

NOVAS ABORDAGENS PARA IDENTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA
AO *Pratylenchus brachyurus* E ESTRUTURA GENÉTICA DE
SEGREGANTES INTERESPECÍFICOS EM ESPÉCIES DE *Vitis*

PAULO RICARDO DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2018

NOVAS ABORDAGENS PARA IDENTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA
AO *Pratylenchus brachyurus* E ESTRUTURA GENÉTICA DE
SEGREGANTES INTERESPECÍFICOS EM ESPÉCIES DE *Vitis*

PAULO RICARDO DOS SANTOS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento de
Plantas.”

Orientador: Prof^o. Dr. Alexandre Pio Viana

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

065/2018

S237 Santos, Paulo Ricardo dos.

Novas abordagens para identificação da resistência ao *Pratylenchus brachyurus* e estrutura genética de segregantes interespecíficos em espécies de *Vitis* / Paulo Ricardo dos Santos. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

110 f.

Bibliografia: 84 – 95.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientador: Alexandre Pio Viana.

1. Videira. 2. Lesões Radiculares. 3. Marcadores Microsatélites. 4. Procedimento Ward-MLM. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.8

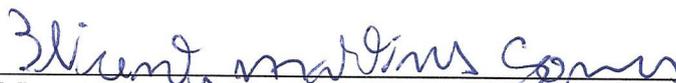
NOVAS ABORDAGENS PARA IDENTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA
AO *Pratylenchus brachyurus* E ESTRUTURA GENÉTICA DE
SEGREGANTES INTERESPECÍFICOS EM ESPÉCIES DE *Vitis*

PAULO RICARDO DOS SANTOS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 9 de março de 2018.

Comissão Examinadora:



Prof. Vicente Gomes Martins (D.Sc., Produção Vegetal) - IFF



Prof.^a Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof. Marcelo Vivas (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF



Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Roberto Ricardo dos Santos e Silvânia Maria dos Santos; A meus irmãos Paulo Alberto dos Santos e Ana Paula dos Santos e ao meu padrasto Roberto Ricardo dos Santos, que depositaram sua confiança em mim e que sempre estiveram ao meu lado em todas as etapas de minha vida

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela minha vida, por essa luz que me guia de tantas bênçãos concedidas e que me ajudam a crescer diariamente no conhecimento da Tua sabedoria.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense pela oportunidade para a realização do curso de doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas.

À *University of California* – UC Davis pelo meu treinamento no intercâmbio em realizado no exterior pelo Programa de Doutorado Sanduíche em Davis na Califórnia - EUA.

À CAPES e FAPERJ, pela concessão da bolsa do meu doutorado aqui no Brasil e auxílio financeiro para realização do meu intercâmbio em Davis na Califórnia - EUA.

Ao Prof. Dr. Alexandre Pio Viana, pela orientação, oportunidade, confiança e ensinamentos, que juntos se fizeram os ingredientes importante para minha formação acadêmica.

Ao professor PhD. Andrew Walker, pela orientação e oportunidade que me foi dada em seu Lab para realização do meu Doutorado Sanduiche em Davis.

À Prof. Dra. Rosana Rodrigues, pela orientação, apoio constante e inestimável colaboração, indispensável na concretização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Amaral Júnior, pelos ensinamentos, confiança, preciosa cooperação, essenciais para minha formação.

Ao Prof. Dr. Vicente Gomes, pelo apoio, ensinamentos e incentivo para essa pesquisa.

À pesquisadora Dra. Helena pelas valiosas contribuições nas análises moleculares.

Aos pesquisadores e funcionários do “Walker’s Lab”, especialmente a Summaira, Hong e Dan pelas valiosas contribuições e apoio no Laboratório da UCDavis.

Aos professores do programa em Genética e Melhoramento de Plantas – UENF, sobretudo aos Professores Alexandre, Messias, Amaral, Rosana, Gonçalo, Telma, pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas ministradas.

Aos amigos Brasileiros e estrangeiros que foram muito importantes pra mim durante minha estadia em Davis, Sara, Makiko, Elise, Gabriela, Fernandes, Bruno, Duka, Luises, Mariana, Letícia, Welligton, Pablo, Paola, Tiago, Wilson, Ana, Erika e Renata.

Aos amigos da Pós-Graduação da UENF, Zé Arantes, Jokarla, Nayara, Tathiana, Tâmaras, Adriano, Ismael, Yuri, André, Afonso, Gabrielle, Derivaldo, Lúgia, Janeo, Arthur, Caio, Fábio e Maxwell pelo apoio, colaboração, amizade e companheirismo.

A todos os amigos do laboratório 222 e P8, Odimar, Raiani, Flávia, Sandra, Nardélio, Daniele, Rodrigo, Géssica, Carlos, Bruno, Ravena, Júnior, Fernando, Natan, Moysés, Marcela, Beatriz e Valquíria, pela colaboração na execução do trabalho e, sobretudo pelas horas de descontração, amizade, apoio e companheirismo.

Ao secretário Daniel, pela amizade, aconselhamentos, por estar sempre disponível em nos ajudar.

À minha família, aos meus pais, Roberto e Silvânia, pelo amor incondicional e ensinamentos da vida. Aos meus irmãos, Paulo Alberto, Ana Paula e Mayra, pelo incentivo e amizade.

A todos, enfim, o meu sincero reconhecimento pela colaboração e participação neste importante trabalho.

EPÍGRAFE

Travessia

Quando você foi embora
Fez-se noite em meu viver
Forte eu sou mas não tem jeito
Hoje eu tenho que chorar
Minha casa não é minha
E nem é meu este lugar
Estou só e não resisto
Muito tenho pra falar

Solto a voz nas estradas
Já não quero parar
Meu caminho é de pedra
Como posso sonhar
Sonho feito de brisa
Vento vem terminar
Vou fechar o meu pranto
Vou querer me matar

Vou seguindo pela vida
Me esquecendo de você
Eu não quero mais a morte
Tenho muito que viver
Vou querer amar de novo
E se não der não vou sofrer
Já não sonho, hoje faço
Com meu braço o meu viver

Fernando Brant / Milton Nascimento

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. CAPÍTULOS	7
3.1.RESISTÊNCIA AO <i>Pratylenchus Brachyurus</i> EM SEGREGANTES INTERESPECÍFICOS DE <i>Vitis</i> spp. POR MEIO DE ABORDAGENS MULTIVARIADAS E MODELOS MISTOS	7
3.1.1. INTRODUÇÃO	7
3.1.2. REVISÃO	9
3.1.2.1. A cultura da videira	9
3.1.2.2. Melhoramento da videira	11
3.1.2.3. Métodos estatísticos multivariados em diversidade genética	13
3.1.2.4. Nematóide das lesões radiculares na videira	16
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1.3.1. Populações avaliadas	20
3.1.3.2. Condução do experimento e fenotipagem	23
3.1.3.3. Análise multivariada pelo procedimento Ward-MLM.....	27
3.1.3.4. Estimativas de parâmetros genéticos e seleção individual via procedimento REML/BLUP	28
3.1.4. RESULTADOS.....	30
3.1.4.1. Análise multivariada pelo procedimento Ward-MLM.....	30

3.1.4.2. Estimativas de parâmetros genéticos e seleção individual via procedimento REML/BLUP	37
3.1.5. DISCUSSÃO	40
3.1.6. CONCLUSÕES	44
3.2. SELEÇÃO DE CLONAL EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE <i>Vitis</i> spp. RESISTENTES AO NEMATÓIDE DAS LESÕES RADICULARES (<i>Pratylenchus brachyurus</i>) VIA PROCEDIMENTO REML/BLUP.....	45
3.2.1. INTRODUÇÃO.....	45
3.2.2. REVISÃO	47
3.2.2.1. Metodologia dos modelos mistos no melhoramento de plantas ...	47
3.2.2.2. Parâmetros genéticos e correlações entre caracteres.....	49
3.2.2.3. Princípios e importância da seleção clonal	51
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.2.3.1. Híbridos interespecíficos avaliados.....	52
3.2.3.2. Instalação do experimento, inoculação e avaliação.....	52
3.2.3.3. Características avaliadas	53
3.2.3.4. Análise estatística das características	54
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
3.2.5. CONCLUSÕES	64
3.3. DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR EM SEGRAGANTES DE <i>Vitis</i> : IMPLICAÇÕES PARA O MELHORAMENTO DA Videira VISANDO RESISTÊNCIA AO <i>P. brachyurus</i>	65
3.3.1. INTRODUÇÃO	65
3.3.2. REVISÃO	67
3.3.2.1. Uso de marcadores microssatélites (SSR) no estudo de diversidade genética em videira.....	67
3.3.2.2. Hibridação interespecífica na videira	69
3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3.3.3.1. Material vegetal.....	70
3.3.3.2. Extração e quantificação do DNA genômico.....	72
3.3.3.3. Amplificação dos marcadores microssatélites SSR.....	72
3.3.3.4. Análise das variáveis moleculares	74
3.3.4. RESULTADOS.....	75
3.3.5. DISCUSSÃO	79
3.3.6. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

RESUMO

SANTOS, Paulo Ricardo dos; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2018; NOVAS ABORDAGENS PARA IDENTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO *Pratylenchus brachyurus* E ESTRUTURA GENÉTICA DE SEGREGANTES INTERESPECÍFICOS EM ESPÉCIES DE *Vitis*; Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana; Conselheiros: Prof^a Rosana Rodrigues, Prof^o Antônio Teixeira do Amaral Júnior

O nematoide das lesões radiculares causado por *Pratylenchus brachyurus*, é a uma doença considerada de grande importância econômica para a videira. O cruzamento interespecífico apresenta importantes implicações dentro do programa de melhoramento da uva, especialmente no intuito da introgressão de genes de uma espécie resistente para outra suscetível. O presente estudo apresenta como objetivos: avaliar a resistência ao nematoide das lesões radiculares em populações segregantes de espécies de *Vitis*; caracterizar genitores e híbridos de *Vitis*; quantificar a diversidade e estruturação genética entre os indivíduos da população via marcadores moleculares microssatélites, descritores morfológicos quantitativos e qualitativos por métodos estatísticos multivariados; identificar genótipos próximos ou distantes geneticamente e defini-los em grupos; quantificar a variabilidade genética por meio da estimação de parâmetros, seleção genotípica de indivíduos da população segregante de videira, via modelos mistos por REML/BLUP, e associações entre caracteres de importância agrônômica para seleção de resistentes. Para os estudos para seleção de indivíduos resistentes ao nematoide das lesões radiculares e

fenotipagem de descritores morfológicos em casa de vegetação, foram avaliadas três populações segregantes, com 57 híbridos do cruzamento, entre os genitores, *Vitis romanetii* C166-043 x 07355-075, 06354-047 x Cereza e 06354-047 x Nocera, provenientes do Banco de Germoplasma da University of Califórnia. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com duas repetições e três plantas por parcela. As plantas foram inoculadas com suspensão de 600 espécimes de *P. brachyurus*. Determinou-se a massa de raízes, nematoides por grama de raiz e o fator de reprodução que foram utilizadas como as variáveis quantitativas e, foram também avaliados 16 descritores multicategóricos. As características foram analisadas utilizando o procedimento Ward-Modified location model (Ward-MLM) para composição dos grupos de genótipos e foram estimados parâmetros genéticos e a predição dos valores genéticos pela Restricted maximum likelihood/Best linear unbiased prediction (REML/BLUP). A estratégia de classificação Ward-MLM, permitiu a formação de três grupos homogêneos, em que, o grupo I foi constituído por 13 híbridos, o II por 26 híbridos e o III por 18 híbridos, sendo estes dois últimos grupos os que alocaram os híbridos resistentes ao *P. brachyurus*. Foram verificados altos valores para herdabilidade no sentido amplo para massa de raízes, fator de reprodução e nematoides por grama de raiz, o que evidenciou ganho genético e seleção de genótipos resistentes, a partir da clonagem dos materiais, visto que a totalidade da variância genética são advindas dos efeitos dominância. Dos 57 genótipos avaliados foram selecionados como resistentes aqueles que apresentaram os menores valores genotípicos para fator de reprodução, entre os quais: CH3.2, CH3.23, CH3.8, CH3.37, CH3.38, CH3.41, CH3.36, CH2.1, CH2.7, CH1.1, CH1.3 e CH1.2. Para aumentar o tamanho de indivíduos selecionados foi considerado uma nova classificação para seleção com base não somente nos valores genéticos (u+g) fator de reprodução, e sim no índice de reprodução que demonstra maior eficiência e otimização no procedimento adotado para as condições de seleção. Os menores valores genotípicos (u+g) das características fator de reprodução e índice de reprodução preditos pelo Blup foram utilizados para selecionar 14 híbridos interspecíficos resistentes ao *P. brachyurus*. Para os estudos utilizando marcadores moleculares SSR, etapa realizada na University of California, foram utilizados 74 híbridos interespecíficos, sete genitores de *Vitis* e uma variedade *V. Labrusca* (Niagara) e um total de 10 marcadores SSR foram utilizados para a genotipagem. A partir dos

dados moleculares foi gerado um dendograma UPGMA para agrupamento dos genótipos dissimilares, estimados as variáveis moleculares e verificado a estruturação genética da população por inferência Bayesiana. Pelo método UPGMA foram formados cinco grupos grupamentos principais, enquanto que o agrupamento bayesiano indicou que os 74 híbridos interespecíficos, os sete genitores e cultivar da espécie *V. Labrusca* avaliadas apresentaram agrupamento com probabilidade mista de distribuição distribuídos em sete grupos. Os marcadores SSR evidenciaram divergência genética entre os híbridos interespecíficos, os quais foram eficientes na avaliação do polimorfismo, sendo indicados para seleção de híbridos interespecíficos para o cruzamento entre os híbridos resistentes provenientes dos genitores *V. romanetii* C166-043, Cereza e Nocera com os genótipos de origem viníferas 07371-25 e 07355-075. E os genitores *V. vinifera* 07371-25 e 07355-075 devem ser utilizadas em cruzamentos com os híbridos resistentes do grupo V por serem as mais divergentes e possuir conhecidamente elevada produtividade. Tais resultados possibilitam delinear os rumos do programa de melhoramento genético de uva da UENF.

ABSTRACT

SANTOS, Paulo Ricardo dos; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2018; NOVAS ABORDAGENS PARA IDENTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO *Pratylenchus brachyurus* E ESTRUTURA GENÉTICA DE SEGREGANTES INTERESPECÍFICOS EM ESPÉCIES DE *Vitis*; Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana; Conselheiros: Prof^a. Rosana Rodrigues, Prof^o. Antônio Teixeira do Amaral Júnior

The nematode of the root lesions caused by *Pratylenchus brachyurus*, is a disease considered of great economic importance for the vine. The interspecific crossover presents important implications within the grapes breeding program, especially for the introgression of genes from one resistant species to another susceptible species. The objective of the present study was to evaluate the nematode resistance of root lesions in segregating populations of *Vitis* species; to characterize *Vitis* genus and hybrids; to quantify genetic diversity and structuring among individuals of the population via microsatellite molecular markers, quantitative and qualitative morphological descriptors by multivariate statistical methods; identify nearby or distant genotypes genetically and define them in clusters; quantification of genetic variability by means of parameter estimation, genotypic selection of individuals from the vine segregant population, via mixed models by REML / BLUP, and associations between characters of agronomic importance for selecting resistance. For the studies to select nematode resistant individuals from root lesions and phenotyping of morphological descriptors in a greenhouse, three segregating populations with 57 hybrids of the cross were

evaluated between the parents, *Vitis rotundifolia* C166-043 x 07355-075, 06354 - 047 x Cherry and 06354-047 x Nocera, from the Germoplasm Bank of the University of California. A randomized complete block design was used, with two replications and three plants per plot. The plants were inoculated with suspension of 600 specimens of *P. brachyurus*. The mass of roots, nematodes per gram of grass and the reproduction factor that were used as the quantitative variables were determined, and 16 multivariate descriptors were also evaluated. The characteristics were analyzed using Ward-Modified location model (Ward-MLM) for composition of genotype groups and estimated genetic parameters and predicted genetic values by Restricted maximum likelihood / Best linear unbiased prediction (REML / BLUP). The Ward-MLM classification strategy allowed the formation of three homogeneous groups, in which group I consisted of 13 hybrids, the II group with 26 hybrids and the III group with 18 hybrids, the latter two groups being the ones that allocated hybrids resistant to *P. brachyurus*. High values for heritability were verified in the broad sense for root mass, breeding factor and nematodes per root grass, which evidenced genetic gain and selection of resistant genotypes, from the cloning of the materials, since the totality of the genetic variance are effects of dominance. The 57 evaluated genotypes, those with the lowest genotypic values for reproduction factor were selected as resistant, among which: CH3.2, CH3.23, CH3.8, CH3.37, CH3.38, CH3.41, CH3. 36, CH2.1, CH2.7, CH1.1, CH1.3 and CH1.2. In order to increase the size of selected individuals, a new classification for selection was considered based not only on the genetic values ($u + g$) of the reproduction factor, but on the reproduction index that shows greater efficiency and optimization in the procedure adopted for selection conditions . The lowest genotypic values ($u + g$) of the reproduction factor and breeding index characteristics predicted by Blup were used to select 14 interspecific hybrids resistant to *P. brachyurus*. For the studies using SSR molecular markers, conducted at the University of California, 74 interspecific hybrids were used, seven *Vitis* and a *V. Labrusca* (Niagara) strain and a total of 10 SSR markers were used for genotyping. From the molecular data a UPGMA dendrogram was generated to group the dissimilar genotypes, estimated the molecular variables and verified the genetic structuring of the population by Bayesian inference. By the UPGMA method five main group groups were formed, while Bayesian grouping indicated that the 74 interspecific hybrids, the seven

breeders and the cultivar of the *V. Labrusca* species evaluated presented grouping with mixed distribution probability distributed in seven groups. SSR markers showed genetic divergence among interspecific hybrids, which were efficient in the evaluation of the polymorphism and were indicated for selection of interspecific hybrids for the cross between the resistant hybrids from the parents *V. romanetii* C166-043, Cereza and Nocera with the genotypes of origin 07371-25 and 07355-075. And the *V. vinifera* 07371-25 and 07355-075 parents should be used in crosses with the resistant group V hybrids because they are the most divergent and known to have high productivity. Such results make it possible to delineate the directions of the breeding program.

1. INTRODUÇÃO

No cenário internacional, a vitivinicultura brasileira ocupou, em 2015, o 17º lugar em área cultivada com uvas, o 11º em produção de uvas e o 13º em produção de vinhos. No que se refere às transações internacionais para o ano de 2016, o Brasil foi o 14º maior exportador de uvas; 17º maior exportador de suco de uvas e o 31º maior exportador de vinho (FAO, 2015).

A produção anual brasileira de uvas (*Vitis* spp.) está em torno de 1,6 milhões de toneladas, metade comercializadas como uvas de mesa e a outra metade como uvas para processamento (IBGE, 2016).

O cultivo da uva tem crescido no Brasil, principalmente em regiões onde as condições climáticas são favoráveis ao sistema de condução da lavoura. As regiões mais quentes do Brasil proporcionam a produção de uma uva de mesa de qualidade superior, em comparação com as regiões tradicionalmente produtoras que se encontram no sul do Brasil, devido ao baixo índice de precipitação (semiárido brasileiro) e/ou alta luminosidade e temperatura, como a região Noroeste de São Paulo (Camargo et al., 2011). A região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro se enquadra “a priori” nessas condições favoráveis de clima para o desenvolvimento da viticultura de mesa, pois também se caracteriza pela alta luminosidade e o baixo índice pluviométrico.

O Estado do Rio de Janeiro teve, no ano de 2015, uma produtividade média de 17.750 kg. ha⁻¹, uma produção de 142 toneladas em uma área total de 8 ha,

destacando-se a Região Norte Fluminense como maior produtora do Estado (Ibge, 2016).

O crescimento sustentável e a competitividade da viticultura, tanto nas atuais como nas potenciais zonas de produção dependem do uso de cultivares adaptadas, cuja produção atenda a demandas do mercado. Normalmente, as cultivares comerciais, em sua maioria castas de *Vitis vinifera*, são oriundas de zonas temperadas onde a precipitação pluviométrica dos meses de verão é baixa. Decorre daí os problemas de adaptação das cultivares nas condições brasileiras, em muitas das regiões produtoras como Minas Gerais e São Paulo (Camargo, et al., 2011).

Na viticultura, doenças causadas por nematóides limitam a produtividade, prejudicando o seu desenvolvimento, perda de vigor, diminuição do sistema radicular e a qualidade dos frutos produzidos. Em nível mundial, estima-se que a sua incidência possa reduzir em 20 a 25% a produção anual de uvas (Ferris et al., 2012; Puerari et al., 2012).

Levantamentos realizados em diferentes regiões do Brasil registraram a ocorrência de espécies de nematóides do gênero *Pratylenchus* spp. associados à rizosfera da videira. Dentre estas espécies deste gênero, o *P. brachyurus* se destaca pela ampla disseminação nas principais áreas de cultivo agrícola e é reconhecido como um dos maiores problemas na viticultura (Puerari et al., 2012).

A inclusão de espécies silvestres para hibridação em programas de melhoramento é uma das práticas para resolver problemas da incidência de pragas e moléstias, visto que essas podem conter genes de resistência ao *P. brachyurus* não encontradas nas videiras cultivadas. Nesse contexto, a variabilidade genética para seleção de clones resistentes em populações segregantes, é particularmente importante para o melhorista, uma vez que grande variabilidade, ainda não totalmente conhecida e explorada, está disponível nessas populações (Viana et al. 2011).

A melhor estratégia, para o controle deste nematóide, é o desenvolvimento de cultivares mediante programas de melhoramento genético. Estudos têm mostrado que existe grande variabilidade genética entre as cultivares de videiras para resistência a doenças, sobretudo as americanas (Zasada et al. 2012).

As espécies silvestres mantidas em bancos de germoplasma são alternativas para exploração das bases genéticas da resistência a diversas

doenças, que podem ser combinadas com características de produtividade e qualidade de frutos (Galet, 1998; Viana et al., 2013; Viana et al., 2016).

Uma das alternativas adotadas pelos programas de melhoramento para combater a doença do nematóide das lesões radiculares (*P. brachyurus*), é a transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais por meio de hibridações interespecíficas (Galet, 1998).

Este trabalho integra um projeto de melhoramento genético de videiras que busca tecnologias para o desenvolvimento da vitivinicultura do Norte Fluminense, que envolve a Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF e a *University of California* - UC Davis, onde no ano de 2009 foram realizados cruzamentos para obtenção de uma população segregante, e as sementes foram enviadas para a UENF para implementação do programa de melhoramento genético.

Para se desenvolver genótipos resistentes ao nematóide das lesões radiculares, com boa produtividade para as condições do Norte Fluminense, faz-se necessário, conhecer e explorar convenientemente a variabilidade genética disponível dentro de um programa de melhoramento, o que requer a caracterização e avaliação da diversidade de germoplasma ou de populações segregantes provenientes de cruzamentos interespecíficos.

Dentre os procedimentos utilizados para a avaliação genética de indivíduos de uma população, os métodos multivariados, em que diversos caracteres podem ser avaliados simultaneamente, têm oferecido contribuições efetivas na identificação de genótipos para serem utilizados em programas de melhoramento genético e na indicação de caracteres que melhor contribuem para a divergência genética (Cruz et al., 2012).

Há ainda o uso de marcadores microssatélites que viabilizam a caracterização genética de muitos genótipos, por meio de procedimentos moleculares relativamente rápidos. A detecção de marcadores ligados a genes de interesse agrônomico permite a seleção de genitores superiores em programas de melhoramento de forma objetiva e precisa, fornecendo informações genéticas importantes referentes à população segregante (Riaz et al., 2006; Schuck et al., 2011; Viana et al., 2013; Viana et al., 2016).

Além dos procedimentos multivariados e moleculares, as análises biométricas, sobretudo as estimativas de parâmetros genéticos, são fundamentais para conhecer a natureza da ação dos genes envolvidos no controle de

determinado caráter. Além disso, permitem predizer o ganho genético com a seleção e planejar as estratégias de melhoramento (Viana & Resende, 2014; Santos et al., 2017).

Entre os métodos que podem ser utilizados para a obtenção de estimativas dos parâmetros genéticos, destaca-se a metodologia REML/BLUP (máxima verossimilhança restrita/melhor predição linear não viciada). Esse procedimento confere maior acurácia e precisão às estimativas, especialmente aquelas obtidas de ensaios desbalanceados, situação comum quando se dispõe de grande número de plantas. Na prática, os componentes de variância devem ser estimados com a maior precisão possível, visando à seleção baseada nos maiores valores genéticos individuais (Viana & Resende, 2014).

Com isso, esse estudo pretende identificar genótipos de videiras resistentes ao nematóide das lesões radiculares. A estratégia adotada foi a hibridação interespecífica, entre os genitores A96-19, 07371-25, Romanetti C166-043, 07355-075, Cereza, 06354-047 e Nocera, que envolvem as espécies *V. vinifera*, *V. rotundifolia* e *V. romanetti*, pertencentes ao banco de germoplasma da *University of Califórnia*. A pesquisa está estruturada em seis etapas, que englobam estudos dos genitores e seus híbridos interespecíficos, avaliação da resistência ao *P. brachyurus* por meio de avaliações fenotípicas, estimação da divergência genética com base em marcadores microssatélites e caracteres morfológicos, estruturação genética por inferência beysiana, estimação de parâmetros e ganhos genéticos pelo método REML/BLUP e associações entre caracteres.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Identificar genótipos resistentes ao nematóide das lesões radiculares e caracterizar quanto à diversidade e estrutura genética de populações segregantes de cruzamento interespecíficos em espécies de *Vitis*.

2.2. Específicos

- a. Fenotipagem para caracteres morfológicos e resistência ao *P. brachyurus*;
- b. Genotipagem de segregantes interespecíficos de *Vitis* por meio de marcadores microssatélites;
- c. Estimar divergência genética com base em descritores caracteres morfológicos quantitativos e qualitativos;
- d. Estimar parâmetros genéticos e selecionar genotipicamente pelo método REML/BLUP para seleção clonal de porta-enxertos resistentes ao *P. brachyurus* e associações entre caracteres;

- e. Analisar a estrutura e diversidade genética de segregantes interespecíficos de *Vitis* resistentes ao *P. brachyurus* com base em marcadores microssatélites e identificar genótipos próximos ou distantes geneticamente e defini-los em grupos.

3. CAPÍTULOS

3.1. RESISTÊNCIA AO *Pratylenchus brachyurus* EM SEGREGANTES INTERESPECÍFICOS DE *Vitis* spp. POR MEIO DE ABORDAGENS MULTIVARIADAS E MODELOS MISTOS

3.1.1. INTRODUÇÃO

A produção de uvas no Brasil tem recebido grande incremento, principalmente em regiões onde a viticultura é emergente, em que as condições climáticas são favoráveis ao sistema de produção, incluindo regiões de clima temperado, subtropical e tropical (Camargo et al. 2011). Em 2016 a produção nacional de uvas foi de 673.422 milhões de quilos, sendo a produção de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados), representando 46,89% da produção nacional. O restante da produção (53,11%) foi destinado ao consumo *in natura* (Ibge, 2016). No entanto, para aumentar a produtividade, é necessário que cultivares mais produtivas, adaptadas e resistentes a doenças sejam introduzidas ou melhoradas para os cultivos comerciais (Camargo et al. 2011).

Na viticultura, doenças causadas por nematóides podem afetar seriamente as plantas, prejudicando o seu desenvolvimento, perda de vigor, diminuição do

sistema radicular dificultando o estabelecimento das plantas no campo e a qualidade dos frutos produzidos, constituindo-se, dessa forma, fator limitante à produtividade. Em nível mundial, estima-se que a sua incidência possa reduzir em 20 a 25% a produção anual de uvas (Campos et al., 2012, Ferris et al., 2012, Heriksen et al., 2012).

Levantamentos realizados em diferentes regiões do Brasil registraram a ocorrência de espécies de nematóides do gênero *Pratylenchus* spp. associados à rizosfera da videira. Nesse gênero, são três espécies de nematóides que causam lesões nas raízes da videira: *P. brachyurus*, *P. jordanensis* e *P. thornei*. Dentre estas espécies, o *P. brachyurus* se destaca pela ampla disseminação nas principais áreas de cultivo agrícola e é reconhecido atualmente como um dos maiores problemas na viticultura (Naves, 2005).

O aumento dos níveis populacionais e dos danos causados pelo *P. brachyurus*, representam um grave problema aos sistemas de produção, visto que a viticultura emergente tem sido prejudicada, uma vez que está sendo estabelecida em novas áreas que anteriormente estavam ocupadas por culturas de grande importância econômica no Brasil que apresentam suscetibilidade, como soja, feijão, algodão, milho, cana-de-açúcar. Com isso, demandam a seleção de híbridos resistentes para utilização como porta-enxertos para a obtenção de boa produtividade na viticultura (Zasada et al. 2012).

A inclusão de espécies silvestres para hibridação em programas de melhoramento é uma das práticas para resolver esses problemas, visto que essas podem conter genes de resistência ao *P. brachyurus* não encontradas nas videiras cultivadas. Nesse contexto, a variabilidade genética para seleção de clones resistentes em populações segregantes é particularmente importante para o melhorista, uma vez que grande variabilidade, ainda não totalmente conhecida e explorada, está disponível nessas populações (Viana et al. 2011).

Para quantificar a diversidade genética, destaca-se o procedimento Ward-MLM (Modified Location Model), proposto por Franco et al. (1998), que permite analisar variáveis quantitativas e variáveis qualitativas simultaneamente, acessando grande parte da informação disponível do germoplasma (Gonçalves et al. 2009). Além desse procedimento multivariado, as estimativas de parâmetros genéticos, são fundamentais para conhecer a natureza da ação dos genes envolvidos no controle de determinado caráter e, permitem predizer o ganho

genético com a seleção, o que auxilia nas estratégias de melhoramento (Cruz et al. 2012). Neste caso, o REML/BLUP (máxima verossimilhança residual ou restrita/melhor predição linear não viciada) torna-se um procedimento ótimo de avaliação genotípica, além de conferir maior acurácia e precisão às estimativas (Viana & Resende, 2014). Em videiras, métodos estatísticos utilizando modelos mistos não é explorado e esses procedimentos têm ganhado ampla aplicação no melhoramento de fruteiras (Santos et al., 2015). Utilizando essa abordagem quantitativa em fruteiras para características relacionadas à resistência à doença, foi identificado apenas um trabalho de seleção de progênies femininas de mamoeiro para resistência à mancha-de-phoma (Vivas et al. 2014). Em videiras, a abordagem envolvendo o procedimento REML/BLUP é pioneira.

Os objetivos deste trabalho foram: i) caracterizar três populações de cruzamentos interespecíficos de *Vitis* spp. com base em descritores qualitativos e quantitativos; ii) estimar os parâmetros genéticos e selecionar os híbridos interespecíficos resistentes ao *P. brachyurus* para o programa de melhoramento genético da videira.

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. A cultura da videira

A videira pertence à família Vitaceae que compreende 19 gêneros e 1126 espécies, sendo o gênero *Vitis* o mais antigo, de maior importância econômica e o único que possui frutos comestíveis. São plantas trepadeiras, perenes e podem ser monóicas ou dióicas. As inflorescências são opostas às folhas e as flores podem ser hermafroditas perfeitas, masculinas ou femininas. Este gênero está subdividido em duas seções: *Muscadinia* Planch ($2n = 40$) e *Euvitis* Planch ($2n = 38$). A seção *Muscadinia* é nativa do Sudeste dos Estados Unidos e México e possui três espécies conhecidas, *Vitis rotundifolia* Michaux, *Vitis munsoniana* Simpson e *Vitis popenoi* Fennell. Em geral, os híbridos provenientes entre *Muscadinia* e *Euvitis*, não são viáveis. Contudo, o sucesso obtido pela hibridação entre *Muscadinia rotundifolia* e inúmeras espécies de *Vitis* torna esta seção uma

importante fonte de genes de resistência a doenças. Por outro lado, a qualidade dos frutos de *M. rotundifolia* têm sido melhoradas pelo seu cruzamento com *Vitis vinifera* L. (Galet, 1998).

A espécie *V. vinifera* é a mais importante economicamente e apresenta elevada diversidade morfológica e genética. A facilidade de propagação assexual deu origem a um número estimado em 14.000 cultivares em todo mundo, sob as finalidades de consumo *in natura*, passas, sucos e vinhos (Alleweldt et al., 1990). No entanto, This et al., (2006) que estudaram perfis alélicos utilizando marcadores microssatélites, demonstraram inúmeros casos de sinonímias e homonímias desta espécie mantidas em coleções de germoplasma revelando que 5.000 são cultivares.

Os cruzamentos e as mutações naturais desempenharam um papel fundamental na evolução da videira cultivada. A propagação vegetativa permitiu o acúmulo de mutações ao longo do tempo, com variações nas folhas, flores e bagas que têm sido selecionados como clones ou novos cultivares, aumentando o número de cultivares de videiras existentes (This et al., 2006).

A origem das cultivares de uvas de mesa é diferente, pois estas já eram consumidas *in natura* antes da elaboração dos primeiros vinhos. Os primeiros vinhedos europeus incluíam diferentes cultivares de uvas de mesa e para vinho, consumidos pela própria família do viticultor, sendo o excedente comercializado. Algumas das mais importantes cultivares para vinho comercializados na Europa também estão entre os mais importantes para consumo como fruta fresca como 'Golden Chasselas' e 'Muscat de Alexandria'. As mais importantes introduções de cultivares de uvas de mesa realizadas no século XX foram resultado de programas de melhoramento, são elas: 'Itália' ('Pirovano 65'), 'Cardinal', 'Perlette' e 'Flame Seedless' (Reisch & Pratt, 1996).

A uva europeia ou grupo de *V. vinifera* caracteriza-se por uma ampla variabilidade morfológica e fisiológica e tem frutos de excelente qualidade (This et al., 2006). É cultivada em todas as regiões temperadas e tropicais do mundo para frutas frescas, frutas secas, suco e amplamente utilizado na indústria mundial de vinhos finos (Camargo et al., 2011).

A espécie europeia *V. vinifera* individualmente adquiriu interesse econômico significativo ao longo do tempo, enquanto que, algumas outras espécies, por exemplo, as Americanas (*V. rupestris*, *V. riparia* ou *V. berlandieri*), adquiriram sua

importância para fins de melhoramento genético, devido à resistência contra patógenos de videira, tal como filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), oídio (*Uncinula necator*), míldio (*P. viticola*) e nematóides (This et al., 2006; Terral et al., 2010). As variedades americanas prosperaram no Brasil pelas suas características vegetativas que melhor se adaptaram às condições ambientais e, principalmente, pela resistência às principais moléstias que atacam a videira, e à produção mais volumosa, embora de qualidade inferior, vindo a predominar nas plantações brasileiras em mais de 90%. Ainda hoje a maior produção de uvas no país é proveniente de variedades americanas e híbridas (Camargo et al., 2011; Leão et al., 2013).

Enquanto as uvas europeias foram introduzidas em regiões fora do seu habitat natural, eram muitas vezes cruzadas com espécies de *Vitis* nativas, por exemplo, na América do Norte, América Central e do Japão. Isto resultou em híbridos mais adaptados a ambientes locais e habilitou a viticultura, onde espécies viníferas não poderiam ter sobrevivido devido à sua suscetibilidade às doenças fúngicas ou geadas severas do inverno (Alleweldt e Possingham, 1988).

A espécie *V. vinifera* com sua enorme quantidade de variedades é a única de real importância econômica, mas espécies silvestres do gênero *Vitis* têm contribuído, através de cruzamentos interespecíficos, acidentais ou planejados para a adaptação da videira as mais diferentes condições que a sua expansão tem exigido. Existem mais variedades de videira de importância econômica provenientes de híbridos que gozam de qualidade entre as variedades europeias e as americanas (Shuck et al., 2011; Viana et al., 2016).

3.1.2.2. Melhoramento da Videira

O aproveitamento de espécies do gênero *Vitis* pelo homem remonta dos tempos da antiguidade. O momento no qual o homem começou a cultivar essa planta permanece desconhecido. Porém, foi a necessidade de volumes crescentes para a elaboração de vinhos que determinou o cultivo da videira. A espécie *V. vinifera* com sua enorme quantidade de variedades é a única de real importância econômica, mas espécies silvestres do gênero *Vitis* têm contribuído, através de cruzamentos interespecíficos, para a adaptação da videira às mais diversas condições ambientais e, sobretudo para introgressão de genes que

conferem resistência aos diversos estresses bióticos e abióticos para expansão da viticultura (Cunff et al., 2008).

Uvas do tipo *labrusca*, denominadas de uvas comuns de mesa, caracterizadas pelo sabor aframboesado, muito apreciadas pelos consumidores brasileiros, cuja referência é a 'Niagara Rosada'. Embora esse grupo represente cerca de 50% do mercado interno brasileiro de uvas de mesa, a produção está altamente concentrada entre os meses de dezembro e fevereiro porque as cultivares tradicionais desse grupo apresentam sérias dificuldades de adaptação às zonas tropicais. Além disso, as uvas comuns de mesa apresentam sérios problemas pós-colheita expressos por uma baixa capacidade de armazenamento e transporte (Camargo et al., 2011). Para ampliação do período de oferta estão sendo buscadas cultivares precoces e tardias adaptadas às condições do sul do Brasil, bem como cultivares adaptadas às regiões tropicais que viabilizem o abastecimento do mercado ao longo do ano. Aderência ao pedicelo, resistência da película e do engaço ao murchamento são as principais características na seleção para a conservação pós-colheita (Maia et al., 2013).

Uvas finas para mesa, são uvas que se caracterizam por apresentar bagas grandes e polpa firme, cujo cultivo no Brasil abrange todas as regiões estando, porém, restrito ao uso de praticamente uma só cultivar que é a 'Itália'. A falta de opções deve-se à dificuldade de adaptação das uvas finas às condições brasileiras em função da sua alta suscetibilidade às doenças fúngicas e à baixa fertilidade de gemas de muitas cultivares, especialmente de uvas apirênicas (sem semente), em condições tropicais (Leão et al., 2009; Maia et al., 2013). As principais demandas imediatas do setor produtivo são por cultivares de uvas coloridas para o mercado interno e cultivares sem semente para o mercado externo, que apresentem um baixo custo de produção, principalmente em relação à mão de obra para raleio das bagas. Numa visão de médio e longo prazo, entretanto, há que se considerar um programa de melhoramento visando seleção para a resistência a doenças e a adaptação ao meio de cultivo, visando reduzir o custo com o uso de produtos químicos para o controle fitossanitário (Sant'ana et al., 2012; Maia et al., 2013).

No melhoramento da videira existem várias estratégias para alcançar os objetivos propostos, como o uso de métodos de melhoramento, avaliando as principais características de interesse do programa, introdução de novos

genótipos, seleção massal, seleção clonal. Além de ferramentas de biotecnologia como micropropagação, resgate de embriões para viabilização de sementes em cruzamentos de uvas apirênicas e uso de marcadores moleculares que permitem o estudo da diversidade genética, mapeamento de QTLs e a seleção assistida (Riaz et al., 2006; Camargo et al., 2011; Viana et al., 2016). Também já se faz uso rotineiro do desenvolvimento de perfis genéticos visando a proteção das novas cultivares (Sant'ana et al., 2012).

No entanto, há uma carência de abordagens quantitativas no melhoramento da videira, em que o mais importante é ter o conhecimento da variabilidade sobre sua utilidade e adequação ao objeto que se propõe estudar. Além disso, é indispensável seu uso com precisão e rigor científico e ter certeza do método a ser empregado, bem como o tipo de análise que o método possibilita construir.

3.1.2.3. Métodos estatísticos multivariados em diversidade genética

Para desenvolver de maneira conveniente um programa de melhoramento, o primeiro passo é caracterizar o germoplasma, de modo a obter informações básicas sobre os genótipos. A caracterização morfológica é a forma mais acessível e mais utilizada para se quantificar a diversidade genética do germoplasma disponível. A detecção da variabilidade intra e interespecífica é de fundamental importância, pois possibilita o uso mais eficiente dos recursos genéticos pelo melhorista. O sucesso de um programa de melhoramento depende inicialmente da escolha dos genitores, que ao serem cruzados, aumentam as chances de obtenção de genótipos superiores em gerações segregantes (Viana et al., 2011; Cruz et al., 2012).

A utilização da estatística multivariada assume importância relevante, sobretudo, quando o objetivo é obter informações sobre a distância genética entre populações ou genótipos. As análises multivariadas são baseadas em algoritmos, ou medidas de distância, que consideram simultaneamente inúmeras características nos experimentos de caracterização e avaliação de germoplasma (Viana et al., 2011). Quando convenientemente empregados, tais procedimentos permitem, dentre outros: estimar o grau de pureza varietal de populações; identificar genótipos próximos ou distantes, geneticamente, seja em nível interespecífico ou entre espécies botânicas; conhecer a amplitude da base

genética das populações; identificar grupos heteróticos; avaliar o grau de erosão genética de germoplasmas; estruturar coleções nucleares; identificar genótipos para introgressão gênica; quantificar a contribuição de características para a variabilidade presente; e averiguar a eficiência da seleção recorrente em promover o incremento de alelos favoráveis (Amaral Júnior et al., 2010; Viana et al., 2011).

Nas análises de agrupamento, o objetivo é identificar grupos homogêneos de indivíduos, semelhantes entre si. Dessa forma, os elementos dentro do grupo são os mais similares entre si e os elementos em grupos diferentes os mais heterogêneos, considerando-se as variáveis que neles foram mensuradas. Por meio das variáveis, calcula-se a "semelhança" (ou seu complemento, a "distância") entre dois indivíduos ou entre grupos de indivíduos. A medida de distância ou similaridade que pode ser definida entre dois indivíduos ou grupos depende do tipo de variáveis utilizadas (Crossa & Franco, 2004). Os métodos de agrupamento envolvem necessariamente duas etapas: a primeira refere-se ao cálculo das medidas de distância ou de similaridade; e a segunda, à utilização de uma técnica de agrupamento para formação dos grupos (Cruz et al., 2012).

Uma definição mais abrangente de distância genética foi dada por Mohammadi e Prasanna (2003) como sendo "qualquer medida quantitativa da diferença genética, seja relacionada à sequência ou à frequência de alelos, que é calculada entre indivíduos, populações ou espécies". As diferentes medidas de distância ou de similaridade são calculadas em função do tipo de variável que se está avaliando.

Crossa e Franco (2004) descrevem os procedimentos para estimar medidas de distância. Os autores recomendam para variáveis contínuas ou quantitativas a distância Euclidiana e para variáveis qualitativas binárias os índices de Jaccard, Nei e Li. Por sua vez, Cruz et al., (2012) indicam para variáveis quantitativas com repetição a distância de Mahalanobis, e para variáveis qualitativas multicategóricas o índice de Cole-Rodgers. De acordo Mohammadi e Prasanna (2003) a distância Euclidiana é a mais utilizada para estimar a distância genética entre os indivíduos por meio de dados morfológicos.

As estimativas de dissimilaridade atendem aos objetivos do melhorista, por quantificarem e informarem o grau de semelhança ou de diferença apresentado entre dois genótipos quaisquer. Entretanto, devido ao grande número de

estimativas torna-se impraticável o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual das estimativas. Assim, para realizar essa tarefa, faz-se o uso de métodos de agrupamento ou de projeções de distâncias em gráficos bi e tridimensionais, em que cada coordenada é obtida a partir da medida de dissimilaridade escolhida (Cruz et al., 2012).

Os métodos de agrupamento têm por finalidade separar um grupo original de observações em vários subgrupos, de forma a obter homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os subgrupos. Entre os métodos de agrupamento, os hierárquicos têm sido utilizados com mais frequência, sobretudo o de ligação simples (SL), o de ligação média entre grupos (UPGMA) e Ward (Mohammadi & Prasanna, 2003). A confiabilidade dos métodos de agrupamentos depende da magnitude da correlação cofenética que mede o grau de associação entre as distâncias estimadas e suas respectivas projeções em diagramas ou gráficos. Padilla et al., (2007) e Cerqueira-Silva et al., (2010) compararam diferentes métodos de agrupamentos e verificaram com base nos valores de correlação cofenética, que o UPGMA foi mais confiável que os métodos Ward e Ligação Simples (SL) em todas as situações de análise.

Em determinados casos, torna-se necessária a avaliação em conjunto das características quantitativas, qualitativas e ordinais. Em decorrência, torna-se entusiástica a possibilidade de combinar os diferentes tipos de variáveis com o intento de obter uma matriz única que traduza a distância ou parecença genética. Gower (1971) procedeu à primeira sugestão de medida de similaridade entre duas unidades de amostras, quando são avaliadas em conjunto tipos de características.

Outro método proposto para análise conjunta de características quantitativas é o proposto por Lawrence e Krzanowski (1966), que se basearam na fundamentação de Olkin e Tate (1961). O procedimento, designado *Location Model* (LM) classifica n indivíduos quando p variáveis quantitativas e q variáveis qualitativas são obtidas em um ambiente. O LM combina níveis de todas as variáveis qualitativas em única variável multinomial, W , com m níveis.

Franco et al., (1998) modificaram o ML e propuseram o *Modified Location Model* (MLM), assumindo que m níveis da variável W e variáveis p -multinormais para cada subpopulação são independentes. A estratégia MLM inclui as seguintes etapas: na primeira, o método de agrupamento de Ward (Ward Júnior, 1963) é

aplicado sobre a matriz de dissimilaridade de Gower (Gower, 1971). Na segunda etapa, o vetor de médias das variáveis quantitativas é estimado pelo procedimento MLM para cada subpopulação, independente da variável qualitativa.

Este método possui como vantagem, utilizar toda a informação disponível sobre as variáveis quantitativas e qualitativas do germoplasma em questão. Além disso, permite a definição do número ótimo de grupos e o cálculo de uma medida dos grupos com alta precisão, uma vez que permite identificar, de forma fidedigna a melhor probabilidade de cada genótipo se alocar em grupos específicos (Amaral Júnior et al., 2010).

Esse método de agrupamento, utilizando simultaneamente variáveis quantitativas e qualitativas, tem sido amplamente empregado nos últimos 5 anos, especialmente em estudos de diversidade genética visando subsidiar programas de melhoramento genético de plantas. Estes procedimentos foram utilizados por Cabral et al., (2010) em *Phaseolus vulgaris* e Sudré et al., (2010) em *Capsicum* spp. Com fruteiras têm-se o relato de trabalhos realizados com banana, Pereira et al., (2012), goiaba (Campos et al., 2013), entre outros.

3.1.2.4. Nematóide das lesões radiculares na videira

Os nematóides das lesões radiculares (“root lesion nematodes”) pertencem ao gênero *Pratylenchus*, conhecido mundialmente como um dos maiores problemas em culturas de grande importância econômica, como, por exemplo, soja, milho, algodão, feijão, café, cana-de-açúcar, além de diversas forrageiras, hortaliças e frutíferas, destacando-se a videira (Goulart, 2008; Puerari et al., 2012).

Considerando os impactos econômicos, os nematóides das lesões radiculares ocupam o segundo lugar em relação aos impactos econômicos mundiais e nacionais, afetando várias culturas agrícolas, sendo superados apenas pelos nematóides de galhas (gênero *Meloidogyne*). Existem 70 espécies do gênero *Pratylenchus* distribuídas em todo o mundo, parasitando dezenas de espécies vegetais. No Brasil, as mais importantes são *P. brachyurus* Filipjev & Schuurmans Stekhoven, *P. zaeae* Graham e *P. coffeae* Filipjev & Schuurmans Stekhoven, considerando as perdas econômicas e os danos causados, a distribuição geográfica e o número de plantas hospedeiras (Goulart, 2008).

Os nematóides das lesões radiculares têm causado danos elevados e crescentes, além de perdas econômicas extremamente preocupantes em diversas culturas e em várias regiões do Brasil. As causas desse aumento ainda não estão esclarecidas e necessitam ser investigadas, mas, no caso de *P. brachyurus*, podem estar relacionadas com os seguintes fatores: ausência de rotação de culturas, com cultivo contínuo de uma mesma espécie vegetal; rotação ou sucessão com culturas que são boas hospedeiras do nematóide – maioria dos genótipos de soja, de feijão, de algodão, de milho, de sorgo e de diversas gramíneas forrageiras, além de muitos genótipos de girassol e de milheto entre outros). Além desses, outros prováveis fatores também podem contribuir para o aumento dos níveis populacionais de nematóides de gênero *Pratylenchus* no solo: sistema de “plantio direto” ou cultivo mínimo, mantendo o solo com umidade mais elevada e adequada para os nematóides; uso mais frequente de solos com textura arenosa ou média; compactação de solo prevalente em solos sob plantio direto; uso de irrigação, que viabiliza até três safras anuais nas áreas com este recurso; desbalanço nutricional; ocorrência simultânea de outros fitonematóides e de outros patógenos como *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, que se aproveitam dos danos às raízes, aumentando a severidade de podridões ou de murchas vasculares (Naves, 2005; Goulart, 2008; Zasada et al., 2012).

A espécie *P. brachyurus* congrega nematóides polípagos que podem parasitar um elevado número de espécies vegetais. São endoparasitas migradores que causam severos danos em raízes de uma ampla gama de culturas, devido à alimentação, movimentação ativa e liberação de enzimas e toxinas no córtex (parênquima) radicular. Tanto a penetração na planta hospedeira, como a migração no interior das raízes, são, provavelmente, facilitadas por uma combinação de ações: mecânica (uso do estilete e movimentação de todo o corpo) e tóxica (degradação enzimática das paredes celulares vegetais) (Lordello et al., 1992; Agrios, 1997).

Os danos nas plantas hospedeiras são resultantes das seguintes ações: espoliadora (alimentação e consumo do conteúdo de células vegetais), mecânica e tóxica (enzimas e toxinas). Os nematóides das lesões radiculares permanecem migradores durante todo o ciclo de vida e movimentam-se ativamente no solo até atingir o sistema radicular da planta hospedeira, quando, então, penetram e

passam a migrar no córtex radicular, podendo, inclusive, retornar ao solo (Agrios, 1997).

A ampla gama de hospedeiros sugere que o parasitismo de *Pratylenchus* spp. seja menos especializado (mais primitivo) em relação a outros fitonematóides, como *Heterodera* spp. (nematóides de cistos) e *Meloidogyne* spp. (nematóides-das-galhas), entre outros (Castillo & Vovlas, 2007). Isso é uma dificuldade para o processo de melhoramento vegetal e para a obtenção de cultivares resistentes, bem como para o manejo integrado, pois existem poucas opções de culturas adequadas para rotação e (ou) sucessão (Starr et al., 2002).

O ciclo de vida de *Pratylenchus* spp. é simples e relativamente rápido, normalmente ocorrem várias gerações em uma única safra da cultura hospedeira. Altas populações podem ser detectadas nas raízes infectadas, logo no início do ciclo da cultura, porém essas populações podem se tornar extremamente baixas, especialmente na ausência da cultura hospedeira. A fêmea deposita os ovos no interior das raízes ou no solo próximo à superfície das raízes (postura isolada, sem formação de massa de ovos). Em média, cada fêmea produz 80 a 150 ovos durante toda a vida. O tempo necessário para completar o ciclo de vida é de 3 a 4 semanas (em média), porém varia muito, dependendo principalmente da temperatura, da umidade, da espécie da planta hospedeira e da espécie de *Pratylenchus* (Agrios, 1997; Castillo & Vovlas, 2007).

Como endoparasitas migradores, os nematóides das lesões radiculares destroem tecidos das raízes, causando rompimento superficial e destruição interna, predispondo-os a infecções secundárias de fungos e bactérias. Os sintomas são inespecíficos e podem passar facilmente despercebidos ou ser confundidos com sintomas causados por outros patógenos, deficiências nutricionais ou estresse hídrico. Os efeitos de *Pratylenchus* spp. sobre o crescimento e, conseqüentemente, sobre a produção vegetal, são resultantes de desordem e mau funcionamento dos processos de crescimento de raízes e exploração do solo para obtenção de água e nutrientes (Goulart, 2008). Estudos de patogenicidade sugerem que são nematóides muito bem adaptados ao parasitismo (até mesmo populações extremamente altas no solo geralmente não chegam a matar a planta hospedeira). Por sua vez, os limiares de dano são muito variáveis, dependendo da combinação das espécies de *Pratylenchus* e da planta hospedeira (Starr et al., 2002; Goulart, 2008; Zasada et al., 2012).

O controle e manejo desses nematóides são considerados difíceis e por esse motivo, deve-se evitar a introdução em locais ainda isentos desses nematóides (Castillo & Vovlas, 2007). A falta de nematicidas no mercado, em razão das preocupações ambientais e dos custos de manutenção de registro do produto comercial tem atraído a atenção para o desenvolvimento de métodos alternativos de manejo de fitonematóides, incluindo espécies de *Pratylenchus*. Por sua vez, os nematicidas, em geral, são economicamente inviáveis e pouco eficientes para aplicação no solo em grandes áreas.

A escolha de estratégias e manejo para redução de populações e danos de *Pratylenchus* spp. depende sempre da diagnose (identificação) das espécies presentes e determinação dos níveis populacionais em amostras de solo e raízes. O melhoramento genético vegetal para resistência a espécies de *Pratylenchus* é considerado difícil, provavelmente porque são, em geral, parasitas muito polípagos e relativamente pouco especializados (mais primitivos), de hábito endoparasita e migrador, não se fixando na planta hospedeira (permanecem sempre móveis). Rotação e sucessão com culturas não hospedeiras são aparentemente os métodos mais promissores de manejo, apesar de existirem poucas opções de culturas para essa finalidade, uma vez que espécies de *Pratylenchus* possuem ampla gama de hospedeiros. A busca por plantas potenciais para o uso em rotação/sucessão de culturas, visando ao manejo de *Pratylenchus* spp., deve considerar o aproveitamento econômico e (ou) outros benefícios adicionais dessas culturas, como a melhoria da qualidade do solo (plantas de cobertura e adubos verdes), facilitando assim a aceitação e adoção da tecnologia pelos produtores rurais (Naves, 2005; Goulart, 2008; Puerari et al., 2012).

Nos parreirais brasileiros já foram relatados diferentes gêneros de fitonematóides que parasitam o sistema radicular causando distúrbios, tanto morfológicos quanto fisiológicos. O controle desses parasitas é complexo e o uso de porta-enxertos resistentes é considerado um dos mais importantes métodos de manejo de nematóides na viticultura (Naves, 2005). Contudo, os trabalhos de seleção de porta-enxertos com resistência aos nematóides das lesões radiculares concentram-se, principalmente, na seleção de genótipos resistentes a *P. vulnus* (McKenry & Anwar, 2006). Considerando a expansão da viticultura para áreas de clima tropical, como a região do Vale do São Francisco, favorável aos principais nematóides das lesões radiculares que ocorrem no Brasil, a seleção de porta-

enxertos resistentes a esses parasitas é muito importante para a obtenção de boa produtividade da cultura.

Essas espécies de *Pratylenchus* se destacam pela ampla disseminação nas principais áreas de cultivo agrícola e pelos danos causados à videira, (Zasada et al., 2012), além da alta frequência e elevada população nas áreas de viticultura emergente. Considerando a viticultura emergente, que são as áreas de expansão da viticultura para áreas de clima tropical brasileiro, como as regiões do Vale do São Francisco, cerrado e tropical atlântico brasileiro, favorável aos principais nematóides das lesões radiculares que ocorrem no Brasil, em especial *P. brachyurus* a seleção de porta-enxertos resistente é muito importante para a obtenção de boa produtividade da cultura (Camargo et al., 2011; Puerari et al., 2012).

De maneira geral, os nematóides do gênero *Pratylenchus* representam um grave problema para diversos sistemas de produção e diferentes culturas, em várias regiões no Brasil (Goulart, 2008). Em virtude da elevada complexidade do problema e da existência de diversas interações com fatores bióticos e abióticos, há necessidade de estudos para abordagens referentes à resistência da videira a esses nematóides, que sejam investigados de modo interdisciplinar e por meio de ações transversais de pesquisa. Essas ações devem contemplar a melhor caracterização do problema, em especial nas regiões da viticultura emergente, bem como o entendimento das interações com diversos fatores bióticos e abióticos do solo, por meio de estratégias de manejo integrado (rotação e sucessão de culturas, uso de plantas de cobertura e antagônicas, manejo físico e químico do solo e outros) e busca por cultivares com algum grau de resistência ou tolerância (McKenry & Anwar, 2006; Puerari et al., 2012).

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Populações avaliadas

Três populações segregantes compostas por 57 híbridos obtidos pelo cruzamento de espécies de *Vitis* spp. para resistência ao *P. brachyurus* foram avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos genitores e cruzamentos em espécies de *Vitis* spp. utilizados na caracterização morfológica e avaliação para resistência ao *P. brachyurus*, provenientes do Banco de Germoplasma da University of Califórnia, Davis – EUA.

Genitores^a	Características
07355-075 (<i>V. vinifera</i>)	- Apresenta bagas grandes, sendo <i>V. vinifera pura</i> , pertencente ao um importante background de uvas de mesa.
<i>Vitis romanetii</i> C166-043 (<i>V. romanetii</i>)	- Fonte de resistência ao míldio de origem de <i>V. romanetii</i> que tem um alelo de resistência já bem caracterizado (herança monogênica).
Nocera (<i>V. vinifera</i>)	- Tem origem em populações de uvas de mesa. Nocera pode estar identificada de forma incorreta, mas tem bagas grandes e com boa qualidade de sabor.
Cereza (<i>V. vinifera</i>)	- É um genótipo com bagas grandes; é <i>V. vinifera</i> pertencente a uma casta uvas de mesa de alta qualidade.
06354-047 (<i>V. vinifera</i> x <i>V. rotundifolia</i>)	- Apresenta bagas grandes, pertencente a um importante background de uvas de mesa. É originado do cruzamento entre el-78 x Chenin Blanc. el-78 é uma geração avançada de <i>V. vinifera</i> / <i>V. rotundifolia</i> de Olmo (Texas).
Cruzamentos	Número de híbridos avaliados
1 – <i>Vitis romanetii</i> C166-043 x 07355-075	7 - CH1
2 – 06354-047 x Cereza	9 - CH2
3 – 06354-047 x Nocera	41 - CH3
Total	57

^aGenitores procedentes do Banco de Germoplasma da University of Califórnia, Davis – EUA. CH1 CH2 e CH3: híbrido do cruzamento 1, 2, 3 respectivamente.

3.1.3.2. Condução do experimento e fenotipagem

As estacas dos híbridos obtidos foram enraizadas em vasos com capacidade para 7L, contendo mistura de solo: areia na proporção 2:1 (v:v), e mantidos para estabelecimento das mudas em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com duas repetições e três plantas por parcela dos 57 híbridos interespecíficos de *Vitis*, e uma cultivar de milho 'BR 106' (padrão de suscetibilidade) utilizada como tratamento controle para verificar a viabilidade da fonte de inoculo.

Após quatro meses (novembro de 2015), as plantas foram inoculadas com suspensão de 600 espécimes de *P. brachyurus*. A suspensão de nematóides foi calibrada para 300 nematóides/mL e distribuída em dois orifícios abertos ao redor das mudas de uva e de milho. O milho foi avaliado aproximadamente aos 90 dias após a inoculação, e cada vaso recebeu uma nova planta, que foi avaliada juntamente com as plantas de uva. Decorridos 180 dias da inoculação, utilizou-se método destrutivo e coletou-se o sistema radicular das plantas de uva e milho para extração dos nematóides. A extração dos nematóides nas raízes foi feita a partir da metodologia proposta por Coolen and D'Herde (1972). As amostras obtidas foram avaliadas, contando-se todos os espécimes de *P. brachyurus*, presentes em cada amostra sob microscópio estereoscópico, utilizando câmara de Peters. Com os dados obtidos determinou-se a massa de raízes, nematóides por grama de raiz e o fator de reprodução ($FR = P_f/P_i$, em que FR, P_f e P_i correspondem ao fator de reprodução, população final e população inicial, respectivamente) e as plantas foram classificadas como imunes ($FR=0$), resistentes ($0 < FR < 1$) e suscetíveis ($FR > 1$) conforme descreve Oostenbrink (1966) e variações.

Os híbridos interespecíficos também foram caracterizados mediante descritores morfológicos. Foram utilizados 16 descritores qualitativos (no estágio vegetativo), que somados com os três caracteres quantitativos relacionados à resistência ao *P. brachyurus*, totalizaram 19 caracteres (Tabela 2). Os descritores qualitativos foram tomados com base nas instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de videira (*Vitis* spp.) propostos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC),

vinculado ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 2010).

Tabela 2. Descritores usados para caracterização e avaliação de populações de cruzamento interespecífico em *Vitis* spp. UENF, Campos dos Goytacazes - RJ, 2016.

Descritores	Descrição
Qualitativos	
Ramo jovem: abertura da extremidade;	1 = fechada; 3 = semiaberta; 5 = totalmente aberta
Ramo jovem: pigmentação antociânica da extremidade;	1 = ausente ou muito fraca; 3 = fraca; 5 = média; 7 = forte; 9 = muito forte
Folha jovem: cor da face superior do limbo;	1 = verde-amarela; 2 = verde com áreas antociânicas; 3 = vermelho-cobreada clara; 4 = vermelho-cobreada escura; 5 = vermelho-vinho;
Folha adulta: tamanho do limbo;	1 = muito pequeno; 3 = pequeno; 5 = médio; 7 = grande; 9 = muito grande
Folha adulta: forma do limbo;	1 = cordiforme; 2 = deltoide; 3 = pentagonal; 4 = orbicular; 5 = reniforme
Folha adulta: número de lóbulos;	1 = nenhum; 2 = três; 3 = cinco; 4 = sete; 5 = mais que sete
Folha adulta: profundidade dos seios laterais superiores;	3 = rasa; 5 = média; 7 = profunda
Folha adulta: disposição dos lóbulos dos seios laterais superiores;	1 = aberta; 2 = fechada; 3 = ligeiramente sobreposta; 4 = muito sobreposta
Folha adulta: forma da base do seio peciolar;	1 = côncava (em “u”); 2 = retilínea (em “v”); 3 = convexa
Folha adulta: disposição dos lóbulos do seio peciolar;	1 = totalmente aberta; 2 = muito aberta; 3 = meio aberta 4 = pouco aberta; 5 = fechada; 6 = ligeiramente sobreposta; 7 = meio sobreposta; 8 = muito sobreposta 9 = totalmente sobreposta
Folha adulta: comprimento dos dentes;	3 = curto; 5 = médio; 7 = longo
Folha adulta: razão comprimento/largura dos dentes;	1 = muito pequena; 3 = pequena 5 = média; 7 = grande 9 = muito grande
Folha adulta: formato dos dentes;	1 = ambos os lados côncavos; 2 = ambos os lados retilíneos; 3 = ambos os lados convexos; 4 = um lado côncavo e o outro convexo; 5 = combinação de ambos os lados retilíneos com ambos os lados convexos
Folha adulta: pigmentação antociânica das nervuras principais na face superior do limbo;	1 = ausente ou muito fraca; 3 = fraca; 5 = média; 7 = forte; 9 = muito forte

Tabela 2. Cont

Descritores	Descrição
Qualitativos	
Folha adulta: comprimento do pecíolo em relação à nervura central;	4 = mais curto; 5 = igual; 6 = mais longo
Folha adulta: densidade de pelos eretos sobre o pecíolo;	1 = ausente ou muito baixa; 3 = baixa; 5 = média; 7 = alta; 9 = muito alta
Quantitativos	
Massa de raízes (g)	Massa total do sistema radicular das plantas aos 180 dias após inoculação
Fator de reprodução	$FR = Pf/Pi$, em que FR, Pf e Pi correspondem ao fator de reprodução, população final e população inicial, respectivamente
Nematóides por grama de raiz	Pesadas 10 g de raízes que foram separadas e picotadas para a determinação do número de nematóides

3.1.3.3. Análise multivariada pelo procedimento Ward-MLM

As variáveis quantitativas e qualitativas foram analisadas simultaneamente, utilizando o procedimento Ward-MLM para composição dos grupos de genótipos, por meio do procedimento CLUSTER e IML do programa SAS (SAS Institute, 2003). Para uso do método de agrupamento Ward, a matriz de distância foi obtida pelo algoritmo de Gower (Gower, 1971). A definição do número ideal de grupos foi realizada de acordo com os critérios do pseudo-F e pseudo-t² combinados com o perfil da verossimilhança associado com o teste da razão da verossimilhança (SAS Institute, 2003).

O índice de dissimilaridade de Gower foi utilizado porque o conjunto de variáveis em estudo formou um grupo misto de características qualitativas e quantitativas, no qual este gera um único índice de dissimilaridade, variando de 0 a 1. A dissimilaridade foi dada por:

$$S_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} \cdot S_{ijk}}{\sum_{k=1}^p W_{ijk}}$$

Onde i e j representam os indivíduos a serem comparados no que diz respeito à característica k ; p = número total de características, e S_{ij} = contribuição da variável k para a distância total. Se uma variável é qualitativa, S_{ijk} assume o valor 1, quando a concordância é positiva ou negativa para a característica k entre os indivíduos i e j , e por outro lado quando a variável é quantitativa:

$$S_{ij} = \frac{|Y_{ik} - Y_{jk}|}{R_k}$$

Onde R_k = a amplitude de variação da variável k , tendo valores entre 0 e 1. O valor de W_{ijk} foi usado para definir as contribuições dos indivíduos S_{ijk} . Assim, quando o valor da variável k está ausente em um ou ambos os indivíduos, $W_{ijk} = 0$ ou, de outra forma, é igual a 1.

Por último, foi realizada a análise MLM completa para o número de grupos (g) definidos, descrevendo os resultados da classificação, com uma tabela da descrição dos grupos formados e a análise canônica para as variáveis

quantitativas, sendo utilizado, para estas últimas o arquivo *canfile*, obtido pelo SAS (2003), contendo as coordenadas canônicas para as observações.

3.1.3.4. Estimativas de parâmetros genéticos e seleção individual via procedimento REML/BLUP

Para escolha do valor representativo de um clone, os valores genotípicos para cada característica quantitativa avaliada foram obtidos a partir do procedimento REML - Máxima Verossimilhança Restrita, aplicada ao modelo linear misto, que na forma matricial, utilizado para avaliação de clones aparentados, no delineamento em blocos ao acaso com várias plantas por parcela sugerido por Resende (2000) é:

$$Y = Xr + Za + Zd + Wp + e$$

Em que, $Y =$ é o vetor de dados; $r =$ é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral; $a =$ é o vetor dos efeitos genéticos aditivos (assumidos como aleatórios); $d =$ é o vetor dos efeitos genéticos de dominância (assumidos como aleatórios), (assumidos como aleatórios); $p =$ é o vetor dos efeitos de parcela; $e =$ é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

Foram estimados os seguintes parâmetros genéticos: variâncias genética aditiva (σ_a^2), variância genética de dominância (σ_d^2), variância ambiental entre parcelas (σ_{parc}^2), variância residual (ambiental) (σ_e^2), variância fenotípica individual (σ_f^2), herdabilidade individual no sentido restrito (\hat{h}_a^2), herdabilidade individual dos efeitos de dominância (\hat{h}_d^2), herdabilidade individual no sentido amplo (\hat{h}_g^2), coeficiente de determinação dos efeitos de parcela (c_{parc}^2) e média geral do experimento.

As estruturas de médias e variâncias são dadas por:

$$E \begin{bmatrix} y \\ a \\ d \\ c \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Xb \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}; \quad \text{Var} \begin{bmatrix} y \\ a \\ d \\ c \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} V & ZA\sigma_a^2 & ZD\sigma_d^2 & Wl\sigma_c^2 & l\sigma_e^2 \\ A\sigma_a^2Z' & A\sigma_a^2 & 0 & 0 & 0 \\ D\sigma_d^2Z' & 0 & D\sigma_d^2 & 0 & 0 \\ l\sigma_a^2W' & 0 & 0 & l\sigma_c^2 & 0 \\ l\sigma_a^2 & 0 & 0 & 0 & l\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

em que:

$$V = ZA \sigma_a^2 Z' + ZD \sigma_d^2 Z' + Wl \sigma_c^2 + l\sigma_e^2.$$

Equações de modelo misto:

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z+A^{-1}\lambda_1 & Z'Z & Z'W \\ Z'X & Z'Z & Z'Z+D^{-1}\lambda_2 & Z'W \\ W'X & W'Z & W'Z & W'W+l\lambda_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{a} \\ \hat{d} \\ \hat{c} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix},$$

em que:

$$\lambda_1 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2} = \frac{1 - h_a^2 - c^2}{h^2};$$

$$\lambda_2 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_d^2} = \frac{1 - h_a^2 - c^2}{h_a^2 - h^2};$$

$$\lambda_3 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_c^2} = \frac{1 - h_a^2 - c^2}{c^2}$$

σ_d^2 e h_a^2 : variância genética de dominância e herdabilidade no sentido amplo, respectivamente; D: matriz de correlação genética de dominância entre os indivíduos em avaliação.

O sistema apresentado prediz isoladamente os efeitos aditivos (\hat{a}) e de dominância (\hat{d}). Os valores genotípicos totais, dados por $\hat{g} = \hat{a} + \hat{d}$, podem ser preditos diretamente pelas equações de modelos mistos:

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z+G^{-1}\sigma_e^2 & Z'Z \\ W'X & W'Z & W'W+l\lambda_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{g} \\ \hat{c} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix},$$

em que:

$$G = \sigma_a^2 + D\sigma_d^2$$

Estimadores iterativos dos componentes de variância por REML via algoritmo EM:

$$\hat{\sigma}_e^2 = [y'y - \hat{b}' X'y - \hat{a}' Z'y - \hat{d}' Z'y - \hat{c}' W'y] / [N - r(x)]$$

$$\hat{\sigma}_c^2 = [\hat{c}'\hat{c} + \hat{\sigma}_e^2 \text{tr } C^{44}] / s;$$

$$\hat{\sigma}_a^2 = [a'A^{-1} - \hat{a}' + \hat{\sigma}_e^2 \text{tr } (A^{-1} C^{22})] / q;$$

$$\hat{\sigma}_d^2 = [\hat{d}' D^{-1} \hat{d} + \hat{\sigma}_e^2 \text{tr } (D^{-1} C^{22})] / q.$$

3.1.4. RESULTADOS

3.1.4.1. Análise multivariada pelo procedimento Ward-MLM

A estratégia de classificação Ward-MLM, utilizando simultaneamente caracteres quantitativos relacionados à resistência ao *P. brachyurus* e qualitativos, foi eficiente para discriminar os híbridos interespecíficos com a formação de três grupos a partir da função de máxima verossimilhança (Figura 1).

Pelo procedimento da função de verossimilhança, foi determinado o número ideal de grupos, com um valor de incremento de 66,51 (Figura 1). Segundo Barbé et al. (2010), a análise da função de verossimilhança pode definir critérios mais

precisos na formação de grupos, resultando na determinação de grupos menos subjetivos.

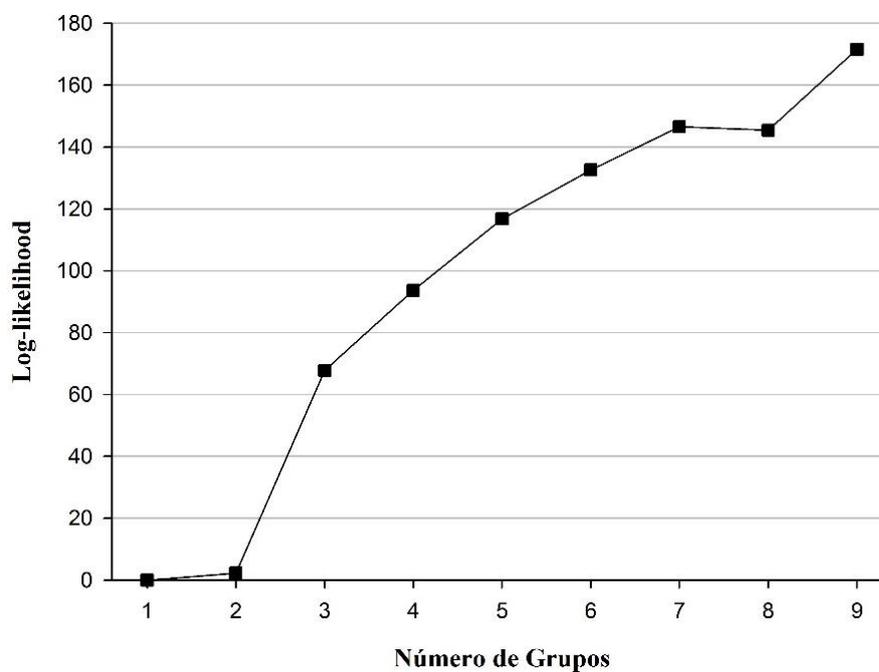


Figura 1. Distribuição da função logarítmica da probabilidade (Log-likelihood) em relação ao número de grupos formado pela estratégia Ward-MLM em híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. UENF, Campos dos Goytacazes, 2016.

Considerando as características presentes nos ramos jovens, pode-se observar abertura da extremidade para a maioria dos híbridos, com predomínio de fraca pigmentação antociânica ou ausente (84,21%), e apenas o grupo II alocou quatro híbridos com forte pigmentação antociânica (Tabela 3).

Tabela 3. Características e número de híbridos interespecíficos por grupo de características multicategóricas em cada um dos três grupos formados pela estratégia Ward-MLM. UENF, Campos dos Goytacazes, 2016.

Descritores	Grupos		
	G I (13)	G II (26)	G III (18)
Ramo jovem: abertura da extremidade			
Fechada	-	6	3
Aberta	13	20	15
Ramo jovem: pigmentação antociânica da extremidade			
Ausente ou fraca	11	16	13
Média	2	6	5
Forte	-	4	-
Folha jovem: cor da face superior do limbo			
Verde-amarela	1	6	6
Verde com áreas antociânicas	10	19	11
Vermelho-cobreada clara	1	1	1
Vermelho-cobreada escura	1	-	-
Vermelho-vinho	-	-	-
Folha adulta: forma do limbo			
Cordiforme	3	2	2
Deltóide	8	21	13
Pentagonal	2	3	3
Orbicular	-	-	-
Reniforme	-	-	-
Folha adulta: número de lóbulos			
Nenhum	4	-	-
Três	9	11	11
Cinco	-	14	7
Sete	-	-	-
Mais que sete	-	1	-
Folha adulta: profundidade dos seios laterais superiores			
Rasa	2	5	7
Média	6	12	7
Profunda	5	9	4
Folha adulta: disposição dos lóbulos dos seios laterais superiores			
Aberta	10	17	12
Fechada	3	8	5
Muito sobreposta	-	1	1
Ligeiramente sobreposta	-	-	-
Folha adulta: forma da base do seio peciolar			
Côncava (em "u")	5	7	1
Retilínea (em "v")	6	10	10
Convexa	2	9	7
Folha adulta: disposição dos lóbulos do seio peciolar			
Totalmente aberta	9	10	12
Meio aberta	2	13	5
Pouco aberta	1	1	1
Fechada	1	2	-
Sobreposta	-	-	-

Tabela 3. Cont.

Descritores	Grupos		
	G I (13)	G II (26)	G III (18)
Folha adulta: comprimento dos dentes			
Curto	9	13	14
Médio	3	10	3
Longo	1	3	1
Folha adulta: razão comprimento/largura dos dentes			
pequena	2	6	3
média	10	17	14
grande	1	3	1
Folha adulta: tamanho do limbo			
Muito pequeno	-	1	4
Pequeno	7	13	13
Médio	3	8	1
Grande	2	2	-
Muito grande	1	2	-
Folha adulta: forma dos dentes			
Ambos os lados côncavos	2	11	5
Ambos os lados retilíneos	3	12	9
Ambos os lados convexos	8	1	4
Um lado côncavo e o outro convexo	-	2	-
Lados retilíneos com lados convexos	-	-	-
Folha adulta: pigmentação antociânica das nervuras principais no limbo superior			
Ausente ou fraca	7	20	15
Média	5	3	2
Forte	1	3	1
Folha adulta: comprimento do pecíolo em relação à nervura central			
Mais curto	7	19	12
Igual	5	6	4
Mais longo	1	1	2
Folha adulta: densidade de pelos eretos sobre o pecíolo			
Ausente ou baixa	8	17	16
Média	4	4	2
Alta	1	5	-

Considerando as características avaliadas nas folhas adultas, os híbridos do grupo I apresentaram entre zero e três lóbulos, enquanto os híbridos do grupo II e III predominaram entre três e cinco lóbulos (91,22%); folhas em forma de membros predominantemente deltóides (73,68%), seio lateral superior variando de raso a profundo; para a forma da base dos pecíolos, a maioria dos híbridos de cada grupo apresentou folhas do tipo retilíneo; os híbridos dos grupos I e II apresentaram tamanho de folheto variando de pequeno a muito grande, enquanto

o grupo III alocou os híbridos com membros predominantemente pequenos (13 híbridos) (Tabela 3).

Para as características avaliadas nas folhas adultas, os híbridos tinham de zero a cinco lóbulos, folhas com formato deltóide, seios laterais superiores rasos a profundos, seios peciolares variando de côncavo, convexo a retilíneo, e tamanhos de membros variando de muito pequenos a muito grandes (Tabela 3).

Com relação as variáveis relacionadas a resistência ao *P. brachyurus* para testemunha suscetível, o milho 'BR 106', os valores médios obtidos para número de espécimes por grama de raiz e fator de reprodução foram 86,58 e 29,40, respectivamente, demonstrando a viabilidade do inóculo utilizado neste trabalho.

Para as variáveis quantitativas na videira, relacionadas à resistência ao *P. brachyurus*, detectou-se ampla variação genética entre os híbridos avaliados (Tabela 4). O grupo I alocou os 13 genótipos com os maiores valores para fator de reprodução e nematóides por grama de raiz, no entanto com menores massas de raízes. O valor mínimo para fator de reprodução desse grupo foi de 4,09 e número de nematóides por grama de raízes foi de 21,74, ou seja, todos os híbridos tiveram alta taxa de reprodução do nematóide, apresentando fator de reprodução acima de 1,0 e, portanto, considerados todos suscetíveis. O número de nematóides por grama de raízes frescas é um bom parâmetro para se avaliar a população de nematóides, pois este correlaciona diretamente com os prejuízos causados pelos nematóides (Starr et al., 2002), e os híbridos suscetíveis apresentaram os maiores valores para essa característica. Dos híbridos alocados nesse grupo um híbrido é proveniente do cruzamento *Vitis rotundifolia* C166-043 x 07355-075, dois do cruzamento 06354-047 x Cereza e dez do cruzamento 06354-047 x Nocera.

No grupo II alocaram-se o maior número de genótipos (26 híbridos), sendo cinco provenientes do cruzamento *Vitis rotundifolia* C166-043 x 07355-075, cinco do cruzamento 06354-047 x Cereza e 16 do cruzamento 06354-047 x Nocera. Este grupo alocou alguns genótipos resistentes, com fator de reprodução de 0,7. Nenhum dos híbridos foi considerado imune ao *P. brachyurus*, uma vez que a população dos nematóides no sistema radicular dos genótipos avaliados e o fator de reprodução foram superiores a zero.

Tabela 4. Mínimo, máximo, média e desvio padrão das características quantitativas para cada um dos quatro grupos e coeficiente de correlação das variáveis quantitativas com as duas primeiras variáveis canônicas (CAN). UENF, Campos dos Goytacazes, 2016.

Variáveis	Parâmetros	Grupos			CAN	
		G I (13)	G II (26)	G III (18)	CAN 1	CAN 2
Massa de Raiz	Mínimo	65,40	71,0	100,50	1,88	1,94
	Máximo	97,0	133,20	134,50		
	Média	79,80	100,93	120,0		
	Desvio Padrão	9,19	15,55	10,20		
Fator de Reprodução	Mínimo	4,09	0,71	0,35	-1,65	-6,55
	Máximo	14,22	9,25	7,68		
	Média	8,34	5,04	2,69		
	Desvio Padrão	3,38	2,60	2,11		
Nematóides por grama de raiz	Mínimo	21,74	3,87	1,33	0,33	7,32
	Máximo	72,0	33,64	22,80		
	Média	41,37	19,25	8,82		
	Desvio Padrão	14,99	8,86	6,56		

O grupo III alocou 18 genótipos, com cinco indivíduos resistentes, visto que o valor mínimo para o fator de reprodução foi de 0,35. A maioria dos híbridos deste grupo é pertencente à população do cruzamento entre os genitores 06354-047 x Nocera (15 híbridos) e os demais híbridos dos cruzamentos 06354-047 x Cereza (dois híbridos) e *Vitis romanetii* x C166-043 (um híbrido). Este grupo foi o mais homogêneo dentre os demais apresentando valor médio de 2,69 e uma baixa estimativa do desvio padrão 2,11 para fator de reprodução. Os melhores genótipos para a resposta ao *P. brachyurus* com as maiores estimativas para massa de raízes (120,0 g) e uma menor população de nematóide no sistema radicular (8,82) foram alocados nesse grupo. Os híbridos que apresentaram menor número de nematóides por grama de raiz e, conseqüentemente, menor fator de reprodução, também exibiram um sistema radicular mais desenvolvido, característica avaliada pela massa de raízes.

As duas primeiras variáveis canônicas (CAN) obtidas por meio da metodologia Ward-MLM explicaram 100,00% da variação total (Figura 2). Conforme Cruz et al. (2012), caso as duas primeiras variáveis canônicas permitam estimativas acima de 80% da variação total, pode-se obter uma interpretação satisfatória da variabilidade entre os híbridos, tal como ocorreu neste estudo, sendo possível a representação gráfica bidimensional totalmente

apropriada para visualizar a relação entre os grupos e entre os híbridos dentro dos grupos.

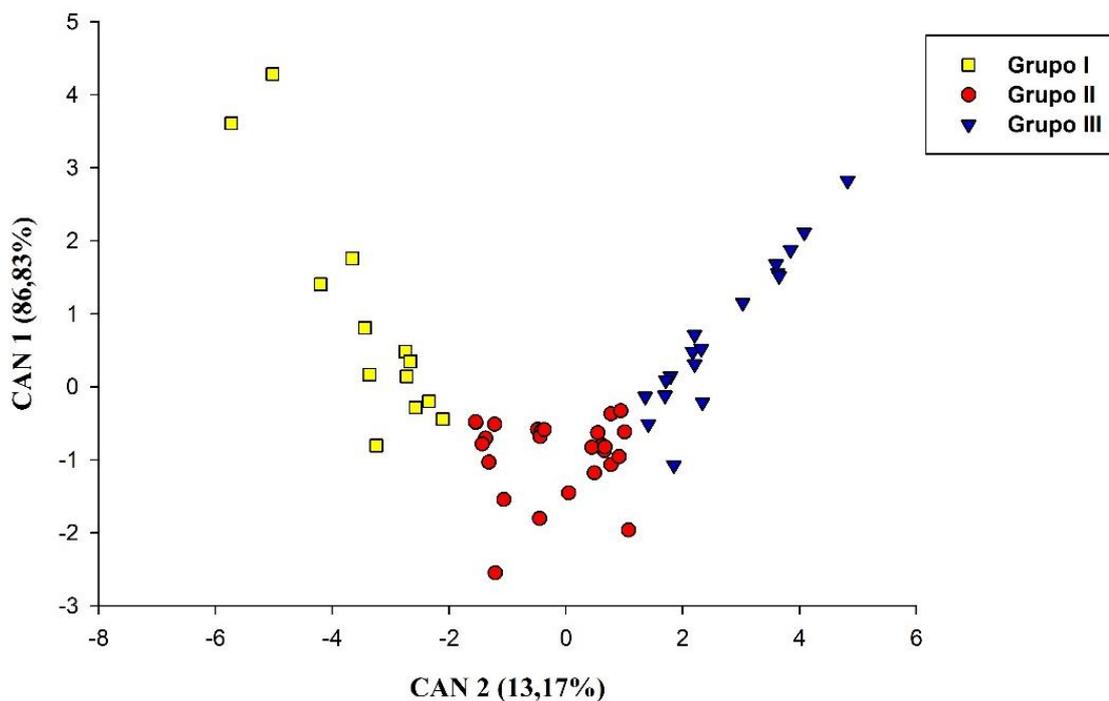


Figura 2. Distribuição das duas primeiras variáveis canônicas para os três grupos formados pela análise Ward-MLM. UENF, Campos dos Goytacazes, 2016.

As características que mais contribuíram para a quantificação da divergência genética, com base na primeira variável canônica, foram massa de raízes com 1,88 e fator de reprodução -1,65 (Tabela 3).

Percebe-se um distanciamento entre os grupos I e III formados pelo procedimento Ward-MLM e a aproximação dos grupos I com II e II com III (Tabela 5 e Figura 2). Os grupos II e III contemplam os híbridos resistentes com as mais baixas populações de nematóides nas raízes.

Tabela 5. Distância entre os grupos formados pelo procedimento Ward-MLM, proposto por Franco et al. (1998). UENF, Campos dos Goytacazes, 2016.

Grupos	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Grupo I	-	37,83	87,88
Grupo II	37,83	-	36,11
Grupo III	87,88	36,11	-

Foi observado durante a condução do experimento que as plantas suscetíveis, apresentaram reações sintomáticas, como: lesões necróticas de vários tamanhos e cores encontradas ao longo das raízes de videira infestadas por *P. brachyurus*. Na parte aérea ocorreram diversos sintomas, como, perda de vigor, tamanho desigual de plantas, amarelecimento e queda prematura de folhas, murcha durante as horas mais quentes do dia, crescimento lento, folhas necrosadas e uma planta morreu por consequência da inabilidade de produzir sistema radicular adequado. Essas reações sintomáticas verificadas são típicas do gênero *Pratylenchus* em videiras (Naves, 2005, Zasada et al. 2012).

3.1.4.2. Estimativas de parâmetros genéticos e seleção individual via procedimento REML/BLUP

As estimativas do coeficiente de herdabilidade no sentido amplo que capta os efeitos genotípicos totais foram elevadas para as três características, sobretudo para fator de reprodução ($\hat{h}_g^2 = 84,99\%$), fato que evidencia alto controle genético na expressão dos caracteres e mostra grande potencial para seleção com boas perspectivas de avanço genético na seleção de indivíduos resistentes ao *P. brachyurus* (Tabela 6).

As estimativas das variâncias genéticas, em maior parte são advindas dos efeitos de dominância (σ_d^2) para massa de raízes (401,569), fator de reprodução (24,7453), e nematóides por grama de raiz (500,8805), conseqüentemente, a herdabilidade individual de dominância foram elevadas, variando de 0,722 a 0,831, em que, tais valores são próximos das estimativas das herdabilidades no sentido amplo (Tabela 6). As herdabilidades individuais no sentido restrito (\hat{h}_a^2)

foram de baixas magnitudes para as três características, variando de 0,0180 a 0,0236, fato evidenciado pelas baixas estimativas das variâncias aditivas (σ_a^2) que atingiram valores até 13,1238 para massa de raízes.

Tabela 6. Estimativas dos componentes de variância e parâmetros genéticos, para as variáveis: massa de raízes (g), fator de reprodução e nematóides por grama de raiz, a partir de 57 clones de uma população de cruzamento interespecíficos de *Vitis* spp. para resistência ao nematóide *P. brachyurus*. UENF, Campos dos Goytacazes, 2016.

Componentes de Variância (REML Individual)	Características		
	Massa de Raízes	Fator de Reprodução	Nematóides por grama de raiz
σ_a^{2a}	13,1238	0,5622	11,2973
σ_d^2	401,5690	24,7453	500,8805
σ_{parc}^2	0,0955	0,0167	0,2839
σ_e^2	141,4035	4,4519	114,3441
σ_f^2	556,1918	29,7760	626,8058
\hat{h}_a^2	0,0236	0,0188	0,0180
\hat{h}_g^2	$0,7456 \pm 0,1495$	$0,8499 \pm 0,1596$	$0,8171 \pm 0,1565$
\hat{h}_d^2	0,7220	0,8310	0,7991
c_{parc}^2	0,002	0,006	0,005
Média geral	104,0917	6,1129	19,5720

^aEstimativas das variâncias genética aditiva (σ_a^2), variância genética de dominância (σ_d^2), variância ambiental entre parcelas (σ_{parc}^2), variância residual (σ_e^2), variância fenotípica individual (σ_f^2), herdabilidade individual no sentido restrito (\hat{h}_a^2), herdabilidade individual dos efeitos de dominância (\hat{h}_d^2), herdabilidade individual no sentido amplo (\hat{h}_g^2), coeficiente de determinação dos efeitos de parcela (c_{parc}^2) e média geral do experimento.

Considerando as variâncias fenotípicas (σ_f^2) de massa de raízes (556,1918), fator de reprodução (29,7760) e nematóide por grama de raízes (626,8058), as variâncias de dominância foram superiores as residuais (σ_e^2), que variaram de 4,4519 (fator de reprodução) a 141,4035 (massa de raízes), ratificando que estas condições são favoráveis para seleção, demonstrando que a maior parte do fenótipo é atribuída a causas genéticas de natureza dos efeitos de dominância.

Os coeficientes de determinação dos efeitos de parcela (c_{parc}^2) ficaram entre 0,002 e 006 para todos os caracteres, ou seja, apresentaram valores próximos de zero, revelando que pequena variação ambiental permaneceu dentro das parcelas indicando boa precisão experimental, o que é ratificado pelas baixas estimativas

da variância ambiental entre parcelas (σ_{parc}^2), que variaram de 0,0955 a 0,2839 (Tabela 6).

Verificou-se grande diferença entre os híbridos avaliados, no que se refere aos valores genotípicos, variando de 0,63 a 18,48 para fator de reprodução dos nematoides (Tabela 7). Para seleção dos indivíduos resistentes com base nos seus valores genotípicos (u+g) destacam-se os híbridos CH3.2, CH3.23, CH3.8, CH3.37, CH3.38, CH3.41 e CH3.36 do cruzamento entre 06354-047 x Nocera, CH2.1 e CH2.7 do cruzamento entre 06354-047 x Cereza e CH1.1, CH1.3 e CH1.2 do cruzamento entre 06354-047 x Nocera.

Tabela 7. Ordenamento dos 57 híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. para resistência ao nematóide *P. brachyurus*, em que (a) são os efeitos aditivos preditos, (d) efeitos de dominância preditos, (g) efeitos genotípicos preditos, (u+g) e média ou valores genotípicos para a característica fator de reprodução na seleção de híbridos. UENF, Campos dos Goytacazes, 2016.

Ordem	Híbridos	a	d	g	u + g	Ganho	Nova Média
1	CH1.2	-0,0962	-5,3813	-5,4774	0,6355	0,0063	6,1193
2	CH3.36	-0,07	-5,3257	-5,3956	0,7173	0,1043	6,2172
3	CH2.7	-0,0631	-5,1453	-5,2083	0,9046	0,2043	6,3172
4	CH3.38	-0,0663	-5,0817	-5,1479	0,965	0,3045	6,4174
5	CH1.3	-0,0905	-5,003	-5,0935	1,0194	0,4074	6,5203
6	CH3.37	-0,0642	-4,9428	-5,0069	1,106	0,5132	6,6261
7	CH1.1	-0,0891	-4,911	-5,0001	1,1129	0,6214	6,7343
8	CH3.8	-0,0633	-4,8855	-4,9488	1,1641	0,7338	6,8468
9	CH2.1	-0,0584	-4,8349	-4,8932	1,2197	0,8498	6,9627
10	CH3.23	-0,0605	-4,7036	-4,7641	1,3488	0,9694	7,0824
11	CH3.2	-0,0597	-4,6493	-4,7091	1,4039	1,0914	7,2044
12	CH3.41	-0,0493	-3,9642	-4,0136	2,0993	1,2175	7,3305
13	CH3.6	-0,0423	-3,499	-3,5413	2,5716	1,3338	7,4467
14	CH3.1	-0,0371	-3,1594	-3,1966	2,9164	1,4446	7,5575
15	CH3.9	-0,0358	-3,0694	-3,1052	3,0077	1,5525	7,6654
16	CH3.5	-0,0333	-2,9085	-2,9418	3,1711	1,6634	7,7763
17	CH3.13	-0,031	-2,7517	-2,7827	3,3302	1,7757	7,8887
18	CH3.16	-0,0259	-2,4205	-2,4464	3,6665	1,8897	8,0026
19	CH3.32	-0,0255	-2,3936	-2,4192	3,6937	2,0009	8,1138
20	CH3.3	-0,0236	-2,2642	-2,2878	3,8252	2,1172	8,2301
21	CH3.30	-0,0215	-2,1252	-2,1467	3,9663	2,2363	8,3492

Tabela 7. Cont.

Ordem	Híbridos	a	d	g	u + g	Ganho	Nova Média
22	CH2.2	-0,0166	-2,0788	-2,0954	4,0175	2,358	8,4709
23	CH3.24	-0,0119	-1,4905	-1,5024	4,6106	2,4852	8,5982
24	CH3.34	-0,0081	-1,2407	-1,2488	4,8641	2,6025	8,7155
25	CH3.10	-0,0066	-1,1472	-1,1539	4,9591	2,7192	8,8322
26	CH3.27	-0,0041	-0,9821	-0,9863	5,1267	2,8403	8,9532
27	CH3.25	-0,0031	-0,916	-0,9192	5,1938	2,9637	9,0766
28	CH3.12	0,0041	-0,4376	-0,4335	5,6794	3,0931	9,2061
29	CH3.7	0,0046	-0,4028	-0,3981	5,7148	3,2147	9,3277
30	CH3.28	0,0048	-0,3936	-0,3889	5,7241	3,3438	9,4567
31	CH3.35	0,0054	-0,3493	-0,3439	5,7691	3,482	9,5949
32	CH3.20	0,0055	-0,3467	-0,3412	5,7717	3,6292	9,7421
33	CH3.14	0,0143	0,2382	0,2526	6,3655	3,788	9,9009
34	CH2.9	0,0187	0,2505	0,2692	6,3821	3,9353	10,0482
35	CH2.6	0,0202	0,3503	0,3705	6,4834	4,0947	10,2076
36	CH2.5	0,0264	0,7609	0,7873	6,9003	4,264	10,3769
37	CH1.4	-0,0023	0,8154	0,8131	6,9261	4,4295	10,5424
38	CH3.18	0,0243	0,8952	0,9195	7,0324	4,6103	10,7233
39	CH3.31	0,0273	1,0956	1,1229	7,2359	4,8046	10,9175
40	CH3.4	0,0299	1,2661	1,296	7,409	5,0091	11,1221
41	CH3.22	0,0371	1,7385	1,7756	7,8885	5,2275	11,3405
42	CH1.5	0,0128	1,8131	1,8259	7,9388	5,4433	11,5562
43	CH1.3	0,0258	2,6683	2,6941	8,8071	5,6845	11,7974
44	CH3.15	0,0532	2,7998	2,853	8,9659	5,898	12,011
45	CH3.11	0,0542	2,8685	2,9227	9,0356	6,1323	12,2452
46	CH2.4	0,0599	2,9672	3,0271	9,14	6,3997	12,5127
47	CH3.26	0,0601	3,256	3,316	9,429	6,7064	12,8193
48	CH3.17	0,0765	4,3423	4,4188	10,5317	7,0454	13,1583
49	CH3.29	0,0779	4,4319	4,5098	10,6227	7,3372	13,4502
50	CH3.33	0,082	4,702	4,7839	10,8969	7,6907	13,8036
51	CH3.39	0,0863	4,9862	5,0725	11,1854	8,1059	14,2188
52	CH1.7	0,0636	5,1635	5,2271	11,34	8,6115	14,7244
53	CH2.3	0,1144	6,5668	6,6812	12,7941	9,2884	15,4013
54	CH2.8	0,1266	7,3685	7,4951	13,608	9,9401	16,0531
55	CH3.19	0,1489	9,117	9,2659	15,3788	10,7552	16,8681
56	CH3.40	0,1692	10,4602	10,6295	16,7424	11,4998	17,6127
57	CH3.21	0,1952	12,1749	12,3702	18,4831	12,3702	18,4831

3.1.5. DISCUSSÃO

Pelos critérios pseudo-F e pseudo-t₂, a função de verossimilhança definiu o número ideal de grupos homogêneos em três, agrupados de acordo com suas

similaridades. Isso se deve ao maior aumento da função de verossimilhança que ocorreu em relação ao grupo III, onde houve um incremento de 65,54 (Figura 1).

A função de verossimilhança definiu critérios mais precisos para a formação dos grupos, resultando em agrupamentos mais objetivos, diferentemente do que ocorre com os métodos de agrupamento hierarquizado em que o número de grupos é estabelecido de forma mais subjetiva e pessoal. O número de grupos pode variar de acordo com a espécie, número de acessos e o número e tipo de descritor (Gonçalves et al. 2008). Campos et al. (2013), avaliaram uma população de 138 indivíduos de *Psidium guajava*, proveniente do programa de melhoramento da UENF, e verificaram que o maior incremento na função de probabilidade foi atingido quando oito grupos foram considerados. Semelhante a esse estudo, Santos et al. (2015) avaliando uma população de 138 híbridos interespecíficos de *Passiflora* spp., determinaram como três, o número ideal de grupos, uma vez que o valor máximo foi alcançado neste ponto.

Para maioria dos híbridos, nos três grupos formados, predominaram folhas com ausência ou fraca pigmentação antociânica das nervuras principais no limbo superior, no entanto 35,08% dos híbridos apresentaram de média a forte, considerando também que nos ramos jovens 29,08% apresentaram pigmentação antociânica variando de média a forte (Tabela 2). Cultivares com presença de antocianinas nas folhas, ramos e bagas são importantes para produção destinada a indústria de vinhos tintos, porque contribuem para os atributos sensoriais e, principalmente, para a coloração do vinho. A quantidade e a composição das antocianinas presentes nas uvas diferem de acordo com a espécie, variedade, maturação, condições climáticas e cultivar (Muñoz-Espada et al. 2004).

O conhecimento das características morfológicas avaliadas neste trabalho (Tabela 2) é de fundamental importância em programas de melhoramento de plantas, sobretudo para as do gênero *Vitis*, pois mesmo não se tratando de características de interesse econômico, proporcionam contribuições para uma melhor caracterização da diversidade genética, exploração da variabilidade genética e posterior conservação das espécies.

Os híbridos de *Vitis* foram divididos em três grupos de acordo com valores genotípicos para reação ao *P. brachyurus*, considerando a característica fator de reprodução (FR): 45 genótipos suscetíveis ($FR \geq 1$) sete moderadamente resistentes ($2 \geq FR \geq 1$) e quatro resistentes ($FR \leq 1$). Foram selecionados 11

híbridos interespecíficos, considerando aqueles resistentes e moderadamente resistentes, que corresponderam a 19,29% no total das três populações segregantes (Tabela 7). Em geral, os híbridos resistentes foram provenientes dos cruzamentos em que o genitor 06354-047 foi utilizado, o que indica que tal genitor pode ser a fonte de resistência para o *P. brachyurus*.

Os grupos I e II apresentaram híbridos resistentes, porém nenhum destes foram imunes ao nematóide. Diferente desse estudo, Heriksen et al. (2012) estudaram a reação de oito porta-enxertos de videira a *P. brachyurus* e *P. zaeae* e identificaram que todos os porta-enxertos foram imunes. No entanto, os híbridos selecionados neste trabalho podem apresentar dupla aptidão, ou seja, tanto para uso direto como porta-enxerto como também para copa, a partir dos clones selecionados e propagados vegetativamente.

A herdabilidade é um dos mais importantes parâmetros genéticos, pois quantifica a fração da variação fenotípica de natureza herdável, passível de ser explorada na seleção. As estimativas de herdabilidade no sentido amplo, relativas às características fator de reprodução, nematóides por grama de raiz e massa de raízes permitem os melhores progressos genéticos associados à clonagem de materiais selecionados. Além disso, por serem caracteres correlacionados, os resultados indicam que, em se tratando de seleção para resistência, há boas chances de sucesso nos três caracteres pela seleção apenas do fator de reprodução (Rosado et al. 2009).

Este fato revela que para o melhoramento da uva, a reprodução desses híbridos por via sexuada não conduzirá a ganhos genéticos expressivos para essas características. No entanto, selecionando-se os híbridos para menor fator de reprodução e nematóides por grama de raiz e, clonando-se este material selecionado, os ganhos genéticos poderão ser maximizados (Kalil et al. 2000).

Neste trabalho, as condições são favoráveis para seleção, visto que a maior parte do fenótipo é atribuída a causas genéticas. Como as variâncias fenotípicas totais, em virtude do efeito ambiental entre parcelas (σ_{parc}^2) e dos coeficientes de determinação dos efeitos de parcelas (c_{parc}^2) tenderam a zero, pode-se concluir que há baixa magnitude para o efeito de parcelas e boa eficiência de seleção em termos de precisão experimental para fator de reprodução, massa de raízes e nematóides por grama de raiz (Rosado et al. 2009).

Para efeito de seleção pelos componentes de média preditos pelo BLUP, os valores genotípicos devem ser preferidos pelos pesquisadores no melhoramento de plantas, pois são estes os verdadeiros valores a serem preditos. Valores de nova média são as predições feitas pelo BLUP para os cultivos comerciais, ou seja, os híbridos deverão ter, em média, até 1,40 para fator de reprodução predito (Tabela 7).

Pelo critério baseado nos fatores de reprodução, observou-se, em geral, prevalência de reação de suscetibilidade para os híbridos interespecíficos, por predominarem valores maiores que 1,0 para fator de reprodução. No entanto, como para diversos híbridos os valores genéticos ($u+g$) para fator de reprodução ficaram entre 1,0 e 2,0, o mais apropriado seria, nesses casos, considerar tal suscetibilidade como resistência moderada, visto que são genótipos que asseguram a sobrevivência do nematóide, sem concorrer a aumentos muito expressivos e rápidos em seus níveis populacionais em áreas infestadas e por não apresentaram lesões significativas nas raízes das plantas. O mesmo pode ser dito em relação à resistência revelada pelo híbrido CH3.38 cujo valor genético foi ligeiramente inferior a 1,0 de fator de reprodução.

De outra parte, vários híbridos, com valores maiores que 2,0 de fator de reprodução ou bem próximos disso, devem ser qualificadas como suscetíveis. Esses indivíduos atuam como hospedeiros eficientes e favorecem o estabelecimento de níveis populacionais de *P. brachyurus* capazes de causar danos diretos significativos à viticultura e, conseqüentemente, maiores dificuldades na condução de programas de melhoramento.

Considerando os efeitos genotípicos aditivos e dominantes, é notório a superioridade dos efeitos de dominância nos híbridos obtidos das populações segregantes de *Vitis* para reação ao *P. brachyurus*. E os indivíduos selecionados para resistência neste estudo apresentaram os menores valores genotípicos, com ganhos previstos abaixo de 1,2%. O híbrido CH1.2 apresentou o menor valor genotípico para o fator de reprodução ($u + g = 0,6355$) e ganho genético próximo a zero (0,0063). Isso indica que genótipos com valores mais baixos para o fator de reprodução podem ser clonados e avançados.

O uso da resistência varietal em videiras, juntamente com outras medidas de controle dos nematóides, possibilita uma maior eficiência na redução populacional deste patógeno no solo, obtendo um maior rendimento comercial da cultura. Além

do uso direto, os clones resistentes poderão ser utilizados também como porta-enxertos comerciais (Walker et al. 1994, Campos et al. 2012).

3.1.6. CONCLUSÕES

A estratégia de classificação Ward-MLM, foi eficiente para discriminar a variabilidade entre os genótipos e permitiu a separação dos 57 genótipos em três grupos homogêneos. Os grupos II e III foram os mais próximos geneticamente e alocaram os híbridos resistentes ao *P. brachyurus*. As altas estimativas de variância de dominância sugerem que maiores progressos genéticos serão alcançados com a clonagem dos híbridos resistentes. Com base nos valores genotípicos para fator de reprodução foram selecionados os clones resistentes e moderadamente resistentes CH3.2, CH3.23, CH3.8, CH3.37, CH3.38, CH3.41, CH3.36, CH2.1, CH2.7, CH1.1, CH1.3 e CH1.2. Tais híbridos que demonstraram menores populações de nematóides por grama de raiz e menor capacidade de reprodução para o nematóide *P. brachyurus* devem ser testados como porta-enxertos e preferidos para transplante em áreas infestadas.

3.2. SELEÇÃO DE CLONAL EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Vitis* spp. RESISTENTES AO NEMATÓIDE DAS LESÕES RADICULARES (*Pratylenchus brachyurus*) VIA PROCEDIMENTO REML/BLUP

3.2.1. INTRODUÇÃO

A viticultura brasileira tem se expandido ao longo dos anos, sobretudo, nas regiões de produção emergente, que incluem as regiões subtropical e tropical (Camargo et al. 2011; IBGE 2015). No entanto, para aumentar, ou mesmo garantir a produtividade e qualidade dos frutos, é necessário o desenvolvimento de novas cultivares, adaptadas e resistentes as principais doenças nas novas áreas de cultivos e nas tradicionais.

Doenças causadas por fitonematóides afetam gravemente a videira, principalmente, sob altas populações do patógeno no solo. Entre os fitonematóides, o nematóide das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.) é considerado determinante para a baixa produtividade mundial e brasileira (Naves et al., 2005; McKenry & Anwar, 2006; Ferris et al., 2012). Setenta espécies de *Pratylenchus* são encontradas no mundo. No Brasil foram registradas: *P. coffeae*, *P. brachyurus*, *P. zaeae*, *P. penetrans*, *P. neglectus*, *P. scribneri*, *P. vulnus*, *P. pseudopratensis*, *P. jordanensis*, *P. pseudofallax* e *P. jaehni*. Neste gênero, são três espécies de nematóides que causam lesões nas raízes da videira: *P. brachyurus*, *P. jordanensis* e *P. thornei*. Dentre estas espécies, o *P. brachyurus* se destaca pela ampla disseminação nas principais áreas de cultivo agrícola e é

reconhecido atualmente como um dos maiores problemas na viticultura (Naves, 2005; Ferris et al., 2012; Puerari et al., 2012; Zasada et al., 2012).

A aplicação de nematicidas como método de controle é uma opção cara e ineficiente. O uso de genótipos resistentes é a principal estratégia de controle do patógeno na videira, por não onerar o custo de produção e não ser agressivo ao meio ambiente (Pinheiro et al., 2009). Com isso, há demanda de seleção de clones resistentes para a obtenção de alta produtividade, visto que o melhoramento genético visando incorporar resistência a *P. brachyurus* apresenta dificuldades, devido a espécie ser polífaga, pouco especializada, e de hábito endoparasita migrador, não se fixando na planta hospedeira (Inomoto et al., 2007; Goulart, 2008; Puerari et al., 2012). A hibridação interespecífica em programas de melhoramento é uma estratégia para resolver esses problemas, quando incluem-se espécies silvestres, sendo que essas podem conter os genes que conferem a resistência genética ao *P. brachyurus* não encontradas nas videiras cultivadas (Schuck et al., 2011; Santos et al., 2015).

Nesse aspecto, a variabilidade genética para seleção de genótipos resistentes em populações segregantes interespecíficas, é particularmente importante para o melhorista, uma vez que a magnitude da variabilidade genética disponível nessas populações é quantificada e explorada nos programas de melhoramento (Prestes & Goulart 1995; Schuck et al, 2011; Santos et al. 2015). As estimativas de parâmetros genéticos, como herdabilidades e coeficientes de variação genotípico e ambiental são fundamentais para conhecer a natureza genética envolvida no controle das características e, permitem a seleção de genótipos (Resende et al., 2016; Santos et al., 2017).

Em experimentos desbalanceados, situação comum na experimentação no campo em fruteiras, a análise de variância conduz a estimativas imprecisas de componentes de variância, sendo, portanto, as estimativas dos valores genéticos duvidosa. Nesses casos, o procedimento estatístico pela Restricted maximum likelihood/Best linear unbiased prediction (REML/BLUP) é de avaliação genotípica otimizado (Viana & Resende, 2014). Em videiras, métodos estatísticos utilizando esta abordagem para estimação de parâmetros genéticos e componentes de médias genotípicas ($u+g$) para características fator de reprodução e índice de reprodução, que definem a resistência genética à nematóides não são

explorados. Contudo, o presente trabalho preenche essa lacuna por meio dessa abordagem pioneira no melhoramento da videira.

Neste trabalho, estimaram-se os coeficientes de variação genética e ambiental, as herdabilidades individual e no sentido amplo e de médias de clones e foram preditos os valores genéticos ($u + g$), utilizando-se o procedimento REML/BLUP para eficiência na seleção de híbridos interespecíficos resistentes ao nematóide *P. brachyurus*.

3.2.2. REVISÃO

3.2.2.1. Metodologia dos modelos mistos no melhoramento de plantas

O método estatístico dos modelos mistos foi proposto por Henderson (1949) para ser utilizado no melhoramento genético animal. Um modelo é considerado misto quando possui um ou mais efeitos fixos, além da média geral, e um ou mais efeitos aleatórios, além do erro experimental. Este modelo possibilita adaptar, simultaneamente, os efeitos fixos e aleatórios. Com isto, é possível obter estimativas para os efeitos fixos e predições para os efeitos aleatórios. Para cada condição experimental e estrutura populacional existe um modelo apropriado com suas estruturas de médias e variâncias, estimadores e preditores associados aos delineamentos experimentais e genéticos empregados no melhoramento genético de plantas (Viana & Resende, 2014).

No melhoramento de plantas, os procedimentos estatísticos de avaliação genética desempenham papel fundamental, pois permitem a predição dos valores genéticos aditivos, genéticos de dominância e genotípicos dos candidatos à seleção, propiciando uma seleção mais acurada. A utilização de técnicas adequadas para a seleção permite a maximização dos ganhos que serão gerenciados mais eficientemente pelos programas de melhoramento. Assim, a utilização de metodologias que aumentem a acurácia do processo seletivo é de extrema importância (Laviola et al., 2010).

O melhoramento genético depende do êxito na escolha dos melhores indivíduos para serem os genitores das próximas gerações (Cruz et al., 2012).

Uma das maneiras de identificar os indivíduos portadores de genes desejáveis para cruzamento se faz com a avaliação genética. A seleção deve ser feita com base nos valores genéticos dos indivíduos que serão utilizados na recombinação. Dessa forma, torna-se necessária a obtenção da estimativa da variância genética aditiva e de dominância para a predição de ganhos (Borges et al., 2010; Resende et al., 2016).

A avaliação genotípica compreende a estimação de componentes de variância e a predição dos valores genotípicos. A experimentação de campo, comumente, está associada a obtenção de dados desbalanceados, em função disso e da necessidade de inferências em nível genético e não fenotípico, o procedimento ótimo de avaliação genotípica refere-se ao REML/BLUP (máxima verossimilhança restrita/melhor predição linear não-viciada). A predição de valores genéticos usando o BLUP assume que os componentes de variância são conhecidos na população base não selecionada. Entretanto, na prática, não se conhecem os verdadeiros valores dos componentes de variância, que são estimados com o procedimento REML, que interagem nas equações de modelos mistos do procedimento BLUP (Viana & Resende, 2014).

Estes procedimentos lidam naturalmente com o desbalanceamento, conduzindo a estimações e predições de parâmetros genéticos e valores genéticos, respectivamente. O procedimento BLUP maximiza a acurácia seletiva e, portanto, é superior ou pelo menos, igual a qualquer outro método (Santos et al., 2015; Santos et al., 2017).

As principais vantagens práticas da metodologia REML/BLUP na estimação simultânea de parâmetros genéticos e predição de valores genéticos são: permite comparar indivíduos ou variedades através do tempo (gerações e anos) e espaço (locais e blocos); não exige dados obtidos sob estruturas rígidas de experimentação; permite a simultânea correção para os efeitos ambientais, estimação de componentes de variância e predição de valores genéticos; permite lidar com estruturas complexas de dados (medidas repetidas, diferentes anos, locais e delineamentos); pode ser aplicado a dados desbalanceados; permite utilizar simultaneamente grande número de informações, provenientes de diferentes gerações, locais e idades, gerando estimativas e predições mais concisas (Viana & Resende, 2014; Resende et al., 2016).

Os procedimentos analíticos dos modelos mistos têm ganhado ampla aplicação no melhoramento de plantas, em especial de espécies florestais e frutíferas. Para essas espécies, tem-se o relato de trabalhos com o eucalipto, visando à estimação dos valores genéticos e seleção entre e dentro de progênies de meios irmãos (Rocha et al., 2006); com pinhão-mansão para seleção de indivíduos entre e dentro de famílias de meios irmãos (Laviola et al., 2010). Em fruteiras, citam-se estudos recentes com mamão visando estimar parâmetros genéticos e valores genotípicos em duas populações segregantes (Calimosa-F₂ e Tainung-F₂) (Oliveira et al., 2012). Além deste, há relatos de trabalhos com maracujá (Santos et al., 2015) e goiabeira (Santos et al., 2017).

3.2.2.2. Parâmetros genéticos e correlações entre caracteres

Os parâmetros genéticos são de grande importância nos programas de melhoramento, pois permitem conhecer a variabilidade genética das populações de melhoramento. A magnitude das estimativas de parâmetros, como a herdabilidade, fornece subsídios para definição das estratégias de seleção, bem como, auxiliam a predição de ganhos (Santos et al., 2017). É necessário determinar as magnitudes das variâncias de origem genética (dominância e aditiva) frente às variâncias de efeitos ambientais para que seja possível estimar de maneira acurada o potencial da população para fins de seleção. A herdabilidade expressa o resultado da seleção baseada no fenótipo dos indivíduos de uma geração em função do grau de associação da variância genética desses indivíduos com a variância genética da geração seguinte (Santos et al., 2015).

Para a avaliação do potencial de uma população para melhoramento e escolha do método de seleção a ser utilizado, é necessária a estimativa dos componentes da variância genética. Os parâmetros genéticos estimados mediante as variâncias mencionadas são, em geral: coeficiente de variação genética (CVG%), coeficiente de variação ambiental (CVE%), índice de variação (CVG/CVE), herdabilidade no sentido amplo e no sentido restrito, ganhos genéticos absolutos (G_s) e relativos ($G_s\%$), correlações fenotípicas ($r_F\%$), genética aditiva ($r_A\%$) e ambiental ($r_E\%$) (Cruz et al., 2012).

Para que se obtenham ganhos com a seleção de genótipos superiores, é crucial tanto o conhecimento da variabilidade genética disponível na espécie

quanto o de associações de características para a formação de genótipos com tipos agronômicos desejáveis (Marçal et al., 2015). Isto porque os programas de melhoramento buscam obter novas cultivares, além de agregar vantagens adicionais com diversas características consideradas simultaneamente, que é um desafio constante e multidisciplinar. O mercado exige, além de produtividades superiores, características capazes de reduzir o custo de produção, resistência ou tolerância a pragas e doenças, qualidade de frutos, maior eficiência de nutrientes, arquitetura adequada, visando facilitar o manejo, entre outras. Considerando o grande número de caracteres melhorados simultaneamente, os programas de melhoramento vêm encontrando dificuldades na seleção dos genótipos, devido à existência de correlação entre os caracteres, sendo que a correlação pode ser utilizada como estratégia de seleção nos processos de melhoramento (Ramalho et al., 2012).

A importância de estudos de correlação entre características reside na possibilidade de se determinar o quanto a alteração em um caráter pode afetar diretamente os demais. Essa informação é importante para o melhorista, principalmente quando a seleção de um caráter é dificultada por causa de baixa herdabilidade ou dificuldades na mensuração e identificação (Santos et al., 2017).

Pode-se estimar correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais. As correlações fenotípicas apresentam causas genéticas e ambientais, porém apenas as genéticas incluem uma associação de natureza herdável, podendo, portanto, ser utilizada para que se obtenha êxito em programas de melhoramento (Cruz et al., 2012). A correlação fenotípica é feita com base nos dados coletados diretamente no campo. As correlações genéticas podem ser causadas por pleiotropismo, fenômeno pelo qual um gene influencia dois ou mais caracteres; e ligações gênicas, as quais são transitórias e ocorrem principalmente em populações derivadas de cruzamentos entre linhagens divergentes (Falconer e Mackay, 1996).

As correlações entre características quando envolvem variáveis de resposta à doença com componentes morfológicos e produtivos ainda não estão elucidadas e são de grande importância na determinação das estratégias de seleção para o melhoramento genético, de modo que a magnitude e o valor das correlações são imprescindíveis para esclarecer as relações entre as características (Santos et al., 2017).

3.2.2.3. Princípios e importância da seleção clonal

Os primeiros cultivos de videiras, provavelmente, datam de, aproximadamente, 6.000 anos a.C. e grande parte das cultivares de *V. vinifera* existentes atualmente foi consequência da grande diversidade genética provocadas pela propagação vegetativa e da domesticação feita pelo homem, ao longo desses anos (Camargo et al., 2011).

Em 1860, a morte de plantas em vinhedos franceses, em função da filoxera, um pulgão subterrâneo que ataca as raízes da planta, modificou a história da viticultura mundial, pois transformou a forma de propagação da videira, passando a utilizar a enxertia sobre cultivares resistente à doença. Isso ocorreu quando fontes de resistência foram identificadas nos Estados Unidos, onde os insetos viviam em simbiose com variedades americanas, entre as quais *V. riparia* e *V. rupestris*, que se mostraram as mais tolerantes e foram largamente propagadas (Leão et al., 2011; Bao et al., 2015).

A utilização de hibridação interespecífica passou a ocorrer ainda na metade do século XIX, com o objetivo de se obter híbridos de porta-enxertos resistentes à filoxera para manter intactas as qualidades das cultivares de copa. Nos anos seguintes, foram obtidos híbridos interespecíficos, buscando-se resistência às doenças causadas por fungos, a exemplo do míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Uncinula necator*) (Camargo & Ritschel, 2008). No entanto, somente a partir do século XX, na Europa, passou-se a dar grande ênfase ao aprimoramento de cultivares tradicionais para a produção de vinhos por meio da seleção clonal, com a justificativa do surgimento de fungicidas para o controle das doenças fúngicas e da baixa qualidade dos vinhos produzidos pelas cultivares híbridas. Desde então, a seleção clonal tem gerado resultados positivos para a viticultura, em quantidade e qualidade de produção em todo mundo (Camargo & Ritschel, 2008).

No Brasil, o estudo da seleção clonal em videira começou a se desenvolver em 1990, particularmente pela Embrapa Uva e Vinho e o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), as quais possuem matrizeiros com material propagativo com qualidade fitossanitária disponíveis para os viticultores, medida que contribui para a melhoria da produtividade, a longevidade e a qualidade da videira. Inicialmente, os programas de seleção clonal foram orientados para a obtenção de maior produtividade, mas, com o decorrer do tempo, várias outras características

agronômicas nortearam as seleções, tais como tamanho das bagas, potencial qualitativo, porte das plantas, etc. (Camargo & Ritschel, 2008; Camargo et al., 2011).

A videira é altamente heterozigota e sua propagação por estacas mantém sua heterozigosidade e, conseqüentemente, a intensidade da heterose. A seleção clonal tem o objetivo de identificar, selecionar e propagar clones superiores oriundos de variações somáticas e/ou de híbridos interespecíficos. Esta seleção, geralmente, é conduzida com dualidade de objetivos, ou seja, obter clones geneticamente superiores aos cultivados e com garantia sanitária (Camargo et al. 2009).

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Híbridos interespecíficos avaliados

Foram avaliadas três populações segregantes de cruzamento interespecíficos de *Vitis* spp. para resistência ao *P. brachyurus*. No total foram avaliados 57 híbridos oriundos do cruzamento entre os genitores *Vitis romanetii* C166-043 (*V. romanetii*) x 07355-075 (*V. vinifera*) – sete híbridos; 06354-047 (*V. vinifera/V. rotundifolia*) x Cereza (*V. vinifera*) – nove híbridos; e 06354-047 (*V. vinifera/V. rotundifolia*) x Nocera (*V. vinifera*) – 41 híbridos. Os cruzamentos, bem como os híbridos obtidos são provenientes do banco de germoplasma ativo do Department of Viticulture and Enology da University of Califórnia.

3.2.3.2. Instalação do experimento, inoculação e avaliação

As estacas dos híbridos obtidos foram enraizadas em vasos com capacidade para 7L, contendo mistura de solo: areia na proporção 2:1 (v:v), e mantidos para estabelecimento das mudas em casa de vegetação na Unidade de Apoio a Pesquisa da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com duas repetições e três plantas por parcela dos 57 híbridos interespecíficos de *Vitis*, e uma cultivar de milho ‘BR 106’ (padrão de suscetibilidade) utilizada como

tratamento controle para verificar a viabilidade da fonte de inóculo e utilizada para as estimativas dos índices de reprodução do nematóide nos híbridos de videira.

Após quatro meses (novembro de 2015), as plantas foram inoculadas com suspensão de 600 espécimes de *P. brachyurus*. A suspensão de nematóides foi calibrada para 300 nematóides/mL e distribuída em dois orifícios abertos ao redor das mudas de uva e de milho. O milho foi avaliado aproximadamente aos 90 dias após a inoculação, e cada vaso recebeu uma nova planta, que foi avaliada juntamente com as plantas de uva. Decorridos 180 dias da inoculação, utilizou-se método destrutivo e coletou-se o sistema radicular das plantas de uva e milho para extração dos nematóides. A extração dos nematóides nas raízes foi feita a partir da metodologia proposta por Coolene D'Herde (1972). As amostras obtidas foram avaliadas, contando-se todos os espécimes de *P. brachyurus*, presentes em cada amostra sob microscópio estereoscópico, utilizando câmara de Peters.

3.2.3.3. Características avaliadas

Com as características avaliadas determinou-se a massa de raízes, nematóides por grama de raiz, fator de reprodução e índice de reprodução. Fator de reprodução foi estimado por $FR = P_f/P_i$, em que FR, P_f e P_i , correspondem ao fator de reprodução, população final e população inicial, respectivamente. As plantas foram classificadas como imunes ($FR=0$), resistentes ($0 < FR < 1$) e suscetíveis ($FR > 1$) conforme critério de Oostenbrink (1966). O índice de reprodução dos nematóides foi determinado com uso da reprodução dos nematóides no milho como testemunha padrão (100%) em comparação com os híbridos de videira, de acordo com a metodologia estabelecida por Taylor (1967). A população final (P_f) encontrada nos genótipos de uva foi dividida pela encontrada no milho, de modo a definir os índices de reprodução. Com base nesses valores, definiram-se os níveis de resistência de cada genótipo de uva a *P. brachyurus*, de acordo com o seguinte critério de reprodução estabelecido por Taylor (1967): S, planta suscetível, reprodução normal, IR acima de 51%; LR, levemente resistente, IR de 26 a 50%; MoR, moderadamente resistente, com IR de 11 a 25%; MR, muito resistente, IR de 1 a 10%; AR/I, altamente resistente/imune, IR abaixo de 1%.

3.2.3.4. Análise estatística das características

Para escolha do valor representativo de um clone, os valores genotípicos para cada característica avaliada foram obtidos a partir do procedimento REML - Máxima Verossimilhança Restrita, aplicada ao modelo linear misto, que na forma matricial, utilizado para avaliação de clones aparentados, no delineamento em blocos ao acaso com várias plantas por parcela sugerido por Viana & Resende (2014) é:

$$Y = Xr + Za + Zd + Wp + e$$

Em que, Y = é o vetor de dados; r = é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral; a = é o vetor dos efeitos genéticos aditivos (assumidos como aleatórios); d = é o vetor dos efeitos genéticos de dominância (assumidos como aleatórios); p = é o vetor dos efeitos de parcela (assumidos como aleatórios); e = é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

A significância dos efeitos aleatórios foi obtida através da Análise de Deviance (ANADEV), pelo método REML (máxima verossimilhança restrita), que substituí com vantagens a análise de variância (ANOVA) em casos de dados desbalanceados, pelo teste da razão da máxima verossimilhança (LRT). As deviances foram obtidas conforme descrito por Viana e Resende (2014), utilizando-se o modelo com e sem os respectivos efeitos, subtraindo a deviance obtida no modelo completo do modelo sem o efeito e comparada com o valor do Qui-quadrado (χ^2) com um grau de liberdade (Viana and Resende, 2014; Silva et al., 2017). O fator bloco, assumido como efeito fixo, foi avaliado pelo teste F de Snedecor.

Foram estimados os seguintes parâmetros genéticos: variâncias genética aditiva (σ_a^2), variância genética de dominância (σ_d^2), variâncias genéticas ($\sigma_g^2 = \sigma_d^2 + \sigma_a^2$), variâncias ambientais (σ_e^2), e a herdabilidades individuais no sentido amplo (\hat{h}_g^2) e média de clones (\hat{h}_m^2) e, média geral do experimento para cada característica.

O sistema apresentado prediz isoladamente os efeitos aditivos (\hat{a}) e de dominância (\hat{d}). Os valores genotípicos totais, dados por $\hat{g}=\hat{a}+\hat{d}$, podem ser preditos diretamente pelas equações de modelos mistos:

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z+G^{-1}\sigma_e^2 & Z'Z \\ W'X & W'Z & W'W+\lambda_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{g} \\ \hat{c} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix},$$

em que:

$$G = \sigma_a^2 + D\sigma_d^2$$

Os coeficientes de variação genética (CVg) e ambiental (CVe), bem como o índice de variação (CVg/CVe), para as características avaliadas, foram estimados a partir das seguintes expressões de acordo com o procedimento de Vencovsky & BARRIGA (1992):

$$CVg\% = \frac{\sqrt{\sigma_g^2}}{\mu} \times 100;$$

$$CVe\% = \frac{\sqrt{\sigma_e^2}}{\mu} \times 100 \text{ e}$$

$$IV = \frac{CVg}{CVe}$$

Após a obtenção das médias corrigidas pelo procedimento BLUP, foram estimadas as correlações genéticas entre as variáveis analisadas.

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A significância dos efeitos genotípicos mensurados foi avaliada pela análise de deviance, em que foi observada significância para os efeitos de híbridos a 1% de probabilidade para todas as características (Tabela 1). Isso revela a

variabilidade existente entre os híbridos interespecíficos avaliados, ou seja, seus efeitos explicam parte da variação total, o que demonstra a possibilidade de obtenção de ganhos genéticos mediante a seleção para genótipos resistentes. Para todas as características, os efeitos de parcelas apresentaram valores semelhantes de zero, ou seja, não significativos a 5% de probabilidade, revelando que pequena variação ambiental permaneceu dentro das parcelas e que a seleção deve levar em conta as médias de clones.

Tabela 1. Análise de deviance para características de massa de raiz (g), fator de reprodução, nematóides por grama de raiz e índice de reprodução de 57 híbridos interespecíficos de *Vitis* spp, para resistência ao nematóide *P. brachyurus*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – Brasil, 2016

Efeitos	Massa de Raiz		Fator de Reprodução	
	Deviance	LRT (χ^2) ⁽²⁾	Deviance	LRT (χ^2)
Clones ⁽¹⁾	1473,48	713,41**	806,94	1231,42**
Parcela ⁽¹⁾	2186,85	0,04 ^{ns}	2036,04	2,32 ^{ns}
Modelo Completo	2186,89	-	2038,36	-
Efeitos	Nematóides por Grama de Raiz		Índice de Reprodução	
	Deviance	LRT (χ^2)	Deviance	LRT (χ^2)
Clones ⁽¹⁾	1467,9	1007,55**	1710,37	1231,57**
Parcela ⁽¹⁾	2474,35	1,10 ^{ns}	2939,61	2,33 ^{ns}
Modelo Completo	2475,45	-	2941,94	-

⁽¹⁾Deviance do modelo ajustado sem os efeitos de clones e parcelas, ⁽²⁾ LTR, teste da razão de verossimilhança de distribuição com 1 grau de liberdade, ^{ns}Não significativo e ^{**} significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de χ^2 (1% = 6.63; 5% = 3.84).

Os coeficientes de variação ambiental foram altos para as características fator de reprodução, nematóides por grama de raízes e índice de reprodução, respectivamente, 34,47%, 42,86% e 34,76% (Tabela 2). Porém, coeficientes dessas magnitudes são comuns em experimentos com nematóides (Cardoso et al., 2005; Aballay et al, 2009). Para massa de raízes coeficiente de variação ambiental foi médio (11,16%), evidenciando boa precisão experimental para esta característica (Pimental-Gomes, 2009). Por outro lado, estimativas mais elevadas para o coeficiente de variação genético foram observadas, tanto para massa de raízes quanto para fator de reprodução, nematóides por grama de raízes e índice de reprodução, o que indica, além de alta variabilidade genética entre os híbridos interespecíficos, uma situação bastante favorável à seleção de clones resistentes ao *P. brachyurus*.

Tabela 2. Parâmetros genéticos dos caracteres: massa de raiz (g), fator de reprodução, nematóides por grama de raiz e índice de reprodução, de 57 híbridos interespecíficos de *Vitis* spp, para resistência ao nematóides *P. brachyurus*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – Brasil, 2016

Parâmetros Genéticos	Características			
	Massa de Raiz	Fator de Reprodução	Nematóides por Grama de Raiz	Índice de Reprodução
σ_g^2	414.69	25.31	512.18	1948.50
σ_e^2	141.40	4.45	114.34	343.38
CVe %	11.16	34.47	42.86	34.76
CVg %	19.11	82.20	90.70	82.32
IV = CVg/ CVe	1.71	2.38	2.12	2.37
\hat{h}_g^2 (%)	74.56	84.99	81.71	85.01
\hat{h}_m^2 (%)	85.44	92.73	89.96	91.90
Média geral	106.54	6.12	24.95	53.62

* Estimativas de variâncias genéticas (σ_g^2), variância ambiental (σ_e^2), coeficiente de variação experimental (CVe%), coeficiente de variação genética (CVg%), índice de variação (IV = CVg/ CVe), herdabilidade individual de sentido amplo (\hat{h}_g^2), herdabilidade da média de clones (\hat{h}_m^2) e média geral do experimento.

As estimativas de herdabilidade individual no sentido amplo \hat{h}_g^2 (%), que capta os efeitos genotípicos totais ($\sigma_g^2 = \sigma_d^2 + \sigma_a^2$), foram altas para todas as características variando de 74,56% a 85,01% e, refletem o fato de que a maior parte da variabilidade fenotípica observada foi de natureza genética, e indicam que a seleção baseada nessas características poderia ser realizada com eficiência, ou seja, baixa reprodução, bem como menores populações dos nematóides na rizosfera da videira e maior massa de raízes. Esse fato é reforçado pelos valores estimados do índice de variação CVg/CVe, que foram todos superiores a 1,0, o que também indica uma situação favorável para seleção de clones resistentes, sobretudo para as características fator de reprodução, nematóides por grama de raízes e índice de reprodução que apresentaram de 2,12 a 2,38 vezes maior proporção de variação genética em relação a variação ambiental (Vencovsky e Barriga, 1992; Santos et al., 2017).

Para todas as características, nitidamente, temos que $\hat{h}_m^2 > \hat{h}_g^2$, ou seja, a seleção baseada em médias de clones está num nível mais elevado de precisão do que a seleção baseada em parcelas ou plantas individuais. Isto decorre principalmente da influência dos erros experimentais quando se utilizou médias,

ao invés de indivíduos, como critério de seleção (Vencovsky e Barriga, 1992). Pelos resultados obtidos, de fato, somente \hat{h}_m^2 interessou para avaliar as expectativas da seleção, visto que não foram selecionados clones individuais com base nas amostragens dentro das parcelas, associado ao fato que neste tipo de população tem-se a expectativa de obtenção de variância genética apenas entre os clones testados, visto o método de propagação já fixar as características dos indivíduos que são clonados. O coeficiente \hat{h}_g^2 , só tem validade para fins de comparação com outros, pois este independe do número de repetições e número de indivíduos dentro de parcelas.

Verificou-se grande diferença entre os híbridos avaliados, no que se refere aos valores genotípicos ($u+g$), variando de 0,63 a 18,48 para fator de reprodução dos nematóides (Tabela 3). Para efeito de seleção pelos componentes de média preditos pelo BLUP, os valores genotípicos ($u + g$) devem ser preferidos pelos pesquisadores no melhoramento de plantas, ao invés das médias fenotípicas, pois são estes os verdadeiros valores a serem preditos (Borges et al, 2009; Viana e Resende 2014).

Segundo o critério proposto por Oostenbrink (1966), 92% dos híbridos interespecíficos testados, com base nos valores genotípicos, foram considerados suscetíveis, com fator de reprodução igual ou acima de 1,0 (Tabela 3). Os híbridos do cruzamento entre 06354-047 x Cereza, C2.3 ($u + g = 12,79$) e C2.8 ($u+g = 13,61$), juntamente com híbridos C3.19 ($u + g = 15,38$), C3.21 ($u + g = 18,48$) e C3.40 ($u + g = 16,74$) do cruzamento entre 06354-047 x Nocera, foram os que apresentaram os maiores valores genotípicos para o fator de reprodução, com valores superiores à média apresentada pela testemunha suscetível BR 106 (Milho). Nesses genótipos, a população de nematóides chegou a crescer mais de 12 vezes relativamente à população inicial de 600 espécimes do inóculo com *P. brachyurus*.

Tabela 3. Valores genotípicos (u + g) para os caracteres fator de reprodução de e índice de reprodução dos 57 híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. para resistência ao nematóide *P. brachyurus*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – Brasil, 2016.

Clones	Cruzamentos	Fator de Reprodução		Índice de Reprodução	
		u + g	Categoria ^a	u + g	Categoria ^b
C1.1	<i>Vitis romanetii</i> C166-043 x 07355-075	1,12	S	9,75	MR
C1.2		0,64	R	5,57	MR
C1.3		8,81	S	77,27	S
C1.4		6,93	S	60,72	S
C1.5		7,94	S	69,66	S
C1.6		1,02	S	8,94	MR
C1.7		11,34	S	99,49	S
C2.1	06354-047 x Cereza	1,22	S	10,68	MR
C2.2		4,02	S	35,22	LR
C2.3		12,79	S	112,24	S
C2.4		9,14	S	80,2	S
C2.5		6,90	S	60,54	S
C2.6		6,48	S	56,89	S
C2.7		0,90	R	7,92	MR
C2.8		13,61	S	119,41	S
C2.9		6,38	S	55,99	S
C3.1	06354-047 x Nocera	2,92	S	25,57	MoR
C3.2		1,40	S	12,3	MoR
C3.3		3,83	S	33,55	LR
C3.4		7,41	S	65,01	S
C3.5		3,17	S	27,8	LR
C3.6		2,57	S	22,56	MoR
C3.7		5,71	S	50,14	LR
C3.8		1,16	S	10,2	MR
C3.9		3,01	S	26,38	LR
C3.10		4,96	S	43,48	LR
C3.11		9,04	S	79,28	S
C3.12		5,68	S	49,81	LR
C3.13		3,33	S	29,21	LR
C3.14		6,37	S	55,84	S
C3.15		8,97	S	78,66	S
C3.16		3,67	S	32,15	LR
C3.17		10,53	S	92,36	S
C3.18		7,03	S	61,7	S
C3.19		15,38	S	134,97	S
C3.20		5,77	S	50,64	LR
C3.21		18,48	S	162,2	S
C3.22		7,89	S	69,22	S
C3.23		1,35	S	11,81	MoR
C3.24		4,61	S	40,45	LR
C3.25		5,19	S	45,56	LR
C3.26		9,43	S	82,73	S
C3.27		5,13	S	44,97	LR

Tabela 3. Cont.

Clones	Cruzamentos	Fator de Reprodução		Índice de Reprodução	
		u + g	Categoria ^a	u + g	Categoria ^b
C3.28		5,72	S	50,22	LR
C3.29		10,62	S	93,21	S
C3.30		3,97	S	34,79	LR
C3.31		7,24	S	63,48	S
C3.32		3,69	S	32,41	LR
C3.33		10,90	S	95,61	S
C3.34		4,86	S	42,66	LR
C3.35		5,77	S	50,62	LR
C3.36		0,72	R	6,28	MR
C3.37		1,11	S	9,71	MR
C3.38		0,97	R	8,44	MR
C3.39		11,19	S	98,15	S
C3.40		16,74	S	146,92	S
C3.41		2,10	S	18,4	MoR
BR 106 (Milho)		11,40	S	-	-

^aS – plantas suscetíveis e R – plantas resistentes;

^bS – plantas suscetíveis, reprodução normal, RI (índice de reprodução) acima 51%; SR – levemente resistente, RI de 26 a 50%; MR – moderadamente resistente, RI entre 11 e 35%; VR – muito resistente, RI de 1 a 10%; e ER/I – extremamente resistente/imune, RI abaixo 1%.

Pelo mesmo critério de Oostenbrink (1966), 8% dos genótipos testados foram classificados como resistentes, com fator de reprodução abaixo de 1,0. Incluem-se os híbridos interespecíficos C1.2 do cruzamento entre os genitores *Vitis romanetii* C166-043 x 07355-075 ($u + g = 0,64$), C2.7 entre 06354-047 x Cereza ($u + g = 0,90$), C3.36 e C3.38 entre 06354-047 x Nocera ($u + g = 0,72$ e $0,97$, respectivamente). Esta baixa frequência de híbridos resistentes ao *P. brachyurus*, se deve ao baixo número de híbridos que foram obtidos nos cruzamentos e que foram avaliados.

Considerando somente a característica fator de reprodução, 53 genótipos são considerados suscetíveis (Fator de reprodução ≥ 1) e apenas quatro resistentes (Fator de reprodução ≤ 1). Sete híbridos apresentaram $2 \geq FR \geq 1$, estes poderiam também ser selecionados para aumentar o ponto de truncamento, atingindo até 19,29% no total dos genótipos segregantes selecionados. Isto porque, os híbridos interespecíficos selecionados neste trabalho, estão em fase testes e, apresentam resistência para outras doenças como míldio (*P. viticola*) e oídio (*U. necator*), podendo apresentar dupla aptidão, ou seja, tanto para uso direto como porta-enxerto como também para copa, a partir dos clones selecionados e propagados vegetativamente.

Segundo o critério de reprodução, estabelecido por Taylor (1967), foram constatados, desde híbridos suscetíveis até muito resistentes, de acordo com seu índice de reprodução, quando se usa testemunha padrão para a espécie de nematóide em estudo (Tabela 2). Entre os híbridos testados, 43,86% foram classificados como suscetíveis, incluindo a cultivar de milho BR 106; 31,58% foram classificados como levemente resistentes; 8,77% moderadamente resistentes; 15,79% muito resistentes; e nenhum híbrido foi classificado como altamente resistente ou imune. Genótipos resistentes de batata-doce (Marchese et al., 2010), feijão-comum e feijão-vagem (Ferreira et al., 2010) foram obtidos com sucesso ao se utilizar testemunhas suscetíveis como hospedeiro padrão, segundo esse mesmo critério utilizado neste estudo, o que demonstra sua efetividade para classificação de genótipos quanto a resistência genética à nematóides.

Os genótipos classificados pelo índice de reprodução como muito resistentes e moderadamente resistentes representaram 24,56% dos genótipos avaliados, e estão incluídos os mesmos quatro genótipos classificados como resistentes com base no fator de reprodução ≤ 1 . Nesse cenário, foram selecionados como resistentes, 14 híbridos interespecíficos que serão clonados para dar continuidade ao programa de melhoramento da videira.

Na comparação entre os critérios de Oostenbrink (1966) e Taylor (1967), observa-se coerência, e ambos são eficientes para a identificação e seleção de genótipos com resistência ao *P. brachyurus*. Porém, observa-se que, em razão do índice de reprodução proporcionar maior distribuição de classes distintas –S, LR, MoR, MR e AR/I –, é possível maior flexibilidade para estabelecer um ponto de truncagem dos genótipos a serem selecionados como resistentes do que em relação somente ao fator de reprodução. O melhoramento genético vegetal visando incorporar resistência a *P. brachyurus* para a obtenção de cultivares resistentes é considerado difícil, devido a espécie ser polífaga, hábito endoparasita migrador e a ampla gama de hospedeiros que sugere que o parasitismo de *P. brachyurus* seja pouco especializado em relação a outros fitonematóides, como *Heterodera* spp. e *Meloidogyne* spp., entre outros (Starr et al., 2002; Castillo e Vovlas, 2007; Goulart, 2008).

De maneira geral, os híbridos selecionados neste trabalho pelo fator de reprodução e índice de reprodução, apresentaram tanto maiores e menores

valores genotípicos (u+g) para massas de raízes, quanto ao número de nematóides por grama de raiz (Tabela 4).

Tabela 4. Valores genotípicos (u+g) para os caracteres massa de raiz (g) e nematóides por grama de raiz de 57 híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. para resistência ao nematóide *P. brachyurus*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – Brasil, 2016

Clones	Cruzamentos	Massa de Raiz	Nematóides por Grama de Raiz
		u + g	u + g
C1,1*	<i>Vitis romanetii</i> C166-043 x 07355-075	117,58	4,5
C1,2*		111,93	2,53
C1,3		105,30	30,6
C1,4		100,03	28,49
C1,5		87,53	40,84
C1,6*		74,31	4,85
C1,7		97,43	46,19
C2,1	06354-047 x Cereza	104,25	4,73
C2,2*		93,77	17,74
C2,3		125,44	37,95
C2,4		174,34	24,89
C2,5		117,42	23,44
C2,6		99,87	26,09
C2,7*		129,47	3,32
C2,8		93,00	59,05
C2,9		89,69	29,39
C3,1*	06354-047 x Nocera	121,32	9,91
C3,2*		111,96	5,46
C3,3		122,12	12,61
C3,4		90,61	32,97
C3,5		101,56	12,99
C3,6*		130,39	8,10
C3,7		101,53	23,51
C3,8*		86,11	5,81
C3,9		106,4	11,32
C3,10		86,82	23,89
C3,11		98,78	36,87
C3,12		97,83	23,45
C3,13		123,02	11,37
C3,14		110,87	23,52
C3,15		114,12	31,47
C3,16	124,9	12,01	
C3,17	109,69	40,49	
C3,18	119,29	23,95	
C3,19	101,99	60,16	
C3,20	105,23	21,94	
C3,21	91,87	80,32	
C3,22	114,21	27,98	
C3,23*	131,14	4,49	

Tabela 4. Cont.

Clones	Cruzamentos	Massa de Raiz	Nematóides por Grama de Raiz
		u + g	u + g
C3,24		95,56	20,24
C3,25		103,5	20,29
C3,26		85,70	45,9
C3,27		107,15	19,25
C3,28		103,09	22,45
C3,29		105,00	40,38
C3,30		85,37	18,89
C3,31		129,2	22,32
C3,32		109,57	13,58
C3,33		85,42	51,88
C3,34		91,00	21,83
C3,35		122,55	19,15
C3,36*		89,41	3,39
C3,37*		100,54	5,04
C3,38*		117,68	3,87
C3,39		115,33	39,68
C3,40		77,68	93,94
C3,41*		125,78	7,05
BR 106 (Milho)		85,00	56,88

* Híbridos interespecíficos selecionados pelos valores genotípicos (u + g) baseados em critérios de resistência definidos pelo fator de reprodução de Oostenbrink (1966) e índices de reprodução de Taylor (1967), definidos como resistentes e moderadamente resistentes.

De modo similar aconteceu com os genótipos suscetíveis. O que é explicado, por serem caracteres cujas correlações foram negativas, tanto de natureza fenotípicas, genéticas e ambientais (Tabela 5), No entanto, há uma ligeira tendência em genótipos resistentes apresentarem maior massa de raízes e menores populações de nematóides na rizosfera. Isso acontece porque massa de raízes, mesmo com baixas magnitudes nas correlações, são negativas com as características fator de reprodução, nematóides por grama de raiz e índice de reprodução,

Nota-se também que, ligeiramente, a correlações fenotípicas são maiores que as genéticas devido as maiores correlações entre os efeitos ambientais de massa de raízes com as demais características. Enquanto que, para os efeitos ambientais que afetam as associações fator de reprodução x índice de reprodução, fator de reprodução x nematóides por grama de raiz e nematóides por grama de raízes x índice de reprodução, são pouco correlacionados, por essa razão as correlações fenotípicas se aproximam da genética. Os resultados

indicam que, se tratando da seleção de genótipos para resistência, há ótimas chances de sucesso nos três caracteres pela seleção apenas do índice de reprodução, pois, segundo Falconer e Mackay (1996), ao selecionar caracteres que contribuem positivamente para o caráter de interesse, faz-se o uso da correlação de forma mais efetiva,

Tabela 5. Correlações fenotípica (r_f), genotípica (r_g) e ambiental (r_e) entre massa de raiz, nematóides por grama de raiz, fator de reprodução e índice de reprodução de 57 híbridos interespecíficos de *Vitis* spp. Para resistência ao nematóide. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-Brazil, 2016.

Características	Coefficiente de Correlação	Fator de Reprodução	Nematóides por Grama de Raiz	Índice de Reprodução
Massa de Raiz	r_f	-0,1669	-0,3515	-0,1669
	r_g	-0,0598	-0,2655	-0,0597
	r_e	-0,1885	-0,3622	-0,1808
Fator de Reprodução	r_f		0,9523	0,9985
	r_g		0,9574	0,9985
	r_e		0,6528	0,5985
Nematóides por Grama de Raiz	r_f			0,9523
	r_g			0,9574
	r_e			0,652

3.2.5. CONCLUSÕES

A relação entre o coeficiente de variação genética e ambiental; e as herdabilidades individuais no sentido amplo e de médias de clones são altas tanto para o fator de reprodução quanto para o índice de reprodução, o que demonstra a eficiência do método empregado na seleção de genótipos resistentes.

A análise via metodologia REML/BLUP e o modelo apresentado mostram-se adequados para seleção de genótipos de videiras com resistência genética ao *P. brachyurus*.

Foram selecionados 14 (24,56%) híbridos interespecíficos resistentes ao *P. brachyurus* que poderão ser utilizados como porta-enxertos ou clonados para dar continuidade ao programa de melhoramento da videira.

3.3. DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR EM SEGRAGANTES DE *Vitis*: IMPLICAÇÕES PARA O MELHORAMENTO DA VIDEIRA VISANDO RESISTÊNCIA AO *P. brachyurus*

3.3.1. INTRODUÇÃO

A viticultura brasileira, embora esteja presente em vários estados e regiões, a maior expressão da atividade se concentra nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste (Leão et al., 2013). No entanto, a produção nacional de uvas tem recebido grande incremento, principalmente em regiões onde a viticultura é crescente e as condições climáticas são favoráveis ao sistema de produção, incluindo regiões de clima temperado, subtropical e tropical. A viticultura tem contribuído fortemente para o desenvolvimento dessas regiões envolvidas, promovendo a valorização de seus respectivos produtos comerciais agregados e culturais (IBGE, 2016).

A maior parte das uvas produzidas no Brasil é constituída por variedades europeias (*V. vinifera*) e híbridos americanos, embora diversos híbridos desenvolvidos por programas de melhoramento no país também sejam cultivados com sucesso (Leão et al., 2013). Para se desenvolver genótipos com boa produtividade para as áreas de viticultura emergente, faz-se necessário, conhecer e explorar convenientemente a variabilidade genética disponível, dentro e entre populações de melhoramento, o que requer a caracterização e avaliação da diversidade de germoplasma ou de populações segregantes provenientes de cruzamentos interespecíficos (Viana et al., 2011; Viana et al., 2016).

Os resultados deste trabalho integram um projeto de melhoramento genético de videiras que busca tecnologias para o desenvolvimento da viticultura do Norte Fluminense, que envolve a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF e a *University of California* - UCDavis, onde no ano de 2009 foram realizados cruzamentos interespecíficos para obtenção de populações segregantes, e as sementes foram enviadas para a UENF para implementação do programa de melhoramento genético.

O desenvolvimento e aplicação de tecnologias baseadas em marcadores moleculares fornecem ferramentas únicas capazes de identificar a variação genética existente entre e dentro de populações, em função do alto grau de precisão e informação que pode ser obtido pela genotipagem molecular. Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites ou SSR (Single Sequence Repeats) têm sido a ferramenta molecular mais utilizada em *Vitis spp* para a identificação e caracterização de genótipos copa e porta-enxerto, avaliação da variabilidade genética, estudos de pedigree, mapeamento genético, estruturas genéticas e diferenciações em coleções de germoplasmas, populações naturais e segregantes interespecíficas (Riaz et al., 2004; Riaz et al., 2006; Goto-Yamamoto et al., 2013; Leão et al., 2013; Viana et al., 2013; Viana et al., 2016).

O uso de marcadores SSR viabilizam a caracterização genética de muitos genótipos, por meio de procedimentos moleculares relativamente rápidos. A quantificação da divergência permite a seleção de genitores superiores em programas de melhoramento de forma objetiva e precisa, fornecendo informações genéticas importantes referentes às populações segregantes (Riaz et al., 2006; Shuck et al., 2011; Leão et al., 2013; Bao et al., 2015; Dangl et al., 2015; Viana et al., 2016).

Neste estudo, são apresentados os resultados de uma avaliação da diversidade genética utilizando marcadores moleculares microssatélites SSR para avaliar populações segregantes de uva de mesa. Essas populações derivaram de cruzamentos com seleções avançadas para uvas de mesa *V. vinifera* sem sementes que envolvem espécies silvestres resistentes a doenças, como Pierce's disease, nematóides das lesões radiculares. O objetivo do estudo foi: i) estimar a distância genética entre os híbridos e parentais, utilizando marcadores microssatélites; ii) realizar a caracterização genética, buscando estimar índices genotípicos para a quantificação e estruturação da variabilidade genética entre os

genótipos; e iii) identificar indivíduos divergentes para uso como genitores no programa de melhoramento de uva focado em combinar a resistência ao nematóide das lesões radiculares (*P. brachyurus*) com outras características morfoagronômicas desejáveis.

3.3.2. REVISÃO

3.3.2.1. Uso de marcadores microssatélites (SSR) no estudo de diversidade genética em videira

Os marcadores moleculares são ferramentas importantes em programas de melhoramento sendo definidos basicamente, como características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Esses marcadores são utilizados para o aumento da eficiência de seleção e para o melhor conhecimento e caracterização do germoplasma e maximização dos ganhos genéticos (Riaz et al., 2006).

Entre as aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal, está a seleção assistida de características de importância agronômica, a qual se fundamenta no mapeamento e associação de marcadores moleculares a genes que controlam essas características de interesse (Viana et al., 2016). O uso de marcadores moleculares viabiliza a caracterização genética de muitos genótipos por procedimentos relativamente rápidos. A detecção de marcadores ligados a genes de interesse agronômico permite a seleção de genitores superiores em programas de melhoramento de forma objetiva e precisa, determinando a formação de populações segregantes com alta frequência de genótipos superiores (Bered, 1997). Comparados com os caracteres morfológicos, os marcadores moleculares que detectam polimorfismos no nível do DNA têm a vantagem de ser neutros frente ao ambiente, possuem um maior poder discriminativo e são altamente reproduzíveis, detectáveis em todas as fases de crescimento da planta (Martinez et al., 2006).

Uma classe de marcadores moleculares que tem sido amplamente utilizada nos últimos anos são os microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas ou *simple sequence repeats* (SSR). São regiões de sequências pequenas (dois a seis pares de bases), repetidas em tandem, organizadas em série e distribuídas aleatoriamente pelo genoma. Estas sequências são altamente variáveis, pois sofrem alta taxa de mutação, e estão dispersas em muitos sítios nos genomas, aos quais podem ou não estar associados com genes (Bao et al., 2015). São marcadores amplamente utilizados em estudos genéticos, incluindo a diversidade genética, genética de populações, melhoramento genético e testes de paternidade. Esta gama de aplicações é devido ao fato destes apresentarem herança mendeliana, serem codominantes, apresentarem alto nível de polimorfismo, serem altamente reprodutíveis, terem alta resolução e serem baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (Leão et al., 2013).

Desde o surgimento da PCR, pesquisadores reconheceram a sua grande utilidade na caracterização genética de organismos. Os marcadores moleculares foram adaptados para resolver vários problemas. No caso de videiras, tem sido de grande valia para identificação e discriminação de cultivares, a fim de facilitar a gestão das coleções e controlar o comércio de material vegetal com uma correta identificação de cultivares (This et al., 2006; Schuck et al., 2011; Leão et al., 2013;), e na relação genética entre elas e no mapeamento dos genes (Viana et al., 2016).

A disponibilidade de um grande número de marcadores microssatélites para a videira disseminou a sua utilização, sendo atualmente muito utilizados para os mais diferentes objetivos. Thomas et al., (1993) foram os primeiros a investigar o uso de sequências de DNA repetitivas para a identificação de cultivares, e observaram que estas sequências eram abundantes no genoma da videira e conservadas entre diferentes espécies de *Vitis* e *Muscadinia*. Eles demonstraram pela análise de pedigree, que os alelos de microssatélite eram herdados em um padrão mendeliano e co-dominante, confirmando o seu potencial para estudos de mapeamento e diversidade genética. Outros marcadores foram desenvolvidos posteriormente (Bowers et al., 1996; 1999; Sefc et al., 2000), culminando com a formação, em 1997, do *Vitis Microsatellite Consortium* (VMC) composto por 21 grupos de pesquisa em 12 países, e que resultou na identificação de 333 novos marcadores microssatélites obtidos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas

(Riaz et al., 2007). Outros 118 marcadores microssatélites foram isolados a partir de biblioteca genômica de *V. vinifera*, enriquecida para repetições (AC)_n (Di Gapero et al., 2005). O desenvolvimento de um conjunto de alelos microssatélite de referência para identificação de cultivares foi proposto mediante a utilização de seis *loci* microssatélite e 13 cultivares de referência.

Além do mais, estes marcadores podem ser utilizados para identificar as sinonímias e homonímias das cultivares de vários países com tradição ancestral no cultivo da videira. Na Espanha foram usados para identificar *Vitis* autóctones visando à conservação da diversidade dos recursos fitogenéticos de videira e torná-lo disponíveis em bancos de germoplasma (Moreno-Sanz et al., 2011). No Brasil, 221 acessos de videira da Embrapa Semiárido foram caracterizados com o uso dos SSRs, cujos resultados permitiram a integração de dados de perfis de *fingerprint* com características morfológicas para estabelecer a correta identificação de cultivares, identificar erros de nomenclatura e identificar um conjunto de acessos únicos que não correspondem as cultivares em bases de dados internacionais de referência (Leão et al., 2013). Também se tem utilizado na análise para seleção genômica em populações segregantes de uva de mesa (Viana et al., 2016).

Diante do exposto, verifica-se a grande potencialidade do estudo de diversidade genética por marcadores de DNA. Apesar de essas técnicas exigirem investimentos de grande porte financeiro, em se tratando de espécies frutíferas, no caso específico da uva, com longo ciclo de vida e alta exigência de recursos e mão de obra para implantação de ensaios de campo, tal metodologia poderá reduzir em muito o tempo necessário para obtenção de cultivares melhoradas.

3.3.2.2. Hibridação interespecífica na videira

A realização da hibridação tem por finalidade combinar em um mesmo indivíduo, dois ou mais fenótipos desejáveis que se encontram em indivíduos diferentes. Através do cruzamento entre estes indivíduos, é gerada uma população com variabilidade genética. Posterior ao processo de hibridação, a seleção e a clonagem (propagação vegetativa) das melhores combinações, seguidas de avaliação clonal, podem resultar em novas cultivares (Pommer, 2012).

O melhoramento da videira é baseado principalmente em hibridações controladas, sendo que os métodos mais utilizados são os cruzamentos biparentais e cruzamentos interespecíficos (Schuck et al., 2011). *V. vinifera* é a espécie que apresenta melhor qualidade de frutos e maior produtividade, o uso de cruzamentos interespecíficos no melhoramento da videira visa sempre a incorporação de genes para resistência e fatores bióticos e abióticos (Pommer, 2012).

Na utilização da estratégia da hibridação interespecífica, um dos genitores deve ser uma espécie silvestre, americana ou asiática, ou híbrido entre elas, em contrapartida, o outro genitor, deve ser quase sempre *V. vinifera* ou um híbrido intraespecífico dela. Esse tipo de cruzamento teve início em meados do século XIX para fazer frente ao problema causado pela filoxera. Posteriormente, à medida que foram conhecendo melhor as outras espécies e suas características, outros enfoques passaram a ser dados (Viana et al, 2011; Pommer, 2012).

Os esforços para estudos dos recursos genéticos, sua conservação e utilização no melhoramento da videira têm aumentado bastante nos últimos tempos e muitas espécies do gênero *Vitis* têm contribuído com o melhoramento da videira (Bao et al., 2015). Pode-se dizer que as espécies americanas são destacadamente as principais fontes de resistência às moléstias causadas por fungos (*Plasmopara viticola*, *Uncinula necator* *Botrytis cinerea*), às doenças causadas por bactérias (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pierce disease*), e aos nematóides (*Meloidogyne* spp. *Xiphinema* spp e *Pratylenchus* spp.) e a filoxera.

Por outro lado, as espécies chinesas, como *V. flexuosa*, *V. romanetii*, *V. davidii* e sua variedade botânica, *V. davidii* var. *cyanocarpa*, são muito tolerantes aos climas úmidos e quentes e às condições de grande sombreamento (Alleweldt & Possingham et al., 1988; Viana et al., 2011; Leão et al., 2013).

3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.3.1. Material Vegetal

A análise molecular foi conduzida no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da (UENF) em Campos dos Goytacazes- RJ e no departamento de viticultura e enologia da University of Califórnia, Davis, EUA–UCDavis. Foram utilizados 74 híbridos interespecíficos, sete genitores de *Vitis* e uma variedade *V. labrusca* (Niagara) (Tabela 1).

Tabela 1. Parents and crosses used in the morphological characterization and evaluation for resistance to *P. brachyurus*, housed at the University of Califórnia, Davis - USA.

Genitores^a	Origem e características
A96-19	É naturalmente uvas de bagas grandes, sem sementes, oriundas da seleção para uvas de mesa de alta qualidade.
07371-25 (<i>V. vinifera</i>)	É F ₂ -35 (vínifera pura com flores femininas oriunda da Ruby Cabernet (Carignane x Cabernet Sauvignon) x U0502-26 (A81-138 x Chardonnay). A81-138 É uma vínifera de uvas de mesa oriunda da espécie <i>V. arizonica</i> fonte de resistência à Pierce's disease.
07355-075 (<i>V. vinifera</i>)	Seleção avançada de uva de mesa com resistência à Pierce's disease originária de <i>V. arizonica</i> .
<i>Vitis romanetii</i> C166-043 (<i>V. romanetii</i>)	Espécie chinesa, DVIT2732. Fonte de resistência ao míldio de origem de <i>V. romanetii</i> que tem um alelo de resistência já bem caracterizado (herança monogênica).
Nocera (<i>V. vinifera</i>)	Uvas de mesa de alta qualidade. Originária da Itália da região de Sicília.
Cereza (<i>V. vinifera</i>)	Uvas de mesa com grandes bagas e alta qualidade de origem italiana.
06354-047 (<i>V. vinifera</i> / <i>V. rotundifolia</i>)	Híbrido resistente ao míldio, a partir de seleções entre as espécies <i>V. vinifera</i> x <i>Muscadinia rotundifolia</i> .
Cruzamentos	Número de híbridos avaliados
A96-19 X 07371-25	C1 – 3 ^a
<i>V. romanetii</i> C166-043 X 07355-075	C2 – 6
<i>Vitis romanetii</i> C166-043 x Nocera	C3 – 2
06354-047 x Cereza	C4 – 13
06354-047x Nocera	C5 – 50
Total	74 interespecifics Hybrids

^aC1, C2, C3, C4 e C5: híbridos obtidos a partir dos cruzamentos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

3.3.3.2. Extração e quantificação do DNA genômico

Para extração do DNA, foram coletadas cinco folhas jovens de cada híbrido em plantas na casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF, Campos dos Goytacazes e dos genitores no Departamento de Viticultura e Enologia da University of Califórnia, Davis. As folhas foram envoltas em papel alumínio e armazenada em freezer -80°C para que não houvesse a degradação do DNA. O DNA foi extraído por um método CTAB modificado como descrito por Bowers et al., (1993).

Em seguida, o DNA foi quantificado por análise em gel de agarose a 1 % com tampão TAE 1X (Tris, Acetato de Sódio, EDTA, pH 8,0), utilizando o marcador Lambda (λ) de 100 pb (100 ng/ μ L⁻¹) (Invitrogen, USA) por meio de comparação das bandas. Para esse procedimento, as amostras foram coradas utilizando a mistura de Gel Red™ e Blue Juice (1:1) e a imagem capturada pelo sistema de fotodocumentação Mini Bis Pro (Bio-Imaging Systems). Posteriormente, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de trabalho de 10 ng/ μ L⁻¹.

3.3.3.3. Amplificação dos marcadores microssatélites SSR

Um total de 10 iniciadores SSR foram utilizados nas 82 progênies segregantes, que inclui os seus respectivos genitores e uma variedade *V. labrusca*. As condições de PCR utilizadas foram descritas por Riaz et al., (2004). A reação de amplificação das sequências correspondentes aos microssatélites constou de um volume final de 10 μ l contendo 10 ng de DNA genômico. Em cada par de marcadores microssatélite um deles (Primer forward) foi marcado com as seguintes fluorescências: FAM, HEX, NED e TET (Tabela 2).

Neste estudo, cinco painéis de marcadores microssatélites (painel multiplex-sequenciador) constituídos por 10 marcadores marcados com fluorescência foram utilizados para a genotipagem semiautomática em sequenciador de DNA. Os painéis multiplex-sequenciador foram montados de acordo com a cor do marcador e do tamanho dos alelos (Tabela 2).

Uma alíquota de 0,5 μ l do produto amplificado foi misturada a 9,5 μ l de tampão de carregamento (98% formamida, 10 mM EDTA-blue dextran) e 0,3 μ l de

um padrão de tamanho conhecido (Genescan-500 ROX, Applied Biosystems), seguido de desnaturação a 94°C por 3 minutos para separação por eletroforese capilar a 15 kV por 45 minutos em um sequenciador de DNA ABI 3100 (Applied Biosystems).

Tabela 2. Marcadores microssatélites marcados com fluorescência utilizados nos cinco painéis múltiplos (multiplex-sequenciador). Laboratório de Genética e Biotecnologia, UCDAVIS, Davis – Califórnia, EUA

Marker	Label	Range	Panel
VVlv37	fam	138-170	A
VMC1b11	hex	160-210	B
VVlp60	hex	290-370	B
VVMD28	fam	210-290	C
VrZAG62	hex	170-220	C
VVMD27	ned	160-230	G
VrZAG79	fam	220-270	G
VVln16	tet	130-176	I
VVMD21	fam	210-285	I
VVMD25	ned	220-270	J

Tabela 3. Relação dos iniciadores microssatélites, sequências, e tamanho esperado dos alelos (pares de base) utilizados em 74 híbridos interespecíficos, sete genitores e uma variedade (Niagara) de *Vitis*.

Locus	Sequência	Tamanho dos alelos
VVIV37		
Forward	TTTTCTCCCTACTCTTAACTTC	138-170
Reverse	GGTAGACCTTGAAATGAAGTAA	
VMC1b11		
Forward	CTTTGAAAATTCCTTCCGGGTT	160-210
Reverse	TATTCAAAGCCACCCGTTCTCT	
VVIp60		
Forward	ATGAAAAGGCACAACTGATAG	290-370
Reverse	TCTCCGACGAATACATCCTGAA	
VVMD28		
Forward	AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGAGA	221-279
Reverse	TCATCAATTTTCGTATCTCTATTTGCTG	
VrZAG62		
Forward	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	185-203
Reverse	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	
VVMD27		
Forward	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	173-194
Reverse	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	
VrZAG79		
Forward	AGATTGTGGAGGAGGAACAAACCG	236-260
Reverse	TGCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	
VVIn16		
Forward	TACCGAGGAGGAACAACGCA	130-176
Reverse	GAGTAGAGTATTGACAAGTGA	
VVMD21		
Forward	GGTTGTCTATGGAGTTGATGTTGC	210-285
Reverse	GCTTCAGTAAAAGGGATTGCG	
VVMD25		
Forward	TTCCGTAAAGCAAAAGAAAAAGG	243-275
Reverse	TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG	

Esta etapa do trabalho foi realizada no Departamento de Viticultura e Enologia da University of Califórnia – UCDAVIS (Davis/EUA), no Laboratório de Genética e Biotecnologia.

3.3.3.4. Análise das variáveis moleculares

A partir dos perfis alélicos gerados com os dez marcadores microssatélites para os 82 genótipos de videira, foi construída uma matriz, na qual cada alelo de cada loco foi designado numericamente de 1 até o número máximo de alelos no

loco. A partir dessa matriz numérica, foi calculada a distância genética entre os genótipos estudados com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2016) utilizando o Índice Ponderado. A análise de agrupamento dos indivíduos via dendrograma foi feita por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Average*) com auxílio do programa Mega versão 7 (Kumar et al., 2016). Para avaliar a consistência do agrupamento, ou seja, verificar a capacidade do dendrograma em reproduzir a matriz de dissimilaridade, calculou-se o coeficiente de correlação cofenética - CCC (Leão et al., 2013). Foi considerado mais consistente o agrupamento que apresentou maior escore de CCC.

Utilizando o aplicativo computacional “Genealex 6” (Peakall & Smouse, 2012) foram estimadas as seguintes variáveis moleculares: número de alelos, número de alelos efetivos, índice de informação, heterozigose observada e esperada, índice de fixação.

Para averiguar a estruturação genética dos 82 genótipos analisados neste estudo, utilizou-se o método baseado em algoritmos de agrupamentos bayesianos, com o uso do programa STRUCTURE versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para tanto, empregou-se o modelo “*no admixture model*” e frequências alélicas independentes, usando-se um “*Burnin Period*” de 10.000, seguido de uma extensão (*Markov Chain Monte Carlo*) de 50.000 repetições, e o número de grupos (*k*) variando de 1 a 10 com 10 simulações.

3.3.4. RESULTADOS

Foi constatada variabilidade genética entre os híbridos interespecíficos avaliados para os 10 iniciadores utilizados. Foram obtidos 28 fragmentos amplificados (Tabela 4). O número de fragmentos por iniciador variou de 2 (VMC1b11, VVMD27, VrZAG79, VVln16 e VVMD25) a 4 (VVlv37, VVMD28 e VVMD21), com média igual a 2.8. O número de alelos efetivos (N_e) variou de 1.134 (locus VVMD21) a 3.222 (VVlv37), apresentando uma média igual a 1.84 (Tabela 4). Os valores médios de heterozigosidade observada (0.52) foram superiores aos obtidos para heterozigosidade esperada e variaram de 0.12 a 0.81 e 0.12 a 0.69, respectivamente. O índice de informação que equivale a

diversidade genética da população variou de 0.30 a 1.25 com média de 0.93. Em contrapartida o índice de fixação (F) estimado em toda população apresentou valor médio de -0,230, e variou de -0.576 a 0.001 entre os locus.

Tabela 4. Número de alelos por loco (Na), número de alelos efetivos (Ne), índice de informação (I), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), e índice de fixação (F), para 10 iniciadores microssatélites avaliados em 74 híbridos interespecíficos, sete genitores e uma variedade (Niagara) de *Vitis*.

Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	F
VVlv37	78	4	3,222	1,249	0,808	0,690	-0,171
VMC1b11	71	2	1,996	0,692	0,732	0,499	-0,467
VVlp60	82	3	2,021	0,843	0,561	0,505	-0,111
VVMD28	82	4	1,825	0,770	0,585	0,452	-0,295
VrZAG62	82	3	1,367	0,522	0,268	0,269	0,001
VVMD27	82	2	1,951	0,681	0,768	0,487	-0,576
VrZAG79	78	2	1,665	0,589	0,500	0,399	-0,252
VVln16	81	2	1,432	0,479	0,346	0,302	-0,145
VVMD21	73	4	1,134	0,297	0,123	0,118	-0,044
VVMD25	69	2	1,800	0,637	0,551	0,444	-0,239
Média	77,8	2,8	1,841	0,935	0,524	0,416	-0,229

O resultado da análise de correlação cofenética demonstrou uma associação de 80,49% entre as distâncias obtidas pelo índice ponderado (matriz de dissimilaridade) e as representadas no dendrograma (matriz cofenética). Tomando-se como ponto de corte a distância média de 0,50 foi possível observar a formação de cinco grupos principais: grupo I com um híbrido (C5.10); grupo II com a variedade Niagara (*V. labrusca*); grupo III por um híbrido (C2.5); grupo IV com oito genótipos, composto por três genitores (07371-25, 07355-075 e *V. romanetii* C166-043) e cinco híbridos (C2.1, C2.2 C2.3, C3.1 e C3.2) e grupo V com os demais genótipos incluindo os genitores Nocera, Cereza, A96-19 e 06354-047. O maior grupo incluiu todos os indivíduos da população quatro e cinco, além dos genitores Cereza (*V. vinifera*), Nocera (*V. vinifera*) e A 96-19 (Figura 1).

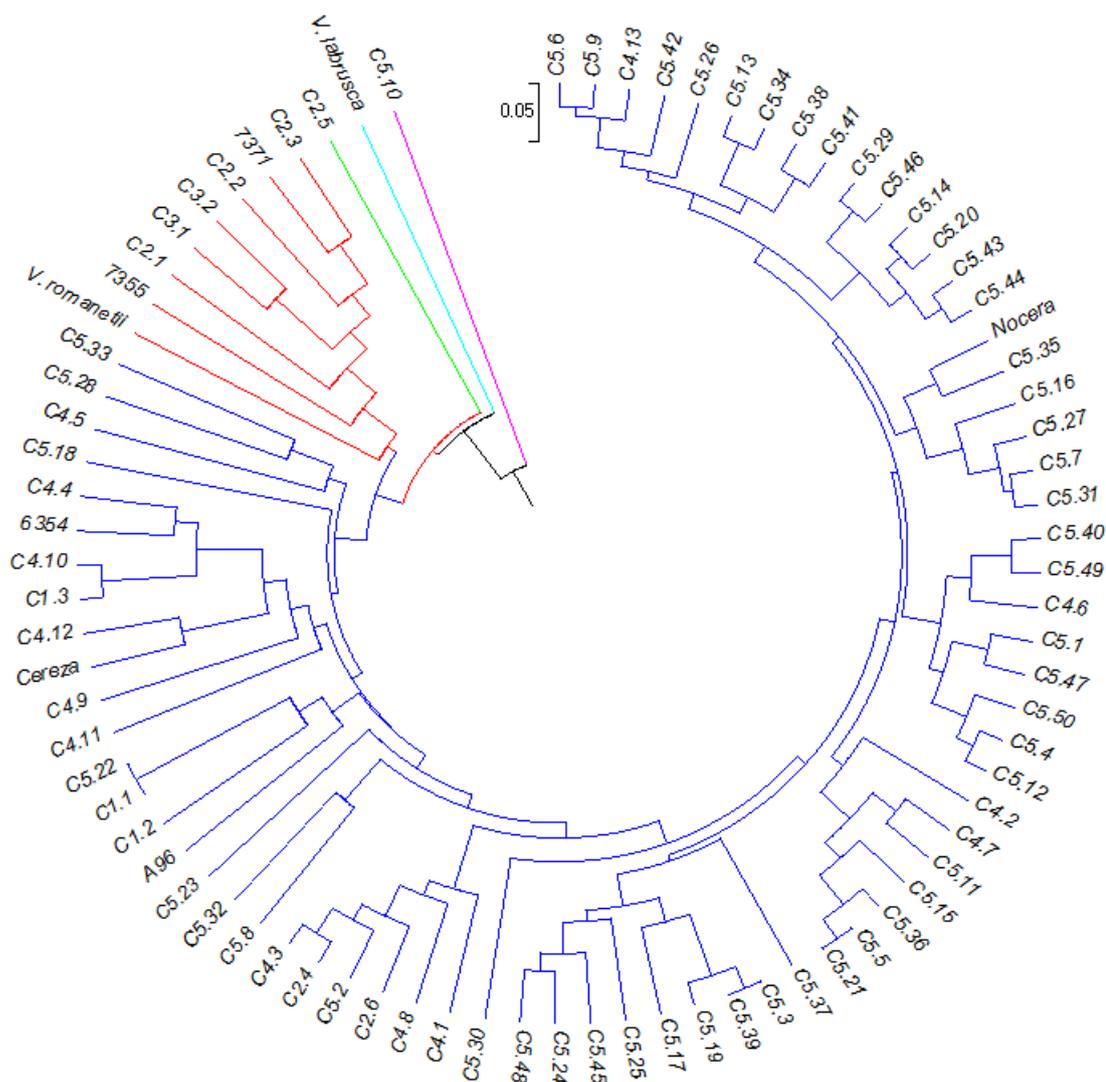


Figura 1. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o índice ponderado como distância genética entre 74 híbridos de *Vitis* seus parentais e uma testemunha (variedade Niagara).

Com uma abordagem bayesiana, esses 28 alelos foram usados para inferir sobre estruturação genética da população de cruzamento interespecífico de *Vitis* em estudo. De acordo com o critério de Evanno (2005), o valor de k mostrou que sete foi o número ideal de grupos genéticos (K) que melhor ajustou, por apresentar o maior de ΔK (73,7) (Figura 2 e 3). Com uma probabilidade de adesão de $> 0,75$ o agrupamento bayesiano indicou que os 74 híbridos interespecíficos, os sete genitores e cultivar da espécie *V. labrusca* avaliadas apresentaram agrupamento com probabilidade mista de distribuição entre os sete grupos formados. Os trabalhos de Dangl et al., (2015) e Sant'na et al., (2012) também encontraram grupos com probabilidade mista de distribuição.

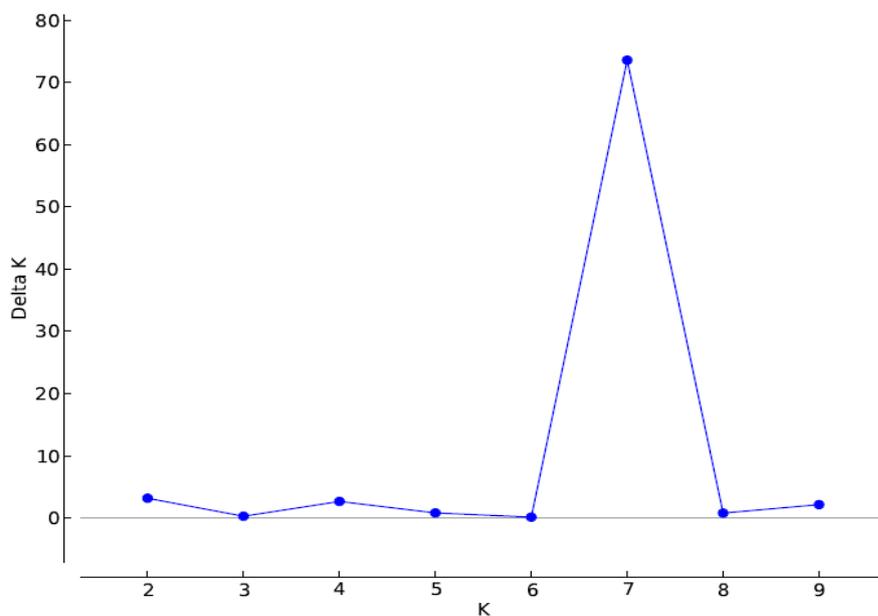


Figura 2. Agrupamento por inferência Bayesiana e delta K (ΔK) para os respectivos números de grupos (K).

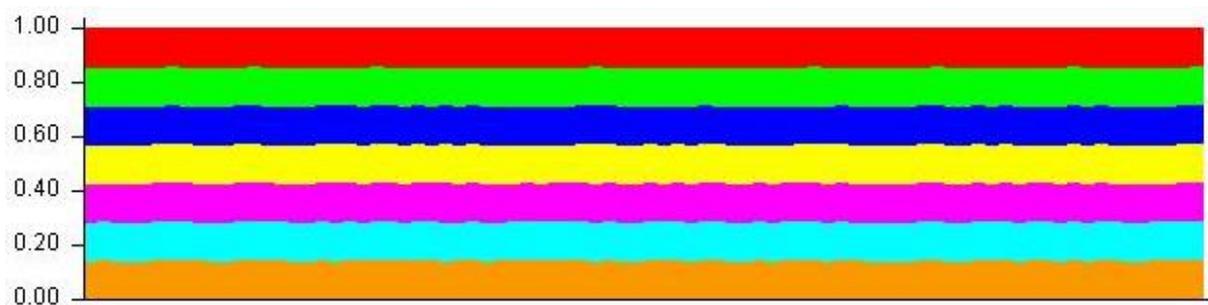


Figura 3. Agrupamento e estruturação genética pela inferência bayesiana de híbridos interespecíficos de *Vitis* ($k=7$).

3.3.5. DISCUSSÃO

A escolha de estratégias que sejam eficientes para o melhoramento de populações de cruzamento interespecíficos é dependente do conhecimento prévio da distribuição de sua variabilidade genética entre e dentro das populações (Bao et al., 2015; Viana et al., 2011). Neste contexto, os marcadores microssatélites são ferramentas poderosas, utilizadas para cálculo de estimativas populacionais e de diversidade genética, como foi mostrado neste trabalho.

Todos os *primers* microssatélites testados foram eficazes para a detecção de polimorfismo nos híbridos e parentais analisados. O número máximo de alelos por loco encontrados nesse estudo foi quatro, o que é esperado dado a natureza biparental dos cruzamentos avaliados. Por outro lado, estudos que envolvem genótipos oriundos de bancos de germoplasma ou variedades que não tenham informações de genitores espera-se encontrar um número maior de alelos (Cunff et al., 2008; Sant'Ana et al., 2012).

Num estudo em que foram analisados 35 genótipos de *V. vinifera*, Sant'Ana et al. (2007) observaram uma média de 8,67 alelos por *locus*. Esse estudo foi constituído exclusivamente por variedades viníferas de origem europeia e pertencentes a uma mesma espécie (*V. vinifera*). Bowers et al. (1999) detectaram uma média de 11 alelos por *locus* analisando 350 variedades francesas de videira. Já Sefc et al. (2000), analisando um conjunto de 164 variedades, encontraram em média 9,8 alelos por *locus*. Nesses dois últimos trabalhos, o número relativamente alto de alelos por *locus* pode ser explicado pelo fato de que, em ambos os casos, os conjuntos de variedades analisados, são numerosos.

Dos dez marcadores analisados, nove apresentaram valores de heterozigidade observada superiores aos valores esperados para a condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que pode ter contribuído para média alta do índice de informação (0.93). Segundo Padua et al. (2011) quanto mais próximo a 1 for o valor desse índice mais diversificada é a população. Essa superioridade de indivíduos heterozigotos pode ter sido causada pela seleção para qualidade e produtividade de frutos em gerações precoces e que foi mantida por meio da propagação vegetativa, técnica que é comumente empregada na multiplicação comercial da videira e nos métodos de melhoramento. Uma vez que a videira é

bastante sensível à depressão por endogamia, em geral, as melhores performances são obtidas com indivíduos heterozigotos, devido aos efeitos heteróticos da complementação alélica entre genitores na combinação híbrida (Dangl et al., 2015). Apenas no caso do *locus* VrZAG62 a heterozigosidade observada foi inferior a esperada, semelhante ao encontrado no trabalho de Sant'Ana et al., (2007), que utilizaram o mesmo loco microssatélite em uma abordagem semelhante a realizada nesse estudo. O índice de fixação intrapopulacional (F) estimado em toda população, considera o modo como a diversidade genética se encontra distribuída dentro e entre as populações e está relacionado com o coeficiente de endogamia (Dangl et al., 2015). Os valores encontrados entre -0,576 e 0.001 indicam variabilidade e considerável diferenciação genética dentro da população de híbridos interespecíficos, o que é esperado considerando a estrutura genética da população avaliada. Quando a heterozigose observada é maior que a esperada, o F é negativo e isso denota que os locos não estão sendo fixados, o que é comum em populações alógamas como a videira. Estimativas negativas para o coeficiente de endogamia, também são comuns nestes casos ($H_o > H_e$), como obtido neste estudo, sugerindo excesso de locos em heterozigose.

Marcadores moleculares baseados em SSR têm sido empregados com sucesso nas estimativas de variabilidade genética em espécies silvestres e cultivadas e em híbridos interespecíficos (Shuck et al., 2011; Leão et al., 2013; Dangl et al., 2015). Na caracterização genética de videira, existem disponíveis, diversos banco de dados online; Swiss Vitis Microsatellite Database – SVMd: <http://www.unine.ch/nccr/svmd/> e GENRES: <http://www.genres.de/eccdb/vitis/>). Diversos autores, a partir desse banco de dados (Dettweiler et al., 2000; This et al., 2003, 2004) recomendam o uso de 6 locos microssatélites (VVS2, VVMD5, VVMD2, VVMD27, VrZAG62 e VrZAG79) com 97,5% de probabilidade de segurança na identificação varietal e confiabilidade na quantificação da diversidade genética. Neste trabalho, utilizou-se 10 marcadores microssatélites, incluindo os 6 locos citados acima mais 4 outros amplamente utilizados na genotipagem da videira, no sentido de aumentar o polimorfismo, reduzir a probabilidade de falsa identificação e elevar o grau de confiabilidade do estudo de diversidade genética. Para Bowers et al., (1996, 1999) e Sefc et al., (1999) estes 10 locos microssatélites possuem elevado grau de polimorfismo e poder de

discriminação genética, sendo capazes de caracterizar e distinguir genótipos de videira. Portanto, pode-se concluir que os híbridos interespecíficos de *Vitis* analisados no presente trabalho, apesar de não ser numerosos, apresenta uma diversidade genética considerável, possivelmente por incluir espécies viníferas de origem europeia, espécies de origem americana e, principalmente, por incluir genitores que na maioria dos casos são seleções híbridas originadas a partir de cruzamentos interespecíficos.

O agrupamento pelo índice ponderado utilizando o método UPGMA resultou na formação de cinco grupos (Figura 1). Os grupos I, II e III foram constituídos por apenas um indivíduo, os híbridos C5.10 e C2.5 alocados nos grupos I e II respectivamente e a variedade Niagara no grupo II. Os grupos IV e V se destacaram com o maior número de indivíduos. Algumas peculiaridades merecem ser destacadas nesses grupos. O grupo IV apresentou cerca de 6% dos indivíduos com maior similaridade genética com os genitores de origem vinífera, 07371-25, 07355-075 e de origem asiática *Vitis romanetii* C166-043 (*V. romanetii*). Desses híbridos três foram classificados como muito resistentes ao nematóide das lesões radiculares (*P. brachyurus*) considerando o índice de reprodução desenvolvido por Taylor (1967), a partir do trabalho de Santos et al., (2018) que estudou esses mesmos genótipos.

O grupo maior (Grupo V) apresenta aproximadamente 82% dos híbridos com maior similaridade com os genitores de origem vinífera Nocera (*V. vinifera*), Cereza (*V. vinifera*), A96-19 e do genitor 06354-047 de origem interespecífica entre *V. vinifera* x *V. rotundifolia*. Desses híbridos, nove foram classificados como muito resistentes ou moderadamente resistentes provenientes do cruzamento entre os genitores *V. romanetii* C166-043 X Nocera e dois híbridos resistentes a partir do cruzamento entre os genitores 06354-047 x Cereza, considerando o índice de reprodução em trabalho realizado por Santos et al., (2018). Essa maior proporção de híbridos similares aos parentais Nocera, Cereza, A96-19 e 06354-047 está de acordo com a origem vinífera destes. Assim, uma progênie gerada a partir do cruzamento entre 06354-047 e Nocera ou 06354-047 e Cereza seria um tipo de retrocruzamento e, portanto, os genomas desses híbridos apresentarão maior contribuição porcentual de videira vinífera.

Como pode ser observado no dendrograma, houve a formação de pequenos subgrupos entre os genótipos dos grupos IV e sobretudo do grupo V (Figura 1).

Entretanto, a análise bootstrap não revelou consistência estatística entre esses grupos. Conforme Leão et al. (2013), a não-formação de grupos estatisticamente significativos pode ser decorrente da constituição genética dos híbridos que, neste trabalho, teria sido originada pela segregação independente dos marcadores SSR, sendo quebrado o efeito da ligação, de acordo com o tamanho amostral da população segregante (82) e com o número de marcadores utilizado (10).

Os cruzamentos interespecíficos em videira são utilizados para incorporar genes de interesse, que geralmente estão associados à resistência a doenças, e que se encontram em espécies silvestres de origem americana ou asiática ou híbrido entre elas. Após a introdução do gene de interesse, utiliza-se o retrocruzamento como forma de reintroduzir as características comerciais de *V. vinifera* (Moreira et al., 2011; Viana et al., 2011; Dangl et al., 2015; Viana et al. 2017).

O cruzamento entre os híbridos resistentes do grupo IV provenientes dos genitores *V. romanetii* C166-043, Cereza e Nocera apresentam grande potencial para cruzamento com os genótipos de origem viníferas 07371-25 e 07355-075 (grupo V), tendo em vista, que tais apresentam melhor qualidade. Enquanto que os genitores alocados no grupo IV de origem vinífera 07371-25 e 07355-075 devem ser utilizados em cruzamentos com os híbridos resistentes do grupo V por serem os mais divergentes e possuir conhecidamente elevada produtividade (Santos et al. 2018).

A análise bayesiana, com base no critério de Evanno et al. (2005), sugeriu a formação de sete grupos. A ausência de estruturação entre os grupos pode ser explicada pelo cruzamento biparental interespecífico envolvendo genitores heterozigóticos. Isso indica que a população avaliada compartilha os mesmos alelos dentro dos grupos. Os 74 híbridos interespecíficos não compreendem claramente um conjunto definido de estruturação genética, o que indica que houve introgressão de genes de *V. vinifera*, *V. romanetii* ou *Muscadinia rotundifolia*. Sant'ana et al., (2012) não encontraram uma boa estruturação em relação a dois grupos de variedades viníferas e porta-enxertos híbridos interespecíficos, devido aos altos níveis de diversidade genética e heterosiguidade observada dentro dos grupos de genótipos.

A quantificação e documentação das características de interesse requerem tempo e intensiva mão de obra. Reduzir este trabalho a partir das informações

sobre a variabilidade molecular acelera o processo de seleção de genótipos superiores nos programas de melhoramento. Em populações de melhoramento as chances de se obterem resultados favoráveis pela seleção visando combinar resistência genética, produtividade e qualidade é tanto maior quanto maior for a heterogeneidade genética da qual se lança mão. Essa máxima heterogeneidade genética obtém-se com o somatório do maior número possível de ancestrais diferentes, que possa ser seguido da máxima eficácia da recombinação genética, para obtenção de descendentes o mais heterozigoto possível.

3.3.6. CONCLUSÕES

Há divergência genética entre os híbridos interespecíficos, parentais de origem vinífera, asiática e a testemunha americana *V. labrusca* com base nos marcadores microssatélites utilizados.

Os marcadores microssatélites são eficientes na caracterização genético-molecular e discriminação dos cruzamentos entre diferentes espécies de *Vitis*.

Híbridos interespecíficos resistentes ao *P. brachyurus* e mais próximos geneticamente a um dos parentais de origem vinífera serão selecionados para futuros cruzamentos dando continuidade ao programa de melhoramento da videira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aballay E., Persson, P., Martensson, A. (2009) Plant-parasitic nematodes in Chilean vineyards. *Nematropica* 31:85-97.
- Agrios, G. N. (1997) Plant diseases caused by nematodes. In: AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. San Diego: Academic Press, 1997. p. 565-597.
- Alleweldt, G., Possingham, J. V. (1988) Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 75: 669-673.
- Alleweldt, G., Spiegel-Roy, P., Reisch, B. (1990) Grapes (*Vitis*). *Acta Horticulturae*, 290: 291-337.
- Amaral Júnior, A. T., Viana, A. P., Gonçalves, L. S. A., Barbosa, C.D. (2010) Procedimentos Multivariados em Recursos Genéticos Vegetais. In: Pereira, T. N. S. (ed.). *Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas*. Viçosa, MG: Arca, 205- 254p.
- Bao, L, V., Scatoni I. B., Gaggero, C., Gutiérrez, L., Monza, J., Walker, M. A. (2015) Genetic Diversity of Grape Phylloxera Leaf-Galling Populations on *Vitis* species in Uruguay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66 (1): 43-53.
- Barbé, T. C., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Scapim, C.A. (2010). Association between advanced generations and genealogy in inbred

lines of snap bean by the Ward-Modified Location Model. *Euphytica* 173 (3): 337-343.

Bered, F., Neto, J. F. B., Carvalho, F. I. F. (1997) Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciência Rural*, 27 (2): 513-520.

Borges, V., Ferreira, P. V., Soares, L., Santos, G. M., Santos, A. M. M. (2010) Seleção de clones de batata-doce pelo procedimento REML/BLUP. *Acta Scientiarum Agronomy* 32: 643-649.

Bowers, J. E., Bandman, E. B., Meredith, C. P. (1993) DNA Fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44: 266-274.

Bowers, J. E., Dangl, G. S., Meredith, C. P. (1999) Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50: 243-246.

Bowers, J., Dangl, J. S., Vignani, R., Meredith, C. P., Vignani, R., Meredith, C. P. (1996) Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat locos in grape (*Vitis vinífera* L.). *Genome*, 39: 628-633.

Brasil. 2010. *Serviço Nacional de Proteção de Cultivares*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 45p.

CabraL, P.D.S., Soares, T.C.B., Gonçalves, L.S.A., Amaral Júnior, A.T., Lima, A.B.P., Rodrigues, R., Matta, F.P. (2010) Quantification of the diversity among common bean accessions using Ward-MLM strategy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45: 1124-1132.

Camargo, U, A., Bernd, R. B., Revers, L. F. (2009) Melhoramento genético, In: Soares, L. M., Leão, P. C. S. *A vitivinicultura no semiárido brasileiro*, Embrapa Informação tecnológica; Petrolina, 756p.

Camargo, U, A., Tonietto, J., Hoffmann, A. (2011) Progressos na viticultura brasileira, *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume Especial: 144-149.

- Camargo, U. A., Ritschel, P. S. (2008) New table and wine grape cultivars world scenario with emphasis on Brazil. *Acta Horticulturae*, 785: 89-95.
- Campos, B. M., Viana, A.P., Quintal, S.S.R., Gonçalves, L.S.A., Pessanha, P. G.O. (2013) Quantificação da divergência genética entre acessos de goibeira por meio da estratégia Ward-MLM. *Revista Brasileira de Fruticultura Brasileira de Fruticultura*, 35 (2): 87–94.
- Campos, V. P., Maximiniano, C., Ferreira, E. A. (2012). Doenças causadas por nematoides. *In Uva de Mesa: Fitossanidade*. Lima, M. F., Moreira, F. R. B. Embrapa Informação Tecnológica, 75-80p.
- Castillo, P., Vovlas, N. (2007) *Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management*. Leiden: Brill, 529 p.
- Cerqueira-silva, C.B.M., Conceição, L.D.H.C.S., Santos, E.S.L., Cardoso-silva, C.B., Pereira, A.S., Oliveira, A.C., Corrêa, R.X. (2010) Genetic variability in wild genotypes of *Passiflora cincinnata* based on RAPD markers. *Genetics and molecular research*, 9 (4): 2421–2428.
- Coolen, W, A., D'Herde, C. J. (1972) *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*, Ghent 77p.
- Crossa, J., Franco, J. (2004) Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica*, 137 (1): 19–37.
- Cruz C. D, Regazzi A. J., Carneiro, P. C. S. (2012) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, 480 p.
- Cruz, D. C., (2016) Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum Agronomy*, 3(4): 547-552.
- Cunff, L. Le, Fournier-Level, A., Laucou, V., Vezzulli, S., Lacombe, T., Adam-Blondon, AF., Boursiquot, JM., This, P. (2008) Construction of nested genetic core collections to optimize the exploitation of natural diversity in *Vitis vinifera* L. subsp. *sativa*. *BMC Plant Biology* 8: 31-39.
- Dangl, G. S., Mendum, M. L., Yang, J., Walker, M, A., Preece, J. E. (2015) Hybridization of cultivated *Vitis vinifera* with wild *V. californica* and *V. girdiana* in California. *Ecology and Evolution*, 5 (23): 5671–5684.

- Dettweiler E., Jung, A., Zyprian, Eva Zyprian., Topfer, R. (2000) Grapevine cultivar Mueller-Thurgau and its true to type descent. *Vitis* 39:63–65.
- Di Gaspero, G., Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Andreetta, D., Castro, M. J. P., Peterlunger, E.; Testolin, R. (2005) Isolation of (AC) n -microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marked assisted selection. *Molecular breeding*, 15: 11-20.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8): 2611-2620.
- Falconer, D, S., Mackay, T. F. C. (1996) *Introduction to quantitative genetics*, London: Longman Malaysia, 463p.
- Ferreira, S., Gomes, L. A. A., Maluf, W. R., Campos, V. P., Carvalho Filho, J. L. S., Santos, D. C. (2010) Resistance of Dry Bean and Snap Bean Cultivars to Root-knot Nematodes, *Hortiscience* 45:320-322.
- Ferris, H, Zheng, L., Walker, M. A. (2012) Resistance of Grape Rootstocks to Plant-parasitic Nematodes. *Journal of Nematology*, 44: 377–386.
- Franco, J., Crossa, J., Villaseñor, J., Taba, S., Eberhart, S.A. (1998) Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. *Crop Science*, 38 (6): 1688-1696.
- Galet, P. (1998) *Grape varieties and rootstocks varieties*. Paris: Oenoplurimédia, 315p.
- Gonçalves, L. S, Rodrigues, R., Amaral Júnior, A. T., Karasawa, M, Sudré, C. P. (2008) Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. *Genetics and Molecular Research*, 7: 1289-1297.
- Gonçalves, L.S, Rodrigues, R., Amaral Júnior, A. T., Karasawa, M., Sudré, C. P. (2009) Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified location model. *Genetics and Molecular Research*, 8: 364-374.
- Goulart, A. M. C. (2008) *Aspectos gerais sobre nematóides-das-lesões-radiculares (gênero Pratylenchus)*, Embrapa Cerrados, Planaltina, 27p.

- Gower, J.C. (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, 27: 857-874.
- Henderson, C. R. (1949) Estimation of changes in herd environment. *Journal of Dairy Science*, 32: 1-16.
- IBGE (2016) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Banco de dados agregados: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro*. Disponível em, <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=106&z=p&o=28>. Accessed 18 Jan 2018.
- Inomoto, M, M., Machado, A. C. Z., Antedomênico, S. R. (2007) Host status of *Brachiaria* spp, and *Panicum maximum* to *Pratylenchus brachyurus*. *Fitopatologia Brasileira* 32: 341-344.
- Kalil Filho, A. N., Resende, M. D. V., Kalil, G. P. C. (2000) Componentes de variância e predição de valores genéticos em seringueira pela metodologia de modelos mistos (REML/BLUP). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 1883-1887.
- Kumar S., Stecher G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870-4.
- Laurentin, H. (2009) Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 56 (2): 277-292.
- Laviola, B, G., Rosado, T. B., Bhering, L. L., Kobayashi, A. K. (2010) Genetic parameters and variability in physic nut accessions during early developmental stages. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45 (10): 1117–1123.
- Lawrence C. J., Kranoxsky W. J. (1966) *Mixture separation for mixed-mode data*. *Statistics and Computing*, v. 6, 85-92p.
- Leão, P. C. S., Brandão, E. O. G., Silva, N. P. (2011) Caracterização agronômica e molecular do clone Itália Muscat no submédio do Vale do São Francisco. *Revista Brasileira Fruticultura*, 33 (1): 297-302.

- Leão, P. C. S., Cruz, C. D., Motoike, S. Y. (2013) Diversity and genetic relatedness among genotypes of *Vitis* spp. using microsatellite molecular markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35: 799-808.
- Leão, P.C.S., Riaz, S., Graziani, R., Dangl, G.S.; Motoike, S.Y.; Walker, M.A. (2009) Characterization of a Brazilian Grape Germplasm Collection Using Microsatellite Markers. *American Journal of Enology and Viticulture*. 60: 517-524.
- Lordello, R. R. A., Lordello, A. I. L., Sawazaki, E. (1992) Flutuação e controle de *Pratylenchus* spp. em milho. *Summa Phytopathologica*, 18: 146-152.
- Maia, J. D. G., Rirschel, P., Camargo, U. A., Souza, R. T. de, Fajardo, T. V. M., Naves, R. de L., Girardi, C. L. '*BRS 'Isis' Nova cultivar de uva de mesa, sem sementes e tolerante ao míldio*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Comunicado Técnico, 143. 2013. 20p.
- Marçal, T. S., Ferreira, A., Oliveira, W. B. S., Guilhen, J. H. S., Ferreira, M. F. S. (2015) Correlações genéticas e análise de trilha para caracteres de fruto da palmeira juçara, *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37: 692-698.
- Marchese, A., Maluf, W. R., Gonçalves Neto, A. C., Gonçalves, R. J. S., Gomes, L. A. A. (2010) Seleção de clones de batata-doce resistentes a *Meloidogyne incognita* raça 1. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45: 997-1004.
- Martínez, L. E., Cavagnaro, P. F., Masuelli, R. W., Zuniga, M. (2006) SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Science*, 170: 1036–1044.
- McKenry, M. V., Anwar, S. A. (2006) Nematode and Grape Rootstock Interactions Including an Improved Understanding of Tolerance. *Journal of Nematology* 38: 312-318.
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M. (2003) Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants - Salient Statistical Tools. *Crop Science*, 43: 1235–1248.
- Moreira, F. M., Madini, A., Marino, R., Zulini, L., Stefanini, M., Velasco, R., Kozma, P., Grandó, M. S. (2011) Genetic linkage maps of two interspecific grape

crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes* 7: 153–167.

Moreno-Sanz, P., Loureiro, M. D., Suárez, B. (2011) Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain). *Scientia Horticulturae*, 129: 433–440.

Muñoz-Espada A. C, Wood KV, Bordelon B; Watkins, B. A. (2004) Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of concord, norton, and marechal foch grapes and wines. *Journal Agriculture Food Chemical*, 52: 6779-6786.

Naves, R. L. (2005) *Diagnose e manejo de doenças causadas por fitonematóides na cultura da videira*, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves 23p.

Nöel, K. K. J., Edmond, K. K., Louïs, K. K. J., Eugene, K. K. (2011) Microsatellite gene diversity within Philippines dwarf coconut palm (*Cocos nucifera* L.) resources at Port Bouët. *Scientific Research and Essays*, 6 (28): 5986-5992.

Oliveira, E. J., Fraife Filho, G, A., Freitas, J. P. X., Dantas, J. L. L., Resende, M. D. V. (2012) Plant selection in F₂ segregating populations of papaya from commercial hybrids. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 12: 191–198.

Oostenbrink, M. (1966) *Major characteristics of the relation between nematodes and plants*. Mendelingen Landbouwhogeschool 66:1- 46p.

Padilla, G., Cartea, M., Ordás, A. (2007) Comparison of several clustering methods in grouping kale landraces. *Journal of America society for horticultural Science*, 132: 387–395.

Peakall R., Smouse, P. E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537–2539.

Pereira, V.M., Borges, C.V., Brandão, L.P., Oliveira, L.S. (2012) Genetic diversity between improved banana diploids using canonical variables and the Ward MLM method. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 10 (47): 1480–1488.

Pimentel Gomes, F. (2009) *Curso de Estatística Experimental*, ed 15 Fealq, 451p.

- Pinheiro, J. B., Boiteux, L. S., Lopes, C. A., Silva, G. O. (2009) *Identificação de fontes de resistência ao nematoide *Meloidogyne mayaguensis* em acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicon*)*, Brasília: Embrapa Hortaliças, v, 9, 19p.
- Pommer, C. (2012) Videira. In: *Melhoramento de fruteiras de clima temperado*. Bruckner, C. H. ed. UFV, Viçosa, 186p.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945-959.
- Puerari H. H, Dias-Arieira, C.R., Moura, M. F., Biela, F., Chiamolera, F.M., Cunha, T. P. L. (2012) Reaction of grapevine rootstocks to *Pratylenchus brachyurus* and *Pratylenchus zaeae*. *Tropical Plant Pathology*, 37: 220-222.
- Rajesh, M. K., Arunachalam, V., Nagarajan, P., Lebrun, P., Samsudeen, K., Thamban, C. (2008) Genetic survey of 10 Indian coconut landraces by simple sequence repeats (SSRs). *Scientia Horticulturae* 118: 282-287.
- Ramalho, M. A. P., Santos, J. B., Pinto, C. A. B. P., Souza, E. A., Gonçalves, F. M. A., Souza, J. C. (2012) *Genética na agropecuária*, ed. 5, Lavras – MG, 563p.
- Reisch, B. I., Pratt, C. (1996) Grapes. In: Janick, J., Moore, J. N. (Ed.). *Fruit breeding: vine and small fruits*. New York: John Wiley, v.2, 297-370p.
- Resende, M. D. V. (2000), *Análise estatística de modelos mistos via REML/BLUP na experimentação em melhoramento de plantas perenes*, Embrapa Florestas, Colombo, 98p.
- Resende, M. D. V., Ramalho, M. A. P., Carneiro, P. C. S., Carneiro, J. E. S., Batista, L. G., Gois, I. B. (2016) Selection index with parents, populations, progenies and generations effects in autogamous plant breeding. *Crop Science*, 56: 530-546.
- Riaz, S., Dangl, G. S., Edwards, K. J., Meredith, C. P. (2004). A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 864-872.
- Riaz, S., Doliguez, A., Henry, R. J., Walker, M. A. (2007) Grape. In: Kole, C. (Ed.) *Genome mapping and molecular breeding in plants: fruits and nuts*. Berlin: Springer-Verlag, 63-101p.

- Riaz, S., Krivanek, A. F., Xu, K., Walker, M. A. (2006). Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, PdR1, and Sex on an extended genetic map of *Vitis rupestris* × *V-arizonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 1317-1329.
- Riaz, S.; Garrison, K. E., Dangl, G. S. (2002) Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127 (4): 508-514.
- Rocha, M., Pires, I. E., Xavier, A., Cruz, C. D., Rocha, R. B. (2006) Avaliação genética de progênies de meio-irmãos de *Eucalyptus urophylla* utilizando os procedimentos REML/BLUP e E(QM). *Ciência Florestal*, 16 (4): 369–379.
- Rosado, AM, Rosado, T.B., Resende Júnior, M. F. R., Bhering, L. L., Cruz, C. D. (2009) Ganhos genéticos preditos por diferentes métodos de seleção em progênies de *Eucalyptus urophylla*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44: 1653-1659.
- Sant'Ana, J. C., J. L. Ferreira, Rocha, J. C., Borém, A., Pasqual, M., Cançado G. M. A. (2012) Comparison of a retrotransposon-based marker with microsatellite markers for discriminating accessions of *Vitis vinifera*. *Genetics and molecular research*, 11 (2): 1507-1525.
- Santana, J. C., Hidalgo, E., De Lucas., A. I., Recio, P., Ortiz, J. M., Martin, J. P. (2007) Identification and relationships of accessions grown in the grapevine (*Vitis vinifera* L.) Germplasm Bank of Castilla y León (Spain) and the varieties authorized in the VQPRD areas of the region by SSR marker analysis. *Genet Resources and Crop Evolution*, 55: 573-583.
- Santos, E. A., Viana, A. P., Freitas, J. C. O., Rodrigues, D. L., Tavares, R. F., Paiva, C. L., Souza, M. M. (2015), Genotype selection by REML/BLUP methodology in a segregating population from an interspecific *Passiflora* spp, crossing. *Euphytica* 204: 1-11.
- Santos, P, R., Preisigke, S. C., Viana, A. P., Cavalcante, N. R., Sousa, C. M. B., Amaral Júnior, A. T. (2017) Associations between vegetative and production traits in guava tree full-sib progênies. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 62: 303-310.

- Schuck M, R., Biasi, L. A. Mariano, A. M., Lipski, B., Riaz, S., Walker M, A. (2011) Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 1480-1488.
- Schuck, M, R., Biasi, L, A., Mariano, A. M., Lipski, B., Riaz, S., Walker, M. A. (2011) Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46:1480-1488.
- Sefc K, M., Regner F., Turetschek E., Glüssl J,, Steinkellner, H. (1999) Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42:367-373.
- Sefct, K, M., Lopes, M. S., Lefort, F., Botta, R., Roubelakisangelaskis, K. A., Ibanez, J., Pejic, I., Wagner, H. W., Glossi, J., Steinkellener, H. (2000) Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 498-505.
- Silva, S. N., Silva, M. A., Marçal, T. S., Ferreira, A., Fontes, M. M. P., Ferreira, M. F. S. (2017), Genetic parameters of pollen viability in guava (*Psidium guajava* L.). *Australian Journal Crop Science* 11: 1-8.
- Starr, J, L., Cook, R., Bridge, J. (2002) *Plant resistance to parasitic nematodes*, Cabi Publishing, Wallingford, 202p.
- Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Riva-Souza, E.M., Bento, C. dos S. (2010) Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genetic and Molecular Research*, 9: 283-294.
- Taylor, A. L. (1967) *Introduction to research on plant nematology: an FAO guide to study and control of the plant-parasitic nematodes*, Rome: Food And Agricultural Organization of the United Nations, 133p.
- Terral, J.F.; Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance, J.B., Jung, C., Fabre, L., Tardy, C., Compan, M., Bacilierl, R., Lacombe, T., This, P. (2010) Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed

domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105: 443-455.

- This P., Dettweiler E. (2003) EU-project GENRES ct96 no81 European Vitis database and results regarding the use of a common set of microsatellite markers. *Acta Horticulture*, 603:59–66.
- This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangl, G. S., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibanez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, R., Meredith, C, P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., Maul, E. (2004) Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1448-1458.
- This, P.; Lacombe, T., Thomas, M. R. (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 2 (9): 511-519.
- Thomas, M. R., Matsumoto, S., Cain, P., Scott, N. S. (1993) Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetic*, 86: 173-180.
- Vencovsky, R., Barriga, P. (1992) *Genética biométrica no fitomelhoramento*, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 496p.
- Viana, A. P., Resende, M, D. V. (2014) *Genética quantitativa no melhoramento de fruteiras*, Interciência, Rio de Janeiro, 232p.
- Viana, A. P., Riaz, S., Walker, M. A. (2011). Evaluating genetic diversity and optimizing parental selections in a segregating table-grape population. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62: 285-290.
- Viana, A. P., Riaz, S., Walker, M. A. (2013). Genetic dissection of agronomic traits within a segregating population of breeding table grapes. *Genetics and Molecular Research*, 12: 951-964.
- Viana, A.P., Resende, M. D. V., Riaz, S., Walker, M. A. (2016) Genome selection in fruit breeding: application to table grapes. *Scientia Agricola*. 73: 142-149.

- Viana, A.P., Riaz, S., Walker, M. A. (2011). Evaluating genetic diversity and optimizing parental selections in a segregating table-grape population. *American Journal Enology and Viticulture*, 62: 285-290.
- Vivas, M, Silveira, S. F., Vivas, J. M. S., Viana, A. P., Amaral Júnior, A. T., Pereira., M. G. (2014). Seleção de progênies femininas de mamoeiro para resistência a mancha-de-phoma via modelos mistos. *Bragantia* 73: 446-450.
- Walker, M. A., Ferris, H., Eyre, M. (1994) Resistance in *Vitis* and *Muscadinia* species to *meloidogyne incognita*. *Plant Disease* 1994, 1055-1058.