantagens sobre o RAPD: i) um maior número de loci pode ser analisado por experimento; são obtidas por análise, um número de marcas informativas, aproximadamente 10 vezes maior; ii) os marcadores AFLP são a princípio dominantes; porém, usando equipamento e “software” apropriados para analisar os géis podem ser codominantes, sendo possível identificar um alelo quer ele seja dominante ou recessivo em genótipos homocigotos ou heterocigotos, gerando mais informações do que os marcadores dominantes como RAPD; e iii) o AFLP gera padrões de bandamento altamente reprodutíveis, devido a um pareamento altamente específico dos “primers” aos nucleotídeos adaptadores complementares. Por outro lado, a tecnologia RAPD, pode apresentar uma falta de reprodutibilidade, que é causada por um pareamento desigual dos “primers” aleatórios. Os AFLPs parecem ser tão reprodutíveis quanto os RFLPs, mas são tecnicamente mais exigentes e requerem mais DNA (500ng por reação) do que os RAPDs. Devido à sua grande cobertura genômica (em média eles geram 100 bandas por gel comparado com 20 dos RAPDs), os AFLPs são particularmente bons para mapeamento genômico e “fingerprinting”, e podem ser usados para calcular distâncias genéticas entre genótipos. A identidade e distribuição das bandas de AFLP no genoma está claramente relatado para os “primers” selecionados que estão sendo usados, mas dados recentes indicam, por exemplo, que bandas de AFLP podem agrupar-se em torno dos centrômeros nos mapas genéticos.

Apesar disso, a técnica RAPD também possibilitou resultados satisfatórios no presente estudo, uma vez que foi possível a verificação de marcas moleculares específicas para as cultivares sem sementes, apesar de que, ao gerar o dendrograma, não foram obtidos agrupamentos específicos para cada tipo de videira em questão.

5. IMPLICAÇÕES

Utilizando-se a técnica RAPD obteve-se uma marca molecular bastante expressiva com o “primer” UBC 443, presente em todas as cultivares sem sementes e ausente nas demais. Conseqüentemente será possível o desenvolvimento de marcadores SCAR a partir dessas marcas RAPD encontradas, possibilitando a criação de um “kit” de identificação rápida e precoce de apirenia em videira.

Além disso, foi possível identificar marcadores específicos para várias cultivares, independentemente da presença ou ausência de sementes, visto que devido a diversas mutações existentes no gênero, pode ocorrer dificuldade na definição da “identidade” de cultivares.

Se as diferenças encontradas geneticamente estão ou não relacionadas com diferenças morfológicas identificadas nas cultivares em outros estudos, este trabalho representa um material de grande importância, a começar pela caracterização dos fragmentos polimórficos amplificados em gel.

Os dados obtidos por *f*AFLP também apresentam-se como uma importante ferramenta para estudos futuros, principalmente para construção de mapa genético de ligação de alta densidade, havendo entretanto, a necessidade de serem testados uma maior quantidade de combinações de “primers”, podendo ser iniciado com os já selecionados neste trabalho. Os mapas genéticos de ligação facilitam a localização e identificação de genes de interesse para melhoramento assistido por marcadores, e posterior clonagem desses genes.

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética e melhoramento de plantas, possibilitando a cobertura e análise completa de genomas; a decomposição de característica genéticas complexas nos seus componentes Mendelianos; a localização das regiões que controlam caracteres de importância; a quantificação do efeito destas regiões na característica estudada e

a canalização de toda esta informação para uso em programas de melhoramento (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

6. CONCLUSÕES

O melhor método de extração de DNA genômico em videira, para análise RAPD foi o descrito por Lodhi *et al.* (1994), e, para análise por *f*AFLP, o método de Doyle e Doyle (1991), com algumas adaptações.

Foi possível identificar uma marca molecular específica para as cultivares de videira sem sementes, pela técnica RAPD, utilizando o “primer” UBC 443 (TGA TTG CTC G).

Com o *f*AFLP obteve-se um melhor agrupamento das cultivares estudadas do que com o RAPD, tendo sido gerados grupos distintos: com sementes, sem sementes e porta-enxertos.

7. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2000. Disponível em: <http://www.uvas.hpg.ig.com.br/introducao.htm>> Acesso em: 9 jan.2002.

ANDREANI JÚNIOR, R. **Caracterização do sexo do mamoeiro (*Carica papaya* L.) através de marcadores moleculares e de microscopia eletrônica de varredura.** 1998. 65f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

AUKAR, A.P.A.; ZAIN DAN, H.A.; FREITAS, M.L.; LEMOS, E.G.M. F-AFLP analysis of genetic diversity within and between *Passiflora* spp. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47, 2001. Águas de Lindóia, SP. **Anais...** 1 CD Rom.

BELLIN, D.; VELASCO, R.; GRANDO, M.S. Intravarietal DNA polymorphisms in grapevine (*Vitis vinifera* L.) polymorphisme intravarietal de L'ADN chez la vigne. **Acta Horticulturae**, v.546, p. 343-349, 2001.

BENATTI, T.R.; SOUZA, A.C.D.; SCARPARE FILHO, J.A.; SANTOS, P.C.; TULMANN NETO, A.; KIDO, E.A.; FIGUEIRA, A. Detecção de marcadores AFLP associados ao nanismo em bananeira (*Musa* spp.). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47, 2001, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** 1 CD Rom.

BERNARDES, E. A uva que ressuscitou. **Época**, n.190, p.23, 2002.

BOUQUET, A.; DANGLLOT, Y. Inheritance of seedless ness in grapevine (*Vitis vinifera* L.) **Vitis**, v.35, p.35-42, 1996.

BOWERS, J.E.; BANDMAN, E.B.; MEREDITH, C.T. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. **American Journal Enology and Viticulture**, v.44 , p. 266–274, 1993.

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

CAIN, D.W.; EMERSHAD, R.L.; TARAIOLO, R.E. In ovulo embryo culture and seedling development of seed and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). **Vitis**, v. 22, p. 9-4, 1983.

CAMARGO, U.A. Cultivares para a viticultura tropical no Brasil. **Informe Agropecuário**, v.19, n. 194, p. 15-19, 1998.

CAMARGO, U.A.; AMARAL, A.L.; OLIVEIRA, P.R.D. Uvas sem sementes: Uso da biotecnologia na busca de novas cultivares apirênicas. **Biotecnologia**. 2001. Disponível em:< www.biotecnologia.com.br/bio/10g.htm>. Acesso em 14 jan. 2002.

CASSIANO, A.P.A.A. **Variações genéticas entre espécies de Passiflora (Passifloraceae) usando marcador molecular RAPD**. 1998. 47f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; SANCHA, J.C.; MARTINEZ de TODA, F.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources . A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical Applied Genetic**, v.97, p. 51-59, 1998.

CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; CHANG, C.J.; HOPINS, D.L. randomly amplified polymorphic DNA analysis of xilella fastidiosa Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.1688-1690, 1995.

COLLINS, G.G.; SYMONS, R.H. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR thecnique. **Plant Molecular Biology Reproduction** v.11, p. 105 – 112, 1993.

DEVOS, K.M.; GALE, M.D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. **Theoretical Applied Genetic**, v.84, p.567-572, 1992.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, p.13-15, 1991.

EMERSHAD, R.L.; RAMMING, D.W.; SERPE, M.D. In ovelo embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera* L. **American Journal of Botany** , v.76, p. 397– 402, 1989.

FAIRBANKS, D.J.; WALDRIGUES, A.;RUAS, P.M. Efficient characterization of biological diversity using fielol DNA extraction and random amplified polymorphic DNA markers. **Revista Brasileira de Genética**, v.16, n.1, p.11-22, 1993.

FELSENSTEIN, J. PHILIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2) **Clasistics**. v. 5, p. 164-166, 1985.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1995, 220p.

FRUTICULTURA. In: AGROSITE Disponível em: <http://www.agrosite.com.br/frutas>> Acesso em: 7 jan.2002.

GALET, A. **A practical ampelography: grapevine indetification**. Ithaca: Lommstock, 1979, 248 p.

GOTO-YAMAMOTO, N. Estimation of the relationship among grape cultivars based on AFLP analysis. **Journal American Society Enology and Viticulture**, v. 8, n.3, p. 204–206, 1997.

GOTTARDI, M.V.C. **Avaliação de plantas matrizes de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne, utilizando marcadores RAPD e padrões isoenzimáticos**. 2001. 81f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GRANDO, M.S; DE MICHELI, L.; SCIENZA, A. Characterization of Vitis germplasm using random amplified polymorphic DNA markers. **Genetic Research Crop Evolution**, v.43, p.187-192, 1996.

GRAY, D.; MEREDITH, C. Grape. In: HAMMERSCHLAG, F.; LITZ, R. (eds.) **Biotechnology of perennial fruit crops**, Wallingford: CAB International, 1992. p.229-269.

HANCOCK, J.F. **Plant evolution and the origin of crop species**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1992. 297p.

HELIENTJARIS, T.; KING, G.; SLOCUM, M.; SIEDENSTRANG, C.; WEGMAN, S. Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. **Plant Molecular Biology**, v.5, p. 109-118, 1985.

IBGE. 1998. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br> >. Acesso em: 16 jan. 2002.

IBRAF. 2002. Disponível em: < <http://www.ibraf.org.br> >. Acesso em: 16 jan. 2002.

JESOVSEK, G.K. **Utilização de marcadores moleculares na caracterização de espécies do gênero *Cássia***. 1995. 67f. (Dissertação de Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

JOHNS, M.A.; SKROCH, P.; NIENHUIS, J.; HINRICHSEN, P.; BASCUR, G.; MUÑOZ, C. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **CropScience**, v. 37, p. 605-613, 1997.

LAHOQUE, F.; THIS, P.; BOUQUET, A. Identification of a codominant Scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. **Theoretical Applied Genetic**, v.97, p. 950-959, 1998.

LAMBOY, W.F.; ALPHA, C.G. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis L.*) species. **Journal American Society of Horticulture Science**, v. 123, p. 182–188, 1998.

LIN, J.J.; KUO, J. A new reagent for simple isolation of plant genomic DNA. **Plant Biotechnology**, v.20, n.2, p. 46-48, 1998.

LODHI, M.A.; GUANG-NING YE; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.

LOOMIS, N.H.; WEINBERGER, J.H. Inheritance studies of seedlessness in grape. **Journal American Society of Horticultural Science**, v. 104, p. 181-184, 1979.

MANUBENS, A.; LOBOS, S.; JADUE, Y.; TORO, M.; MESSINA, R.; LLAADSER, M.; SELENFREUND, D. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, p. 255-267, 1999.

MARÍNEZ-ZAPATER, J.M.; CABEZAS, J.A.; CERVERA, M.T. AFLPs in genetic identification and genome analysis of grapevine. **Acta Horticulturae**, v. 528, p. 105-110, 2000.

MORENO, S.; GOGORCENA, Y.; ORTIZ, J.M. The use of rapid markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera L.*). **Scientia Horticulturae**, v.62, p.237-243, 1995.

MULLINS, M.G. Tissue culture and the genetic improvement of grapevines: a review. **Acta Horticulturae**, v. 280, p. 11-22, 1990.

NARVÁEZ, C.R.; VALENZUELA, J.B. ; MUÑOZ,C.; MINRICHSEN, P.R. Comparasion of RAPD and AFLP as methods for genetic identification on *Vitis* based on the analysis of anonymous genomic sequences. **Agricultura Técnica**, v. 60, n. 4, p. 320–340, 2000.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical Applied Genetic**, v. 85, p. 985-993, 1993.

PEARL, A.; SAMAR, N.; SPIEGEL-ROY, P.; OR, E. Conventional and biotechnological approach in breedings of seedless table grapes. In: SYMPOSIUM INTERNATIONAL SUR LA GÉNÉTIQUE ET L'AMÉLIORATION DE LA VIGNE, 7, 1998, Montpellier. **Proceedings...** p. 80-84.

POMMER, C.V.; RAMMING, D.W.; EMERSHAD, R. Influence of grape genotype, ripening season, seed trace size, and culture date on in ovule embryo development and plant formation. **Bragantia**, Campinas, v.54, n.2, p.237-249, 1995.

QU, W.; LU, J.; LAMIKANRA,O. Genetic diversity in muscadine and american bunch grapes based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Journal American Horticulture Science**, v. 121, p. 1020-1023, 1996.

REGNER, F.; STEINKELLNER, H.; TURETSCHKEK, E.; STADLHUBER, A.; GLOSSI, J. Genetic characterization of grape (*Vitis vinifera*) cultivars by microsatellite analysis. **Mitteilungen Klosterneuburg**, v. 46, p. 52–60, 1996.

REGNER, F.; STAUDLHUBER, A.; EISENHELD, C.; KASERER, H. Considerations about the evolution of grapevine and the kole of traminer. **Acta Horticulturae**, v. 528, p. 177-179, 2000.

REISCH, B.I., PRATT, C. Grapes. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Fruit Breeding**. vine and small fruits. New York, 1996. v.2.

REITER, R.S.; WILLIAMS, J.G.K.; FELDMANN, K.A.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.; SCOLNIK, P.A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. **Proceedings Nature Academic Science**, v. 89, p. 1477-1481, 1992.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEN. 1998. p. 163-177.

RONNING, C.M.; SCHNELL, R.J.; GAZIT, S. Using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify *Annona* cultivars. **Journal American Society of Horticultural Science**, v.120, n. 5, p. 726-729, 1995.

ROSSET, G.D. The state of vitiviniculture in the world and the statistical information in 1996. **Bulletin de L'O.J.V.**, n. 803-4, p. 102-174, 1998.

RUAS, P.M. Genetic relationship among four varieties by pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, n.3, p. 413-416, 1995.

SAGHAI-MARROF, M.A.; SOLEMAN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **PANS**, v.81, p. 8014-8018, 1984.

SCOTT, K.D.; PACEY, T.; ABLETT, E.M.; LEE, L.S.; HENRY, R.J. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. **Euphytica**, v.113, n.3, p. 245-249, 2000.

SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR / MIN. DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO, 2001. Disponível em: <www.mdic.gov.br>. Acesso em: 12 jan. 2002.

SENSI, E.; VIGNANI, R.; ROHDE, W.; BIRICOLTI, S. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. **Vitis**, v. 35, p. 182-188, 1996.

SHILLITO, R.D.; SAUL, M.W. Protoplast isolation and transformation. **Plant Molecular Biology: a practical approach**. IRL Press, p. 181, 1988.

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

SATUB, J.E.; SERQUEN, F.C. GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**. v.31, p. 729 – 741. 1996.

STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical Applied Genetic**, v.85, p. 697-701, 1993.

STOUT, A.B. **Seedlessness in grapes**. New York: Agricultural Experiment Station, 1936. 68p.

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

STRIEM, M.J.; BEM-HAYYIM, G.; SPIEGEL-ROY, P. Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape. **Journal American Society of Horticulture Science**, v.121, p. 758-763, 1996.

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

THIS, P.; LAHOUGUE, F.; ADAM-BLONDON, A.F.; DOLIGEZ, A.; BOUQUET, A. Towards markers-assisted selection for seedlessness in grapevine. **Acta Horticulturae**, v. 528, p. 221-229, 2000.

TIGNON, M.; KITTMANN, R.; WATILLON, B. Use for the identification of apple cultivars and mutants. **Acta Horticulturae**, v. 521 (2001). Disponível em: <<http://www.actahot.org/books/546>>. Acesso em: 14 jan. 2002.

TINKER, N.A.; FORTIN, M.G.; MATHER, D.E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. **Theoretical Applied Genetic**, v. 85, p. 976-984, 1993.

TRAVENSOLO, R. de F. **Marcador SCAR para *Xylella fastidiosa* em videira**. 2000. 54f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

VAROQUAUX, F.; BLANVILLAIN, R.; DELSENY, M., GALLOIS, P. Less is better: new approaches for seedless fruit production. **Tibtech**, v.18, p. 233-242, 2000.

VILARINHOS, A.D.; VIANA, C.H.P.; SOARES FILHO, W.S.; NICKEL, O.; OLIVEIRA, R.P. de. Marcadores RAPD na avaliação da diversidade genética e na identificação de híbridos interespecíficos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.22, n.1, p.14-19, 2000.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REINJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p. 4407-4414, 1995.

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

WANG, Y.; CHEN, J.; LU, J.; LAMIKANRA, O. Randomly amplified polymorphic DNA-analysis of *Vitis* species and Florida bunch grapes, **Scientia Horticulturae**, v.82, p. 85-94, 1999.

WARBURTON M.L.; BLISS, F.A. Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Bath), revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. **Journal American Society of Horticultural Science**, v. 121, n. 6, p. 1012-1019, 1996.

WEAVER, R.J. **Gibberellin on grapes**. Califórnia: University California Agriculturae. Extension Service, 1964. 57p. (bulletin AXT – 33).

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A. Genetics Analysing Random Amplified Polymorphic Markers. **Methods in Enzimology**, v.218, p.704-740, 1993.