



Mutações e Recombinações Genéticas geram uvas coloridas

Marcadores isoenzimáticos e RAPD em cultivares de uvas finas de mesa

Fotografias e ilustrações cedidas pelos autores

1. Introdução

1.1. Caracterização das cultivares de *Vitis vinifera* L.

As cultivares 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil' de *Vitis vinifera* L. conhecidas como uvas finas de mesa em razão da qualidade e aparência de seus frutos (Figura 01), são cultivadas na região noroeste do estado do Paraná. A origem destas cvs. tem sido proposta como decorrente de mutações somáticas ocorridas em setores da cv. 'Itália', originando as cvs. 'Rubi' e 'Benitaka', e em setores de 'Benitaka', originando a cv. 'Brasil'. A cv. 'Itália' e suas mutações apresentam poucas diferenças morfológicas, e, em nível bioquímico e molecular, os primeiros trabalhos foram realizados por Oliveira-Collet (2003) e Zequim-Maia (2003), respectivamente.

As cvs. 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil' tem sido descritas como diferindo apenas na coloração dos frutos. A 'Itália' apresenta bagas de cor esverdeada a levemente amarelada, quando maduras. A cv. 'Rubi', descrita como originária de mutação somática espontânea na cv. 'Itália', ocorreu em um parreiral comercial do produtor Kotaro Okuyama, no município de Santa Mariana (PR), em 1972 (Kishino & Mashima, 1980), diferencia-se da cv. original ('Itália') pela coloração rosada das bagas. A cv. 'Benitaka' também descrita como originária de uma mutação somática espontânea, encontrada em parreiral de 'Itália', do viticultor Sadao Takakura, em Florai (PR), em 1988 (Sousa, 1996), difere da cv. 'Itália' e também da cv. 'Rubi' pelo intenso desenvolvimento da cor rosada-escura, desde o início da maturação. A cv. 'Brasil' por sua vez, foi descrita como derivada da 'Benitaka', por mutação somática espontânea, encontrada na propriedade de Hideo

Takakura, também em Florai (PR), no ano de 1991 (Gonçalves, 1995). Essa cv. difere das outras cvs. de cor ('Rubi' e 'Benitaka') pela cor preta da casca e polpa colorida de vermelho. Os frutos das quatro cvs. são apresentados na figura 01.

2. Análises bioquímicas das cvs. de *V. vinifera*

2.1. Metodologia

As análises bioquímicas das cvs. de *V. vinifera* mantidas na região noroeste do estado do Paraná foram realizadas em amostras de brotos foliares de 179, 183, 99 e 70 plantas dos cvs. 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil', respectivamente, coletadas em 55 parreirais. A homogeneização das amostras ocorreu em tubos de microcentrífuga, com auxílio de bastão de vidro apropriado, usando solução de extração preparada com Tris-HCl 0,1M, pH 8,5, PVP-40 4%, EDTA 0,2 %, ácido ascórbico 0,2 %, borato de sódio 0,38 %, cloreto de sódio 0,36 % e PEG 4%, as amostras permaneceram no gelo durante toda a manipulação. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 20.000 r.p.m. durante 30 minutos, na temperatura de 4 °C.

Os sobrenadantes foram adsorvidos em papel Whatman nº 3 (4x5mm) e aplicados em gel de amido 16% (penetrose @50), previamente preparado com soluções tampão adequadas para cada um dos sistemas enzimáticos analisados (Tabela 01). Após a migração, os géis foram cortados longitudinalmente em 2 ou 3 camadas, para proceder-se à coloração específica para cada isozima (Tabela 02). A incubação dos géis foi feita a 37°C.

Concluídas as reações de coloração, os géis foram lavados e fixados

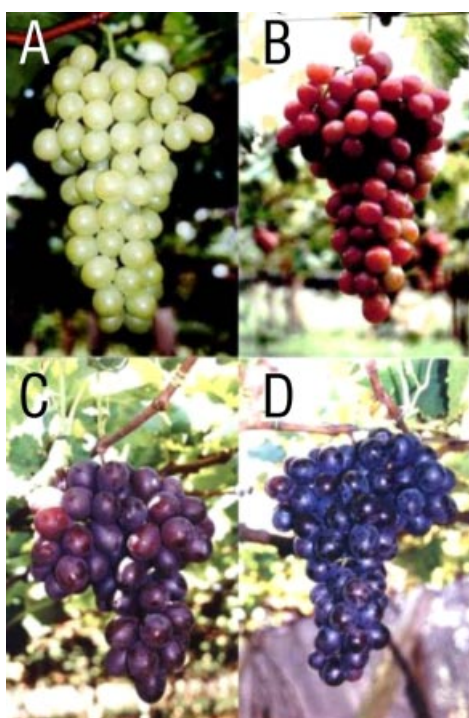


Figura 1. Frutos de *Vitis vinifera* L. A) cv. Itália, B) cv. Rubi, C) cv. Benitaka, D) Brasil

**Sandra Aparecida de Oliveira-Collet,
Sílvia Helena Zequim-Maia,
Claudete Aparecida Mangolin e
Maria de Fátima Pires da Silva Machado.**

Depto. de Biologia Celular e Genética,
Universidade Estadual de Maringá - UEM

com uma solução preparada com metanol, água destilada e ácido acético (5:5:1). Depois desse procedimento de fixação, os géis foram fotografados e registrados como esquemas.

2.2. Resultados e Discussão

As isozimas foram definidas por Market e Möller (1959) como formas moleculares múltiplas de um sistema enzimático que atuam sobre um mesmo substrato, e representam os produtos de genes constitutivos, podendo ser utilizadas, portanto, para avaliar a identidade genética entre os exemplares de uma amostra populacional.

A análise dos seis sistemas enzimáticos permitiu a identificação de 7 isoesterases, 8 isozimas malato desidrogenases, 2 isoperoxidasas, 2 isozimas glutamato desidrogenases, 2 isozimas fosfatase alcalina e 5 isozimas fosfatase ácida, totalizando assim, 26 isozimas que foram utilizadas como marcadores bioquímicos para a comparação individual das amostras de *V. vinifera*. A comparação destas isozimas revelou uma relativa uniformidade genética entre as cvs. 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil' (Figura 02).

A história do cultivo e desenvolvimento destas cvs. justificam estes resultados. De acordo com a viticultora Yassuko Yamanaka (informações pessoais), o cultivo da uva fina de mesa 'Itália' no município de Marialva (PR) foi iniciado na década de 60, pela colônia japonesa, com uma pequena quantidade de material vegetativo, cerca de 10 gemas, oriundas de uma propriedade no município Ferraz de Vasconcelos (SP). Os primeiros par-

reirais, plantados, estavam nas propriedades dos Senhores Yamanaka e Wakita, no ano de 1962; a partir destes, novos parreirais foram formados em diferentes propriedades na região noroeste do estado do Paraná.

Além dos fatores históricos e da propagação vegetativa que caracteriza o cultivo de 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil', as plantas destas cvs. de *V. vinifera* sofrem autofecundação. Estes eventos devem contribuir para a uniformidade genética. Um número significativo de pesquisas com isozimas de espécies colonizadas, primariamente autofecundadas, tem revelado que estas são geneticamente uniformes ou contêm um baixo nível de polimorfismo e de heterozigosidade (Allard et al., 1978, Crawford & Smith, 1979, Marshall & Weiss, 1982, Giles, 1983, Scribailo et al., 1984, Wolff & Jefferies, 1987a, b, Koniuszek & Verkeij, 1982, Van Oostrum et al., 1985, Sharitz et al., 1980).

Subden et al. (1987) estudaram a variabilidade isoenzimática de clones fenotipicamente distintos das cvs. 'Chardonnay' e 'Riesling' de *V. vinifera* e não detectaram diferenças entre os clones nessas cvs., apesar da diversidade morfológica apresentada por elas. Os autores concluíram que as diferenças fenotípicas entre as cvs., provavelmente, refletem polimorfismos de genes que controlam a morfologia das plantas, e não aqueles genes associados com o metabolismo intermediário.

Vários estudos têm mostrado que as variações morfológicas nem sempre estão associadas às alterações bioquímicas decorrentes de alterações em *loci* codificadores de isozimas

(Hamrick, 1989; Noh & Minocha, 1990; Nagai et al., 1991; Mangolin & Machado, 1997). As alterações economicamente significantes, ou mutações somáticas, que marcaram as diferentes cores dos frutos nas cvs. 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil', também não parecem estar associadas com mutações específicas em genes constitutivos, responsáveis pela codificação das isozimas analisadas neste estudo.

As mutações em setores da cv. 'Itália', que originaram as cvs. 'Rubi' e 'Benitaka', foram registradas somente uma vez (Kishino & Mashima, 1980; Sousa, 1996), e relatos de alguns produtores das regiões norte e noroeste do estado do Paraná, concordam com a proposição de que tais mutações devem ter ocorrido apenas uma única vez (informações pessoais, Eng. Agrônomo M. A. Collet). Por outro lado, os produtores já citados relataram em pelo menos 5 plantas da cv. 'Benitaka' mantidas em três propriedades diferentes, a ocorrência de alguns cachos característicos da cv. 'Brasil', no período 1995-2002 (Oliveira-Collet, 2003), indicando assim, que a conversão de fenótipo 'Benitaka' → 'Brasil' é um evento relativamente frequente.

Neste mesmo período foram relatadas reversões para o fenótipo 'Itália' em parreirais de 'Rubi' (cerca de 30 plantas com cachos apresentando setores de 'Itália', em 10 parreirais) e em parreirais de 'Benitaka' (figura 03, cerca de 40 plantas com cachos apresentando setores de 'Itália' em 10 parreirais), e para o fenótipo 'Benitaka', em parreirais de 'Brasil' (cerca de 200 plantas com cachos apresentando setores de 'Benitaka' em 6 parreirais).

Tabela 01. Sistemas Eletroforéticos para a análise das isozimas de *Vitis vinifera* L

	Sistema A	Sistema B
Tampão do Gel	Histidina-HCl 0,05M e EDTA 0,0014M, pH 7,0 ajustado com tris 1M, e diluído a 4:5	Tris 0,01 M e ác. cítrico 0,0028M, pH 7,5
Tampão dos Eletrodos	Tris 0,125 M, pH 7,0 ajustado com ácido cítrico 1M	Tris 0,1M e ac. cítrico 0,028M, pH 7,5
Condições da Corrida	15:30 horas 50 V no gel	5 horas e 35 mA na fonte

Sistema A: Utilizado para MDH e GDH

Sistema B: Utilizado para EST, ACP, POD e ALP

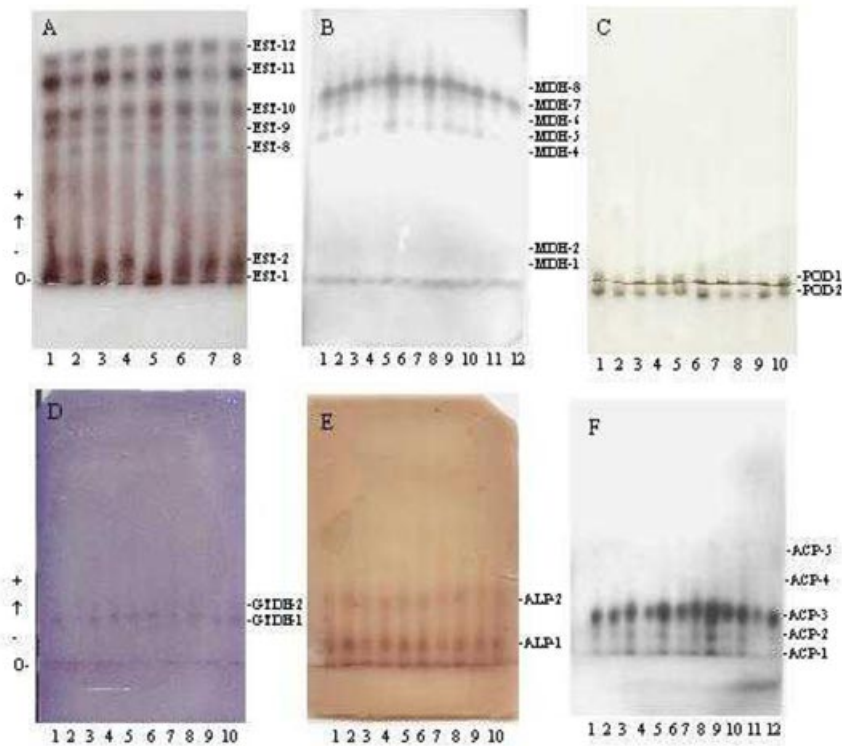


Figura 2. Géis de eletroforese de isozimas com amostras de brotos foliares das diferentes cvs. De *Vitis vinifera* de isozimas. A) esterase; B) malato desidrogenase; C) peroxidase; D) glutamato desidrogenase; E) fosfatase alcalina; F) fosfatase ácida

De acordo com essas evidências, e considerando que a expressão dos sete genes envolvidos na via do pigmento antocianina de *V. vinifera* seja controlada por um gene regulatório (Boss et al., 1996), a proposta do presente estudo para o surgimento das cvs. 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil' é que as alterações morfológicas que as distinguem devem ser decorrentes de alterações em pelo menos 4 genes regulatórios, envolvidos na expressão de antocianinas, determinantes da coloração dos frutos nessas cvs.

Um gene regulatório *C* permite a expressão da cor nas cvs. 'Rubi' e 'Benitaka'. Em contraste, o alelo *c* previne a expressão da cor, e a constituição *cc* apresenta um efeito epistático para a biossíntese de antocianinas nos frutos da cv. 'Itália'. Assim, uma mutação na composição *cc* de 'Itália' deve ter sido responsável pela origem dos setores contendo frutos com coloração rosada característicos das cvs. 'Rubi' e 'Benitaka'. A coloração rosa, mais intensa e uniforme, apresentada nos frutos da cv. 'Benitaka' deve estar sendo regulada por um gene *D*, determinante da distribuição uniforme

do pigmento antocianina, enquanto o genótipo *dd* determina uma coloração rosa mais clara e diluída.

A recuperação do fenótipo 'Itália', ocorrida em setores (ramos laterais ou cachos, Figura 03) de plantas 'Benitaka' (0.8%) e 'Rubi' (0.27%), indica uma recuperação da constituição do fenótipo homocigoto *cc*. Isso pode estar ocorrendo devido a eventos de *crossing-over* mitótico, uma vez que a recombinação somática é um dos processos que promovem a homocigotização de genes que estejam na condição heterocigota (Figura 04). Embora os eventos de recombinação somática sejam considerados raros, sua ocorrência em plantas tem sido descrita como associada com mutações induzidas por agentes físicos e químicos (Arenaz & Vig, 1978, Vig, 1982) e também associada às condições do cultivo *in vitro* (Machado et al., 2000).

As evidências moleculares para a ocorrência de recombinação mitótica nos genomas de plantas foram encontradas em *Nicotiana tabacum* (Peterhans et al., 1990), *Zea mays* (Das et al., 1990, 1991) e *Arabidopsis thali-*

ana (Assad & Singer, 1992). Diversos estudos têm mostrado que a recombinação mitótica em fungos permite a expressão de fenótipos de genes previamente encontrados no estado heterocigoto (Zimmermann, 1992; Kafer, 1977; Franzoni et al. 1997; Baptista & Castro-Prado, 1997).

Rearranjos somáticos podem explicar também a origem da cv. 'Brasil' a partir da cv. 'Benitaka' (0.1%), bem como a reversão fenotípica em plantas da cv. 'Brasil', originando setores com o fenótipo da cv. 'Benitaka' (28.57%). *Crossing-over* somático pode estar ocorrendo em genes determinantes da modificação de antocianinas em alguns setores de plantas de 'Benitaka'. Martin e Gerats (1993) registraram que o ajustamento da cor em flores na variedade críspa de *Perilla frutescens* é determinado por genes que codificam enzimas para a modificação de antocianinas, tais como glicosilação, acilação e metilação. Boss et al. (1996) mostraram que as cvs. de *V. vinifera* geralmente produzem diferentes tipos e quantidades de antocianinas; dezessete tipos de antocianina foram encontrados em amostras da cv. 'Shiraz'. Três tipos de antocianinas foram predominantes e determinados pela atividade de genes codificadores de enzimas que promovem a modificação de antocianinas. Assim, é possível sugerir que, na cv. 'Benitaka', os genótipos *MM* e *Mm* codificam enzimas que determinam o tipo de antocianina com coloração vermelho-ro-



Figura 3. Cacho de *Vitis vinifera* L. da cv. 'Benitaka', com setor apresentando reversão para o fenótipo da cv. 'Itália'

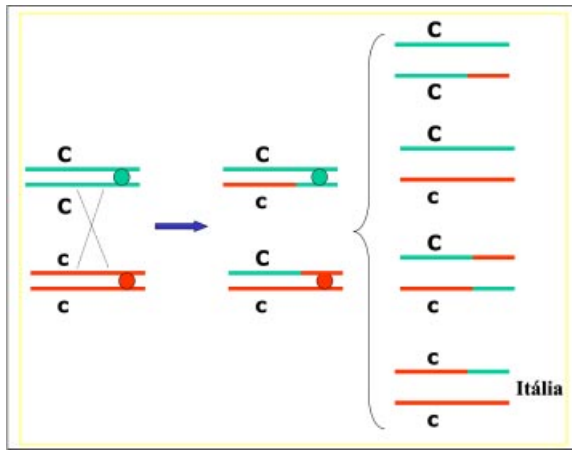


Figura 4. Esquema do crossing-over mitótico envolvendo os alelos **Cc** do gene regulatório que regula a expressão do pigmento antocianina. Este processo de recombinação somática promove a homozigotização de genes que estejam na condição heterozigota, e pode ser o responsável pela reversão dos fenótipos das cultivares ‘Rubi’ e ‘Benitaka’ para o fenótipo ‘Itália’

sada nas cascas de uvas maduras. *Crossing-over* somático, em setores do genótipo *Mm*, podem produzir a constituição *mm* que determina uma expressão alterada para a modificação de antocianina e marca a cor escura (preta ou violeta-avermelhada) das cascas dos frutos da cv. ‘Brasil’.

A reversão para o fenótipo ‘Beni-

taka’, em setores da ‘Brasil’, pode estar ocorrendo por ação de alelos supressores (*su*) que cancelam a expressão do alelo *m* e restauram o fenótipo correspondente *M₋*. O *crossing-over* somático no gene supressor (*Susu*), em setores da cv. ‘Brasil’, produz a constituição *susu* em ramos e cachos, de modo que o genótipo *mm/susu* apresenta o fenótipo *M₋* de plantas da cv. ‘Benitaka’ (Figura 05).

Os estudos com plantas e fungos têm indicado que os eventos de recombinação somática são frequentemente associados com a ocorrência de mutações (Gorbunova et al., 2000; Baptista e Castro-Prado, 2002). Duplas quebras na molécula de DNA podem estimular a recombinação durante a mitose. Em cultura de tecidos de calos, a ocorrência de *crossing-over* somático foi considerada como um dos possíveis mecanismos que induzem variação somaclonal (Machado et al., 2000). As características morfológicas dos somaclones produzidos *in vitro* regeneraram caules com características morfológi-

cas de cvs. e espécies encontradas em populações naturais do gênero (Mangolin et al., 1997).

O polimorfismo de cores de frutos nas cvs. de *V. vinifera*, da região de Marialva, indica a ocorrência de *crossing-over* somático em plantas cultivadas na natureza. Os rearranjos somáticos podem explicar a origem de novos cvs. e serem responsáveis pela instabilidade fenotípica das cvs. ‘Rubi’, ‘Benitaka’ e ‘Brasil’.

3. Análises moleculares dos cvs. de *V. vinifera*

3.1. Metodologia

Para a extração do DNA foram utilizadas amostras de folhas jovens (recém-expandidas), coletadas de 14 plantas de cada uma das quatro cvs. de *V. vinifera*, em parreirais localizados nos municípios de Marialva e Paçandu (PR). A extração foi efetuada com 100 mg de tecido em microtubos, através do método descrito por Thomas et al. (1993). A seguir as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C com ocasionais inversões. Após a incubação, as amostras foram retiradas do banho e ao alcançarem a temperatura ambiente foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico, preparado na proporção 24:1.

Tabela 02. Método de Coloração das isozimas analisadas nos tecidos de *Vitis vinifera* L.

Reagentes	EST cromogênicas	MDH	ACP	POD	ALP	GDH
Tampão	50ml de fosfato de sódio 0,05M, pH 6,5	15ml de tris-HCl 0,1M	50ml de acetato de Na 0,1M, pH 5,0	25ml de acetato de Na 1M, pH 4,7	50ml de tris 0,05M, pH 8,5	50 ml de tris-HCl 0,1 M, pH 8,0
Substrato	4ml de α ou β naftil acetato	150 mg de ácido málico, ajustar o pH para 8,6 após adição do tampão	1,5ml de naftil fosfato 1%	2 ml de H ₂ O ₂	1,5ml de naftil fosfato 1%	300 mg de ácido glutâmico
Cofator		6 mg de NAD ⁺			0,5ml MgCl ₂ 1M 0,5ml MnCl ₂ 1M	6 mg de NAD
Corante	40mg de fast blue RR salt	0,5ml de MTT(5mg/ml) 0,8ml de PMS (5mg/ml)	25mg de fast blue RR salt	50mg de benzidina	50mg de fast blue RR salt	0,5ml de MTT(5mg/ml) 0,8ml de PMS (5mg/ml)
Outros		15ml de agar 2%		25 ml de metanol		0,5 ml de CaCl ₂ 10 mM

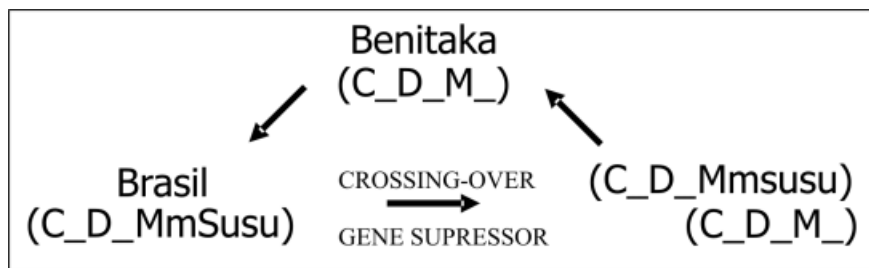


Figura 5. Esquema indicando a origem da cv. 'Brasil' a partir da cv. 'Benitaka' e a reversão do fenótipo 'Brasil' para 'Benitaka'. A recombinação somática promovendo a homozigotização de genes é a responsável por estes dois eventos

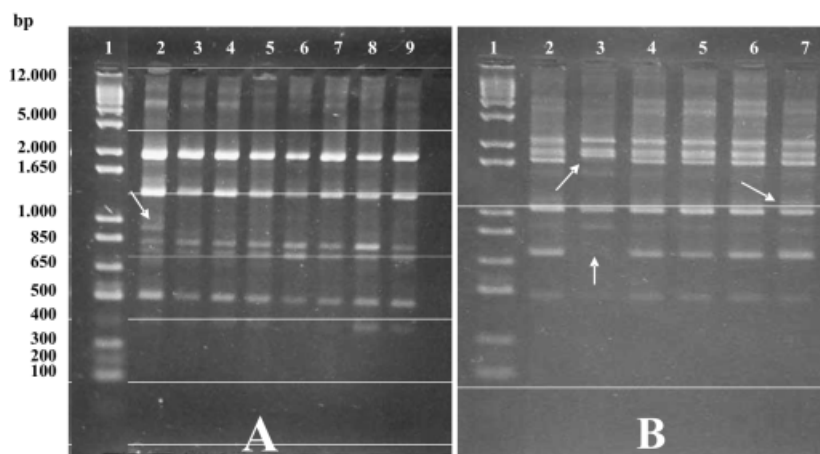


Figura 6. Fragmentos de RAPD das cultivares de *V. vinifera* utilizando os "primers" da Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) **(A)** OPE-14 utilizado para amplificar o DNA da cultivar Itália (1) e cultivar Benitaka (2-9) **(B)** OPM-03 utilizado para amplificar o DNA da cultivar Itália, as setas apontam para os fragmentos polimórficos. Em 1 A e B, marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder

Tabela 03. Seqüências do programa para a amplificação do DNA de *Vitis vinifera*

Procedimento	
Desnaturação Inicial	94 °C 5 Min.
Desnaturação ¹	94 °C 45 Seg.
Anelamento ²	35 °C 45 Seg.
Extensão ³	72 °C 1 Min. 15 Seg.
Extensão Final	72 °C 5 Min. 15 °C ∞

^{1,2,3.} Passos do ciclo de amplificação foram repetidos 45 vezes

As fases foram separadas por centrifugação em 16.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi coletada e adicionado 0,54 do volume obtido de isopropanol gelado para precipitar o DNA.

O "pellet" de DNA obtido foi separado por centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos e ressuspenso em 100 µL de TE (Tris/ HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0) contendo 15 µg de Rnase, incubado em temperatura ambiente por 30 minutos.

Para precipitar as proteínas foi utilizado 50 µL de acetato de amônio a 7,5 M; após este tratamento as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e o DNA foi precipitado com 0,54 volumes de isopropanol gelado, centrifugado nas condições previamente descritas. O sobrenadante foi descartado, o "pellet" foi seco na temperatura ambiente, e ressuspenso em 100 µL de TE para ser estocado a 4 °C.

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro Beckman DU-65 e a quantificação foi confirmada em géis de agarose 0,8% preparado com tampão TAE 1X (Tris, acetato de sódio, EDTA, pH 8,0 - Hoisington et al., 1984) usando soluções de DNA padrão (fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas. O gel foi corado em solução de brometo de etídio contendo 0,5 µg/ml e visualizado sobre transiluminador e fotografado sob luz ultravioleta.

As reações de amplificação foram preparadas em microtubos de 0,2 mL com um volume final de reação de 20 µL. Como base para a amplificação foi utilizado o protocolo original descrito por Williams et al. (1990), e após a padronização das concentrações dos reagentes foram testados 20 "primers" dos quites A, B, E e alguns "primers" dos quites F, I, M e P (Operon Technologies Inc, - Alameda, CA, USA), totalizando 70 "primers" avaliados.

As condições para a amplificação estão descritas na tabela 02. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 2 % usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA) com 60 Volts por 6 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio e a imagem foi capturada com Ultraviolet Transilluminator High Performan-

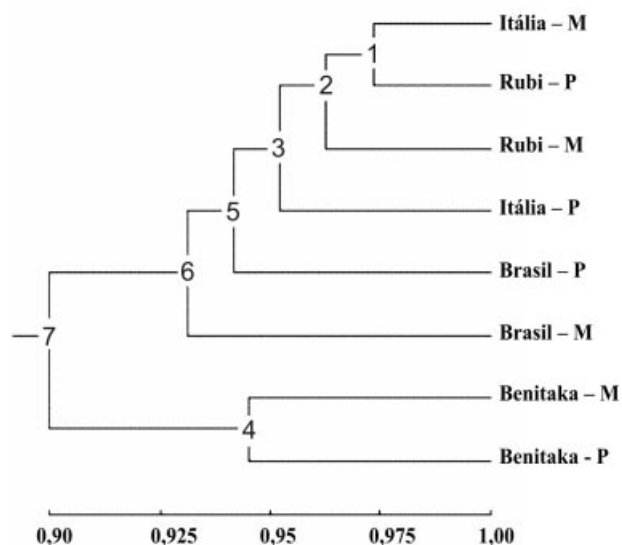


Figura 7. Dendrograma representando a relação entre as cultivares Itália, Rubi, Benitaka, e Brasil de *Vitis vinifera* das regiões de Marialva (M) e Paçandu (P) no estado do Paraná, a distância genética foi baseada no emprego do método de UPGMA o agrupamento foi obtido a partir dos fragmentos produzidos por 10 “primers” de RAPD

analisadas reflete a variabilidade genética presente nas quatro cvs. da espécie *V. vinifera* (figura 06).

A análise de agrupamento realizada para as 55 plantas das quatro diferentes cultivares, utilizando o coeficiente de Jaccard, mostrou que apesar do número de fragmentos polimórficos ter sido diferente (tabela 1) estas formam um só grupo, onde a maior parte foi agrupada entre 80 – 90 % de similaridade (Zequim-Maia, 2003). Esta análise não agrupou as amostras das diferentes cultivares de uva e nem de acordo com as diferentes regiões de cultivo (Marialva e Paçandu). Através da análise de identidade genética de Nei (1978), as quatro cvs de *V. vinifera* procedentes de Marialva e Paçandu foram distribuídas em 8 grupos com diferentes valores de identidade genética. Entretanto, nesta análise as quatro cvs. também não foram agrupadas de acordo com a coloração dos bagos e nem com a região de cultivo (Figura 07). As cvs. ‘Itália’ de Marialva e ‘Rubi’ de Paçandu apresentaram a maior identidade genética (0,9547) e a menor identidade genética foi encontrada entre ‘Itália’ de Paçandu e ‘Benitaka’ de Paçandu (0,8954) (Tabela 2).

A avaliação realizada utilizando o marcador RAPD mostrou que este é uma importante ferramenta para estudar polimorfismo nas cvs. ‘Itália’, ‘Rubi’, ‘Benitaka’ e ‘Brasil’. Apesar das quatro cultivares possuírem origem comum, o polimorfismo foi avaliado em 72 % (Zequim-Maia, 2003). Este alto polimorfismo é contrastante com

ce -Edas 290 utilizando o programa Kodak 1D 3.5. Para definir o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular ‘1Kb DNA Ladder’ (Gibco - BRL).

A análise dos produtos das ampliações foi realizada em termos da presença ou ausência de cada fragmento de DNA amplificado, e a similaridade entre as plantas foi calculada empregando o coeficiente de Jaccard e análise de agrupamento UPGMA usando o programa NTSYS-pc (Rohlf, 1989).

3.2. Resultados e Discussão

Em contraste com a uniformidade genética detectada a partir de marca-

dores bioquímicos (Oliveira-Collet, 2003), a análise molecular através de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) evidenciou diferenças entre as amostras individuais das quatro cultivares.

A análise dos produtos de amplificação mostrou que os *primers* OPA-13, OPB-01, OPB-07, OPE-03, OPE-14, OPE-15, OPF-05, OPM-03, OPP-08, e OPP-10 geraram 135 fragmentos reproduzíveis, dos quais 81 foram polimórficos nas plantas da cv. ‘Itália’, 77 foram polimórficos nas plantas da cv. ‘Rubi’, e 84 e 79 fragmentos foram polimórficos nas plantas das cvs. ‘Benitaka’ e ‘Brasil’, respectivamente (Tabela 1). O polimorfismo de RAPD observado nas amostras de uvas

Tabela 04. Polimorfismo obtido com os *primers* selecionados para a avaliação das cultivares de *V. vinifera*.

Primers	Total de Fragmentos	Fragmentos Polimórficos /Cultivar - %				
		Itália	Rubi	Benitaka	Brasil	Total - %
OPA-13	14	10 - 71%	09 - 64%	08 - 57%	08 - 57%	11 - 78
OPB-01	10	06 - 60%	05 - 50%	07 - 70%	07 - 70%	07 - 70
OPB-07	12	10 - 83%	08 - 66%	08 - 66%	06 - 50%	10 - 83
OPE-03	17	06 - 35%	08 - 47%	12 - 70%	08 - 47%	13 - 76
OPE-14	15	07 - 46%	08 - 53%	09 - 60%	08 - 53%	09 - 60
OPE-15	15	11 - 73%	09 - 60%	10 - 66%	10 - 66%	12 - 80
OPF-05	13	07 - 53%	08 - 61%	09 - 69%	08 - 61%	10 - 76
OPM-03	12	05 - 41%	05 - 41%	03 - 25%	05 - 41%	05 - 41
OPP-08	20	14 - 70%	12 - 60%	13 - 65%	15 - 75%	16 - 80
OPP-10	07	05 - 71%	05 - 71%	05 - 71%	04 - 57%	05 - 71
Total	135	81 - 60%	77 - 57%	84 - 62%	79 - 58,5%	98 - 72,5%

Tabela 05. Medida da identidade e da distância genética para as cultivares Itália, Rubi, Benitaka, e Brasil de *Vitis vinifera* das regiões de Marialva (M) e Paçandu (P). Estas medidas foram obtidas através do método descrito por Nei (1978).

Pop Pop	Itália-M	Itália-P	Brasil-M	Brasil-P	Benitaka-M	Benitaka-P	Rubi-M	Rubi-P
Itália-M	0,0000	0,9511	0,9537	0,9441	0,9392	0,9061	0,9526	0,9547
Itália-P	0,0502	0,0000	0,9377	0,9372	0,9391	0,8994	0,9418	0,9501
Brasil-M	0,0474	0,0644	0,0000	0,9384	0,9437	0,9222	0,9363	0,9357
Brasil-P	0,0576	0,0649	0,0636	0,0000	0,9356	0,9304	0,9403	0,9489
Benitaka-M	0,0628	0,0628	0,0579	0,0665	0,0000	0,9459	0,9424	0,9406
Benitaka-P	0,0986	0,1060	0,0809	0,0721	0,0556	0,0000	0,9140	0,9151
Rubi-M	0,0485	0,0600	0,0658	0,0615	0,0593	0,0899	0,0000	0,9517
Rubi-P	0,0463	0,0512	0,0664	0,0525	0,0612	0,0888	0,0495	0,0000

Diagonal superior Identidade Genética de Nei e diagonal inferior Distância Genética

a similaridade descrita para variedades desenvolvidas a partir de brotações (Tamhankar *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 1998). Por outro lado, o alto polimorfismo encontrado na população destas uvas é uma evidência de que mutações e recombinações somáticas estejam ocorrendo, em genes reguladores. A divergência genética gerada por estes eventos é alta, mas as análises de agrupamento indicam que as alterações ocorridas não são suficientes para caracterizar 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil' como cvs. Assim estas três uvas coloridas podem ser definidas, simplesmente, como tipos ou clones da cv. 'Itália'.

4. Conclusões

As alterações ou mutações que marcaram as diferentes cores dos frutos nas cvs. 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil' não estão associadas a mutações específicas em genes constitutivos, responsáveis pela codificação das isozimas avaliadas, mas podem estar relacionadas com o polimorfismo detectado em seqüências RAPD analisadas neste estudo, em decorrência da mutação e recombinação mitóticas em genes regulatórios.

O polimorfismo de RAPD observado nas plantas de uvas analisadas reflete a variabilidade genética presente nas cvs. 'Itália', 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil', mas as referidas cvs. formam um único grupo, independente das características fenotípicas (coloração das bagas), e da região de cultivo (Marialva e Paçandu). Assim, as pequenas diferenças detectadas através de RAPD

determinam que 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil' sejam definidas como tipos ou clones da cv. 'Itália'.

5. Agradecimentos

Ao Eng^o Agrônomo Marcos André Collet, pelo auxílio nas inúmeras coletas das folhas de uva e valiosas informações, e aos viticultores da região de Marialva (PR) e Paçandu (PR) que colaboraram para a realização deste trabalho.

6. Referências Bibliográficas

ALLARD, R.W.; MILLER, R.D., KAHLER, A.L. The relationship between degree of environmental heterogeneity and genetic polymorphism. In Soltis, D.E., and Soltis, P. S. (eds.), **Isozymes in Plant Biology**, Dioscorides Press, Portland, OR, pp. 106-122, 1978.

ARENAS, P.; VIG, B.K. Somatic crossing-over in *Glycine max* (L.) *merrill*: activation of dimethyl nitrosamine by plant seed and comparison with methyl nitrosourea in inducing somatic mosaicism. **Mutat. Res.** 52, 367-380, 1978.

ASSAAD, F.F.; SINGER, E.R. Somatic and germinal recombination of a direct repeat in **Arabidopsis**. **Genetics** 132, 553-566, 1992.

BAPTISTA, F.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Benlate-induced homozygosity from heterozygous diploid strains in *Aspergillus ni-*

dulans. **Cytologia** 62, 389-396, 1997.

BAPTISTA, F.; CASTRO-PRADO, M.A.A. *uvsZ1* mutation shows epistatic relations with *uvsD153* and *uvsJ1* mutations without any involvement with checkpoint control in *Aspergillus nidulans*. **Biol. Res.** 35, 441-446, 2002.

BOSS, P.K.; DAVIS, C.; ROBINSON, S. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. **Plant Physiol.** 111, 1059-1066, 1996.

CRAWFORD, D.J.; SMITH, E.B. Allozyme variation in several closely related diploid species of *Cheopodium* of the western United States. **Amer. J. Bot.** 66: 237-244, 1979.

DAS, O.P.; LEVI-MINZI, S.; KOURY, M.; BENNER, M.; MESSING, J. A somatic gene rearrangement contributing to genetic diversity in maize. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87, 7809-7813, 1990.

DAS, O.P.; POLIAK, E.; WARD, K.; MESSING, J. A new allele of the duplicated 27kD *zein* locus of maize generated by homologous recombination. **Nucleic Acid Res.** 19, 3325-3330, 1991.

FRANZONI, M.G.M.; CASTRO-PRADO, M.A.A.; GEBARA, J.S. On recombination activity of norfloxacin in a diploid strain of *Aspergillus nidulans*. **Cytologia** 62, 39-47, 1997.

- GILES, B.E. A Comparison between quantitative and biochemical variation in the wild barley *Hordeum mirinum*. **Evolution** 38: 34-41, 1983.
- GONÇALVES, J.A. Paraná descobre nova variedade de uva. *Folha de São Folha*, São Paulo, 12 dez. 1995. **Agrofolha**, p.1.
- GORBUNOVA, V.; AVIVI-RAGOLSKI, N.; SHALEV, G.; KOVALCHUK, I.; ABBO, S.; HOHN, B.; LEVY, A.A. A new hyperrecombinogenic mutant of *Nicotiana tabacum*. **Plant J.** 24, 601-611, 2000.
- HAMRICK, J.L. Isoenzymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In Soltis, D.E., and Soltis, P. S. (eds.), **Isozymes in Plant Biology**, Dioscorides Press, Portland, OR, pp. 87-105, 1989.
- HOISINGTON, D., M. KHAIRALLAH, D. GONZÁLEZ-DE-LEÓN. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second Ed, Mexico, DF: CIMMYT, 50 p. 1984.
- KAFER, E. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. **Adv. Genet.** 19, 131-133, 1977.
- KISHINO, A. Y.; MASHIMA, M. Uva: *Vitis vinifera* L. **Manual Agropecuário do Paraná**. Londrina: IAPAR, p. 138-177, 1980.
- KONIUSZEK, J.W.J.; VERKEIJ, J.A.C. Genetic variation in two related annual *Senecio* species occurring in the same habitat. **Genetica** 59: 133-137, 1982.
- MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA-COLLET, S.A. Somatic crossing-over can induce isozyme variation in somaclones of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Haseltonia** 7, 77-80, 2000.
- MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme extraction from shoot tissue of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) for electrophoretic analysis. **Biochem. Genet.** 35, 205-210, 1997.
- MARKET, C. L.; MÖLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 45: 753-763, 1959.
- MARSHALL, D.R.; WEISS, P.W. Isozyme variation within and among Australian populations of *Emex spinosa* L. **Campd. Austral. J. Biol.** 35: 327-332, 1982.
- MARTIN, C.; GERATS, T. The control of flower coloration. In: BR Jordan, ed., **The Molecular Biology of Flowering**. CAB International, Wallingford, CT, 219-255, 1993.
- NAGAI, C.; AHLOOWALIA, B.S.; Tew, T.L. Somaclonal variants from an intergeneric hybrid: *Saccharum* spp. Hybrid X *Eriantbus arundinaceum*. **Euphytica** 53: 193, 1991.
- NEI, M. Estimates of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Baltimore, v. 89, p. 583-590, 1978.
- NOH, E.-W.; Minocha, S.C. Pigment and isozyme variation in aspen shoots regenerated from callus cultures. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 23: 39, 1990.
- OLIVEIRA-COLLET, S. A. **Caracterização Isoenzimática de Cultivares de Uva de Mesa Vitis vinifera L. (Vitaceae)**. Tese de doutorado. Maringá. UEM. 84p., 2003.
- PETERHANS, A.; SCHLUPMANN, H.; BASSE, C.; PASZKOWSKI, J. Intrachromosomal recombination in plants. **EMBO J.** 9, 3437-3445, 1990.
- ROHLF, F.J. *NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system*, version 1,50 – 1989. New York Exeter Publ New York.
- SCRIBAILLO, R.W.; CAREY, K.; POSLUSZNY, V. Isozyme variation and the reproductive biology of *Hydrocharis morsus-ranae* L. (Hydrocharitaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 89: 305-312, 1984.
- SHARITZ, R.R.; WINERITER, S.A.; SMITH, N.H.; LUI, E.H. Comparison of isozymes among *Typha* species in the eastern United States. **Amer. J. Bot.** 67:1297-1303, 1980.
- SOUSA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. 2 ed. Rev. Aum. Piracicaba: FEALQ, 791p., 1996.
- SUBDEN, R.E.; KRIZUS, A.; LOUGHEED, S.C.; CAREY, K. Isozyme characterization of *Vitis* species and some cultivars. **Am. J. Enol. Vitic.** 38(3): 176-181, 1987.
- TAMHANKAR, S. A.; PATIL, S.G.; RAO, V. S. Assessment of the genetic diversity of some important grape genotypes in India using RAPD markers. **Vitis** 40:157-161, 2001.
- THOMAS, M.R. E SCOTT, N.S. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites, STSs. **Theor. Appl. Genet.** 86: 985-990, 1993.
- THOMAS, M. R.; CAIN, P.; SCOTT, N. S. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. **Plant Mol. Biol.** 25: 939-949, 1994.
- VAN OOSTRUM; H.; STERK, A.A.; WIJSMAN, H.J.W. Genetic variation in agamosperous microspecies of *Taraxacum* sect. *Erythrosperma* and sect. *oblique*. **Heredity** 55: 223-228, 1985.
- VIG, B.K. Soybean (*Glycine max* [L.] *merrill*) as a short-term assay for study of environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.** 99, 339-347, 1982.
- WOLFF, S.L.; JEFFERIES, R.L. Morphological and isozyme variation in *Salicornia europaea* (s.l.) (Chenopodiaceae) in northeastern North America. **Canad. J. Bot.** 65: 1410-1419, 1987a.
- WOLFF, S.L. JEFFERIES, R.L. Taxonomic status of diploid *Salicornia europaea* (s.l.) (Chenopodiaceae) in northeastern North America. **Canad. J. Bot.** 65: 1420-1426, 1987b.
- ZEQUIM MAIA, S.H. **Diversidade Genética em Uvas Finas de Mesa Vitis vinifera L. (Vitaceae)**. Dissertação de mestrado. Maringá. UEM.35 p., 2003
- ZIMMERMANN, F. K. Tests for recombinagens in fungi. **Mutat. Res.** 284: 147-158, 1992. 🌱