

IDENTIFICAÇÃO DE PARENTAIS E HÍBRIDOS ENTRE *VITIS VINIFERA* E *VITIS ROTUNDIFOLIA* UTILIZANDO POLIMORFISMO ENZIMÁTICO E MARCADOR RAPD⁽¹⁾

HAIKO ENOK SAWAZAKI ⁽²⁾, CELSO VALDEVINO POMMER ^(3,4), ILENE RIBEIRO DA SILVA PASSOS ⁽³⁾,
MAURILO MONTEIRO TERRA ^(3,4) e ERASMO JOSÉ PAIOLI PIRES ^(3,4)

RESUMO

Identificaram-se parentais e híbridos entre *Vitis vinifera* (videiras comuns) e *V. rotundifolia* (muscadínias), utilizando-se o polimorfismo enzimático e marcador RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Os sistemas GOT (glutamato-oxaloacetato-transaminase), IDH (isocitrato desidrogenase) e PGI (fosfoglucose isomerase) diferenciaram a muscadínia, sendo observadas cinco aloenzimas para o GOT, duas para o LAP (leucina aminopeptidase) e quatro para o EST (esterase). Os sistemas PGI e IDH apresentaram-se como diméricos com o fenótipo de quatro aloenzimas em duas regiões e três em uma região respectivamente. O marcador RAPD apresentou polimorfismo que permitiu a diferenciação entre todos os cultivares. Os dendrogramas UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) obtidos pelas isoenzimas e pelo marcador RAPD foram semelhantes, sendo a aproximação mais forte entre 'Itália' e 'Rubi' que se ligaram aos cultivares Patrícia e A Dona. Os cultivares Piratininga e Eugênio, também bastante próximos, foram os seguintes a se ligarem às demais viníferas. Pelo polimorfismo enzimático e marcador RAPD, a muscadínia ficou bastante isolada dos outros grupos. Pelo método RAPD, aplicado às muscadínias, ao híbrido da Carolina do Norte NC66 C203-9, a um possível híbrido e seu parental feminino, observou-se o seguinte: os híbridos foram intermediários às muscadínias e viníferas, porém o possível híbrido se assemelhou ao parental feminino, enquanto o NC66203-9 apresentou bandas provenientes das muscadínias e viníferas, comprovando sua origem híbrida.

Termos de indexação: videira, melhoramento, polimorfismo enzimático, RAPD, resistência, hibridação.

⁽¹⁾ Trabalho realizado com o apoio financeiro da FAPESP. Recebido para publicação em 14 de novembro de 1995 e aceito em 17 de julho de 1996.

⁽²⁾ Seção de Fitoquímica, Instituto Agrônomo (IAC), Caixa Postal 28, 13001-970 Campinas (SP).

⁽³⁾ Seção de Viticultura, IAC.

⁽⁴⁾ Com bolsa de pesquisa do CNPq.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF PARENTS AND HYBRIDS AMONG *VITIS VINIFERA* AND *VITIS ROTUNDIFOLIA* USING ISOZYME POLYMORPHISM AND RAPD MARKER

Aiming to identify parents and hybrids among *Vitis vinifera* (bunch grapes) and *Vitis rotundifolia* (muscadine grapes) isozyme polymorphism and RAPD marker were used. GOT (glutamate oxaloacetate transaminase), IDH (isocitrate dehydrogenase) and PGI (phosphoglucosomerase) systems could differentiate the muscadine, being identified five allozymes for GOT, two allozymes for LAP (leucine aminopeptidase) and four allozymes for EST (esterase). PGI and IDH systems were dimeric and had the phenotype of four allozymes in two regions and three allozymes in one region, respectively. RAPD marker showed polymorphism that led to the differentiation among all genotypes. UPGMA dendrogram obtained through isozymes and RAPD marker were similar. The strongest linkage was found among 'Italia' and 'Rubi', followed by 'Patricia' and 'A Dona'. Piratininga and Eugênio cultivars were also closely linked to the others. Through isozymes and RAPD marker, muscadine was found very distantly and separately related to the other groups. When RAPD was used for muscadines, the NC66C203-9 hybrid, one possible hybrid and its female parent, the hybrids were located in an intermediate position for muscadine and bunch grapes, however the possible hybrid was similar to its female parent, while the NC66C203-9 presented bands from both muscadine and bunch grapes, confirming its hybrid origin.

Index terms: grapevine, breeding enzymatic polymorphism, RAPD, interspecific crossing, disease resistance.

1. INTRODUÇÃO

A forma mais almejada para controlar doenças é a criação de cultivares resistentes a patógenos ou a vetores. Apesar da existência de amplas coleções de germoplasma, há pouca possibilidade de encontrar um cultivar acumulando todas as boas características. Assim, é necessária a manipulação de fontes genéticas e o estabelecimento de programas de melhoramento para a recombinação das características desejáveis.

No caso de *Vitis*, o germoplasma com características de resistência a pragas e moléstias está presente no grupo de videiras conhecido como uvas muscadínicas, ou simplesmente muscadínicas, as quais, porém, são associadas a características desfavoráveis do ponto de vista de qualidade.

Uvas muscadínicas são os frutos de plantas das espécies *Vitis rotundifolia*, *V. munsoniana* e *V. penoiei*, as quais constituem a seção Muscadínia, do gênero *Vitis*, da família Vitaceae. Sua característica

biológica mais distintiva é o número cromossômico $2n = 40$, diferente de todas as outras espécies do gênero *Vitis*, em que $2n = 38$, e que constitui a seção vitis.

Dois programas de cruzamentos estão sendo realizados pela Seção de Viticultura do IAC: um visando ao uso de cultivares elite, como Itália, Rubi e Patricia; outro, com vistas à introdução da característica apirena nas muscadínicas. A principal barreira na efetivação do cruzamento entre as muscadínicas e as outras espécies é a formação de híbridos, na sua maioria, estéreis, improdutivos.

Técnicas tradicionais de identificação de cultivares de uva envolvem o exame da morfologia de baga e de outras partes da planta. Essas características são, frequentemente, não muito distintivas e relativamente inconsistentes em expressão, sobretudo com relação à grande diversidade morfológica da parte aérea, cujas características podem ser afetadas por doenças e fatores ambientais.

Polimorfismo de isoenzimas fornece marcadores genéticos para os estudos de melhoramento, pois os alelos das isoenzimas são características co-dominantes com hereditariedade mendeliana, permitindo a distinção entre genótipos homocigotos e heterocigotos para o locus em análise.

Segundo o princípio da técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), oligonucleotídeos de sequência arbitrária são utilizados como "primers" de PCR (polymerase chain reaction), e se esses "primers" forem curtos, sequências complementares ocorrerão muitas vezes no genoma molde. Existem, portanto, chances da existência de pares de sequências complementares ao "primer", próximos e arranjados de tal forma que os finais 3' estejam voltados uns para os outros e a DNA-polimerase pode iniciar a duplicação do fragmento (McPherson et al., 1992). Marcador RAPD é geralmente dominante, não distinguindo entre locus homocigotos e heterocigotos. A polimerase amplifica a partir do anelamento do "primer" nos alelos do locus. O polimorfismo pode ser causado por diferenças na sequência dos nucleotídeos nos sítios de anelamento ou por rearranjos dentro da sequência amplificada, originando a presença ou a ausência de banda (Taylor, 1993). No estudo de caracterização da diversidade genética, no entanto, não importa a diferenciação entre homocigotos e heterocigotos. Trabalhos com RAPD têm sido realizados para identificação de cultivares em videiras por Buscher et al. (1993), Gogorcena et al. (1993), Jean-Jacques (1993) e Marcide et al. (1994).

Neste estudo, caracterizaram-se os parentais das seções vitis e muscadínia, da família Vitaceae, através do polimorfismo enzimático em gel de poliacrilamida e pela técnica RAPD para identificação de cada cultivar utilizado nos cruzamentos e, posteriormente, dos híbridos a serem obtidos no estágio inicial de desenvolvimento, o que possibilitará o descarte dos não-híbridos na fase inicial de desenvolvimento e a otimização de instalações e mão-de-obra, facilitando o trabalho do melhorista.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos de produção e plantio foram desenvolvidos em condições de campo pela Seção de Viti-

cultura para a obtenção dos parentais, cultivares A Dona, Piratininga, Rubi, Itália e Patrícia, e muscadínias (Regale e um não identificado), os quais foram analisados para o polimorfismo enzimático. Em adição a esses cultivares, o híbrido da Carolina do Norte NC66C203-9, um suposto híbrido desenvolvido em casa de vegetação e seu parental feminino, da seção vitis, e o cultivar IAC 871-18, foram estudados e analisados pela técnica RAPD. Folhas jovens, não totalmente expandidas, foram coletadas e armazenadas em geladeira por, no máximo, uma semana.

2.1 Método para isoenzimas

Utilizaram-se os extratos frescos obtidos pela homogeneização com almofariz ou homogeneizador em tampão tris/citrato 0,02M pH 7,5 com 0,15% de cisteína hidrocloreto, 0,15% de ácido ascórbico, 1,5% PEG 40, 0,015% mercaptoetanol com adição de 0,2 g de polivinilpirrolidona para cada 4 ml de tampão e 0,2 a 0,5 g de tecido foliar. Utilizou-se o aparelho de eletroforese vertical da Biorad, e géis com 7% de poliacrilamida de 2 mm de espessura. Prepararam-se os géis segundo sistema de Ashton & Braden (1961), constituído pelo borato de lítio pH 8,3/tris/citrato pH 8,3, modificando-se a constituição do tampão do gel, pela diminuição dos teores de ácido bórico/hidróxido de lítio e aumento dos teores de tris/citrato, resultando em melhor separação das bandas, conforme descrito:

A - tampão do eletrodo: 0,192M ácido bórico (12 g/L) ajustado em pH 8,3 com hidróxido de lítio (molaridade final aproximadamente 0,038M).

B - tampão do gel: 0,0057M ácido bórico, 0,0012M hidróxido de lítio, 0,0888M tris e 0,0132M ácido cítrico com pH final 8,3.

No uso rotineiro para a polimerização dos géis foram empregados: 8,6 mL da solução estoque de acrilamida (22,2% acrilamida e 0,6% N,N'-metilenebisacrilamida); 2,4 mL de tampão tris/citrato constituído pela solução 1M de tris titulado em pH 8,3 com ácido cítrico; 0,8 mL de tampão do eletrodo/borato de lítio; 15,2 mL de água deionizada; 0,1 mL de Temed 10% e 0,1 mL de persulfato de amônia 10%. A corrida eletroforética foi iniciada sob a corrente de 10 mA, aumentando-se gradativamente para

20 mA durante as primeiras duas horas até as amostras entrarem no gel, mantendo-se, depois, a amperagem durante a eletroforese por cinco a seis horas. Os sistemas de reação enzimática para coloração das bandas foram realizados de acordo com Sawazaki (1995) para EST, PGI, GOT, IDH e LAP.

Cada locus foi referido pela abreviatura específica da enzima correspondente, seguida por número referente ao locus com mais de um gene para a mesma enzima. As aloenzimas foram denominadas de acordo com a velocidade de migração das bandas correspondentes, da mais rápida à mais lenta, da seguinte maneira: de F (fast), I (intermediate), M (mediate), S (slow) e R (retarded).

2.2 Método para marcador RAPD

A extração de DNA foi realizada de acordo com Sawazaki (1995) a partir de método com CTAB.

Foram utilizados 2 kits (A e B) de "primers" de 10 mers da Operon Technologies e o aparelho termociclador Gene Atag da Pharmacia, o qual permite 40 reações por vez. Efetuaram-se as reações de amplificação em volume de 25 µL contendo 10 mM tris/HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 µM de cada dATP, dCTP, dGTP e TTP, cinco picomoles de "primer" de 10 mers, 20-25 ng DNA genômico e 2,0 unidades de Taq DNA polimerase (GIBCO). A amplificação foi realizada com um aquecimento inicial de dois minutos a 94°C para denaturação de toda fita dupla de DNA e, a seguir, 35 ciclos de um minuto a 94°C, trinta segundos a 34°C para o anelamento e um minuto e trinta segundos a 72°C para a síntese da cadeia complementar pela DNA polimerase, seguida de sete minutos a 72°C no final da reação para a completa extensão de todas as cadeias complementares. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de 1,2% agarose em tampão TAE (40 mM tris/acetato, 20 mM acetato de sódio, 1mM EDTA, pH 7,6) e as fotografias, tiradas com a máquina polaróide MP4+ da Photodyne. O estudo da diversidade genética foi efetuado pela análise multivariada com o programa NTSYS. A presença ou a ausência de cada banda, constituída pelos alelos das isoenzimas, ou fragmentos amplificados de DNA, foi computada, respec-

tivamente, como 1 ou 0 para construção do padrão de similaridade. Os dendrogramas com base na técnica de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean), a qual utiliza o método de pareamento não ponderado, foram construídos por meio das médias aritméticas dos dados de similaridade.

Consideraram-se apenas os fragmentos com grande intensidade por serem, segundo Heun & Helentjaris (1993), mais reproduzíveis devido ao fenômeno da competição entre os fragmentos para amplificação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema PGI (Figura 1) correspondeu ao definido por Loukas et al. (1983), Chaparro et al. (1989), Calò et al. (1989) e Parfitt & Arulsekhar (1989), como dimérico e definido por 2 locus. O fenótipo da região mais avançada, correspondente ao locus denominado Pgi-2 por Loukas et al. (1983), apresentou, para todos os cultivares, uma banda monomórfica, correspondente à aloenzima denominada F2. Parfitt & Arulsekhar (1989) e Chaparro et al. (1989) denominaram as bandas da 'Itália', relativas ao locus com fenótipo mais próximo à origem, com as letras A e C, porém com a ordem trocada, razão pela qual se decidiu pela denominação das aloenzimas com as letras F, I, M e S.

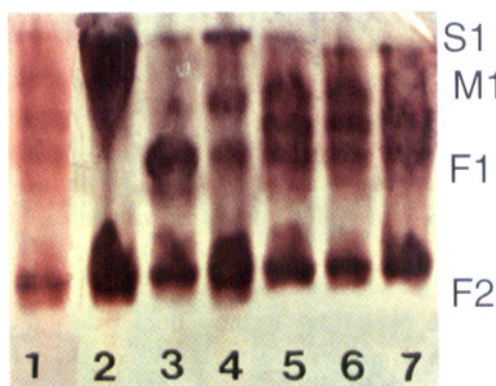


Figura 1. Zimograma de PGI. Início na parte superior, ânodo no final. 1 = 'A Dona' com Pgi-1: F1M1 e Pgi-2: F2F2; 2 = muscadínia S1S1 e F2F2; 3 = 'Piratininga' F1F1 e F2F2; 4 = 'Eugênio' F1S1 e F2F2; 5 = 6 = 7 = 'Itália', 'Rubi' e 'Patrícia' F1M1 e F2F2.

O padrão de três bandas, correspondente, segundo os autores, ao formado pelas proteínas homodiméricas das aloenzimas A e B, mais o heterodímero, foi idêntico ao encontrado neste trabalho para os cultivares Itália, Rubi, Patrícia e A Dona, sendo as aloenzimas denominadas F1 e M1. O 'Eugênio' também apresentou o padrão de três bandas correspondente ao formado pelas aloenzimas F1 e S1, enquanto a muscadínia e a 'Piratininga' apresentaram uma banda correspondente às aloenzimas S1 e F1 respectivamente. O fato de a muscadínia ter apresentado uma aloenzima não encontrada nas demais (S1), com exceção da 'Eugênio', indica que o híbrido pode ser provavelmente diferenciado, pois Chaparro et al. (1989) identificaram os híbridos resultantes de cruzamentos vinífera x muscadínia quando esta foi utilizada como parental masculino.

Parfitt & Arulsekhar (1989) encontraram a variabilidade de distinção das aloenzimas do sistema GOT, conforme a época do ano, fato esse também observado pela maior concentração e número das bandas de 1993 em relação a 1994 (1 a 7 - Figura 2). Benin et al. (1988) encontraram 9 bandas, sendo 6 a 7 mais próximas e duas mais avançadas. Considerando-se o perfil de duas bandas mais retardadas e outra mais avançada de 'A Dona' (1 - Figura 2), fica configurada a presença de, pelo menos, dois loci, tendo-se verificado, algumas vezes, a presença de bandas mais avançadas que podem corresponder às duas mais avançadas de Benin et al. (1988). Royo

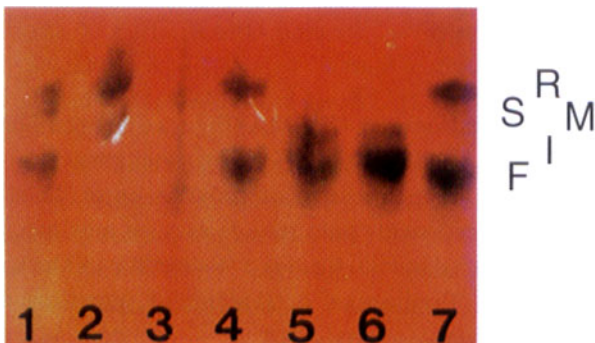


Figura 2. Zimograma de GOT. Início na parte superior, ânodo no final. 1 = 'A Dona' com aloenzimas: F, S e R; 2 = muscadínia M e S; 3 = 'Piratininga' F e S; 4 = 'Eugênio' F e S; 5 = 'Itália' F e I; 6 = 'Rubi' F e I; 7 = 'Patrícia' F e S.

et al. (1994) também relataram o perfil de uma a três bandas mais retardadas e duas mais avançadas, o que reforça a hipótese de, pelo menos, dois prováveis loci. Como, porém, não foram realizados cruzamentos para confirmação da herança mendeliana, as bandas foram denominadas apenas pela velocidade de migração. Quase todos os cultivares apresentaram uma banda mais avançada, correspondente à aloenzima F. 'A Dona' mostrou, além dessa banda, pelo menos mais duas correspondentes às aloenzimas S e R. As demais apresentaram as bandas F e I para 'Rubi' e 'Itália', e F e S para 'Patrícia', 'Piratininga' e 'Eugênio'. A muscadínia apresentou duas bandas correspondentes às aloenzimas M e S.

Chaparro et al. (1989) observaram 2 loci no sistema dimérico IDH em viníferas e muscadínias, tendo o locus mais avançado 4 alelos. Neste trabalho, encontrou-se o fenótipo de uma ou três bandas em apenas uma região (Figura 3).

Os cultivares Itália, Rubi, Patrícia, Piratininga e A Dona apresentaram a banda da aloenzima F e a muscadínia, a S, enquanto, em 'Eugênio', foram observadas as 3 bandas do sistema dimérico, constituído pelas aloenzimas F e M e a banda do heterodímero.

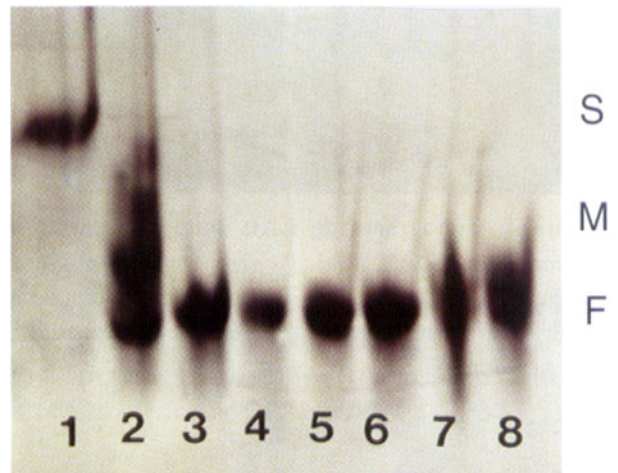


Figura 3. Zimograma de IDH. Início na parte superior, ânodo no final. 1 = muscadínia com aloenzima S; 2 = 'Eugênio' F e M; 3 = 4 = 5 = 6 = 7 = cultivares Patrícia, Rubi, Itália, A Dona e Piratininga F.

Verificou-se, por esse sistema enzimático, que a muscadínia apresentou uma aloenzima diferenciada, possibilitando a identificação de todos os híbridos resultantes dos cruzamentos dos parentais estudados com ela.

Parfitt & Arulsekhar (1989) não relataram o sistema LAP em virtude de terem notado variação no perfil das bandas de acordo com as estações. Segundo Alfenas et al. (1991), o sistema é particularmente suscetível ao aparecimento de enzimas secundárias oriundas de modificações posteriores na estrutura dos polipeptídeos, devido à oxidação de ligação sulfidril, deaminação de aminoácidos, digestão de parte dos polipeptídeos, ou dos compostos ligados a eles por proteases, glicosidases ou lipases, ou polimerização de enzimas, ou formação de estruturas terciárias ou quaternárias diferentes. Embora também tenha sido verificada a alteração do padrão de uma a duas bandas (1 a 7 - Figura 4) para 3 ou 4, o 'Piratininga' foi o único que apresentou uma banda mais retardada, sendo, provavelmente, o sistema monomérico, correspondente ao formado pela aloenzima F para todos os cultivares, com exceção do 'Piratininga', que teria as duas aloenzimas, F e S.

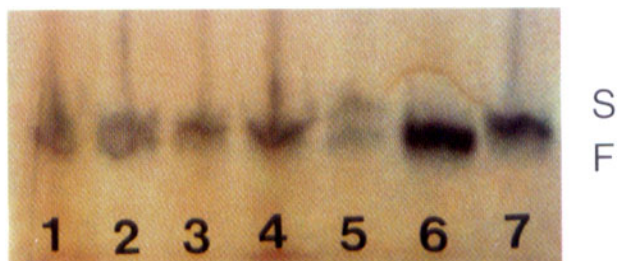


Figura 4. Zimograma de LAP. Início na parte superior, ânodo no final. 1 = 2 = 3 = 4 = cultivares Patrícia, Rubi, Itália e Eugênio com aloenzima: F; 5 = 'Piratininga' F e S; 6 = 7 = muscadínia, 'A Dona' F.

O sistema EST (Figura 5), de acordo com Benin et al. (1988), apresentou 24 bandas, sendo cinco constantes, enquanto Royo et al. (1994) encontraram 12 bandas, sendo cinco polimórficas. No fenótipo observado, somente as bandas mais próximas à origem (Figura 5B) e as polimórficas mais avançadas (Figura

5A) foram mais fortes. Considerando-se as bandas da região A, muscadínia e 'Piratininga' apresentaram o padrão de duas bandas mais avançadas, correspondentes às aloenzimas F e I; 'Itália' e 'Rubi', às duas intermediárias I e M. 'A Dona' e 'Eugênio' mostraram uma ou, às vezes, duas bandas mais retardadas, M e S. 'Patrícia' aparentemente não apresentou bandas, ou essas são de difícil detecção, configurando a hipótese do alelo nulo.

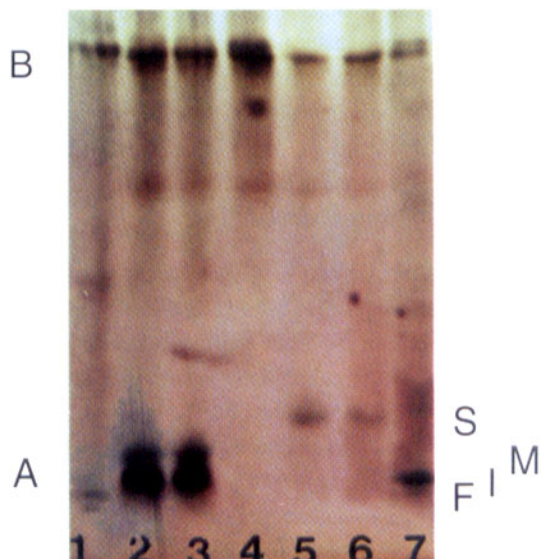


Figura 5. Zimograma de EST. Início na parte superior, ânodo no final. 1 = 'Piratininga' com aloenzimas F e I; 2 = 'Itália' I e M; 3 = 'Rubi' I e M; 4 = 'Patrícia' N; 5 = 'A Dona' M e S; 6 = 'Eugênio' M e S; 7 = muscadínia F e I.

Pelo dendrograma UPGMA (Figura 6), construído a partir das bandas polimórficas das aloenzimas, verificou-se o agrupamento mais próximo entre 'Itália' e 'Rubi', certamente pelo fato de esta ser uma mutação somática daquela, ligadas a 'Patrícia' e 'A Dona', a seguir a 'Piratininga' e 'Eugênio' e, por último, a muscadínia.

A figura 7 mostra as ampliações originadas pelos "primers" OPA7 e OPA9 produzindo, respectivamente, 10 e 8 bandas polimórficas, verificando-se a grande distinção das muscadínias em relação às viníferas.

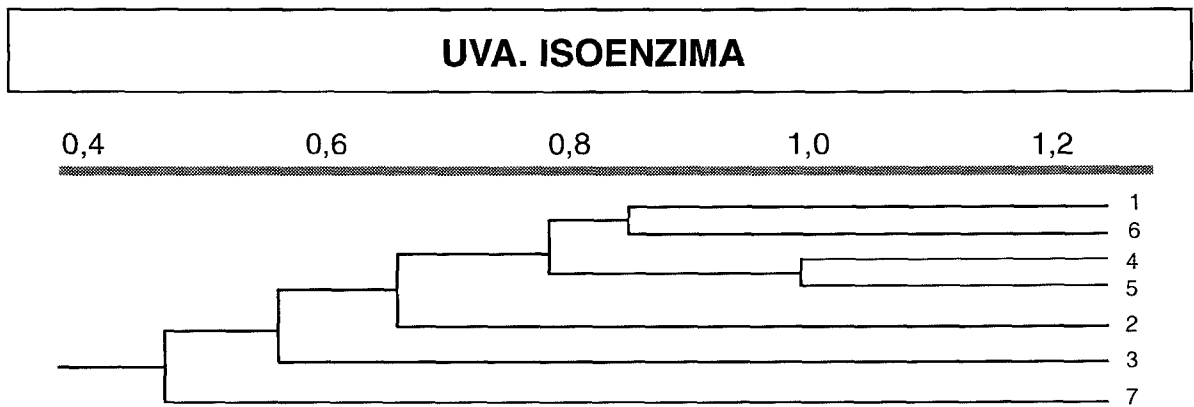


Figura 6. Dendrograma UPGMA de isoenzimas. Cultivares: 1 = A Dona; 2 = Piratininga; 3 = Eugênio; 4 = Itália; 5 = Rubi e 6 = Patrícia; 7 = muscadínia

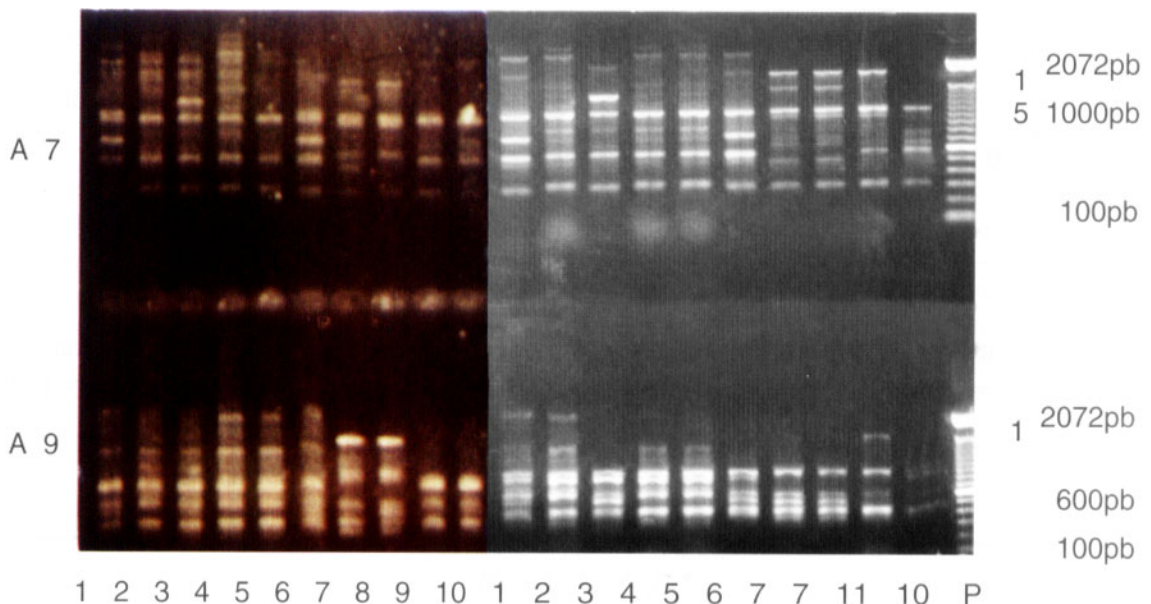


Figura 7. Perfil RAPD para os "primers" OPA7 e OPA9. Cultivares: 1 = A Dona; 2 = Piratininga; 3 = Eugênio; 4 = Itália; 5 = Rubi e 6 = Patrícia; 7 = muscadínia; 8 = 'Regale'; 9 = 'Regale' x 'IAC 871-18'; 10 = 'IAC 871-18'; 11 = NC66C203-9.

Outro fator observado é que o padrão do suposto híbrido 'Regale' x 'IAC 871-18' se assemelhou ao padrão materno, enquanto o híbrido da Carolina do Norte, NC66C203-9, apresentou, além das bandas das viníferas, os fragmentos 1 e 5 com mais de 1.500 e com 1.000 pares de bases (pb) para o "primer" OPA7 e com mais de 1.500 pb para o "primer" OPA9, das muscadínias, comprovando sua origem híbrida. A figura 8 apresenta os fragmentos originados pelos "primers" OPB5 e OPB8. Pelo "primer" OPB5, observou-se que os fragmentos específicos das muscadínias com 1.450, 850 e 450 pb, respectivos às bandas

1, 6 e 10, e pelo OPB8, o fragmento com 500 pb, correspondente à banda 7, foram amplificados pelo NC66C203-9, comprovando sua origem híbrida. Outros "primers" que identificaram o híbrido NC66C203-9 foram OPA2, OPA3 e OPB7.

Os resultados os polimórficos obtidos pelos "primers" foram analisados pelo programa NTSYS, adicionando-se os dados à medida que as análises foram sendo realizadas. A lista dos "primers" utilizados e fragmentos polimórficos obtidos está relacionada no quadro 1.

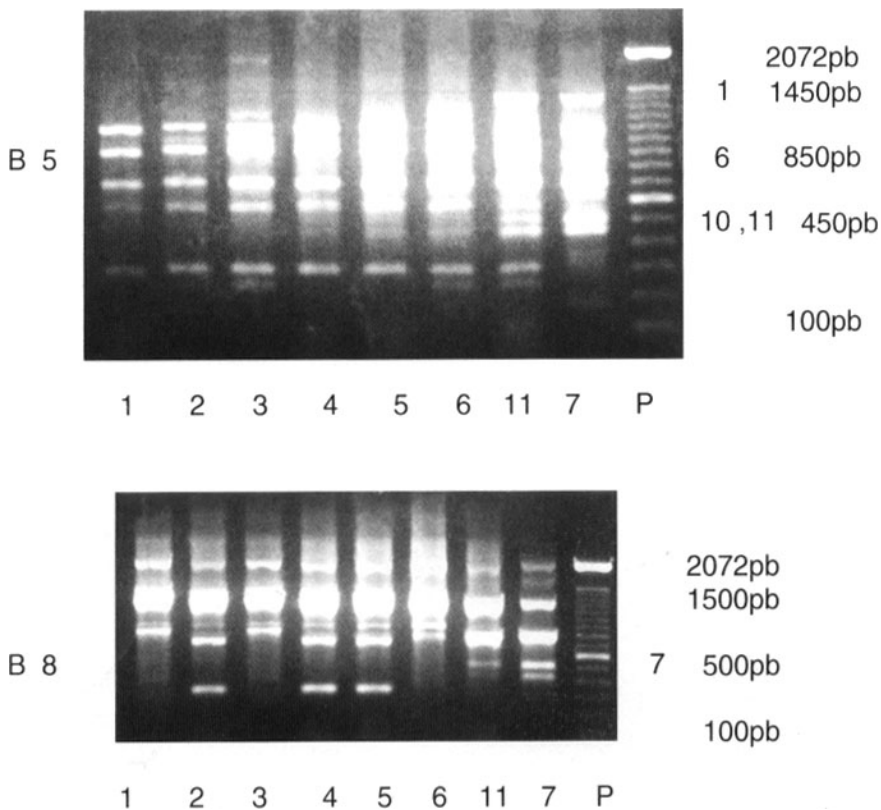


Figura 8. Perfil RAPD para os “primers” OPB5 e OPB8. Cultivares: 1 = A Dona; 2 = Piratininga; 3 = Eugênio; 4 = Itália; 5 = Rubi e 6 = Patrícia; 7 = muscadínia; 11 = NC66C203-9; P = padrão.

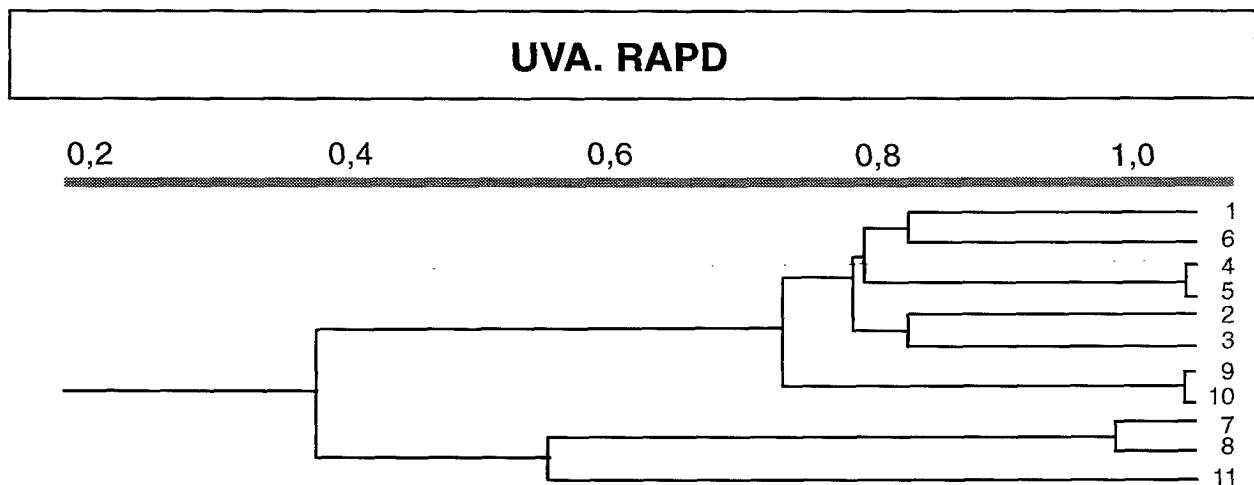


Figura 9. Dendrograma UPGMA obtido com 125 bandas polimórficas amplificadas por RAPD em uvas. Cultivares: 1 = A Dona; 2 = Piratininga; 3 = Eugênio; 4 = Itália; 5 = Rubi e 6 = Patrícia; 7 = muscadínia; 8 = ‘Regale’; 9 = Regale x ‘IAC 871-18’; 10 = ‘IAC 871-18’; 11 = NC66C203-9.

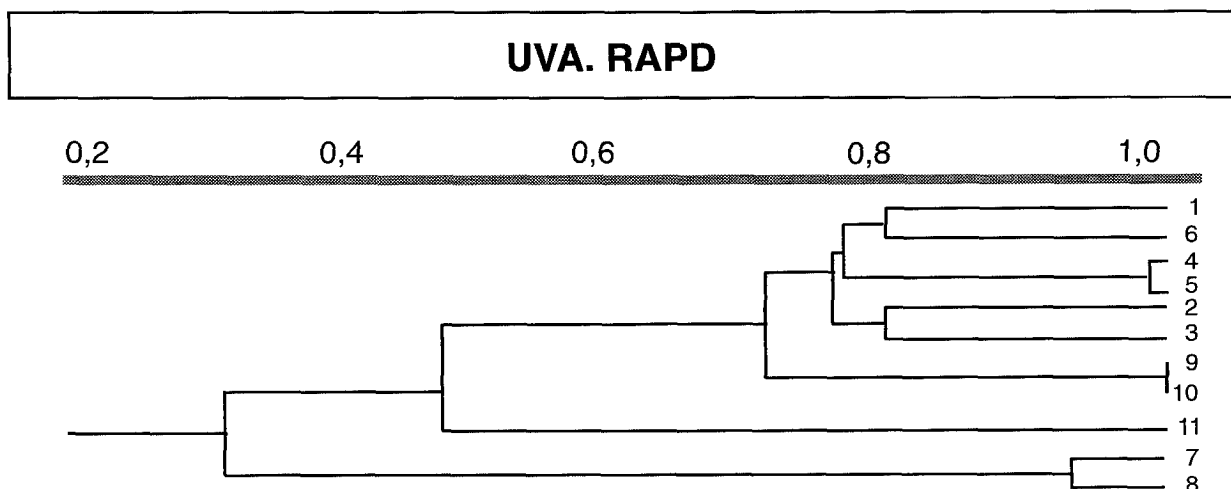


Figura 10. Dendrograma UPGMA obtido com 159 bandas polimórficas amplificadas por RAPD em uva. Cultivares: 1 = A Dona; 2 = Piratininga; 3 = Eugênio; 4 = Itália; 5 = Rubi e 6 = Patrícia; 7 = muscadínia; 8 = 'Regale'; 9 = 'Regale' x 'IAC 871-18'; 10 = 'IAC 871-18'; 11= NC66C203-9.

Quadro 1. Lista dos "primers" utilizados dos kits A (OPA) e B (OPB) da Operon e quantidade de fragmentos polimórficos e total amplificados a partir do DNA de uva pelo método RAPD

"Primer"	Fragmento polimórfico	Número total	"Primer"	Fragmento polimórfico	Número total
OPA1	4	7	OPB1	4	5
OPA2	11	12	OPB2	3	8
OPA3	6	8	OPB3	6	7
OPA4	5	9	OPB4	5	7
			OPB5	8	10
			OPB6	6	11
OPA7	5	11	OPB7	8	9
OPA8	9	11	OPB8	7	9
OPA9	4	7	OPB9	4	7
			OPB10	4	7
OPA11	8	9	OPB11	7	8
OPA12	3	5	OPB12	10	11
OPA15	6	9	OPB15	6	7
			OPB17	5	6
			OPB18	6	8
OPA20	9	10			

Pelos dados do marcador RAPD, correspondentes a 125 e 159 bandas polimórficas, constituíram-se os respectivos dendrogramas das figuras 9 e 10, cujos coeficientes co-fonéticos foram, respectivamente, 0,93490 e 0,97693, confirmando a alta combinação dos agrupamentos para os dados analisados. Veri-

ficou-se a semelhança entre os dois dendrogramas, ficando o híbrido NC66C203-9 mais intermediário aos parentais, comprovando que o número de dados foi suficiente. Verificou-se, também, que o agrupamento das viníferas ocorreu em ordem semelhante à obtida pelo dendrograma das isoenzimas, tendo

ocorrido apenas a maior ligação entre 'Piratinga' e 'Eugênio', confirmando que ambos têm a mesma procedência. O 'IAC 871-18' e o suposto híbrido entre este cultivar e a muscadínia, muito próximos, foram os seguintes a se ligarem às demais viníferas.

As muscadínias formaram um grupo bem distinto e isolado, ficando caracterizada ligeira diferença entre a desconhecida e o 'Regale'. O híbrido NC66C203-9 ficou em posição intermediária aos agrupamentos das muscadínias e demais viníferas, confirmando sua origem híbrida.

4. CONCLUSÃO

O polimorfismo enzimático e o obtido pela técnica RAPD possibilitaram a identificação tanto da muscadínia como dos cultivares, não tendo ocorrido a diferenciação enzimática apenas entre 'Itália' e 'Rubi', certamente pelo fato de esta ser uma mutação somática daquela. O marcador RAPD caracterizou todos os cultivares, suplementando os resultados do polimorfismo enzimático. O dendrograma das isoenzimas foi semelhante ao obtido pelo marcador RAPD, indicando que as bandas observadas foram produtos de expressão gênica. O híbrido NC66C203-9 apresentou bandas provenientes de ambos os parentais, comprovando a eficácia do método para distinção de sua origem híbrida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP o apoio financeiro para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; WALTER, B. & PASSADOR, C.G. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242p.
- ASHTON, G.C. & BRADEN, W.R. Serum beta-globulin polymorphism in mice. *Australian Journal Biological Science*, Melbourne, **14**:248-254, 1961.
- BENIN, M.; GASQUEZ, J.; MAHFOUD, A. & BESSIS, R. Caractérisation biochimique des cépages de *Vitis vinifera* L. par électrophorèse d'isoenzymes foliaires: essai de classification des variétés. *Vitis*, Siebeldingen, **27**:157-172, 1988.
- BUSCHER, N.; ZYPRIAN, E. & BLAICH, R. Identification of grape cultivars by DNA analyses: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10 mer primers. *Vitis*, Siebeldingen, **32**:187-188, 1993.
- CALÒ, A.; COSTACURTA, A.; PALUDETTI, G.; CALÒ, G.; ARULSEKAR, S. & PARFITT, D. The use of isozyme markers to characterize grape cultivars. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, **42**(1):15-22, 1989.
- CHAPARRO, J.X.; GOLDY, R.G.; MOWREY, B.D. & WERNER, J.D. Identification of *Vitis vinifera* x *Muscadina rotundifolia* small hybrids by starch gel electrophoresis. *HortScience*, Alexandria, **24**(1):128-130, 1989.
- GOGORCENA, Y.; ARULSEKAR, S.; DANDEKAR, A.M. & PARFITT, D.E. Molecular marker for grape characterization. *Vitis*, Siebeldingen, **32**:183-185, 1993.
- HEUN, M. & HELENTJARIS, T. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, **85**:961-968, 1993.
- JEAN-JAQUES; DEFONTAINE, A. & HALLET, J.N. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by Random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis*, Siebeldingen, **32**:189-190, 1993.
- LOUKAS, M.; STAVRAKAKIS, M.N. & KRINBAS, C.B. Inheritance of polymorphic production of *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* hybrids through embryo rescue. *Journal of Heredity*, New York, **74**:181-183, 1983.
- MCPHERSON, M.J.; OLIVER, R.J. & GURR, S.J. The polymerase chain reaction. In: GURR; MCPHERSON & BOWLES, eds. *Molecular plant pathology*. Oxford, IRL Press, 1992. p.123-144.
- MARCIDE, J.M.O.; VÁSQUEZ, S.M. & AOIZ, Y.G. Identificación de variedades de vid con técnicas moleculares: los RAPDs. *Viticultura Enologia Profesional*, Barcelona, **32**:12-17, 1994.
- PARFITT, D.E. & ARULSEKAR, S. Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *Journal of the American Society for the Horticultural Science*, Alexandria, **114**(3):486-491, 1989.
- ROYO, J.B.; MIRANDA, S.; ITOIZ, R. & CHOCARRO, A. Caracterización de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) mediante marcadores isoenzimáticos. *Viticultura Enologia Profesional*, Barcelona, **34**:20-28, 1994.
- SAWAZAKI, H. E. Caracterização da diversidade genética em plantas cítricas, palmeiras e brássicas através de isoenzimas e RAPD. 116p. Tese (Doutorado) - Campinas, UNICAMP, 1995.
- TAYLOR, G.R. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: MCPHERSON; QUIRKE & TAYLOR, eds. *PCR, a practical approach*. Oxford, IRL Press, 1993. p.1-13.