

Miguel Ângelo Rodrigues Pinto de Faria

2005

Desenvolvimento de métodos de biologia molecular para identificação de variedades

Cérvicos de Vinho

Aplicação ao estudo da autenticidade de mostos e vinhos

MIGUEL ÂNGELO RODRIGUES PINTO DE FARIA

Licenciado em Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR
PARA A CARACTERIZAÇÃO DE CASTAS E CLONES DE VIDEIRA

Aplicação ao estudo da autenticidade de mostos e vinhos

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR
PARA A CARACTERIZAÇÃO DE CASTAS E CLONES DE VIDEIRA

Aplicação ao estudo da autenticidade de mostos e vinhos

MIGUEL ÂNGELO RODRIGUES PINTO DE FARIA

Licenciado em Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR
PARA A CARACTERIZAÇÃO DE CASTAS E CLONES DE VIDEIRA

Aplicação ao estudo da autenticidade de mostos e vinhos

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Porto, 2005

Trabalho realizado no serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto e no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias
de Vairão sob a orientação da Professora Doutora Margarida A. Ferreira

Este trabalho não teria sido possível sem a atribuição da bolsa de doutoramento PRAXIS

XXI - BD9533/96 pelo Subprograma Ciência e Tecnologia do

2º Quadro Comunitário de Apoio

(...) soube o que é o éter, não é aquilo que geralmente se julga e ensina, e não se pode alcançar pelas artes da alquimia (...)

(...) mas o éter, dêem agora muita atenção ao que vou dizer-lhes, antes de subir aos ares para ser o onde as estrelas se suspendem e o ar que Deus respira, vive dentro dos homens e das mulheres, Nesse caso, é a alma, conclui Baltasar, Não é, também eu, primeiro, pensei que fosse a alma, também pensei que o éter, afinal, fosse formado pelas almas que a morte liberta do corpo, antes de serem julgadas no fim dos tempos e do universo, mas o éter não se compõe das almas dos mortos, compõe-se, sim, ouçam bem, das vontades dos vivos. (...)

Tirou do alforge um frasco de vidro que tinha presa ao fundo, dentro, uma pastilha de âmbar amarelo. Este âmbar, também chamado electro, atrai o éter, andarás sempre com ele por onde andarem pessoas, em procissões, em autos-de-fé, aqui nas obras do convento, e quando vires que a nuvem vai sair de dentro delas, está sempre a suceder, aproxima o frasco aberto, e a vontade entrará nele, E quando estiver cheio, Tem uma vontade dentro, já está cheio, mas esse é o indecifrável mistério das vontades, onde couber uma, cabem milhões, o um é igual ao infinito.

Aos meus pais

À Ani e ao Gustavo

AGRADECIMENTOS

À Professora Margarida Ferreira agradeço a confiança e a permanente disponibilidade, bem como o empenho na criação das condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

À Doutora Beatriz Oliveira, manifesto o meu mais profundo reconhecimento pela sua inexcedível disponibilidade, amizade e acção incansável na concretização das condições indispensáveis ao desenrolar do trabalho experimental.

Ao “Mestre” Dr. José Fernandes, que me acolheu no laboratório de Bromatologia, um especial agradecimento pela amizade, constante presença, disponibilidade e bom-senso. Agradeço-lhe, igualmente, a solidariedade perante o desânimo.

A quem me acompanhou desde os primeiros passos deste trabalho, agradeço a amizade, o constante e efectivo encorajamento e as inúmeras oportunidades. Já sei as sequências ... AgTTCTAggATCCgAA ... chiu!

À Sara e ao Duarte agradeço a amizade, colaboração e constante encorajamento.

À Susana, à Olívia e ao Dr. Rui Alves uma palavra de agradecimento pelo companheirismo.

À Dra. Eulália e à Dra. Isabel quero agradecer a disponibilidade e solidariedade manifestadas.

À D. Rosa e à D. Irene agradeço o apoio, os petiscos e a amizade.

À firma Barros, Almeida & Ca. – Vinhos S.A., nas pessoas do Eng. Soares, Eng. Manso e Eng. Pina Cabral, agradeço toda a colaboração prestada na cedência de amostras de uvas, mostos e vinhos. De igual forma, agradeço ao Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro a cedência de amostras de folhas de videira.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia o meu reconhecimento pelo suporte financeiro, indispensável à realização deste trabalho, através da bolsa de doutoramento BD-9533/96.

Aos meus amigos Carlos, José Carlos, Pedro e Sérgio agradeço, reconhecido, a compreensão, a amizade e a companhia ímpar nas incursões gastronómico-culturais.

Ao Carlos Alvarenga agradeço o estímulo e o nutrir de alma com as boas coisas transmontanas.

Aos meus amigos Alexandre, Henrique, Luís e Vítor ... até à próxima lua cheia!

À D. Maria e ao Sr. Fernando o meu reconhecimento pelo carinho e apoio.

Uma palavra especial à Madrinha, ao Fim, Paula, João e Rafaela a quem agradeço o apoio, a confiança e o carinho sempre demonstrados.

RESUMO

Nos últimos anos, muito por força do prestígio e influência crescentes dos chamados vinhos do "Novo Mundo", tem vindo a ganhar uma importância crescente a comercialização de vinhos com base na(s) respectiva(s) casta(s) de origem. Tendo em conta, por um lado, a evolução natural dos consumidores no sentido de uma maior exigência de qualidade e, por outro lado, a ineficiência dos métodos baseados na caracterização química dos vinhos, torna-se imperioso o desenvolvimento de métodos moleculares de identificação inequívoca das castas empregues no fabrico dos vinhos, que permitam certificar a qualidade destes.

No trabalho de dissertação apresentado pretendeu-se dar a nossa contribuição no sentido indicado, através do desenvolvimento e optimização de métodos moleculares a três níveis distintos: (i) na correcta identificação das castas de videira, (ii) na certificação da constituição dos mostos em termos varietais, qualitativos e quantitativos, durante o processo fermentativo, (iii) na extracção de ADN de vinhos para posterior análise genética. Todos estes métodos se basearam na utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélite.

No que concerne à identificação de castas, os marcadores microssatélite mostraram-se perfeitamente adequados. A distinção de algumas das castas mais importantes cultivadas na região Norte de Portugal foi facilmente conseguida. Foram esclarecidos alguns casos de sinonímia e a genealogia de uma casta. Apesar de estes marcadores se mostrarem ineficientes na discriminação de clones, esta foi conseguida utilizando marcadores StSy-CHS capazes de discriminar 14% dos clones de Touriga Nacional. Devido à necessidade de extractos de ADN mais puros, que surgiu durante este trabalho, foi desenvolvido um método de purificação de ADN, baseado na oclusão do extracto cru numa matriz de agarose, que resultou numa eficiente e prática metodologia para a obtenção de extractos puros para amplificação.

Relativamente ao segundo ponto, a técnica de caracterização genética de castas de videira foi adaptada e optimizada com excelentes resultados para a avaliação da autenticidade de mostos. Foi possível a detecção, no mosto, de até cinco variedades na proporção de 20%. Durante este estudo foi desenvolvido um método de extracção de ADN de mostos, em microescala, que se revelou perfeitamente adequado para o efeito, tendo sido posteriormente utilizado com êxito por outros autores. A quantificação de castas em mostos foi também experimentada. O método de quantificação desenvolvido permitiu detectar uma correlação positiva entre a intensidade das bandas dos alelos de cada casta e a quantidade percentual da mesma presente no mosto.

Finalmente, no que respeita aos processos de extracção de ADN de vinhos para posterior análise genética, indispensável para a avaliação da autenticidade dos mesmos, todos os métodos ensaiados revelaram-se ineficientes, dando origem a extractos sem a quantidade de ADN ou a pureza exigidas para a sua amplificação. Não obstante, são descritos os métodos ensaiados e são feitas sugestões para futuras abordagens.

ABSTRACT

In the last years, due mainly to the increasing prestige and influence of the so called wines from the "New World", the commercialization of wines, based on the respective original grapevine variety(ies), has been gaining an increasing importance. Taking into account, on the one hand a natural evolution of the consumers, demanding higher quality, and, on the other hand, the inefficiency of the methods based on the chemical characterization of wines, there is a crying need for the development of molecular methods for the unequivocal identification of grapevine varieties, which are used in wine production, in order to allow the certification of the wine itself.

Throughout this thesis we aimed to give our contribution towards the goal referred to, by developing and optimizing molecular methods in three distinct levels: (i) in the accurate identification of the grapevine varieties, (ii) in the certification of the musts constitution as far as variety, quality and quantitative terms, during the fermentative process, are concerned, (iii) in the extraction of DNA from wines, for a later genetic analysis. All these methods were based on the use of microsatellite markers.

With respect to the identification of grapevine varieties, the microsatellite markers have proved to be clearly appropriate. The distinction of some of the most important grapevine varieties, grown in the northern region of Portugal was easily made. It was made clear some cases of synonymy and the genealogy of a grapevine variety. Even though these markers have shown to be ineffective for the discrimination of clones, this was achieved using StSy-CHS markers, able to discriminate 14% of the "Touriga Nacional" clones. Due to the need of purer DNA extracts, which came out during this work, it was developed a method of purification of DNA, based on the occlusion of the raw extract in an agarose matrix, which has led to an effective and practical methodology for obtaining pure extracts for amplification.

Concerning the second point, the genetic characterization of grapevine varieties technique was adapted and optimized with excellent results for the evaluation of the musts authenticity. As far as the must is concerned, it was possible the detection up to five varieties in the proportion of 20%. During this study, it was developed a microscale method of DNA extraction of musts, which has shown to be perfectly suitable for the effect, having been used later with success by other authors. The quantification of grapevine varieties in musts was tested as well. The developed quantification method has allowed to detect both a positive correlation between the intensity of the allele bands of each grapevine variety and the quantity in percentage terms of it found in the must.

Finally, with respect to the processes of extraction of DNA from wine, for later genetic analysis, vital for the evaluation of its authenticity, all the methods used have proved to be ineffective, originating extracts lacking the quantity of DNA or purity required for its amplification. Nevertheless, the methods tested are described and suggestions for further approaches are made.

RÉSUMÉ

Au cours des dernières années, notamment grâce au prestige et à l'influence acquis par ce que l'on appelle les vins du "Nouveau Monde", la commercialisation de vins basés sur le ou les respectifs cépages originels, a peu à peu gagné en importance. Etant donné que, d'une part, l'évolution naturelle des consommateurs se traduit par une plus grande exigence en matière de qualité et que, d'autre part, les méthodes basées sur la caractérisation chimique des vins s'avère inefficace, il est dorénavant impératif de développer des méthodes moléculaires qui identifient clairement les cépages utilisés dans la fabrication des vins afin de certifier leur qualité.

Dans le travail de dissertation présenté, nous avons souhaité apporter notre contribution dans ce sens, grâce au développement et à l'optimisation de méthodes moléculaires à trois niveaux distincts: (i) identification correcte des cépages de la vigne, (ii) certification de la constitution des moûts en termes variétaux, qualitatifs et quantitatifs pendant le processus de fermentation (iii) extraction de l'ADN dans les vins en vue d'une analyse génétique postérieure. Toutes ces méthodes ont utilisé des marqueurs moléculaires de type microsatellite.

En ce qui concerne l'identification des cépages, les marqueurs microsatellite se sont avérés parfaitement appropriés. La distinction de quelques cépages majeurs, cultivés dans le nord du Portugal a été facilement effectuée. Certains cas de synonymie, ainsi que la généalogie d'un cépage ont été éclaircis. Bien que ces marqueurs soient inefficaces au niveau de la discrimination des clones, cette dernière a été possible grâce à l'utilisation de marqueurs StSy-CHS, capables de discriminer 14% des clones de "Touriga Nacional". Etant donné qu'au cours de ce travail, le besoin d'extraits d'ADN plus purs s'est fait sentir, nous avons développé une méthode de purification de l'ADN, basé sur l'occlusion de l'extrait cru dans une matrice d'agarose. Le résultat obtenu est une méthodologie efficace et pratique pouvant obtenir des extraits purs destinés à l'amplification.

Quant au deuxième point, la technique de caractérisation génétique de cépages de vigne a été adaptée et optimisée avec d'excellents résultats au niveau de l'évaluation de l'authenticité des moûts. Nous avons été capables de détecter, dans le moût, jusqu'à cinq variétés dans une proportion de 20%. Pendant l'étude, une méthode d'extraction de l'ADN de moûts à microéchelle a été développée. Elle s'est montrée parfaitement adaptée dans ce cadre et a été utilisée a posteriori par d'autres auteurs avec succès. La quantification de cépages au niveau de moûts a également été expérimentée. La méthode de quantification développée a permis de détecter une corrélation positive entre l'intensité des bandes des allèles de chaque cépage et la quantité en pourcentage de celui-ci dans le moût.

Enfin, en ce qui concerne les processus d'extraction d'ADN de vins en vue d'une analyse génétique postérieure, indispensable à l'évaluation de leur authenticité, les méthodes testées se sont avérées inefficaces, compte tenu que les extraits n'ont ni la quantité d'ADN ni le niveau de pureté exigés pour leur amplification. Nonobstant, les méthodes testées sont décrites et nous présentons des suggestions destinées à de futures approches.

Abreviaturas, siglas, expressões latinas e anglo-saxónicas

- a posteriori** – [lat.] posteriormente
- aC** – Antes de Cristo
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- ADNc** – Ácido desoxirribonucleico complementar
- AFLP** – Amplified Fragment Length Polymorphism
- ARN** – Ácido ribonucleico
- BAC** – Bacterial Artificial Chromosome
- CDAB** – Brometo de Cetildimetilamónio
- CIBIO** – Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos
- CSIRO** – Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization
- CTAB** – Brometo de Cetiltrimetilamónio
- D** – Poder discriminante
- dATP** – Desoxiadenosina trifosfato
- dCTP** – Desoxicitidina trifosfato
- dGTP** – Desoxiguanosina trifosfato
- dpi** – Dots Per Inch
- dTTP** – Desoxitimidina trifosfato
- e.g.** – [lat.] abreviatura de *exempli gratia* - por exemplo
- EcoR1** – Enzima de restrição 1 de *Escherichia coli*
- EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético
- EMBL** – European Molecular Biology Laboratory
- EST** – Expressed Sequence Tag
- et al.** – [lat.] loc. comp. (na citação bibliográfica indicação de que a obra a que se faz referência tem mais que um autor e se menciona apenas o primeiro, omitindo os demais)
- etc** – [lat.] abrev. *et cetera* ou *et caetera*
- EVAG** – Estação Vitivinícola Amândio Galhano
- EVN** – Estação Vitivinícola Nacional
- F** – Filial generation
- FAM** – 5-carboxifluoresceína
- FCUP** – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
- FFUP** – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
- FTIR** – Fourier Tranformed Infra-Red
- HEX** – 6-carboxi-2',4',5',7',7'-hexaclorofluoresceína
- i.e.** – [lat.] abreviatura de *id est* – isto é
- ICAV** – Instituto de Ciências Agrárias de Vairão
- ICETA-UP** – Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-alimentares da Universidade do Porto
- In vitro** – [lat.] locução adverbial latina – fora do organismo
- ISSR** – Inter Simple Sequence Repeat

IVV – Instituto da Vinha e do Vinho
Kb – Kilobase
Loci – [lat.] s. m. pl. de *locus*
Locus – [lat.] s. m. - o lugar específico em que um gene se localiza no cromossoma
mA – miliampere
Mbps – 10⁶ pares de bases
min – minuto
Mse1 – Enzima de restrição 1 de *Micrococcus spp*
NCBI – National Centre for Biotechnology Information
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
p. – página
pbs – pares de bases
PCR – Polymerase Chain Reaction
pg – picograma
PHYLIP – Phylogeny Inference Package
PI – Probabilidade de identidade
Pst1 – Enzima de restrição 1 de *Providencia stuartii*
PVP – Polivinilpirrolidona
QTL – Quantitative Trait Loci
RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
RNase – enzima que promove a lise do ARN
SCAR – Sequence Characterized Amplification Region
SDS – Dodecil sulfato de sódio
seg – segundos
spp – [lat.] abrev. de espécies
SSM – Slip-Strand Mispairing Errors
STR – Short Tandem Repeats
STS – Sequence Tagged Site
StSy-CHS – Styrene Synthase – Chalcone Synthase
TAE – Meio tamponado contendo Tris, ácido acético e EDTA
Taq – Polimerase do ADN extraída da bactéria termófila *Thermus aquaticus*
TBE – Meio tamponado contendo TRIS, ácido bórico e EDTA
TE – Meio tamponado contendo TRIS e EDTA
TET - 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína
TRIS - Hidroximetilaminometano
UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UTR - Untranslated region
V – Volt
vd. – [lat.] abrev. de *videre* – ver
viz. – [lat.] abrev. de *videlicet* – nomeadamente
VMC – Vitis Microsatellite Consortium

VQPRD – Vinho de Qualidade Produzido em Região Determinada

vs – [lat.] abrev. de *versus* – contra/por oposição a

WGA – Whole Genome Amplification*

WWW – World Wide Web

YO-PRO-1 - 4-[3-(3-metil-2(3H)-benzoxazolideno)- 1-propenil]-1-[3-(trimetilamônio) propil] quinolina

ÍNDICE GERAL

Resumo.....	XIII
Abstract.....	XIV
Résumé.....	XV
Abreviaturas, siglas, expressões latinas e anglo-saxónicas.....	XVI
Índice de Ilustrações.....	XXII
Índice de Quadros.....	XXIV

INTRODUÇÃO GERAL. Objectivos e Organização do Trabalho.....	1

PARTE TEÓRICA

CAPÍTULO 1

Origem e variabilidade genética da videira (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	7
1. Introdução.....	9
2. Caracterização do género <i>Vitis</i>	9
3. O cultivo da videira e a produção de vinho.....	11
3.1. Origem e domesticação da videira.....	11
3.2. Variabilidade intra específica.....	14
3.2.1. Melhoramento da videira e origem dos clones.....	16
4. Identificação e diferenciação de castas e clones de videira.....	21
4.1. Introdução.....	21
4.2. Diferenciação de castas pelos métodos clássicos.....	22
4.3. Diferenciação de castas e clones pelos métodos moleculares.....	24
4.4. A autenticação de mostos e vinhos.....	25
5. Bibliografia.....	27

CAPÍTULO 2

Métodos moleculares de análise da variabilidade da videira.....	29
1. Introdução.....	31
2. Colheita e conservação das amostras.....	32
3. Extracção de ADN.....	34
3.1. Metodologias de extracção de ADN de videira.....	37
4. Reacção de PCR.....	51
5. Marcadores moleculares.....	53
5.1. Marcadores baseados em sistemas enzimáticos ou Isozimas.....	56
5.1.1. Identificação de castas pela análise de sistemas enzimáticos.....	57
5.2. Marcadores de ADN sem recurso à reacção de PCR.....	58
5.2.1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	58
5.2.1.1. Discriminação de castas por RFLP.....	59
5.3. Marcadores de ADN baseados na reacção de PCR.....	62
5.3.1. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	62
5.3.1.1. Aplicação à discriminação de castas e clones.....	64
5.3.2. Sequence Characterized Amplified Region (SCAR).....	72
5.3.2.1. Uso de marcadores SCAR na discriminação de videiras.....	73
5.3.3. Microssatélites.....	74
5.3.3.1. Caracterização dos microssatélites nos organismos e distribuição no genoma.....	80
5.3.3.2. Funcionalidade dos microssatélites no genoma.....	82
5.3.3.3. Mecanismos de instabilidade (modelos de mutação) de microssatélites.....	83
5.3.3.4. Estratégias de desenvolvimento de marcadores microssatélite.....	86
5.3.3.5. Aplicações para o estudo da variabilidade da videira.....	89
5.3.3.5.1. Loci de marcadores microssatélite do género <i>Vitis</i>	94
5.3.3.5.2. Discriminação de castas através dos microssatélites nucleares.....	96
5.3.3.5.2.1. Discriminação de castas produtoras de uvas de mesa.....	102
5.3.3.5.2.2. Análise do polimorfismo de clones.....	103

5.3.3.5.3. Estudos filogenéticos.....	108
5.3.3.5.3.1. Polimorfismo de microssatélites cloroplastidiais.....	110
5.3.3.5.4. Esclarecimento de homónimas e sinónimas.....	112
5.3.3.5.5. Reconstrução genealógica de castas.....	115
5.3.3.6. Bases de dados de perfis genéticos de variedades de videira.....	120
5.3.3.7. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	123
5.3.3.8. Discriminação de castas por AFLP.....	125
5.3.4. Outros Marcadores.....	128
5.3.4.1. PCR-RFLP.....	128
5.3.4.2. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR).....	129
5.3.4.3. Regiões 5' não transcritas do gene StSy.....	130
6. Análise estatística.....	131
7. Considerações finais.....	133
8. Bibliografia.....	134

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 3

Reagentes, equipamento e programas informáticos usados na parte experimental

desta dissertação	145
1. Reagentes	147
1.1. Enzimas, nucleótidos e padrões de massa molecular	147
1.2. Reagentes específicos	148
1.3. Soluções tamponadas, géis e reagentes de revelação.	149
2. Equipamentos.....	151
2.1. Termocicladores.....	151
2.2. Tinas de electroforese e fontes de alimentação	151
2.3. Sistemas de aquisição de imagens	152
2.4. Outros equipamentos	152
3. Programas informáticos.....	153
3.1. Análise e tratamento de imagem	153
3.2. Análise de marcadores microssatélites e estatísticos.....	153
4. Bibliografia	153

CAPÍTULO 4

Desenvolvimento de uma metodologia de análise de ADN microssatélite:

caracterização de castas provenientes das regiões do Douro e Vinhos Verdes.....	155
1. Introdução	157
2. Amostras	159
2.1. As castas do Douro	162
2.2. As castas da região dos Vinhos Verdes	163
2.3. Colheita	164
2.4. Método de conservação	165
3. Processo de extracção de ADN.....	166
4. Amplificação	169
4.1. <i>Primers</i> seleccionados.....	169
4.2. Programas e condições de amplificação	171
5. Electroforese - separação dos fragmentos amplificados	172
6. Tratamento dos dados.....	172
7. Resultados e discussão.....	174
7.1. Desenvolvimento do método de extracção.....	174
7.2. Aplicação das metodologias desenvolvidas às amostras	175
8. Aplicação ao estudo da paternidade de uma casta da região do Oeste.....	191
8.1. Introdução.....	191
8.2. Materiais e métodos	192
8.3. Resultados e discussão.....	194
9. Conclusões.....	198
10. Bibliografia.....	200

CAPÍTULO 5

Desenvolvimento de metodologias de discriminação de clones de videira: caracterização de clones de Touriga Nacional.....

1. Introdução	203
2. Amostras	205
3. Extracção e purificação de ADN.....	206
3.1. Fundamentos teóricos para o desenvolvimento do processo de extracção e purificação	208
3.2. Ensaios executados para a avaliação do processo desenvolvido.....	210
4. Marcadores moleculares	212
5. Condições de amplificação.....	212
5.1. Optimização das condições de amplificação dos marcadores StSy.....	214
6. Separação dos fragmentos amplificados e tratamento dos dados	215
7. Resultados e Discussão	217
7.1. Processo de purificação	217
7.2. Optimização das condições de amplificação.....	217
7.3. Aplicação ao estudo de clones de Touriga Nacional.....	220
8. Conclusões.....	224
9. Bibliografia	229

CAPÍTULO 6

Desenvolvimento de uma metodologia de avaliação da autenticidade de mostos obtidos de castas usadas na produção de Vinho do Porto.....

1. Introdução	233
2. Amostras	235
2.1. Extracção de ADN	237
2.2. Marcadores moleculares, condições de amplificação e de separação dos fragmentos	239
3. Resultados e discussão	240
3.1. Extracção de ADN de mostos	242
3.2. Identificação das castas constituintes de um mosto.....	242
4. Desenvolvimento de um método de quantificação relativa.....	243
4.1. Introdução	247
4.2. Fundamentos teóricos.....	247
4.3. Amostras e marcadores	248
4.4. Análise dos géis de acrilamida	249
4.5. Resultados e discussão.....	250
5. Conclusões.....	252
6. Bibliografia	257

CAPÍTULO 7

Autenticidade de vinhos pela análise do seu ADN residual.....

1. Introdução	261
1.1. Metodologias clássicas de avaliação da autenticidade do vinho.....	263
1.2. Métodos de análise de ADN de vinhos	266
2. Metodologias de extracção experimentadas	269
3. O processo de degradação de ADN durante a vinificação	274
4. Trabalho futuro	275
5. Conclusões.....	277
6. Bibliografia	277

CONCLUSÕES FINAIS	281

GLOSSÁRIO	287

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 2.1	Amplificação exponencial de um fragmento de ADN pela PCR.....	52
Ilustração 2.2	Representação esquemática exemplificativa de um microsatélite de repetição trinucleotídica (TTA) _n com indicação das sequências flanqueadoras da região repetitiva..	75
Ilustração 2.3	Representação da variabilidade de um <i>locus</i> microsatélite em dois indivíduos.	77
Ilustração 2.4	Modelo do processo de mutação SSM num <i>locus</i> microsatélite	85
Ilustração 2.5	Esquematisação de um gel de acrilamida. As bandas representam alelos de microsatélite das castas (a) Cabernet Franc, (b) Cabernet Sauvignon e (c) Sauvignon Blanc para cada um dos <i>loci</i> indicados.	116
Ilustração 2.6	Esquema do procedimento para análise por AFLP de genomas complexos.....	124
Ilustração 4.3	Frequência dos alelos para cada <i>locus</i>	182
Ilustração 4.4	Fenograma rectangular das 38 castas estudadas.	184
Ilustração 4.5	Fenograma radial das 38 castas em estudo.	185
Ilustração 4.6	Gel de acrilamida com os fragmentos amplificados usando o <i>primer</i> VVMD7 para as castas indicadas	189
Ilustração 4.7	Gel de acrilamida dos fragmentos amplificados pelo <i>primer</i> VVMD6 das amostras Castelo Branco; Cruzado de Rabo de Ovelha; Diagalves; Fernão Pires e Rabo de Ovelha.	195
Ilustração 5.1	Géis de agarose, mostrando o efeito do processo de purificação na qualidade, quantidade e na eficiência de amplificação dos extractos de ADN, usando marcadores microsatélite e StSy-CHS.	218

Ilustração 5.2	Géis de agarose, contendo os resultados dos 12 tratamentos aplicados a ambas as combinações de <i>primers</i> para 4 amostras: 21, 17, 4 e 22.	221
Ilustração 5.3	Gel de acrilamida dos produtos de amplificação obtidos com as combinações SS1/SS10 e SS1/SS13 para a temperatura de hibridação de 58 °C e três níveis de concentração de cloreto de magnésio.....	223
Ilustração 5.4	Gel de acrilamida dos produtos de amplificação do <i>primer</i> VVMD31 para 10 clones de Touriga Nacional	224
Ilustração 5.5	Géis de acrilamida dos produtos de amplificação para as combinações de <i>primers</i> SS1/SS10 e SS1/SS13, usando as condições de amplificação otimizadas.	226
Ilustração 5.6	Fenograma dos 21 clones de Touriga Nacional estudados, usando distâncias Euclidianas e o método UPGMA.....	227
Ilustração 6.1	Genótipos das cinco castas em estudo para os <i>loci</i> referidos.....	241
Ilustração 6.2	Gel de agarose de extractos de ADN obtidos a partir de mostos congelados	242
Ilustração 6.3	Gel de acrilamida dos produtos de amplificação obtidos com os <i>loci</i> VVMD6 e VVMD7.....	244
Ilustração 6.4	Representação esquemática dos perfis de bandas obtidos pela análise dos 26 mostos polivarietais para os quatro <i>loci</i>	245
Ilustração 6.5	Densitogramas das amostras RC10 e RC25.	251
Ilustração 6.6	Rectas de regressão obtidas pela comparação dos valores adicionados e encontrados para cada combinação e <i>primer</i>	255

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 2.1	Composição dos diversos meios extractivos usados na extracção de ADN de <i>Vitis vinifera</i> 42
Quadro 2.2	Parâmetros de utilização dos marcadores RAPD na discriminação de castas ou clones de videira.....66
Quadro 2.3	Perspectivas de avaliação da informação obtida pela utilização de marcadores de ADN microsatélite 93
Quadro 2.4	Origem dos marcadores de ADN microsatélite descritos até Dezembro de 2004.....94
Quadro 2.5	Grupos de clones estudados por marcadores de ADN microsatélite e sua capacidade discriminatória. 107
Quadro 2.6	Casos de homónimas e sinónimas detectados pelos marcadores microsatélites. 114
Quadro 2.7	AFLP: adaptadores, <i>primers</i> e métodos de separação e visualização utilizados na análise de castas e clones de videira. 126
Quadro 2.8	Métodos de cálculo de distâncias, de agrupamento e <i>software</i> utilizados na análise dos dados fornecidos pelos marcadores moleculares.....132
Quadro 4.1	Castas da região dos Vinhos Verdes e do Douro seleccionadas para o presente estudo 160
Quadro 4.2	Processo de extracção final desenvolvido para folhas desidratadas.....168
Quadro 4.3.	<i>Primers</i> de <i>loci</i> de microsatélites de <i>V. vinifera</i> 170
Quadro 4.4	Programas de amplificação para os <i>loci</i> referidos.....172
Quadro 4.5	Genótipo das 38 castas estudadas para os seis <i>loci</i> 177

Quadro 4.6	Parâmetros genéticos para os seis marcadores usados nas 35 castas portuguesas estudadas.	179
Quadro 4.7	Genótipos das cinco castas da região do Oeste para os quatro <i>loci</i> estudados	194
Quadro 4.8	Rácios de probabilidade da casta Cruzado de Rabo de Ovelha (cro) ser originária de um cruzamento entre as castas Diagalves (dia) e Fernão Pires (fpr), em relação a outras possibilidades	196
Quadro 5.1	Descrição das amostras (origem e rendimento) usadas neste estudo.....	207
Quadro 5.2	Processo de purificação de extractos de ADN por oclusão numa matriz de agarose.....	209
Quadro 5.3	Sequência e posição no gene StSy dos <i>primers</i> usados na discriminação de clones.....	213
Quadro 5.4	Tratamentos (combinações de diferentes temperaturas de hibridação e concentrações de cloreto de magnésio) usados para a selecção das condições óptimas de amplificação.	216
Quadro 5.5	Número de bandas e similaridade genética (GS) obtidos com as combinações de <i>primers</i> , indicadas nas amostras estudadas.	228
Quadro 6.1	Amostras analisadas. Castas, mostos monovarietais e misturas de mostos (mostos polivarietais)	238
Quadro 6.2	Representação gráfica dos genótipos de cada uma das castas estudadas para os <i>primers</i> VVMD7 e 6	250
Quadro 6.3	Intensidade relativa das bandas correspondentes aos dois alelos, 1 e 2, para cada casta e <i>locus</i>	252
Quadro 6.4	Média, coeficiente de variação (CV) e nível de significância relativos às percentagens varietais indicadas e encontradas pela aplicação do método descrito	253
Quadro 7.1	Principais processos de degradação do ADN.	274

INTRODUÇÃO GERAL

Objectivos e organização do trabalho

1. OBJECTIVOS DO TRABALHO

De há uns anos a esta parte, os vinhos de excelência têm adquirido grande relevância no mercado internacional, reflexo da evolução natural da sociedade ocidental no sentido de uma maior exigência de qualidade. Estes vinhos estão, regra geral, sujeitos aos ditames das Denominação de Origem locais, que requerem um controlo exaustivo das matérias-primas, com vista a garantir a autenticidade do produto final. A pesquisa de métodos de identificação das castas – através das suas folhas, mostos e vinhos – empregues no fabrico de vinho é o objectivo primordial deste trabalho. Estes métodos foram delineados com o objectivo de avaliar o cumprimento das disposições legais bem como a garantia da qualidade do produto final.

De acordo com o supra referido, as matrizes alvo deste trabalho foram as videiras, castas e clones, os mostos e os vinhos. Só desenvolvendo metodologias para todas estas matrizes se consegue uma avaliação global da autenticidade do produto final – vinho – durante todas as fases do seu fabrico – na vinha, na adega e no ponto de venda.

Com este intuito, este trabalho tem como objectivos propor metodologias que (i) contribuam para a correcta identificação das castas de videira nas vinhas plantadas em explorações vitivinícolas e nas colecções de germoplasma e (ii) permitam certificar a constituição varietal dos mostos, - em termos qualitativos e quantitativos¹ - durante o processo fermentativo. Descrevem-se, também, os diferentes procedimentos ensaiados para a extracção de ADN de vinhos comerciais².

¹ O objectivo inicial consistia no desenvolvimento de metodologias capazes de avaliar a constituição varietal dos mostos, em termos qualitativos. Contudo, a obtenção de alguns resultados interessantes em ensaios quantitativos, justificaram a inclusão, neste trabalho, do desenvolvimento das metodologias que a tal conduziram.

² A extracção de ADN de vinhos comerciais começou por ser o objectivo primordial deste trabalho.

As referências a estas metodologias e a necessidade do seu desenvolvimento nas reuniões³ da Subcomissão de Unificação dos Métodos de Análise e Apreciação do Vinho, órgão científico do Office International de la Vigne e du Vin (OIV), espelham a importância do desenvolvimento do trabalho que se apresenta.

2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação estrutura-se em sete capítulos. Os capítulos 1 e 2 constituem a parte teórica do trabalho, estando dedicados os restantes à parte experimental, onde cada capítulo corresponde às distintas fases do trabalho, praticadas sobre os tipos de matrizes referidas.

No primeiro capítulo, é feita uma breve caracterização da espécie *Vitis vinifera*, do ponto de vista botânico, e apontados métodos de identificação de castas e clones. Também é incluída neste capítulo uma breve resenha histórica do cultivo da videira e do vinho.

O segundo capítulo, por seu lado, faz a revisão bibliográfica dos métodos de conservação das amostras, de extracção de ADN e dos marcadores moleculares usados nos últimos anos para a caracterização da videira. São referidos métodos moleculares não baseados na análise de ADN e sistemas isoenzimáticos, com uma notória predominância dos marcadores microssatélite, reflexo da proporção do número de citações encontradas na bibliografia. Acresce que estes marcadores foram os seleccionados para a execução experimental.

³ Bulletin de L' O.I.V. (1998) 71, 1008; Bulletin de L' O.I.V. (1999) 72; 806; Bulletin de L' O.I.V. (2000) 73, 655; Bulletin de L' O.I.V. (2001) 74, 620; Bulletin de L' O.I.V. (2003) 76, 83 e Bulletin de L' O.I.V. (2003) 76, 967.

Dedica-se o capítulo 3 à descrição dos reagentes, equipamento e programas informáticos utilizados para a prossecução do trabalho experimental.

No capítulo 4, é descrito o método desenvolvido para a caracterização genética de castas e clones de videira da região Norte de Portugal (Vinhos Verdes e Douro) a partir da análise de seis *loci* microssatélite. É inclusive descrita uma outra aplicação destes marcadores, desta vez ao estudo genealógico de uma casta da região do Oeste.

O capítulo 5 é dedicado, especificamente, ao desenvolvimento de uma metodologia de discriminação de clones da casta Touriga Nacional pelos marcadores microssatélite e StSy-CHS. É também proposto um método prático de purificação de extractos de ADN baseado na inclusão destes numa matriz de agarose de baixo ponto de solidificação.

O capítulo 6 descreve o desenvolvimento de uma metodologia de avaliação da autenticidade, em termos qualitativos e uma primeira abordagem em termos quantitativos, de mostos obtidos a partir de algumas castas Durienses.

O capítulo 7 caracteriza-se pela apresentação de alguns métodos de extracção de ADN de vinhos testados, infelizmente sem o êxito desejado. É ainda incluída uma pequena abordagem a novas metodologias que, eventualmente, possam ser utilizadas.

Finalmente, apresentam-se, sucintamente, as conclusões retiradas do trabalho efectuado.

Tendo em conta que as técnicas de biologia molecular não são habitualmente utilizadas em Química dos Alimentos, considerou-se que a atribuição de significados a

alguns dos vocábulos empregues no texto seria um factor que contribuiria para uma leitura e interpretação mais fáceis desta dissertação. Como tal, a parte final deste trabalho é complementada com um glossário que incluiu os mais relevantes termos utilizados.

A relação das referências bibliográficas citadas é feita no final de cada capítulo.

Este trabalho foi executado em três laboratórios diferentes, com as vantagens e desvantagens que deste facto se podem retirar. O primeiro desses laboratórios, entretanto extinto, foi equipado de raiz durante o trabalho que se descreve e manteve-se em funcionamento aproximadamente dois anos. A sua extinção obrigou à transferência para a FFUP, sendo necessário repetir o esforço, já dispendido anteriormente, para equipar o laboratório de Bromatologia de modo a que pudessem ser executadas técnicas de biologia molecular. Surgiu posteriormente, também com a colaboração e o esforço da equipa, o nascimento do Laboratório de Genética Vegetal, parte integrante do CIBIO, em Vairão. Não obstante o enriquecimento pela experiência, ficámos também desgastados, pois longo é o tempo de estabelecimento de metodologias tão sensíveis como as moleculares, implementadas e desenvolvidas ao longo do trabalho que se apresenta.

CAPÍTULO 1

Origem e variabilidade genética da videira
(*Vitis vinifera* L.)

1. INTRODUÇÃO

De entre as culturas frutícolas mais antigas, onde se integram também a oliveira, a tamareira e a figueira, a videira é a mais vastamente cultivada e também a mais importante em termos económicos^[Zohari e Spiegel-Roy, 1975]. As uvas são usadas, com predominância numa determinada forma de acordo com o grupo cultural consumidor, para consumo em fresco, após secagem, para a produção de sumos e para a produção de vinho. O interesse do homem pela videira levou ao seu cultivo intenso desde os primórdios da agricultura e à manutenção de um grande património genético, que entretanto se desenvolveu devido ao aparecimento de novas castas por processos que são referidos nas secções seguintes. Importa, portanto, proceder também a uma descrição do género *Vitis*, dentro do qual surge a variabilidade genética das castas cultivadas actualmente em grande parte do mundo.

2. CARACTERIZAÇÃO DO GÉNERO *VITIS*

As videiras são normalmente agrupadas no género *Vitis*, família *Vitaceae*. Os membros desta família caracterizam-se por serem plantas trepadoras, possuindo folhas que nascem no sentido oposto em cada nó e gavinhas ou frutificações na posição oposta à das folhas. A família das vitáceas comporta cerca de 15 géneros (e.g. *Acareosperma*, *Cissus*, *Parthenocissus*, *Tetrastigma*, *Yua*, etc.) de distribuição tropical ou subtropical, estando o género *Vitis*, contrariamente, distribuído em zonas temperadas do hemisfério norte^[Jackson, 2000].

O género *Vitis* divide-se em dois subgéneros: *Vitis* (anteriormente *Euvitis*) e *Muscadinia*. O subgénero *Muscadinia* é constituído por duas espécies, *V. rotundifolia* e

V. popenoei. Todas as outras espécies do género – cerca de 60^[Wang et al., 1999] - pertencem ao subgénero *Vitis*, incluindo a espécie *Vitis vinifera*.¹ Em termos morfológicos, estes dois subgéneros são facilmente distinguíveis. O sub-género *Vitis* apresenta, entre outras diferenças, caules rugosos e gavinhas bifurcadas, enquanto o *Muscadinia* apresenta caules lisos e gavinhas não ramificadas. Os dois subgéneros diferem também na composição cromossomal, contendo, o grupo *Vitis*, 19 pares de cromossomas, enquanto as espécies do grupo *Muscadinia* contêm 20 pares^[Jackson, 2000]. Lodhi e Reish (1995) avaliaram, através de citometria de fluxo, o conteúdo de ADN de algumas espécies de *Vitis* tendo chegado à conclusão de que o seu teor estava compreendido entre 0,86 e 1,00 pg/2C. O genoma da videira apresentava um tamanho de 475 Mbps contendo 96% de sequências não codificantes.

É frequente encontrar-se na literatura um tipo de classificação de espécies de videira que divide estas em videiras europeias e videiras americanas. Esta classificação, apesar de não ter fundamentos botânicos é historicamente importante, pois as videiras nativas do continente americano – as videiras americanas – são resistentes à infestação por filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) e a doenças como o míldio. A resistência a estas doenças encontra justificação no facto de estas espécies terem evoluído em contacto com os respectivos agentes causadores, também nativos do continente. Deste modo, entendem-se por espécies americanas aquelas nativas do continente americano, onde se contam cerca de 30 espécies, sendo as mais importantes: *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. berlandieri* das quais se obtiveram a maioria dos porta-enxertos actualmente utilizados. Outras espécies de menor importância são: *V. labrusca*, *V. aestivalis* e *V. candicans*^[Alley, 2004]. São consideradas videiras europeias todas as pertencentes à espécie *V. vinifera*.

¹ Outras espécies do subgénero *Vitis* são: *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. Berlandieri*, *V. acerifolia*, *V. labrusca*, *V. Shuttleworthii*, *V. mustangensis*, *V. vulpina*, *V. monticola*, *V. palmata*, *V. cinerea*, *V. aestivalis*, *V. californica*, *V. girdiana*, *V. arizonica*.

3. O CULTIVO DA VIDEIRA E A PRODUÇÃO DE VINHO

3.1. ORIGEM E DOMESTICAÇÃO DA VIDEIRA

A videira silvestre - *V. vinifera* spp. *Silvestris* - difere da videira domesticada - *V. vinifera* spp. *sativa* - no modo de cruzamento dos gâmetas durante a reprodução sexuada. Enquanto a videira silvestre é uma planta dióica, a videira domesticada é hermafrodita, logo capaz de se auto-polinizar, característica crucial para a garantia de frutificação de cada planta.

O local e a época onde ocorreu a domesticação da videira têm sido alvo de vários estudos devido à importância histórica do facto. Desses estudos^[McGovern et al., 1995, 1996] ressalta a referência à existência de práticas de viticultura no Médio Oriente pelas populações neolíticas que habitavam a região a Sul da cadeia montanhosa do Cáucaso, já em 6000 AC. Esta conclusão baseia-se na presença de resíduos de vinho em potes pertencentes a esta época. Efectivamente, o período compreendido entre 6000 e 5000 aC, altura em que se presume ter acontecido a disseminação das práticas agrícolas da sua região de origem, o crescente fértil, até ao norte do Irão e Anatólia, coincidente, como já dissemos, com o aparecimento dos mais antigos vestígios de vinho, é apontado por alguns historiadores^[Jackson, 2000] como o período de início da domesticação das videiras selvagens, induzida pela introdução das novas técnicas.

Outros factos suportam a hipótese do desenvolvimento simultâneo da vinicultura e da domesticação das videiras. Um deles reside na marcada parecença das palavras Vinho e Vinha² nas línguas de origem indo-europeia³ quando, em contraste, pouca

² Comparando os termos que designam vinho, vinha e uva, encontram-se semelhanças, em algumas línguas de origem indo-europeia, nos termos para vinho e vinha, não sucedendo o mesmo para o termo uva. Latim:

semelhança existe entre as palavras que designam o fruto, a uva. Esta observação pode induzir-nos a ideia de que a utilização das uvas para fazer vinho – antes desta utilização seriam colhidas para consumo directo – acompanhou o desenvolvimento do cultivo da vinha.

O local onde se iniciaram as práticas vitícolas reúne a concordância, de uma forma geral, de todos os investigadores⁴. Esse local corresponde à referida região - actualmente parte do território do Irão, Iraque, Turquia, Azerbeijão e Geórgia – localizada a Sul e entre os mares Cáspio e Negro. Apesar desta concordância, em termos geográficos, existem outras teses que defendem um início mais tardio da domesticação da videira, por volta de 4000 aC, cerca de dois milénios depois do aparecimento dos primeiros vestígios de resíduos de vinho^[McGovern et al., 1996]. Surgiu, desta forma, a dúvida sobre qual a mais antiga das práticas, a Viticultura ou a Vinicultura, tornando-se, deste modo, difícil perceber se os resíduos de vinho mais antigos que se conhecem, de cerca de 6000 AC^[McGovern et al., 1996], foram obtidos a partir de videiras cultivadas ou selvagens. À medida que se vão comparando as castas localmente cultivadas e selvagens autóctones, é provável que novos locais de domesticação de videira sejam identificados pois a presença destas plantas, produtoras de bagas doces altamente apelativas para os seres humanos, certamente despertaram a atenção das populações locais^[Olmo, 1995].

A partir do local de origem da domesticação, a videira disseminou-se até às actuais regiões vitivinícolas. Assim, na actual Grécia, encontram-se vestígios de práticas de fabrico de vinho, pelo povo Minóico, por volta de 2300 aC, provavelmente devido à

vinum, vitis, uva; Italiano: vino, vite, uva; Francês: vin, vigne, raisin; Espanhol: vino, vid, uva; Inglês: wine, vine, grape; Alemão: Wein, Weinstock Rebe, Traube; Romeno: vin, vita, strugure.

³ Línguas aparentadas, faladas em parte da Ásia e em grande parte da Europa. Dividem-se nos ramos indo-iraniano, anatólico (desaparecido), báltico, eslavo, itálico, germânico e celta, com as suas respectivas protolínguas e as línguas originadas destas, e inclui ainda o grego, o albanês e o arménio, estas, línguas isoladas^[Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa].

⁴ Evidências claras da domesticação de videiras aparecem apenas em escavações realizadas no nordeste do Irão e em Jericó datadas de cerca de 3200 aC.

transferência de vinhas do Egito. A partir de 800 aC, e até cerca de 100 Ac, os povos Gregos e Fenícios, no decurso da sua colonização da bacia do Mediterrâneo, difundiram as práticas vitivinícolas mais para Oeste. Do mesmo modo, os povos romanos, durante a sua expansão para o norte da Europa, levaram estas práticas para os actuais territórios da França, Alemanha e Áustria. É, no entanto, provável que um tipo de viticultura mais rudimentar já existisse no norte da Europa antes da chegada do povo Romano pois algumas castas de videira selvagens eram abundantes na Europa Central e do na Europa do Sul, sendo plausível a hipótese de que o seu cultivo e selecção desse origem a algumas castas localmente utilizadas^[Sefc *et al.*, 2001]. A expansão dos conhecimentos de vitivinicultura originou, para além da implantação de castas cultivadas em novas áreas, a troca de castas entre regiões. Mais recentemente, a colonização, por parte de vários países Europeus, de outros continentes, promoveu a actual disseminação universal da videira.

Anteriormente à aplicação dos marcadores moleculares a este tipo de estudos existia um consenso entre os historiadores, apoiado em evidências arqueológicas, à volta do referido centro de domesticação da videira – a região do Cáucaso. Todavia, mais recentemente, suportados por estudos com marcadores moleculares de ADN microssatélite cloroplastidial e nuclear, levantaram a hipótese de a videira ter sido domesticada em múltiplos locais espalhados pela Europa e Ásia. Neste sentido apontam os estudos de Arroyo-Garcia *et al.* (2002), baseados em dados obtidos pela análise de três *loci* de microssatélites cloroplastidiais em videiras selvagens e em algumas actualmente cultivadas em Espanha e na Grécia, que teorizaram a hipótese da existência de um segundo centro de domesticação de videira na Península Ibérica. Também Grassi *et al.* (2003), propõem um outro centro de domesticação, embora relativamente a apenas duas castas, na região de Nuoro, na Sardenha, baseados na análise da similaridade genética

entre estas castas e as castas selvagens locais, utilizando para tal seis *loci* microssatélites nucleares.

3.2. VARIABILIDADE INTRA ESPECÍFICA

A rica história associada ao cultivo da videira torna particularmente interessante o estudo dos fenómenos que levaram ao aparecimento de tão rico património genético. A maioria das castas de videira hoje existentes têm séculos de existência e o seu aparecimento deveu-se a um conjunto de diferentes processos, dos quais se podem salientar os seguintes^[Sefc et al., 2001]:

- ' *domesticação de videiras selvagens, quer nos locais ancestrais de origem da planta, na Região do Cáucaso, quer, mais tarde, nas regiões vitivinícolas Europeias;*
- ' *cruzamentos espontâneos entre videiras selvagens e cultivadas;*
- ' *cruzamentos artificiais entre videiras cultivadas.*

De entre os referidos processos, os cruzamentos espontâneos são responsáveis pela maioria das castas hoje existentes^[Meredith, 2001].

Apesar de historicamente a diversidade de videiras existentes na Europa ser, em grande parte, justificada pela influência dos povos migrantes, alguns dados recentes suportam a ideia de que a maioria das videiras europeias evoluíram a partir de videiras selvagens indígenas, com pouca ou nenhuma intercessão exterior^[Bourquin et al., 1993; Sensi et al., 1996].

Até há pouco mais de um século o cruzamento artificial de videiras era uma prática quase inexistente^[Jackson, 2003]. Nos primórdios da sua utilização, o cruzamento de castas visava a obtenção de videiras com as características vinícolas das espécies *V. vinifera* e a resistência à filoxera das espécies americanas(v.d. página 9), pois a única solução para o problema consistia na utilização de porta-enxertos americanos ou híbridos. Também se procuravam castas resistentes ao oídio e ao míldio. Os intentos dos melhoradores de videira pouco se modificaram desde então, tendo hoje em dia uma ferramenta adicional que poderá aumentar a eficiência dos programas de melhoramento: a existência de técnicas moleculares de diferenciação de plantas e um mais alargado conhecimento da genética da videira.

Os melhoradores de castas de videira aplicam os mesmos princípios no melhoramento dos porta-enxertos com o objectivo da aquisição de resistência à filoxera e outras afecções da videira^[Meredith e Guerra, 1995]. Os híbridos resultando de cruzamentos entre *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*, e posterior selecção, são, indiscutivelmente, os porta-enxertos mais usados no presente.

O número de castas de videira existentes actualmente é bastante difícil de avaliar com rigor. Muitos factores contribuem para tal facto, sendo o principal a ausência de registos credíveis em alguns países e o indeterminado número de casos de sinonímia entre castas de países diferentes e mesmo a nível local. De facto, só após a uniformização e aplicação a nível mundial de um método de identificação de videiras poderá ser conduzida uma avaliação razoável do número de castas existentes. Têm sido feitas algumas tentativas neste sentido com a construção de bases de dados de castas.⁵

⁵ A referir no próximo capítulo.

Apesar das incertezas, são frequentemente lançados alguns números, tendo por base o número de nomes de castas diferentes. A listagem de nomes de castas existente na base de dados Europeia da Videira^[Dettweiler, 2002] contém cerca de 10000 entradas de castas existentes em todo o mundo. Tendo em conta os inúmeros casos de sinonímias e homonímias, e apoiados em características ampelográficas, Alleweldt e Possingham (1988) indicam como provável o número de cerca de 6000 castas a nível mundial.

No nosso país, existem catálogos de castas, editados pelo Instituto da Vinha e do Vinho e pelo Ministério da Agricultura, para cada região vitivinícola, que permitem uma avaliação subjectiva do número de castas utilizadas em cada região e das suas principais características. Existem catálogos para as regiões do Algarve, Bairrada, Dão, Douro, Ribatejo, Oeste e Península de Setúbal, Vinhos Verdes, Alentejo e Pinhel.

Também uma publicação relativamente recente do Diário da República^[Portaria 428/2000] define as castas aptas à produção de vinho em Portugal e a respectiva nomenclatura oficial. Este documento, que inclui ainda algumas castas de origem estrangeira, frequentemente usadas no nosso País, refere-se a 341 castas e suas designações oficiais. Listas deste tipo permitem o esclarecimento de algumas confusões na designação das castas.

3.2.1. MELHORAMENTO DA VIDEIRA E ORIGEM DOS CLONES

O melhoramento da videira tem sido praticado fundamentalmente através das técnicas clássicas de melhoramento - selecção clonal e massal - e, mais recentemente e de uma forma preliminar, recorrendo às técnicas de transformação genética.

Um dos maiores problemas associados ao melhoramento da videira pelos métodos clássicos, é a necessidade da atribuição de um novo nome, sempre que se desenvolve uma nova casta. Os viticultores e consumidores, tendo em conta o vasto e tradicional leque de castas, estão pouco receptivos a novas castas.

Um dos requisitos para se iniciar um processo de selecção é a existência de variação genética numa determinada casta. Em espécies de reprodução vegetativa, esta variação genética só pode ter origem em mutações espontâneas ou induzidas. Apesar de algumas mutações ocorrerem durante o desenvolvimento da planta, o desenvolvimento de quimeras – modificações que ocorrem em células embrionárias dos meristemas – é considerado a principal fonte de variação genética (variação somática).

Uma quimera é uma planta composta de uma mistura de tecidos com diferentes genótipos. As mutações que originam estes genótipos têm origem nos meristemas apicais dos rebentos em desenvolvimento. Uma das células de uma das camadas do meristema⁶ sofre uma mutação que, após replicação celular, origina um rebento da planta com genótipos diferentes dos outros. Este tipo de mutações é mantido por propagação vegetativa destes rebentos originando-se, deste modo, novas plantas. No caso da videira, se a característica fenotípica afectada pela mutação tiver incidência sobre uma característica morfológica da planta, claramente visível, esta nova planta é considerada uma nova casta; caso contrário tem lugar o aparecimento de mais um clone^[Cervera *et al.*, 2000]. Franks *et al.* (2002), num estudo das implicações do fenómeno de quimerismo no melhoramento genético, sugerem que as quimeras – referindo-se particularmente às

⁶ O meristema apical da videira comporta duas camadas, como confirmado por Riaz *et al.* (2002). Cada uma destas camadas, após sucessivas mitoses, origina tecidos que mantêm a independência do genoma^[Hocquigny *et al.*, 2004].

quimeras periclinais, onde a mutação ocorre na camada mais exterior do meristema – são geradas a um ritmo apreciável em algumas castas de videira.

Recorrendo a técnicas de melhoramento, o aproveitamento da ocorrência destas mutações pode moldar as características de determinada planta à medida das necessidades actuais. A técnica mais difundida e também aquela que apresenta melhores resultados é a selecção clonal. Com esta é possível melhorar determinadas características da casta sem alterar o carácter varietal e, consequentemente, o nome da casta. Em linhas gerais, a selecção clonal é uma metodologia de melhoramento de espécies de reprodução vegetativa que consiste numa série de procedimentos cujo objectivo é a identificação e o isolamento das melhores plantas de uma determinada casta. Como vimos anteriormente, esta selecção é possível devido a variações genéticas espontâneas que, desde o seu aparecimento, foram propagadas vegetativamente, acumulando mutações que originaram a variação intra-varietal. A partir de uma população mãe de uma determinada casta de videira seleccionam-se varas de plantas superiores. Estas varas são propagadas vegetativamente, em local apropriado, sendo enxertadas em porta-enxertos comuns após o tempo necessário ao seu crescimento. Os clones são então plantados de uma forma organizada, em talhões com replicações, para minimizar o efeito da variação ambiental. Para que se proceda a um estudo comparativo, são avaliadas algumas das suas características, a saber: prevalência de infecções víricas, rendimento da planta (kg uvas/planta), teor alcoólico, acidez e outras características dos vinhos microvinificados a partir de um só clone, etc. Após vários anos de selecção para se estudar a interacção do genótipo com o ambiente, as melhores plantas vão sendo multiplicadas em diferentes locais até à selecção final dos melhores clones e introdução no circuito comercial.

As causas da variação entre clones têm sido alvo de inúmeros estudos, não só no caso da videira, mas também para outras espécies propagadas vegetativamente, como a maioria das árvores de fruto. Segundo Hartman *et al.* (2002) as principais causas da variação fenotípica apresentada pelos clones são devidas a:

- ' *interacções do genótipo com o ambiente;*
- ' *alterações ontogenéticas*⁷;
- ' *infecções com agentes patogénicos;*
- ' *mutações permanentes.*

Uma das causas de variação fenotípica, por vezes confundida com variação genética, resulta da infecção das plantas com vírus que, obviamente, afectam as características agronómicas da planta^[Thomas *et al.*, 1996]. Este factor de variação clonal, cuja eliminação é importante para o melhorador, pode ser perfeitamente controlado em colecções de clones num estágio avançado de selecção em que os vírus foram eliminados de todas as plantas.

Para minimizar o efeito ambiente e facilitar a selecção do genótipo durante a selecção clonal, todos os clones da colecção são enxertados no mesmo tipo de porta-enxertos e plantados no mesmo local, com repetições em blocos casualizados. Também o facto de a idade da planta poder provocar alterações nos fenótipos é um factor controlado, uma vez que apenas se efectuam comparações entre clones de um mesmo campo plantados simultaneamente.

⁷ Que ocorrem durante o curso normal do desenvolvimento de qualquer organismo.

Desta forma, a única fonte de variação genética que não pode ser controlada é também aquela que mais interessa ao melhorador avaliar. O aparecimento de mutações é, portanto, a mais importante fonte de variação clonal.

Por seu lado, a engenharia genética possui um grande potencial, tendo já sido utilizada por diversos investigadores para a introdução de determinadas características em castas comumente utilizadas. Entre as primeiras áreas a serem exploradas surge a resistência a vírus, através da inserção de genes codificantes de proteínas capsulares víricas^[LeGall *et al.*, 1994; Krastanova *et al.*, 1995], ou resistência a fungos patogénicos, como a promovida pela inserção de genes da quitinase de vários organismos^[Yamamoto *et al.*, 2000]. Em relação às alterações da composição do próprio fruto, a eliminação das sementes pode ser conseguida pela introdução de genes letais de sequências reguladoras do crescimento da semente^[Perl *et al.*, 2000]. Também a diminuição da actividade da enzima polifenol oxidase foi promovida pela inserção de sequências silenciadoras do respectivo gene com o intuito de diminuir a oxidação, e consequente escurecimento, das uvas passas^[Thomas *et al.*, 2000]. Nenhuma destas abordagens teve sucesso comercial^[Jackson, 2000] devido, em parte, à ausência de resultados conclusivos nos testes efectuados no terreno com videiras geneticamente modificadas.

4. IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CASTAS E CLONES DE VIDEIRA

4.1. INTRODUÇÃO

Como já foi referido, existem, actualmente, milhares de castas, tendo sido muitas delas distribuídas para locais distantes das suas regiões de origem. Em alguns casos, as videiras adquiriram um novo nome aquando da implantação numa nova região; noutros, simplesmente foram incorrectamente denominadas ou confundidas com outras castas^[Meredith, 2001]. Por conseguinte, é essencial a correcta identificação das videiras num mercado vinícola cada vez mais globalizado.

A existência deste grande número de castas, por vezes muito semelhantes morfológicamente, mas em que as diferenças do valor comercial podem ser consideráveis, levanta o problema da sua identificação precisa. Qualquer um de nós, com alguma experiência de contacto com a vinha, consegue distinguir facilmente algumas castas. Outras, mesmo de características produtivas diferentes, são praticamente indistinguíveis morfológicamente. Devido à grande similaridade entre algumas castas, não existe nenhum técnico capaz de as identificar a todas, baseado apenas na sua morfologia. Perante estas dificuldades, o desenvolvimento de metodologias que permitam a correcta identificação das castas é uma aposta da investigação em viticultura.

O problema da identificação de castas agrava-se quando se consideram os subtipos de castas ou clones. Estes subtipos, pertencentes à mesma casta, apresentam características agronómicas diferentes que, naturalmente, lhe conferem diferente valor. Eliminadas as possibilidades das diferentes características agronómicas terem origem em

influências ambientais ou infecções víricas das plantas, estas diferenças são hoje atribuídas à divergência genética provocada por uma acumulação de mutações somáticas.

4.2. DIFERENCIAÇÃO DE CASTAS PELOS MÉTODOS CLÁSSICOS

Os métodos clássicos de identificação e diferenciação de castas, a Ampelografia e a Ampelometria, baseiam-se nas diferenças morfológicas - da videira, da uva e, principalmente, das folhas - existentes entre aquelas. Os valores obtidos pela avaliação destes parâmetros são registados para posterior comparação e identificação de outras castas. Os ampelógrafos têm feito evoluir os parâmetros a avaliar no sentido de estes se tornarem menos sujeitos a avaliações subjectivas, dando, assim, ênfase a observações objectivas do tamanho e ângulos formados pelas nervuras das folhas, de fácil avaliação.

Até um passado recente, altura em que se iniciou a identificação de castas pela aplicação de metodologias moleculares, não existia alternativa credível a estas técnicas clássicas de identificação. Embora largamente utilizadas, estas metodologias apresentam algumas limitações como as que a seguir se citam de acordo com Sefc *et al.* (2001):

' são aplicáveis apenas durante o período vegetativo da planta pelo facto de as observações serem principalmente executadas nas folhas. No entanto, o material vegetal é adquirido pelos viticultores na forma de varas, o que impossibilita a sua identificação objectiva por este tipo de métodos. Um erro de identificação de castas nesta fase só muito mais tarde, após o estabelecimento da planta, será detectado. No caso de o erro de identificação ocorrer no porta-enxerto, a sua detecção é, por vezes, impossível, uma vez que o desenvolvimento de folhas no porta-enxerto é

evitado. A utilização de um porta-enxerto inadequado terá consideráveis consequências nefastas na qualidade das uvas;

' os fenótipos das plantas são fortemente influenciados pelas condições abióticas assim como pelas bióticas - estados nutricionais e de sanidade das plantas. Pequenas modificações no ambiente podem causar variações nas características morfológicas avaliadas pela ampelografia, o que torna a identificação de plantas mal nutridas ou afectadas, por pragas e doenças, susceptível a erros;

' o número total de castas existentes em colecções ampelográficas em todo o mundo está estimado em cerca de 15000 e, embora bastante mais reduzido, o número de castas em uso é também muito grande. Mesmo que todas estas plantas se encontrem em condições ideais, é extremamente difícil distingui-las apenas pelas características morfológicas;

' por último, mas não de menor importância, a aplicação dos métodos ampelográficos requer pessoas intensamente treinadas para o efeito. Apesar de estes indivíduos serem capazes de diferenciar as castas com as quais estão familiarizados, o mesmo não acontece com as restantes castas, simplesmente pela impossibilidade de uma colecção conter exaustivamente todas as castas mundiais. Mais, a reprodutibilidade das observações entre técnicos em regiões distantes é difícil de conseguir.

São também referidas na literatura várias tentativas de desenvolvimento de métodos que não assentem na avaliação subjectiva das características fenotípicas da planta, mas em características mais estáveis, tais como: a variação da morfologia do pólen^[Ahmedullah, 1983; Marasali et al., 2005], a composição das proteínas da parede dos grãos de pólen^[Cargnello, et al. 1988; Tedesco et al., 1989] e o perfil de ácidos gordos das grainhas^[Fanizza et al., 1986].

Pelas razões referidas, nos últimos 25 anos foram intensamente investigados e testados métodos alternativos para a identificação de castas de videira, baseados em diferenças genotípicas – também designados métodos moleculares^[Karp *et al.*, 1998]. Vários aspectos relacionados com estes métodos serão aprofundados no capítulo 2.

4.3. DIFERENCIAÇÃO DE CASTAS E CLONES PELOS MÉTODOS MOLECULARES

Os métodos moleculares⁸ desempenham actualmente um papel preponderante na identificação e autenticação de castas. Entendem-se por moleculares, os métodos de avaliação de polimorfismos em sistemas enzimáticos e os métodos de avaliação de polimorfismos de ADN.

Algumas enzimas apresentam pequenas variações – isoenzimas - que podem ser avaliadas em laboratório. Esta avaliação é feita pelos métodos isoenzimáticos, cujo funcionamento se fundamenta em metodologias de separação electroforética que permitem verificar diferenças no tamanho das isoenzimas. Apesar das inúmeras limitações e análise isoenzimática é, por vezes, mais objectiva que as técnicas ampelográficas.

As metodologias de avaliação de polimorfismos a nível do ADN – RFLP, RAPD, SCAR, Microsatélites, ISSR, AFLP, etc. – são aquelas que originam resultados mais precisos, pois avaliam algo que é específico de todo o organismo e não pode ser modificado por qualquer tipo de alteração ambiental. Os marcadores de ADN apresentam, indubitavelmente, características que os tornam os marcadores de eleição nos dias de

⁸ No capítulo seguinte é feita a revisão bibliográfica dos métodos.

hoje. Todavia, e sem qualquer influência na escolha destes marcadores, o facto de na sua grande maioria não serem marcadores direccionados para zonas codificantes do genoma, limita, até certo ponto, o seu poder discriminatório entre indivíduos geneticamente mais próximos mas com algumas características fenotípicas aparentemente diferentes, como os clones de uma determinada casta. Grande parte dos marcadores tem como alvo todo o genoma indiscriminadamente, sendo apenas 4% deste constituído por regiões codificantes^[Lodhi e Reish, 1995].

4.4. A AUTENTICAÇÃO DE MOSTOS E VINHOS

H. Przyrembel (2004), num trabalho que aborda a nova legislação europeia relativa a rotulagem de alimentos na perspectiva da informação ao consumidor, foca três propósitos que ressaltam do texto introdutório da directiva 2000/13/EC: (i) informação do consumidor, (ii) protecção do consumidor e (iii) honestidade nas trocas comerciais. Estes propósitos estão inter-relacionados não podendo um deles ser alcançado sem os restantes estarem assegurados. A correcta informação do consumidor acerca da identidade, natureza e composição dos alimentos permite que este faça escolhas conscientes e seguras. Para que a liberdade do consumidor esteja assegurada, devem ser desenvolvidas metodologias de avaliação de autenticidade dos alimentos, provendo, desta forma, os fiscalizadores de ferramentas credíveis. É neste contexto que as técnicas de determinação de autenticidade de vinhos, passando pela sua avaliação no estado de mosto, são consideradas cruciais e recebem a atenção de vários grupos de investigadores em todo o mundo.

O problema da autenticidade de um vinho não é um problema emergente para a indústria vinícola ou para os consumidores, mas o crescente volume do mercado de

vinhos monovariais e o conseqüente incremento dos preços podem desencadear um maior número de tentativas de adulteração do produto. Para o consumidor de excelência este problema dificilmente o afligirá, pois as suas capacidades de apreciação do vinho proporcionam-lhe uma ferramenta, ainda que subjectiva, de detecção de adulterações do produto. Já o consumidor menos experiente terá que orientar a procura de um produto de qualidade, que pretende conhecer, pelas informações que são fornecidas através de rotulagem. Precisa ter, por conseguinte, absoluta confiança no produto que adquire, na medida em que não terá certamente aptidão para o diferenciar de outro de menor qualidade.

Além do problema da adulteração dos vinhos com castas diversas das indicadas no rótulo, as recentes apostas, por parte da comunidade científica, no desenvolvimento quer de leveduras quer de videiras transgénicas, poderão colocar problemas de ordem moral aos consumidores objectores da transformação genética de organismos, num futuro não muito distante. É neste contexto que se considera importante o desenvolvimento das metodologias de autenticidade de mostos e vinhos por técnicas de análise de ADN. Acresce que o desenvolvimento de tecnologia capaz de permitir a rastreabilidade dos vinhos em todo o seu processo de fabrico, desde a uva até ao vinho acondicionado, terá aplicabilidade à medida que a exigência dos consumidores e do mercado forem crescendo.

5. BIBLIOGRAFIA

- Ahmedullah, M. (1983). Pollen morphology of selected *Vitis* cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 108, 155-160
- Alleweldt, G., Possigham, J. V. (1988). Progress in grapevine breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 75, 669-673
- Alley, L. (2004). Rootstock basics. *Wine & Vine*, 106-107
- Arroyo-García, R., Lefort, F., Andrés, M. T., Ibáñez, J. B., Jouve, N., Cabello, F., Martínez-Zapater, J. M. (2002). Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species. *Genome*, 45, 1142-1149
- Bourquin, J. C., Otten, L., Walter, B. (1993). Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L., *Theoret. Appl. Genet.*, 87, 431-438
- Cargnello, G., Gianazza, E., Tedesco, G., Capella, M., Gerona, F. M. (1988). Wall proteins of *Vitis vinifera* pollen I: Constancy of the phenotype. *Vitis*, 27, 47-55
- Cervera, M. T., Cabezas, J. A., Cénis, J. L., Martínez-Zapater, J. M. (2000). Somatic variation in grapevine. In: *Proceedings of the Plant and Animal genome VIII conference*. San Diego. EUA
- Dettweiler, E. (2002). European *Vitis* Database. Consultado em Março de 2005 em German Centre for Documentation and Information in Agriculture: <http://www.genres.de/eccdb/vitis/>
- Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa*. p. 4611. Instituto António Houaiss de Lexicografia, Portugal, Lisboa, 2005.
- Fanizza, G., intrieri, C., Iodice, F. (1986). Diversity analysis for seed fatty acid composition in *Vitis vinifera*. In: *Proceedings of the 4th International Symposium on Grapevine Breeding* (pp 73-74), Verona, Itália
- Franks, T., Botta, R., Thomas, M. R. (2002). Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 192-199
- Grassi, F., Labra, M., Imazio, S., Spada, A., Sgorbati, S., Scienza, A., Sala, F. (2003). Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 107, 1315-1320
- Hartman, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., Geneve, R. L. (2002). *Plant propagation* (7ª Ed.). New Jersey: Prentice Hall
- Hocquigny, S., Pelsy, F., Dumas, V., Kindt, S., Heloir, M-C., Merdinoglu, D. (2004). Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome*, 47, 579-589
- Jackson, R. S. (2000). *Wine Science*. (2ª Ed.) San Diego: Academic Press
- Karp, A., Ingram, D. S., Isaac, P. (Eds.) (1998). *Molecular tools for screening biodiversity*. Londres: Chapman and Hall
- Krastanova, S., Perrin, M., Barbier, P., Demangeat, G., Cornuet, P., Bardonnet, N., Otten, L., Pinck, L., Walter, B. (1995). Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Rep.*, 14, 550-554
- LeGall, O., Torregrosa, L., Danglot, Y., Candresse, T., Bouquet, A. (1994). Agrobacterium-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMFV). *Plant Sci.*, 103, 161-170
- Lodhi, M. A., Reish, B. I. (1995). Nuclear DNA content of *Vitis* species, cultivars and other genera of Vitaceae. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 11-16

- Marasali, B., Pinar, M., Büyükkartal, N. (2005). Palynological study on the pollen grains of selected turkish grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Turk. J. Agric. For.*, 29, 75-81
- McGovern, P. E., Fleming, S. J., Katz, S. H. (1995). *The origins and ancient history of wine*. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers.
- McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature*, 381, 480-481
- Meredith, C. P. (2001). Grapevine genetics: Probing the past and facing the future. *Agric. Conspec. Sci.*, 66, 21-25
- Meredith, C. P., Guerra, B. (1995). Comparision of *Vitis Berlandieri* x *Vitis riparia* rootstocks by restriction fragment length polymorphism analysis. *Vitis*, 34, 109-112
- Olmo, H. P. (1995). The origin and domestication of vinifera grape. In: McGovern, P. E., Fleming, S. J., Katz, S. H. (Eds.). *The origins and ancient history of wine*. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers.
- Perl, A., Sahar, N., Spiegel-Roy, P., Gavish, S., Elyasi, R., Orr, E., Bazak, H. (2000). Convencional and biotechnological approaches in Breeding sedles table grapes. *Acta Hort.*, 528, 607-612
- Portaria 428/2000. *Diário da República de 17 de Julho de 2000* – I Série B, nº163, 3271-3273
- Przyrembel, H. (2004). Food labelling legislation in the EU and consumers information. *Trends Food Sci. Tecnol.*, 15, 360-365
- Riaz, S., Garisson, K. E., Dangl, G. S., Boursiquot, J.-M., , Meredith, C. P. (2002). Genetic divergence and Chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127, 508-514
- Sefc, K. M., Lefort, F., Grando, M. S., Scott, K. D., Steinkellner, H., Thomas, M. R. (2001). Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In K. A. Roubelakis-Angelakis (Ed.), *Molecular Biology and Biotechnology of grapevine* (pp. 2-30). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Sefc, K. M., Lopes, M. S., Lefort, F., Botta, R., Roubelakis-Angelakis, K. A., Ibanez, J., Pejic, I., Wagner, H. W., Glössl, J., Steinkellner, H. (2000). Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 498-505
- Sensi, E., Vignani, R., Rohde, W., Biricolt, S. (1996). Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis*, 35, 183-188
- Tedesco, G., Gianazza, E., arrigotti, S., Cargnello, G. (1989). Wall proteins of *Vitis vinifera* pollen II: Influence of the environment and rootstock on the electrophoretic pattern. *Vitis*, 27, 65-72
- Thomas, M. R., Cain, P., Scott, N. S., Collins, G. G., Symons, H. R. (1996). Differentiation and identification of grapevine cultivars by DNA typing. *Riv. Vitic. Enol.*, 49, 57-58
- Thomas, M. R., Iocco, P., Franks, P. (2000). Transgenic grapevines: status and future. *Acta Hort.*, 528, 279-287
- Wang, Y., Chen, J., Lu, J., Lamikanra, O. (1999). Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vitis* species and Florida bunch grapes. *Sci. Hort.*, 82, 85-94
- Yamamoto, T., Iketani, H., Ieki, H., Nishizawa, Y., Notsuka, K., Hibi, T., Hayashi, T., Matsuta, N. (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal phatogens. *Plant Cell Rep.*, 19, 639-646
- Zohari, D., Spiegel-Roy, P. (1975). Beginings of fruti growing in the old world. *Science*, 187, 319-327

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Física de Caruaru

CAPÍTULO 2

Métodos moleculares de análise da variabilidade
da videira

1. INTRODUÇÃO

No capítulo anterior, foram referidas as mais importantes limitações ao uso dos métodos clássicos de identificação de castas, a Ampelografia e a Ampelometria, limitações que impulsionaram o desenvolvimento de outros métodos de uma maior exactidão e reprodutibilidade. Emergiram, então, diversos estudos sobre a aplicação das metodologias moleculares ao estudo da variabilidade da videira. Esses estudos serão objecto de revisão deste capítulo. Os chamados métodos moleculares podem dividir-se em dois grupos de acordo com o tipo de molécula alvo: as metodologias de análise do polimorfismo enzimático e as metodologias de análise de ADN.

Qualquer que seja o método molecular utilizado, o mesmo requer, claramente, a prévia extracção das moléculas alvo – enzimas, no caso da análise de isoenzimas e ácidos nucleicos, quando se pretendem analisar marcadores de ADN. As técnicas de extracção de ácidos nucleicos serão tratadas com profundidade neste capítulo, enquanto as técnicas de extracção de sistemas enzimáticos não serão alvo de revisão uma vez que não nos parecem relevantes para o trabalho em questão, pois a sua utilização é deveras menor que a dos ácidos nucleicos.

Nas secções seguintes, será dada grande relevância aos métodos de extracção de ADN e à utilização dos marcadores microssatélite. Aos primeiros, porque um dos objectivos deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologias de extracção de ADN de folhas de videira, mostos e vinhos. Quanto aos marcadores microssatélite, a percentagem de trabalhos neles baseados é de tal modo mais elevada do que a dos marcadores alternativos que, a sua revisão toma um lugar preponderante nesta dissertação. Para além

das razões apontadas, foram, como já referimos, os marcadores seleccionados para a realização do trabalho prático.

2. COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

No que concerne à colheita das amostras, a bibliografia consultada, apenas faz referência, de uma forma unânime, à necessidade de se colherem folhas jovens, o que contribui para a obtenção de bons extractos de ADN. A colheita das amostras, propriamente dita, não requer outros cuidados especiais. Todavia, a conservação das amostras, desde a colheita até à análise no laboratório, tem sido alvo de diversos estudos dos quais referiremos alguns, devido à sua importância e aplicabilidade ao caso da videira.

Em grande parte dos trabalhos revistos, os seus autores usaram o método de conservação clássico: o congelamento em azoto líquido. Não obstante a sua grande eficácia, este método apresenta a enorme desvantagem que reside na necessidade de transportar os contentores de azoto líquido e os recipientes isotérmicos que permitam a conservação das amostras, a baixas temperaturas, até ao laboratório. Num trabalho realizado em 1995, Botta *et al.* referem o transporte das folhas de videira congeladas a -70°C desde o local de colheita, na Itália, até ao local da execução da extracção de ADN, na Austrália, em gelo seco.

A utilidade do desenvolvimento de métodos alternativos de conservação das amostras e extracção de ADN é evidente, não devendo estes ser considerados meros procedimentos acessórios da análise de polimorfismos da videira.

Assim, Chase e Hills, em 1991, propuseram um método baseado na capacidade exsicante do gel de sílica, anteriormente utilizado por botânicos em estudos morfológicos, para conservação de amostras que posteriormente seriam sujeitas a processos de extracção de ADN. Estes autores estudaram duas substâncias exsiccantes frequentemente usadas para o efeito – o gel de sílica e o sulfato de cálcio (também designado por *Drierite*) - tendo chegado à conclusão de que a utilização de gel de sílica é mais apropriada, pois a sua capacidade exsicante (cerca de 30%) é bastante mais elevada do que a do sulfato de cálcio (10-14%). Acresce o facto de o gel de sílica não se tornar numa pasta em ambientes húmidos nem libertar pó. Os referidos autores colhiam folhas com cerca de 3 cm de comprimento que armazenavam em sacos *ziplock* com cerca de 50-60 g de sílica com indicador de humidade (quantidade cerca de 10 vezes superior ao peso da amostra). Esta relação 1:10 de amostra e gel de sílica foi considerada como suficiente para proporcionar uma rápida desidratação da amostra, desidratação que pode ser testada pela friabilidade da folha.

Não menos interessante foi a abordagem de outros autores como Storchová e colaboradores (2000), baseada no trabalho de Rogstad *et al.* (1992), que utilizaram uma solução de CTAB e cloreto de sódio, respectivamente a 3 e 35 %, em microtubos de 1,5 ml, onde eram mergulhadas as amostras. Os tubos eram conservados à temperatura ambiente, durante 1 a 4 semanas, até à chegada ao laboratório onde eram armazenados a – 20 °C, sem degradação significativa do ADN, até 2 anos.

Um outro meio de conservação de amostras de videira foi referido por Fossati *et al.* (2001), cuja constituição era a seguinte: 0,6 M EDTA, 10 mM Tris-HCl e 1% N-laurilsarcosina. Imediatamente imersas neste meio após a colheita, as folhas eram

conservadas durante pelo menos 30 dias a 4 °C. Não é feita qualquer referência ao desenvolvimento deste meio de conservação.

3. EXTRACÇÃO DE ADN

O processo de extracção dos ácidos nucleicos e a sua purificação, por vezes considerado meramente acessório, constitui um passo fundamental para o estudo do genoma, designadamente para a sua caracterização através de marcadores moleculares. Este facto é mais relevante quando se trata de organismos cuja constituição dos tecidos podemos considerar complexa, como das plantas extremamente ricas em metabolitos, na sua maioria interferentes nos processos extractivos em questão.

Os diversos métodos disponíveis originam extractos de diferentes graus de pureza contendo ADN mais ou menos fragmentado. A adequação da qualidade do extracto ao método é determinada a jusante, isto é, pelo tipo de aplicação ao qual o extracto vai ser sujeito.

A qualidade de um extracto de ADN é avaliada por três parâmetros: (i) quantidade de ADN extraída, (ii) tamanho médio dos fragmentos de ADN e (iii) pureza do extracto. Um bom extracto é, consequentemente, aquele que conjuga estas três características. Sobretudo o tamanho médio dos fragmentos – quanto maior a menos agressões foi sujeita a amostra ou extracto - está directamente relacionado com a eficiência do método extractivo. Contudo, diferentes técnicas requerem diferentes tipos de extractos, e nem sempre um extracto é rejeitado quando é deficiente num ou noutro destes parâmetros. Técnicas como RFLP¹ necessitam de grande quantidade de ADN de

¹ A técnica de RFLP será tratada na página 55.

grande pureza. Se o extracto for sujeito a reacção de PCR, a quantidade extraída é de importância secundária relativamente à pureza do extracto pois a presença, de inibidores da reacção em quantidades infinitesimais, pode inviabilizar a amplificação.

Nas plantas existem, essencialmente, três tipos de substâncias capazes de inviabilizar reacções enzimáticas em extractos de ADN^[Jobes et al., 1995] (e.g. PCR e restrição enzimática): os polissacarídeos, de difícil separação do extracto de ADN devido à sua grande viscosidade e adesividade à molécula; os polifenóis, e alguns compostos terpénicos, capazes de se ligarem irreversivelmente às cadeias dos ácidos nucleicos; e o ARN, que diminui a eficiência e aumenta os erros de hibridação dos *primers*^[Pikaart e Villeponteau, 1993].

Os métodos de isolamento de ADN são diversos e dependentes do tipo de matriz a analisar. Genericamente, um método de extracção de ADN é constituído pelas seguintes etapas:

- ' *rompimento da estrutura do tecido por acção mecânica;*
- ' *lise celular pelo tratamento com detergentes ou agentes caotrópicos;*
- ' *remoção de proteínas e restos celulares por centrifugação, acção de*
proteínases ou extracção com clorofórmio;
- ' *precipitação do ADN na presença de etanol e catiões salinos.*

O rompimento da estrutura tecidular das amostras é conseguido por processos mecânicos de uso corrente em laboratório. No caso das folhas de videira, matriz usada na maioria dos casos, o rompimento foi quase sempre executado por pulverização em almofariz com a ajuda de diversos reagentes.

Para a promoção da lise celular, a maioria dos autores promove uma digestão, enzimática e/ou química, da matriz pulverizada usando meios tamponados de composição diversa e, por vezes, complexa, que serão indicados neste capítulo.

Os métodos clássicos de extracção de ADN incluíam, na sua maioria, uma extracção de proteínas e lípidos com fenol tamponado a pH=8 e/ou solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)^[Parimoo e Parimoo, 2003]. Apesar da sua eficiência, este reagente tem vindo a ser progressivamente eliminado dos protocolos devido à sua elevada toxicidade causada pela presença de fenol. Foi, por esse motivo, substituído por soluções contendo apenas clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 24:1, com a finalidade da precipitação de proteínas e polissacarídeos do CTAB^[Murray e Thompson, 1980].

O ADN precipita de soluções aquosas pela acção do etanol ou isopropanol na presença de sais como o cloreto de sódio, o acetato de sódio e o acetato de amónio. O tipo de sal a usar nesta precipitação depende, essencialmente, da posterior aplicação do ADN, pois alguns processos poderão ser inibidos pelos iões usados na precipitação (e.g. a enzima fosforilante T4 Kinase perde actividade na presença de iões amónio). O tipo de álcool a usar, uma vez que não interfere com processos a jusante, já que pode ser completamente eliminado por evaporação, é determinado por conveniência, pois a precipitação com isopropanol requer a adição de 1 volume de álcool enquanto o mesmo processo com etanol necessita de dois volumes, aumentando consideravelmente o volume final.^[Parimoo e Parimoo, 2003]

A extracção de ADN em pequena escala, a partir de 10 a 200 mg de tecido, executada em microtubos de 1,5 a 2 ml, constitui uma das preocupações dos investigadores que focam estes assuntos. Em pequena escala poupam-se reagentes, com

evidentes vantagens na diminuição da agressão ambiental, e diminui-se a quantidade de amostra necessária para executar uma análise, o que se revela extremamente útil quando a amostragem é feita em locais distantes do laboratório. Observa-se, por isso, uma tendência para a redução da quantidade de amostra a submeter ao processo extractivo.

3.1. METODOLOGIAS DE EXTRACÇÃO DE ADN DE VIDEIRA

O isolamento de ADN com qualidade adequada para posterior amplificação pela reacção de PCR tem sido conseguido a partir de varas lenhosas, varas verdes, folhas jovens, uvas (bagos verdes e maduros) e engaço. O fundamento das metodologias de extracção adequadas a cada um destes tecidos é basicamente o mesmo, com pequenas adaptações às particularidades texturais de cada um.

Apesar de ser possível extrair ADN de praticamente todos os tecidos da videira, a extracção de ADN de folhas em senescência, em condições adequadas à amplificação, tem-se mostrado bastante difícil. Como tal, a maioria dos autores usa folhas jovens não só porque a probabilidade da obtenção de ADN de excelente qualidade aumenta, mas também porque a colheita de folhas num estágio de crescimento pouco avançado permite a inequívoca identificação da planta a partir da qual a folha está a ser colhida.

Os investigadores que desenvolveram metodologias de extracção de ADN de videira apoiaram-se nos métodos existentes desenvolvidos para outras plantas e promoveram as adaptações que acharam mais convenientes e que melhores respostas originaram. Dos trabalhos publicados mais relevantes para outras plantas, considera-se de maior importância os que a seguir se resumem.

O trabalho relativo à extracção de ADN de plantas com um dos maiores índices de citação, foi publicado em 1980 por Murray e Thompson. Nele, os autores explanam um método, relativamente complexo, fundamentado na capacidade de precipitação selectiva dos ácidos nucleicos pelo brometo de cetiltrimetilamónio (Cetavlon ou CTAB), previamente descrita por Jones (1953), capaz de proporcionar a obtenção de extractos de ADN satisfatoriamente isentos de polissacarídeos e polifenóis, substâncias que inibem a actividade de nucleases de restrição.

A precipitação selectiva do ADN, sob a forma de um complexo CTAB-ADN, é dependente da concentração de cloreto de sódio, ocorrendo apenas quando a concentração deste último for inferior a 0,5 M.^[Parimoo e Parimoo, 2003] Paralelamente, e de uma forma independente da concentração de cloreto de sódio, esta molécula induz a formação de complexos CTAB-polissacarídeos/proteínas na interfase solução aquosa/solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) adicionada na proporção 1:1. Este facto permite a extracção de alguns polissacarídeos e proteínas por múltiplas adições da referida mistura.

^[Parimoo e Parimoo, 2003] O método proposto por Murray e Thompson – fundamentado nos factos anteriormente referidos - consistia no seguinte: a amostra, finamente pulverizada, era dispersa numa solução de 1% de CTAB, Tris-HCl 50 mM (pH=8), EDTA 10 mM, c0,7 M e 1% de 2-mercaptoetanol. Após digestão a quente (50-60 °C), e lavagem com uma solução de clorofórmio:octanol (24:1) para eliminação de proteínas e a maioria dos polissacarídeos. A precipitação selectiva dos ácidos nucleicos – formação de um complexo [CTAB-nucleoproteínas-ADN] – ocorria, na presença de CTAB a 1%, quando a concentração de cloreto de sódio do meio de extracção baixava de cerca de 0,7 para 0,4 M, pela adição de solução de CTAB a 1%. Murray e Thompson (1980) propuseram a posterior purificação do extracto obtido – remoção do CTAB complexado com o ADN - por centrifugação em gradiente de cloreto de cézio de uma solução do complexo formado.

Não obstante, estes autores referiram também a possibilidade de esta purificação ser executada através de precipitação pela adição de 2 volumes de água e 7,5 volumes de etanol, que causaria a precipitação da molécula livre do ADN.

Este procedimento de Murray e Thompson, de utilização de CTAB para a precipitação selectiva de ácidos nucleicos acoplado e uma segunda precipitação pelo etanol, sugerida, também, pelos autores, estão na base da maioria dos métodos de extracção de ADN de plantas actualmente em uso.

O método clássico de Dellaporta *et al.* (1983), muitas vezes indicado na bibliografia como o método de referência para a obtenção de ADN de plantas, é um método citado com frequência, visto que a precipitação de proteínas através da utilização de SDS e acetato de potássio promove o isolamento de ADN com uma pureza considerável. O tampão de extracção era constituído por Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, cloreto de sódio 100 mM, 2-mercaptoethanol 10 mM e 1% de SDS. Após 10 minutos de incubação a 65 °C, era adicionado acetato de potássio a 5M ao meio e este incubado em gelo durante 10 min. Após centrifugação para remoção de proteínas e polissacarídeos o ADN era precipitado com isopropanol e lavado com uma solução a 70% de etanol, antes da secagem e redissolução em TE.

O método de Doyle e Doyle (1990) parece ser o método de extracção de ADN de plantas mais citado. É, também, aquele que mais tem sido sujeito a adaptações para aplicações específicas, como seja a extracção de ADN de videiras [Jean-Jaques *et al.*, 1993; Cipriani *et al.*, 1994; Steenkamp *et al.*, 1994; Grando *et al.*, 1995; Moreno *et al.*, 1995; Grando *et al.*, 1998a, b; Labra *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2000].

Este método, tal como o anteriormente proposto por Murray e Thompson (1980), conjuga a capacidade detergente e de precipitação do CTAB (2% CTAB, 1,4 M cloreto de sódio,

0,2% 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM tris-HCl; a pH=8) com a simplicidade de um passo final de purificação do extracto primário, através de dissolução deste em meio tamponado TE, precipitação com 2/3 do volume de isopropanol, nova dissolução do extracto obtido e precipitação com 2,5 volumes de etanol a 95%. A remoção do ARN pode ser executada entre as duas precipitações, no extracto dissolvido em TE, com as enzimas RNases. Este método é pioneiro na aposta num procedimento simples e universal sendo, por isso, como referimos, o trabalho de extracção de ADN de plantas mais citado.

Visando a eliminação dos três principais interferentes das reacções enzimáticas (polissacarídeos, polifenóis e RNA) dos extractos de ADN de várias plantas, Jobes *et al.* (1995) propuseram um método que se fundamenta na utilização de PVP para eliminação de substâncias fenólicas; cloreto de sódio à concentração de 2,5 M, de modo a evitar a coprecipitação de polissacarídeos e ADN; e, alternativamente ao uso de RNases, LiCl na concentração de 2M com o intuito de promover a precipitação selectiva de ARN. A não utilização de CTAB (SDS em alternativa) – o reagente universal de extracção de ADN de plantas – é apresentada neste trabalho como uma vantagem, uma vez que permite o doseamento e a avaliação da pureza do extracto por espectrofotometria UV a 260/280 nm. Acresce que este trabalho não tem colhido a atenção dos investigadores nesta área.

Este tipo de metodologias tem sido, como mencionado, sujeito a diversas adaptações, nomeadamente no que diz respeito à forma como as amostras são previamente tratadas, à quantidade de material vegetal necessário para se obter ADN passível de ser usado na reacção de PCR, ao tempo de execução da extracção e ao tipo de purificação do extracto final. Desta forma, e tendo em conta a grande diversidade e as inúmeras variações de métodos extractivos de ADN utilizados na identificação molecular

de castas de videira, serão referidos, neste capítulo, apenas aqueles que se consideram francamente inovadores em qualquer das fases do processo.

No Quadro 2.1, é indicada a composição dos meios extractivos, em fase líquida ou sólida, usados em alguns métodos de extracção de ADN de videira, a seguir analisados.

Num dos primeiros trabalhos em que se descreve um procedimento de extracção de ADN de videira, Thomas *et al.* (1993a) propuseram uma metodologia de extracção frequentemente adoptada por outros autores [Büsher *et al.*, 1994; Tschammer e Zyprian, 1994; Botta *et al.*, 1995; Stavarakakis e Biniari, 1998; Sefc *et al.*, 1997, 1998a, b, c, 1999; Lopes *et al.*, 1999; Dettweiler *et al.*, 2000; Regner *et al.*, 2000; Franks *et al.*, 2002]. Esta metodologia baseou-se na dispersão da amostra triturada em azoto líquido no tampão de extracção A^[Quadro 2.1], obtendo-se, após centrifugação, o isolamento dos núcleos celulares. O precipitado foi ressuscitado no tampão de extracção B e sujeito a incubação durante 30 min, a 37 °C. A solução foi, então, submetida a uma lavagem, com igual volume de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). À fase aquosa resultante após centrifugação, adicionaram-se 0,54 volumes de isopropanol, de modo a provocar a precipitação do ADN. O precipitado obtido foi ressuscitado numa solução tampão TE a pH=8 contendo RNase para eliminação do RNA extraído. Posteriormente à eliminação das proteínas com 0,5 volumes de uma solução de acetato de amónio a 7,5 M, o ADN foi então precipitado com 0,54 volumes de isopropanol, tendo sido ressuscitado, depois da decantação da fase líquida, em 200 µl de tampão TE. Este procedimento parte de uma grande quantidade de amostra, 2 g, conservada em azoto líquido. A utilização de grande quantidade de amostra é justificada, neste caso, pela necessidade de obtenção de uma grande quantidade de ADN uma vez que os autores executaram, essencialmente, hibridação de sondas.

Quadro 2.1 – Composição dos diversos meios extractivos usados na extracção de ADN de *Vitis vinifera*.

Autores	Composição do meio extractivo (Liq/SPE)
Bourquin <i>et al.</i> , 1995	A – 0,44 M sacarose, 2,5% Ficoll 400, 5% Dextrano T40, 25 mM Tris-HCl; pH=8 B – 2% N-laurilsarcosina, 1 M cloreto de sódio, 0,2 M Tris-HCl; pH=8
Bowers <i>et al.</i> , 1993	2% CTAB, 1,4 M cloreto de sódio, 100 mM Tris, 20 mM EDTA, 0,5 2-mercaptoetanol; pH=8
Cipriani <i>et al.</i> , 1994	CTAB, 1% PVP 40 (baseado em Doyle and Doyle, 1990)
Fossati <i>et al.</i> , 2001	Membrana de gel de sílica (<i>QIAmp Tissue Protocol</i>) e subsequente purificação por adsorção em partículas de sílica (<i>Elu-Quick DNA purification Kit - Schleicher</i>)
Hocquigny <i>et al.</i> , 2004 González-Techera <i>et al.</i> , 2004 Pollefeys <i>et al.</i> , 2003 Arroyo-García <i>et al.</i> , 2002 Vidal <i>et al.</i> , 2000	Coluna de gel de sílica (<i>Qiagen DNeasy Plant mini-kit</i>)
Labra <i>et al.</i> , 2001	2% CTAB, 1,4 M cloreto de sódio, 0,1 % 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 1% PVP, 100 mM Tris-HCl, pH=8 (baseado em Doyle and Doyle, 1990)
Lefort e Roubelakis-Angelakis, 2001	0,5% Tween 20, 1% CTAB, 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1,1M cloreto de sódio, 0,4M LiCl, 2% PVP (PM=25000); pH=8
Lohdi <i>et al.</i> , 1994	2% CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1,4 M cloreto de sódio, 0,2 % 2-mercaptoetanol; pH=8
Sensi <i>et al.</i> , 1996 Silvestroni <i>et al.</i> , 1997 Vignani <i>et al.</i> , 2002	Purificação por coluna de resina de exclusão pelo tamanho ou <i>gel filtration</i> (Chroma Spin 1000)
This <i>et al.</i> , 1997	2% CDAB, 1,4 M cloreto de sódio, 100 mM Tris, 20 mM EDTA, 0,5% 2-mercaptoetanol; pH=8
Thomas <i>et al.</i> , 1993	A – 0,25 M cloreto de sódio, 0,2 M Tris-HCl, 50 mM EDTA, 0,1 % 2-mercaptoetanol, 2,5 % PVP (PM=40000); pH=8 B – 3 % N-laurilsarcosina, 0,5 M cloreto de sódio, 0,2 M TRIS, 50 mM EDTA, 1% 2-mercaptoetanol, 2,5 % PVP (PM=40000) e 20 % etanol; pH=8
Torres <i>et al.</i> , 1993	2% CTAB, 1,4 M cloreto de sódio, 0,4% 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM tris-HCl, 0,5 mM bissulfito de sódio, pH=8
Wang <i>et al.</i> , 1996	A – 0,25 M cloreto de sódio, 0,2 M Tris-HCl, 50 mM EDTA; pH=8 B – 1,4 M cloreto de sódio, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB; pH=8
Wolf <i>et al.</i> , 1999	20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1,4 M cloreto de sódio, 2%CTAB, 2,7%ureia; pH=8
Xu <i>et al.</i> , 1995	A – 0,35 M sorbitol, 0,1 M Tris, 50 mM MgCl, 50 mM KCl, 10 mM EDTA, 10 mM sulfito de sódio, 10 mM 2-mercaptoetanol, 1% PVP (PM=40000); pH=8 B – 50 mM Tris, 10 mM EDTA; pH=8; Após dissolução do extracto: 10 g cloreto de cézio, 800 µl 10% SDS, 200 µl Triton X-100.

Outro trabalho muito citado^[Bowers *et al.*, 1996a, 1996b, Bowers e Meredith, 1997; This *et al.*, 1997; Zoghalmi *et al.*, 2001; Meredith *et al.*, 1999; Tessier *et al.*, 1999; Fanizza *et al.*, 2003] é o de Bowers *et al.*, também publicado em 1993, e, do mesmo modo, baseado na utilização de CTAB. Ressalta o facto de Bowers, ao contrário de Thomas (1993), não utilizar PVP em nenhum dos passos do processo extractivo. Contudo, o ADN foi extraído, igualmente, de uma quantidade de amostra considerável, 3 g. A amostra foi de igual modo triturada em azoto líquido e o pó suspenso no tampão de extracção, indicado no Quadro 2.1. Seguiu-se uma fase de incubação a 65 °C durante 1 hora e a extracção com uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Nesta fase foi adicionada ao meio solução de CTAB a 10%, adição esta que os autores justificam pelo facto de facilitar a remoção dos compostos orgânicos interferentes (*viz.* compostos fenólicos) aquando da segunda extracção com a solução clorofórmica. O ADN foi, então, precipitado pela adição de 1 volume de isopropanol e, após centrifugação, o precipitado foi lavado com uma solução de acetato de sódio a 0,2 M em etanol a 75 %. Após a secagem, o precipitado foi dissolvido em TE e sujeito a um tratamento com a enzima RNase A e proteinase K. Adicionalmente, os autores propõem um processo complexo de lavagens do extracto com solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1), após o qual precipitam o ADN em meio contendo acetato de sódio e 2 volumes de etanol. Este método, afigura-se bastante complexo e moroso, e apresenta a desvantagem acrescida de não proporcionar bons extractos de folhas mais velhas ou colhidas em condições ambientais muito quentes (> 35 °C). Possivelmente por ser proposto por um dos mais preponderantes grupos no desenvolvimento de marcadores moleculares, é, ainda hoje, um dos mais utilizados. Em 1999, Bowers adaptou este método à utilização em microtubos^[Bowers *et al.*, 1999a, b; Hinrichsen *et al.*, 2001; Riaz *et al.*, 2004]. Nesta altura já a maioria dos métodos de extracção de ADN era realizada em microescala – reduzindo a quantidade de amostra e volume de reagentes cerca de 20 vezes, passando a

usar, desta forma, cerca de 150 mg de folha de videira. Também Dengl *et al.* (2001), invocando o facto de que a reacção de PCR requer apenas mínimas quantidades de ADN, adaptaram o método de Bowers à utilização em microescala. Apenas é utilizado um volume de 1,2 ml de tampão de extracção, em microtubos de 2 ml. Dengl introduziu a adição de PVP (3%) ao meio extractivo, reagente este que não é utilizado no método original.

O método de extracção proposto por Torres *et al.* (1993), aplicado à faveira (*Vicia faba*), foi o método seleccionado por vários autores [Loureiro *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 1998; Sánchez-Escribano *et al.*, 1999; Cervera *et al.*, 2000] para a extracção de ADN de videira. Torres introduziu algumas modificações no meio de extracção de Murray e Thompson (1980) como a duplicação da concentração de 2-mercaptoetanol para 0,4% e a introdução de 5 mM de bissulfito de sódio. Curiosamente, Torres utilizou um método de extracção em microescala, pouco usual na época. Parte de 100 mg de tecido aos quais adiciona, depois de triturados em azoto líquido, 1 ml de tampão de extracção. Prosseguiu com uma extracção usando clorofórmio:octanol, incubando a mistura a 65 °C durante 30 minutos. Posteriormente à centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, ao qual foi adicionado 1 volume de etanol a 95%, à temperatura de – 20 °C. Após precipitação, o ADN resultante foi lavado com uma solução de 0,2 M de acetato de sódio em etanol a 76 % e redissolvido em TE. O ARN coprecipitado foi eliminado simplesmente pela adição de 0,7 unidades de RNase A. Esta solução de ADN foi utilizada directamente ou previamente diluída. No mesmo ano, Mulcahy *et al.* (1993), descrevem um método de extracção de ADN de macieiras com o fim da detecção de polimorfismos pela técnica de RAPD. Surpreendentemente, este método é utilizado por diversos autores para a extracção de ADN de videiras [Silvestroni *et al.*, 1997; Filipetti *et al.*, 1999; Vignani *et al.*, 2002].

Tendo por base o trabalho de Doyle e Doyle (1990) – extracção de ADN com utilização de CTAB – Lodhi *et al.* (1994), complementaram este método com a utilização de cloreto de sódio^[Fang et al., 1992] e PVP^[Maliyakal, 1992], no sentido da obtenção de um extracto de ADN isento de polissacarídeos e polifenóis. À semelhança do trabalho de base de Doyle e Doyle (1990), o referido método é bastante menos complexo do que os anteriormente desenvolvidos por Thomas (1993a) e Bowers *et al.* (1993). A quantidade de material vegetal de partida foi substancialmente reduzida, para 500 mg de folha, sendo esta, após trituração, dispersada em 5 ml de tampão de extracção^[Quadro 2.1]. Foi posteriormente adicionada PVP e, após extracção com a mistura clorofórmio:octanol (24:1) meio volume de cloreto de sódio 5M. O ADN foi precipitado com 2 volumes de etanol a 95%. A adição de PVP favoreceu a formação de complexos ligados por pontes de hidrogénio entre esta e os polifenóis, complexos estes separáveis do ADN por centrifugação. A adição de cloreto de sódio previamente à precipitação do ADN pelo etanol aumenta a solubilidade dos polissacarídeos no meio, evitando assim a sua coprecipitação com os ácidos nucleicos. Os autores verificaram que concentrações de cloreto de sódio superiores a 2,5 M eram mais eficazes para a videira do que a concentração indicada por Maliyakal (1992). O trabalho de Lodhi *et al.* (1994) assume uma grande importância na análise de polimorfismos de ADN de videira, tendo em conta que tem sido frequentemente o método de extracção de ADN seleccionado^[Lodhi et al., 1995; Lodhi et al., 1997; Ye et al., 1998; Ibáñez et al., 2000; Borrego et al., 2002; Doucleff et al., 2004]. Não obstante, este trabalho de Lodhi *et al.* (1994) tem sido sujeito a algumas modificações, das quais se salienta a introdução, no tampão de extracção, de 2,7% de ureia, adaptando este método à extracção de ADN da parte lenhosa dos porta-enxertos^[Wolf et al., 1999].

Tendo-se deparado com alguns problemas na extracção de ADN de videira e relacionado estes com a capacidade tampão do meio extractivo, em 1994 Steenkamp e

seus colaboradores, decidiram estudar o efeito da variação da concentração de Tris do tampão referido por Doyle e Doyle (1990), na qualidade dos extractos de ADN obtidos. Desta forma, estudaram as concentrações 0,1 (usada por Doyle e Doyle, 1990); 0,5; 1,0 e 2,0 M de Tris tendo concluído que a concentração ideal seria de 1,0 M, uma vez que, ao contrário do sucedido com concentrações inferiores, não se verificava um decréscimo do pH do meio quando se homogeneizavam as folhas no meio extractivo. Constataram ainda que, a partir de uma concentração de Tris superior a 1,5 M, o precipitado de ADN apresentava uma coloração amarelada estável à lavagem e, em algumas amostras, o rendimento da extracção era menor. Além disso, os autores estudaram o efeito do tempo de incubação e da concentração de CTAB e, embora estes dois parâmetros não tenham influenciado a qualidade do extracto com a mesma intensidade que a concentração de Tris, concluíram que 30 minutos de incubação e 3% de CTAB seriam os valores ideais. Apesar das conclusões dos autores, a utilização de Tris na concentração de 1,0 M não tem merecido grande atenção por parte dos investigadores, sendo encontradas apenas referências esporádicas a este trabalho^[Geuna *et al.*, 1997, 2000].

Adaptando a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990), Cipriani e seus colaboradores (1994) reclamaram o desenvolvimento de um método de extracção para folhas de videira, baseado na utilização de CTAB e PVP, em todo idêntico a todas as outras adaptações do trabalho original.

Devido à necessidade de obtenção de ADN com um grau de pureza elevado para utilização em técnicas de RFLP, Bourquin *et al.* (1995) optaram pela utilização de um processo extractivo em duas fases. Uma primeira fase de extracção dos núcleos celulares utilizando o tampão de extracção A, referido no Quadro 2.1, e posterior digestão dos núcleos com um segundo meio extractivo, tampão B. A precipitação final do ADN foi

executada com 0,6 volumes de isopropanol. Outros autores ^[Xu et al.,1995] recorreram, de igual forma, a um processo extractivo em duas fases. Após a ressuspensão, com o tampão de extracção B, dos núcleos extraídos com o tampão de extracção A, foram sucessivamente adicionados ao meio os reagentes necessários para a separação do ADN em gradiente de cloreto de cézio. Sublinhe-se que os métodos referidos, baseados num processo extractivo duplo relativamente complexo, são extremamente morosos, mas necessários para a obtenção de ADN de suficiente qualidade para ser sujeito a sondas de hibridação.

Wang *et al.* (1996), tendo em vista o desenvolvimento de um método capaz de proporcionar a obtenção de bons extractos de ADN a partir de amostras conservadas em gel de sílica, segundo proposta de Chase e Hills (1991), testaram uma extracção baseada na utilização de CTAB. Este método compreendia duas fases de extracção - extracção de núcleos celulares e extracção de ADN do precipitado nuclear - nas quais se utilizam dois meios tamponados diferentes, sendo o meio usado para a extracção de ADN dos núcleos (tampão B)^[Quadro 2.1] o descrito por Lodhi *et al.* (1994). Tal como no artigo original de Lodhi, Wang *et al.* (1996) não incorporam PVP directamente no meio de extracção, mas adicionam-na numa das fases do processo. A fase escolhida para a adição de PVP foi a da trituração das amostras, com evidentes vantagens para o processo de homogeneização, tendo em conta que o pó de PVP funciona como coadjuvante de trituração. A utilização de coadjuvantes de trituração em folhas de videira (e.g. sílica pulverizada) tem sido sugerida por vários autores, inclusivamente por Chase e Hills (1991), mas a utilização de um dos componentes do meio extractivo, como PVP em pó, para este efeito, nunca tinha sido referida.

This *et al.* (1997), tendo por base a metodologia desenvolvida por Bowers *et al.* (1993), adaptaram-na à extracção de DNA de partes lenhosas da planta. Essa adaptação consistiu na substituição do reagente CTAB pelo CDAB. Apesar da clara referência à modificação do método de Bowers, os autores não fazem qualquer alusão às razões de tal substituição dos reagentes, nomeadamente se o CDAB apresenta alguma vantagem na extracção de material lenhoso. Todavia, num trabalho posterior^[Doligez *et al.*, 2002], o mesmo método de extracção é aplicado a folhas jovens de videira, permitindo a observação da efectividade do reagente em tecidos de videira, lenhosos e não lenhosos.

Num trabalho onde Di Gaspero *et al.* (2000) apresentam 9 novos microssatélites, o método de extracção utilizado foi o método clássico de Doyle e Doyle (1991) modificado para extracção em microescala – 200 mg de folha – e cujo tampão foi enriquecido pela adição de 1% de PVP. Em termos gerais, os autores seguiram a convergência da maioria dos trabalhos de extracção de ADN para métodos em microescala, usando CTAB, PVP e cloreto de sódio para remoção de interferentes.

Baseando-se numa metodologia previamente desenvolvida pelos mesmos autores, contudo adaptada à extracção de espécies lenhosas, Lefort e Roubelakis-Angelakis (2001) desenvolveram uma metodologia de extracção de ADN de folhas de videira em que são usados dois detergentes^[Quadro 2.1], CTAB e Tween 20, e cloreto de lítio, usualmente não utilizado neste tipo de extracções.

Labra *et al.* (2001), impulsionados pela necessidade de desenvolver uma metodologia capaz de fornecer ADN de qualidade compatível com a metodologia AFLP - DNA muito puro e de relativamente elevado peso molecular – propuseram uma metodologia, baseada no trabalho de Doyle e Doyle (1990). Consistia numa purificação

pós-extracção, pela introdução de alguns passos na metodologia que tinham por objectivo a digestão de interferentes com enzimas como a RNase, proteinase K e α -amilase, e uma dupla precipitação com etanol, na presença de um excesso de iões de sódio. Os autores reclamam para este método a eliminação completa de polissacarídeos, inibidores da *Taq* polimerase do ADN. Acrescente-se que este método tem sido usado apenas pelos seus autores e colaboradores^[Grassi *et al.*, 2003, 2003a].

Pela análise dos vários trabalhos publicados ao longo dos últimos 15 anos, sensivelmente, verifica-se a evolução das metodologias para microescala e a utilização da conjugação dos reagentes CTAB, cloreto de sódio e PVP. A partir do início da primeira década do século XXI, verifica-se, igualmente, um incremento na utilização de *kits* de extracção de ADN disponíveis no mercado adaptados à utilização em plantas. Estes produtos são desenvolvidos tendo em vista a sua utilização em plantas cujos estudos genéticos estão bastante disseminados, como, por exemplo, da *Arabidopsis thaliana*. A aplicabilidade destas metodologias a plantas bastante mais complexas como a videira requer, por vezes, pequenas adaptações tais como as executadas por Vidal *et al.* (2000), em que o volume dos reagentes de digestão foi aumentado devido à elevada viscosidade do extracto originado, e por Adam-Blondon (2004) que adicionaram PVP a uma das soluções de extracção e executaram a eluição do ADN em dois passos. Apesar de haver cada vez maior disponibilidade destes *kits* – que permitem extracções com maior economia de tempo – os métodos clássicos continuam a ser bastante utilizados pois: (i) são bastante menos dispendiosos; (ii) são mais flexíveis, *i.e.* permitem uma mais fácil adaptação às condicionantes da matriz.

O isolamento e purificação de ADN de videiras cultivadas *in vitro* foi objecto de estudo de Harding *et al.* (1994). Os autores indicam algumas dificuldades acrescidas na

extracção de ADN deste tipo de plantas devido ao escurecimento dos extractos, provavelmente por causa da elevada concentração de polifenóis. Foram estudados 5 métodos (baseados na utilização de CTAB, fenol, SDS-acetato de potássio e um método de isolamento nuclear), tendo concluído que o único método, bastante complexo, capaz de originar ADN de qualidade suficiente para tratamento enzimático, seria o do isolamento nuclear com subsequente isolamento de ADN através de cloreto de cério.

4. REACÇÃO DE PCR

Actualmente, a maioria das metodologias que recorre à variabilidade dos marcadores de ADN para a classificação de seres vivos recorre à reacção em cadeia da polimerase ou PCR. A PCR é um método de replicação *in vitro* de ADN. Deste modo, a partir de uma pequena quantidade de ADN, na presença de uma polimerase termostável, de um par de oligonucleótidos iniciadores ou sequências iniciadoras² e em condições apropriadas, uma só molécula de ADN a replicar pode originar milhões de novas moléculas. A vasta utilização desta reacção reside, precisamente, no facto de proporcionar a multiplicação do objecto em análise o que acarreta óbvias vantagens, nomeadamente em relação aos métodos de análise de ADN em uso até ao seu aparecimento.

Uma reacção típica é constituída pelos seguintes elementos: o ADN a amplificar, um par de *primers* específicos, 4-desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), a enzima DNA polimerase termostável, num meio tamponado adequado.

A reacção desenrola-se em vários ciclos, cerca de 30 a 40, sendo cada um deles constituído pelas 3 fases seguintes: (1) desnaturação térmica do ADN, (2) hibridação dos *primers* específicos    respectiva zona complementar em direcções opostas e (3) elongação da cadeia – polimerização – pela polimerase.³ Tendo em conta que a cada ciclo o número de moléculas de ADN existentes no meio duplica, ao fim de 35 ciclos podem existir, teoricamente 2^{35} , ou seja, 34000 milhões de cópias do fragmento original.

² *Primers*, na designação Anglo-Sax  nica.

³ Uma representação esquemática da amplificação exponencial que ocorre numa reacção de PCR é apresentada na Ilustração 2.1.

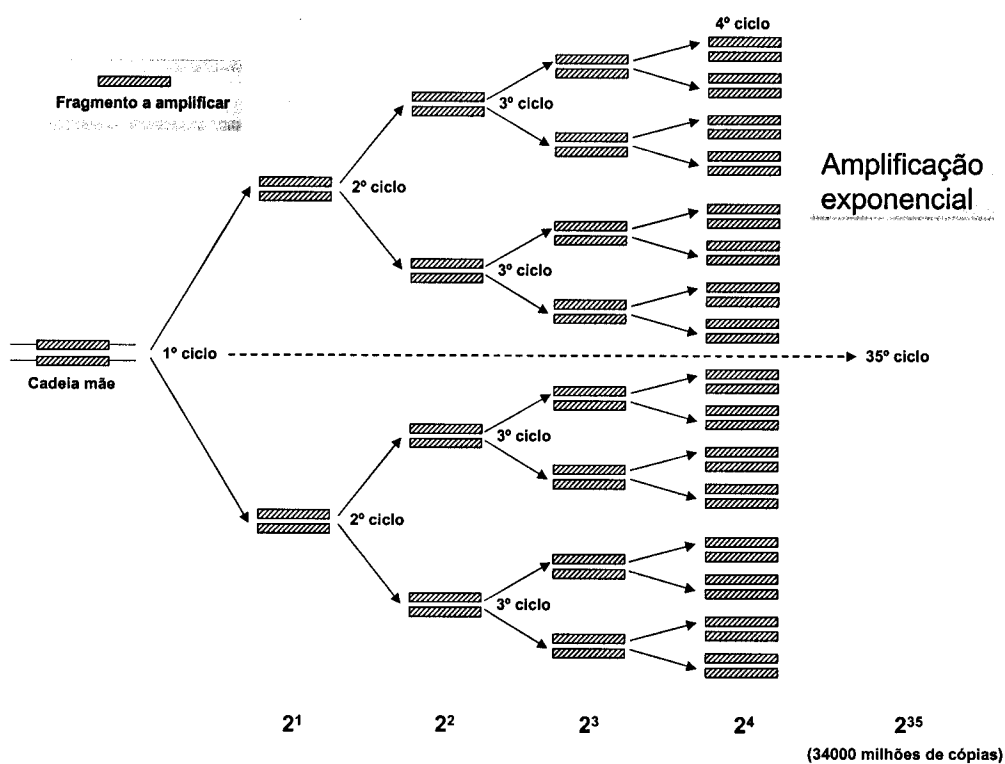


Ilustração 2.1. A amplificação exponencial de um fragmento de ADN pela PCR. Em condições óptimas a enzima *Taq* DNA polimerase amplifica exponencialmente um segmento determinado pelo local de hibridação dos primers. Além da polimerase e dos *primers* outros componentes são essenciais: os dNTPs, o ião Mg^{2+} e um meio tamponado adequado.

5. MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são sequências de ADN, associadas a regiões polimórficas do genoma, que podem ser identificadas por ensaios laboratoriais de uma forma directa, através da sequência de nucleótidos, ou indirecta, no caso da isozimas⁴. Por vezes, estas sequências podem ser relacionadas com determinada característica fenotípica do organismo, ou seja, podem marcar a presença/ausência dessa característica.

Nos últimos anos, praticamente todos os ensaios de marcadores moleculares desenvolvidos foram testados na videira com o intuito de se estabelecer um método credível de identificação genotípica para utilização na gestão das colecções de germoplasma.

Os primeiros métodos moleculares a serem testados na identificação de castas basearam-se na análise de sistemas enzimáticos.⁵ O passo seguinte fundou-se, naturalmente, no desenvolvimento de marcadores moleculares com base na análise de sequências de ADN. Este tipo de marcadores moleculares apresentam vantagens marcantes em relação aos métodos utilizados até então, e que a seguir se citam:

- o ADN de um determinado organismo é idêntico em todas as suas células pertencentes a qualquer tecido, qualquer que seja o estágio de desenvolvimento do organismo;*
- as características do ADN, viz. a sua sequência, não são influenciáveis pelas condições ambientais ou sanitárias das plantas.*

⁴ Os marcadores moleculares podem dividir-se em dois grandes grupos: aqueles baseados no polimorfismo do ADN e os baseados no polimorfismo de outras biomoléculas (e.g. enzimas), sendo o mais relevante o primeiro. Este grande grupo de marcadores de ADN pode, consoante o método utilizado, dividir-se em marcadores detectados pela reacção de PCR ou por outras técnicas (e.g. RFLP).

⁵ Conforme será referido mais adiante neste capítulo, estão inerentes a estes métodos algumas limitações, que catalisaram a aplicação de metodologias que se encontravam em desenvolvimento.

As características referidas da molécula alvo destes marcadores moleculares permitem que a análise seja efectuada em qualquer tecido da planta, *e.g.* caules lenhosos, folhas ou bagos, e, uma vez que as características analisadas não são susceptíveis a influências externas, é, portanto, possível analisar a planta em qualquer época do ano^[Seftic et al., 2001].

Os primeiros marcadores moleculares com base na análise de ADN a serem aplicados à videira foram os RFLPs. Apesar dos resultados promissores com eles obtidos, estes marcadores apresentavam ainda algumas dificuldades, sendo as mais importantes relativas a problemas de leitura dos resultados, ao excessivo dispêndio de tempo e de recursos económicos, e relacionadas com o facto de este método requerer ADN muito puro e relativamente intacto.

O desenvolvimento da técnica de PCR permitiu o aparecimento de diversas técnicas de análise da diversidade genética dos organismos. Os marcadores que utilizam a técnica de PCR, considerando o tipo de abordagem no desenho dos *primers*, podem ser divididos em dois grupos: aqueles em que os *primers* são desenhados arbitrariamente e os denominados STSs - *Sequence Tagged Sites* – em que os *primers* são desenhados com conhecimento da sequência dos marcadores. Os marcadores baseados em *primers* aleatórios conheceram um crescimento muito rápido devido aos poucos recursos laboratoriais necessários à sua execução. Como consequência, a técnica de RAPD atingiu rapidamente a maior relevância. A facilidade de aplicação desta técnica, bem como a pequena exigência em termos de equipamento laboratorial, permitiram a sua rápida difusão. Acresce ao que foi dito que, com esta técnica, foram detectados níveis satisfatórios de polimorfismos em castas e porta-enxertos^[Collins e Symons, 1993]. Não obstante, para a aplicação desta técnica com eficiência, devido à sua inerente baixa

reprodutibilidade, as condições laboratoriais devem ser normalizadas e, de preferência, a sua execução deve ser efectuada em salas brancas, o que se pode tornar num impedimento à sua aplicação^[Büscher *et al.*, 1993]. A conversão de marcadores RAPD em marcadores SCAR, com a consequente utilização de *primers* específicos tornou-se numa ferramenta muito útil para exploração de polimorfismos obtidos por técnicas RAPD, apresentando maior reprodutibilidade^[Bauer e Zyprian, 1997]. Todavia, os marcadores do tipo STS (*e.g.* SCAR), por serem desenvolvidos para apenas um *loci* no genoma, originam resultados muito mais limpos, de mais fácil leitura.

Apesar dos desenvolvimentos consideráveis conseguidos até então, nenhum dos métodos anteriormente mencionados obedecia aos requisitos de um sistema de identificação de castas eficiente – um método prático e, essencialmente, reprodutível com facilidade. Surgem, então, aplicados à análise de polimorfismos na videira, os marcadores baseados na análise das regiões do ADN microssatélite, marcadores do tipo STS, portanto mais eficientes. Após o aparecimento destes marcadores, inicialmente desenvolvidos para organismos animais, *viz.* humanos, toda a comunidade científica interessada na caracterização da videira centrou esforços no seu desenvolvimento e aplicação. Como veremos mais adiante são, efectivamente, marcadores com características apropriadas para a identificação de castas.

A par com a avaliação das relações genéticas entre indivíduos ou grupos, e da distinção de indivíduos, outra aplicação essencial dos marcadores moleculares é na criação de mapas genéticos^[Thomas *et al.*, 1994]. É de notar, contudo, que neste trabalho, os marcadores moleculares foram usados com o intuito da discriminação e avaliação das relações genéticas entre as castas de videira, por conseguinte, a sua utilização como marcadores de mapas genéticos não será discutida.

5.1. MARCADORES BASEADOS EM SISTEMAS ENZIMÁTICOS OU ISOZIMAS

A análise de sistemas enzimáticos tem sido uma ferramenta usada por diversos autores numa tentativa de identificação de castas. Isozimas são múltiplas formas de uma enzima cuja mobilidade electroforética varia de acordo com a forma. Estas diferenças de mobilidade são visualizadas após separação em géis⁶ adequados. Na videira foram identificados apenas cerca de 20 sistemas enzimáticos com propriedades polimórficas^[Reisch, 2000].

É de salientar, no entanto, que apesar do esforço desenvolvido pelos diversos autores referidos, os resultados, obtidos pela análise de sistemas enzimáticos têm algumas restrições inerentes, das quais se salientam como as mais importantes:

- ' a expressão de algumas enzimas depende do estágio de desenvolvimento da planta e das condições ambientais, problema este também inerente aos métodos ampelográficos. Desta forma, apenas sistemas enzimáticos estáveis às referidas variações podem ser considerados como marcadores isoenzimáticos;*
- ' o uso destes sistemas requer material vegetal fresco e em idêntico estágio de desenvolvimento.*

⁶ No presente trabalho optou-se pela utilização do nome géis, como plural de 'gel', ainda que haja registo de um outro: 'geles'.

5.1.1. IDENTIFICAÇÃO DE CASTAS PELA ANÁLISE DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS

Os sistemas enzimáticos, ou isozimas, têm sido propostos por vários autores como marcadores moleculares na análise de castas. No entanto, pelas razões referidas no ponto anterior e devido ao número limitado deste tipo de sistemas, a sua aplicação de um modo extensivo é limitada.

O trabalho pioneiro de avaliação das relações entre castas de videira através dos seus perfis isoenzimáticos foi publicado por Schaefer *et al.* (1971). A partir desta referência, onde 20 espécies e híbridos de *Vitis* são caracterizados, outros autores têm estudado estes marcadores na identificação de castas de videira, sendo os mais importantes estudos os a seguir indicados: Parffit e Arulsekhar, 1989; Walters *et al.*, 1989; Weeden *et al.*, 1988; Eiras-Dias e Bruno-Sousa, 1998; Royo *et al.*, 1998.

Este tipo de marcadores foi usado, essencialmente, para a confirmação de presumíveis casos de homonímias e sinonímias nas colecções de germoplasma dos países de origem dos investigadores. A maioria dos trabalhos consultados apresentam diagramas representando os géis obtidos ou apenas as matrizes de ausência/presença de determinada forma enzimática polimórfica. Este facto atesta a dificuldade da leitura precisa dos géis obtidos e a pouca precisão do método, na generalidade.

Considerando a fraca estabilidade destes marcadores, alguns trabalhos têm por fim não a discriminação de videiras propriamente dita, mas o estudo das condições que têm influência na variabilidade destes marcadores, como a fonte dos tecidos para a extracção de enzimas ou o local de cultivo e a época da colheita. Tendo em conta o conhecimento obtido com este tipo de estudos e de forma a obter resultados exactos, os

autores optaram pela extracção de enzimas de folhas jovens, obtidas de varas, em ambientes controlados.

5.2. MARCADORES DE ADN SEM RECURSO À REACÇÃO DE PCR

5.2.1. RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ou Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição, é uma técnica em que os organismos podem ser diferenciados através dos padrões de bandas obtidos pela clivagem em locais específicos das suas cadeias de ADN, com enzimas de restrição. Após separação electroforética, estes fragmentos são revelados através de sondas específicas, marcadas com radioactividade. Cada banda do padrão obtido representa, então, um fragmento de restrição, que não é mais do que uma sequência de ADN que comporta um local de restrição (específico da enzima utilizada) em cada uma das suas extremidades e uma sequência complementar à da sonda utilizada. Diferentes combinações de enzima/sonda originam diferentes padrões RFLP. As diferenças nestes padrões refletem diferenças na sequência do ADN dos organismos analisados que permitem a sua distinção^[Campbell, 2001].

Durante os anos 80, os marcadores RFLP dominaram todos os métodos baseados em marcadores de ADN^[Soller e Beckmann., 1983]. Estes marcadores foram utilizados com sucesso na detecção de padrões de fragmentos de ADN característicos de cada casta. No entanto, e estabelecendo uma comparação com os métodos ampelográficos e de análise de sistemas enzimáticos anteriormente usados, este método tinha como vantagens a sua maior robustez e a possibilidade de detectar um número maior de polimorfismos. Apesar

disso, as limitações, seguidamente enunciadas, eram ainda muito restritivas da sua utilização:

- ' o ADN a analisar devia apresentar grande pureza e integridade sendo necessário em grande quantidade;*
- ' o desenvolvimento das sondas acarretava custos elevados;*
- ' o procedimento analítico era dispendioso, muito moroso e implicava o recurso a reagentes radioactivos;*
- ' os padrões de bandas obtidos, por serem extremamente complexos, eram de difícil leitura.*

Este tipo de marcadores, devido às referidas exigências técnicas, eram de utilização praticamente inacessível para a maioria dos laboratórios de genética vegetal associados a programas de melhoramento de plantas. Apesar da sua grande robustez e utilidade estes marcadores rapidamente deram lugar a outros métodos que a seguir sinteticamente descrevemos, a partir do ponto 5.3.

5.2.1.1. DISCRIMINAÇÃO DE CASTAS POR RFLP

As primeiras publicações sobre análise de ADN de videiras tinham por base a técnica de RFLP. Encontram-se referências à utilização desta técnica, a nível mundial, apenas por 4 grupos de investigação, o que espelha as dificuldades que lhe são inerentes.

Bourquin *et al.* (1991) fez a primeira abordagem à aplicação desta técnica dedicada à determinação de perfis de porta-enxertos. Os mesmos autores publicaram mais dois trabalhos com estes marcadores, um deles ainda sobre porta-enxertos, com ADN

extraído das partes lenhosas^[Bourquin *et al.*, 1992], e outro sobre 46 castas de videira francesas^[Bourquin *et al.*, 1993]. No trabalho relativo aos porta-enxertos estes marcadores foram também testados em clones de porta-enxerto sem sucesso. Todavia, foi conseguida a distinção dos diferentes porta-enxertos. No que concerne à análise das castas, foram testadas 56 combinações enzima de restrição/sonda, das quais 25 foram informativas e úteis para o estudo em questão. As bandas polimórficas originadas foram agrupadas numa matriz usada para uma análise de componentes principais, da qual resultou um gráfico onde era evidente a divisão das castas em 6 grupos que os autores consideraram concordantes com prévias observações ampelográficas.

Bowers *et al.* (1993) iniciaram os estudos da variabilidade da videira com marcadores moleculares, também RFLP. Analisaram 43 castas pela digestão do ADN com duas enzimas e sondas. Todas as presumíveis castas apresentaram perfis únicos tendo sido identificada a sinonímia Primitivo=Zinfandel. Neste trabalho não é apresentado qualquer estudo estatístico incidente sobre as relações entre as castas estudadas tendo, no entanto, sido calculada a probabilidade de duas castas distintas terem o mesmo perfil de bandas RFLP, tendo resultado no valor $5,64 \times 10^{-8}$. O estudo da similaridade entre as castas seria mais tarde apresentado com outra publicação^[Bowers *et al.*, 1996b], onde utilizando os dados obtidos no trabalho anterior, foi construída uma matriz de similaridade baseada na proporção de bandas partilhadas. Com estes resultados foi contruído um dendrograma, que evidenciava algumas relações genéticas entre as castas estudadas foram tornadas evidentes. Do mesmo grupo de investigação, conhece-se um trabalho de diferenciação e avaliação das diferenças genéticas entre nove variedades de porta-enxertos^[Guerra e Meredith, 1995] através da digestão com duas enzimas e da hibridação com 6 sondas. Este trabalho mostra que o método é capaz de diferenciar os porta-enxertos

em questão - apesar da elevada similaridade morfológica - todos originários do mesmo cruzamento.

Um grupo de investigadores italianos utilizou este tipo de marcadores para a discriminação de 62 variedades de videira, incluindo 15 clones de Pinot e 9 de Chardonnay^[Paludetti *et al.*, 1996]. A distinção de qualquer um dos tipos de clones não foi conseguida. Todavia, através da selecção de 8 combinações enzima/sonda, foram distinguidas todas as castas, excepto a Malvasia e a Primitivo.

Goto-Yamamoto publicou, também, dois trabalhos onde se refere a utilização destes marcadores na distinção de castas de videira^[Goto-Yamamoto, 1997; Goto-Yamamoto *et al.*, 1998]. Em ambas as referências, os autores conjugam os dados obtidos pela utilização de marcadores RFLP com os originados pela utilização simultânea de marcadores RAPD. A avaliação das relações entre as castas Riesling, Koshu-Sanjaku, Riesling Forte e Riesling Lion, usando estes marcadores, indicaram que as duas últimas são originárias de um cruzamento entre as duas primeiras. Num trabalho mais vasto, realizado em 1998, Goto-Yamamoto e seus colaboradores avaliam as relações entre videiras silvestres e cultivadas do Japão, China e Coreia. Os resultados confirmaram a dissimilaridade entre o grupo das videiras cultivadas e silvestres e algumas relações já conhecidas entre as videiras cultivadas nas regiões em estudo.

5.3. MARCADORES DE ADN BASEADOS NA REACÇÃO DE PCR

5.3.1. RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)

A técnica de RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA^[Welsh *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1991] – ou AP-PCR – Arbitrarily-Primed PCR – ou ainda Polimorfismo de ADN Amplificado Aleatoriamente, associa a vantagem da não utilização de sondas radioactivas, em grande parte devido à utilização da reacção de PCR, à possibilidade de amplificação de fragmentos do genoma sem a necessidade do prévio conhecimento da sequência do mesmo.

Esta técnica baseia-se no facto de um pequeno oligonucleótido, de sequência aleatória, quando sujeito a determinadas condições de amplificação – nomeadamente uma baixa temperatura de hibridação na ordem dos 35 °C -, produzir um produto de amplificação contendo diversos fragmentos de ADN cuja natureza é dependente da sequência do *primer* e do genoma a estudar. Após separação em gel de agarose, estes produtos da amplificação originam um perfil de bandas mais ou menos complexo, característico do indivíduo em estudo. Um único *primer*, com cerca de 10 bases de comprimento e contendo, idealmente, 50% de bases púricas (GC), é capaz de originar a amplificação de vários fragmentos se os locais de hibridação, em cadeias opostas, estiverem distanciados o espaço passível de ser percorrido pela *Taq* polimerase – cerca de 2000 nucleótidos. A probabilidade de um *primer* deste tamanho encontrar uma sequência complementar num genoma complexo é suficientemente grande para que, como foi referido, um só *primer* origine vários fragmentos amplificados^[Rafalsky *et al.*, 1991].

Os marcadores RAPD surgem na sequência do desenvolvimento da tecnologia de PCR. A análise de polimorfismos genéticos entre organismos utilizando este método é rápida, fácil e pouco dispendiosa, o que o tornou muito utilizado, inclusivamente pelos laboratórios de poucos recursos. A facilidade de aplicação e os níveis muito satisfatórios de polimorfismo detectados na videira ultrapassaram as inerentes limitações decorrentes da utilização de *primers* não específicos.

Relevamos que a maior desvantagem deste método é a necessidade de se trabalhar em condições experimentais extremamente exigentes. Para além de ser absolutamente essencial que o extracto de ADN não se encontre contaminado com ADN humano ou de qualquer outra origem, os termocicladores, as polimerases do ADN, as concentrações de *primers* e o próprio operador influenciam os resultados finais^[Büscher *et al.*, 1993]. Apesar de ser possível a normalização das condições experimentais, a comparação de resultados entre laboratórios diferentes aparece sempre como uma tarefa de difícil concretização.

Os polimorfismos genómicos, mutações nos locais de complementaridade dos *primers*, detectados por estes marcadores, eliminam o local de hibridação do *primer*. Deste modo, um marcador RAPD apenas detecta a presença de um alelo em cada *locus*, amplificando um fragmento que contém o *locus*. A ausência de amplificação representa todos os outros alelos^[Rafalsky *et al.*, 1991]. São, por isso, marcadores dominantes. Em populações F_2 ⁷, os *loci* heterozigóticos não são distinguíveis dos homozigóticos dominantes^[Lodhi *et al.*, 1997].

⁷ v.d. Glossário

Os marcadores RAPD são marcadores de populações, isto é, os *primers* que amplificam de um modo polimórfico numa população podem ser não-funcionais noutra, o que implica a necessidade de se proceder à selecção destes numa amostra representativa da população, antes da análise de todos os indivíduos da mesma^[Caetano-Annoles, 1994].

5.3.1.1. APLICAÇÃO À DISCRIMINAÇÃO DE CASTAS E CLONES

Os marcadores RAPD marcaram o crescimento exponencial na utilização de técnicas moleculares aplicadas à análise de polimorfismos de videira, certamente devido à facilidade de execução com recursos laboratoriais parcos.

Trata-se, como se referiu anteriormente, de marcadores dominantes. Assim, a sua aplicação ao estudo genealógico das castas é bastante limitada. Este facto justifica, em grande parte, a quase unânime utilização destes marcadores em estudos de proximidade genética entre plantas domesticadas e silvestres^[Grando et al., 1995], grupos de castas geneticamente próximos^[Vidal et al., 1998] e entre clones^[Ye et al., 1998].

No Quadro 2.2 listam-se os principais trabalhos, e os *primers* seleccionados pelos autores para o respectivo estudo, que se basearam na utilização de marcadores RAPD em castas ou clones de videira.

Jean-Jaques *et al.* (1993) testaram mais de 50 *primers* RAPD (OPA – *Primers* fornecidos pela empresa Operon Technologies) em 8 castas e num número não referido de clones. De entre os *primers* testados que originam produtos de amplificação apenas alguns originaram perfis de bandas passíveis de serem lidos e apenas 2 foram discriminantes entre as castas. A grande maioria dos *primers* testados originava perfis demasiado complexos, sem bandas claramente separadas.

Moreno *et al.* (1995) estudaram a eficiência de 14 *primers* RAPD sobre 31 amostras de videira pertencentes a 11 castas usadas em Espanha, estando algumas delas representadas por mais do que um clone. Dos 14 *primers* estudados, 6 não eram polimorfos para as amostras em questão, 5 conseguiam fazer a distinção entre variedades e 3 detectaram polimorfismos em alguns clones. Apesar de afirmarem a eficiência destes três *primers* na distinção de clones, os autores referem o aparecimento de bandas erráticas quando procederam a estudos de reprodutibilidade do método devendo, portanto, ser tomadas em consideração apenas as bandas constantes.

Quadro 2.2 – Parâmetros de utilização dos marcadores RAPD na discriminação de castas ou clones de videira. OP-primers: Primers fornecidos por Operon Technologies, EUA; UBC: Primers fornecidos por University of British Columbia. GTO: Primers fornecidos por Metabion, Alemanha.

Autores	Castas (analisadas/discriminadas)	Primers (testados/eficientes)
Borrego <i>et al.</i> , 2002	24/18 grupo Malvasia e Torrontes	10/10 (OP-A,D,P)
Büscher <i>et al.</i> , 1994	6/6 estudo genealógico	16/9 (OPA)
Fanizza <i>et al.</i> , 2000	14/13 grupo Moscatel	200/158 (série OP)
Faraj <i>et al.</i> , 2000	47/44 castas Marroquinas	18/12 (OP-A, E, O, P, U)
Goto-Yamamoto <i>et al.</i> , 1998	49/48 28 silvestres e 21 cultivadas	5/5 (OP-A,B)
Goto-Yamamoto, 1997	4/3	3/3 (OPA11, OPB6, OPB18)
Grando e Frisinghelli, 1998b	40/33	6/6 (OP-A,B,P)
Grando <i>et al.</i> , 1995	37/24 18 silvestres e 19 cultivadas	44/6 (OP-A,E,U)
Hirichsen <i>et al.</i> , 2000	49/49 castas Chilenas	80/18 (OP-A, B, F, I)
Jean-Jaques <i>et al.</i> , 1993	8/8	>50/2 (OPA)
Loureiro <i>et al.</i> , 1998	18/0 clones de Albariño	20/20 (OP-A,B,C,D,E,P,O)
Moreno <i>et al.</i> , 1995	11/11 alguns clones	14/8
Pollefeys <i>et al.</i> , 2003	16/16 híbridos Franco-Americanos	200/9 (OP-A-F, OP-N-Q)
Regner <i>et al.</i> , 2000	10/10 clones de Riesling	68/68 (14 suficientes) (OPA, GTO)
Stravakakis e Biniari, 1998	14/13 grupo Moscatel	11/11 (7 OP-F e 4 University of Crete)
Striem <i>et al.</i> , 1994	82/- desenvolvimento de marcadores para assistência ao melhoramento	160/110
This <i>et al.</i> , 1997	30/30 porta-enxertos	21/6 (OP-A,B,D,P)
Tschammer e Zyprian, 1994	10 grupo Riesling/10 12 grupo Pinot/6	20/20 (OPA)
Vidal <i>et al.</i> , 1998	24/0	100/42 (UBC)
Wang <i>et al.</i> , 1999	42/42 13 espécies diferentes	15/15 (UBC)
Wolf <i>et al.</i> , 1998, 1999	16/16 porta-enxertos	49/49 (UBC)
Ye <i>et al.</i> , 1998	4/0 (clones Chardonnay) 3/0 (clones Pinot Noir)	53/53 (OP, OBC, GTO, outros)
Zoghalmi <i>et al.</i> , 2001	33/33 castas Tunisinas	43/11 (OP-A, D, G, K; UBC)

Da mesma forma, vários autores têm usado estes marcadores para definição de marcadores capazes de discriminar as castas autóctones dos seus países. Faraj *et al.* (2000), Hinrichsen *et al.* (2000) e Zoghلامي *et al.* (2001) analisaram as respectivas castas [Quadro 2.2] recorrendo a estes marcadores ou à conjugação destes com marcadores AFLP e microssatélites, no caso de Hinrichsen *et al.* (2000). Em estudos preliminares de variabilidade genética, os marcadores RAPD correspondem às expectativas dos investigadores e é conseguida a discriminação de castas.

Numa outra abordagem ao uso destes marcadores, vários casos de sinonímia e homonímia têm sido objecto de estudo de alguns investigadores. Ibáñez *et al.* (2000), Schneider *et al.* (2001) e Ulanovsky *et al.* (2001, 2002) utilizaram estes marcadores para resolver casos relacionados com denominação incorrecta de, respectivamente, um grupo de castas Gregas (Black Currant, Mavri Corinthiaki e Corinthe Noir), entre castas Francesas e do Noroeste de Itália e de castas oriundas de dois bancos de germoplasma em Espanha. Através de, respectivamente, 11, 8 e 20 marcadores – apoiados em dados obtidos pela utilização de marcadores microssatélites – recolheram-se dados suficientes para eliminar as dúvidas até então existentes.

Com o intuito da verificação dos presumíveis progenitores da variedade Müller-Thurgau (MT) – Riesling e Silvaner – Büscher *et al.* (1994) seleccionaram 9 *primers*, dos 16 anteriormente utilizados^[Bücher *et al.*, 1993], para o estudo de seis variedades presumivelmente progenitoras da MT. Estes autores concluíram que a presunção inicial estava errada não chegando, no entanto, a uma conclusão definitiva. Apesar deste tipo de estudos não ser muito frequente usando marcadores RAPD, que são considerados dominantes, os autores verificaram que as bandas amplificadas nos progenitores, para os marcadores usados, poderiam ser herdadas de um dos pais. Explicam o aparecimento de

bandas adicionais (9,3-18,1%) nos descendentes, relativamente às bandas presentes nos progenitores por eventos de recombinação. Paralelamente, os mesmos autores estudaram os perfis isoenzimáticos da peroxidase em 27 castas relacionadas. Também Goto-Yamamoto (1997) utilizou estes marcadores para determinar a genealogia de duas castas, Riesling Lion e Riesling Forte, que se presumem descendentes de um cruzamento entre Riesling e Koshu-Sanjaku. O autor considera que os resultados obtidos com os marcadores RAPD, juntamente com marcadores RFLP, também analisados e já referidos na secção anterior, sugerem a confirmação da pressuposta ascendência.

Os marcadores RAPD também foram usados com o objectivo da identificação de *loci* que controlam características agronómicas, como a ausência de sementes, em variedades de uva de mesa. Nesse sentido, Striem *et al.* (1994) cruzaram os dados obtidos pela aplicação de 78 *primers* (escolhidos dum total de 110) a 82 variedades originadas pelo cruzamento de Early-Muscat e Flame Seedless, com algumas características destas variedades relacionadas com a ausência de sementes. Encontraram algumas bandas altamente relacionadas com, por exemplo, o peso das sementes ou o aroma moscatel. Estes marcadores, relacionados com características agronómicas desejáveis, são extremamente úteis quando aplicados em programas de melhoramento da videira.

Num trabalho preliminar sobre a aplicação destes marcadores em cerca de 300 castas e porta-enxertos, This *et al.* (1996) referem a necessidade da optimização das condições de análise devido à extrema sensibilidade da técnica. A verificação da sensibilidade e instabilidade da técnica levou os autores a compararem os perfis de bandas obtidos, para um mesmo marcador, em diferentes extractos, termocicladores, *Taq* polimerases, etc. Desta forma, os autores confirmaram a instabilidade dos perfis obtidos tendo, todavia, identificado algumas bandas estáveis, cujo aproveitamento para

marcadores seria plausível. O desenvolvimento deste trabalho preliminar originou uma segunda publicação ^[This *et al.*, 1997], onde 21 *primers* foram testados em 30 porta-enxertos. Destes 21 *primers*, 6 foram seleccionados, devido ao seu elevado grau de polimorfismo, permitindo a sua aplicação a discriminação das 30 amostras. Os autores avaliaram alguns factores de instabilidade destes marcadores tendo concluído que o tipo de enzima *Taq* polimerase é aquele que mais profundamente afecta a estabilidade do ensaio. Deste modo, consideraram que, após um rastreio preliminar sobre as condições de amplificação e nível de polimorfismo dos *primers* para um dado grupo de castas, os marcadores RAPD podem ser muito estáveis e úteis na discriminação de porta-enxertos.

Tendo em conta o facto de que os marcadores RAPD são específicos de determinada população de *Vitis*, o que tem como consequência a impossibilidade de definição de marcadores RAPD universais que possibilitariam a uniformização de resultados obtidos em diversos países, Lodhi *et al.* (1997), num interessante trabalho, estudaram mais profundamente a natureza e características destes marcadores em *Vitis*. Os resultados confirmaram alguns dos pressupostos anteriormente referidos como a extrema complexidade dos perfis de bandas obtidos com marcadores RAPD, tendo os autores apontado algumas razões para tal complexidade e instabilidade.

Conjugando a técnica RAPD com a técnica RFLP, Goto-Yamamoto *et al.* (1998) estudaram as relações entre 28 videiras selvagens oriundas do Japão, Coreia e China, e 21 videiras cultivadas. Utilizando 5 *primers* anteriormente seleccionados ^[Goto-Yamamoto, 1997], conseguiram distinguir a totalidade das amostras onde ocorreu amplificação. Algumas amostras de videiras silvestres – *V. davidii*, *V. yenshanensis* e *V. kelungensis* – não originaram produto de amplificação, tendo os autores atribuído este facto à impureza dos extractos. Obtiveram resultados em que o agrupamento das videiras selvagens se faz num

grupo independente das videiras cultivadas, o que confirma a utilidade e eficiência destes marcadores e fornece uma ideia das relações genéticas entre videiras selvagens e cultivadas. Num mesmo tipo de abordagem à comparação de videiras selvagens e cultivadas, desta feita utilizando apenas marcadores RAPD, Grando *et al.* (1995), contrariamente ao trabalho de Goto-Yamamoto, não encontraram diferenças significativas entre videiras selvagens e cultivadas, *i.e.* não foi possível a distinção de dois grupos de videiras. Dos 44 *primers* testados foram definidos 9 bandas polimorfas, de 6 marcadores RAPD, usadas na construção da matriz de similaridade.

Wang *et al.* (1999) estudaram a relação entre 42 variedades de videira pertencentes a 13 espécies, comparando, da mesma forma que os autores anteriormente referidos, espécies de videira com marcadas diferenças morfológicas pertencentes ao subgénero *Muscadinia* e *Vitis* (cultivadas, espécies asiáticas, americanas e da Florida). O grupo *Muscadinia* foi claramente separado e, contrariamente ao sistema de classificação em uso, os grupos americanos e asiáticos encontraram-se mais próximos do grupo *Muscadinia* do que das videiras cultivadas.

A homogeneidade genética de grupos de castas tem sido por diversas vezes estudadas com marcadores RAPD. Stavrakakis e Biniari (1998), Fanizza *et al.* (2000), Borrego *et al.* (2002) e Grando e Frisinghelli (1998b) estudaram, respectivamente, os grupos de castas Moscatel (Grécia), Moscatel (Itália), Malvasia e Torrontes (Espanha) e Trentino (Itália). Apesar da esperada homogeneidade dos grupos de castas, estes autores, utilizando marcadores RAPD associados a microssatélites (com resultados concordantes) verificaram a grande diversidade genética destes grupos, conseguindo a distinção em diversas variedades^[Quadro 2.2]. Particularmente Borrego *et al.* (2002) refere que o seu

trabalho indicia que os nomes Malvasia e Torrontes não refletem qualquer característica geral do grupo de castas.

O desenvolvimento de métodos capazes da distinção de clones tem também passado pelos marcadores RAPD. Enquanto alguns autores^[Regner *et al.*, 2000] utilizam estes marcadores com sucesso, conseguindo a distinção de 10 clones da casta Riesling utilizando combinações de 68 *primers* RAPD, noutros trabalhos^[Vidal *et al.*, 1998; Loureiro *et al.*, 1998 e Ye *et al.*, 1998] em que estes marcadores foram utilizados sobre clones de Albariño, Pinot Noir e Chardonay, não foi possível a discriminação de nenhum clone, ainda que recorrendo à combinação dos dados RAPD com outros marcadores, como microssatélites^[Loureiro *et al.*, 1998].

As variedades de porta-enxertos também foram alvo de estudos de discriminação utilizando estes marcadores. Wolf *et al.* (1998, 1999) conseguiram distinguir os 7 mais importantes porta-enxertos em uso na Alemanha com apenas dois *primers* RAPD, tendo inicialmente rastreado 49 *primers* em 29 porta-enxertos. Estes 29 porta-enxertos, utilizando combinações de *primers*, foram também diferenciados.

Pollefeys *et al.* (2003), num extenso trabalho de comparação dos híbridos franco-americanos cultivados nos EUA, utilizam com fonte de polimorfismos essencialmente marcadores RAPD (33) apoiados pelos resultados de 6 *loci* microssatélites. Com o intuito de eliminar a variabilidade causada pelas condições de amplificação, todas estas foram executadas em dois termocicladores diferentes e apenas fragmentos constantes e de fácil leitura foram considerados no estudo. Os 16 híbridos testados foram discriminados, utilizando os 9 *primers* seleccionados.

Böhm e Zyprian (1998) quando estudavam a sequência de fragmentos monomorfos de produtos de amplificação de *primers* RAPD, verificaram que um destes fragmentos apresentava cerca de 9% de divergência entre duas castas estudadas. Tal facto pode levar a questionar a precisão dos marcadores RAPD quando aplicados a estudos filogenéticos entre castas. No decorrer dos estudos descobriram, adicionalmente, que este marcador estudado integrava em regiões repetitivas, comuns em algumas outras plantas, cuja sequência é altamente variável, designadas por retrotransposições. Futura investigação deste tipo de sequências pode levar ao aparecimento de novos marcadores.

A procura de metodologias mais eficientes e reprodutíveis para a separação de fragmentos amplificados numa reacção RAPD levou Siles *et al.* (2000) a testarem a eficiência da técnica de electroforese capilar com detecção fluorimétrica nestes tipo de fragmentos amplificados de extractos de 4 castas francesas. A marcação do ADN foi conseguida através do agente intercalante YO-PRO-1 (Molecular Probes). Os autores optimizaram as condições de amplificação e do processo de separação, conseguindo uma óptima reprodutibilidade entre injeções; reclamam, também, a discriminação de dois clones de Chardonnay com o *primer* OPA03.

5.3.2. SEQUENCE CHARACTERIZED AMPLIFIED REGION (SCAR)

A técnica de RAPD gera perfis de bandas geralmente não reprodutíveis entre diferentes laboratórios. Apesar de muitos investigadores a usarem com bons resultados outros encontram diversos problemas. De modo a aproveitar as vantagens da utilização de *primers* RAPD, nomeadamente o facto de não ser necessário o conhecimento da sequência do genoma, Paran e Michelmore (1993) desenvolveram uma estratégia que originou um novo tipo de marcadores específicos, os marcadores SCAR. Estes

marcadores são desenvolvidos a partir do isolamento e sequenciação de bandas (marcadores) polimórficas obtidas pela amplificação de um genoma com um *primer* RAPD. Uma vez conhecida a sequência da banda polimórfica, são desenhados novos *primers* SCAR (um par de *primers*) pela adição de 10 a 14 bases, de sequência complementar à da banda, à posição 3' do *primer* de 10 pbs original. Esta sequência adicionada é diferente para cada um dos *primers* do par, de acordo com a sua posição nos flancos do fragmento a amplificar. Assim um *primer* SCAR tem seguramente mais de 24 pbs o que o torna extremamente específico. Naturalmente, se este novo marcador foi obtido a partir de uma banda polimórfica apresentará, também, polimorfismo para o grupo de indivíduos em estudo.

A conversão de marcadores RAPD em marcadores SCAR, com a consequente utilização de *primers* específicos tornou-se numa ferramenta muito útil da exploração de polimorfismos obtidos por técnicas RAPD mas apresentando maior reprodutibilidade^[Bauer e Zyprian, 1997].

5.3.2.1. USO DE MARCADORES SCAR NA DISCRIMINAÇÃO DE VIDEIRAS

Vidal *et al.* (2000) aproveitando 8 pressupostos marcadores RAPD, específicos de 8 genótipos de castas, desenvolveram 30 *primers* SCAR específicos – possuindo cada entre 14 e 29 pares de bases – dos quais, apenas 2 foram eficientes. Um destes marcadores foi testado em 64 castas tendo sido identificado um marcador SCAR específico para a variedade Folle Blanche. O segundo SCAR, não sendo específico, originou sinais positivos de amplificação em algumas castas. Este tipo de marcadores foi também utilizado para a construção de mapas genéticos juntamente com outros marcadores mais vulgares, como microsatélites e AFLP. Deste modo, Doligez *et al.*

(2002) incluíram o marcador SCAR desenvolvido por Lahogue *et al.* (1998) na construção de um mapa genético aplicado à detecção de QTLs que determinem a ausência de sementes. No mesmo sentido, Mejía *et al.* (2003) desenvolveram também um novo marcador SCAR (SCF27) a partir de 336 fragmentos RAPD, específico para a identificação de partenogênese na videira, para assistência ao programa de melhoramento relacionado com o desenvolvimento de castas de uvas sem grainhas.

Outros autores^[Xu *et al.*, 1995, 1996; Bauer e Zyprian, 1997] têm utilizado esta abordagem no desenvolvimento de marcadores eficientes na discriminação de porta-enxertos. Os autores apresentaram 2, 8 e mais 2 marcadores SCAR polimórficos, obtidos, respectivamente, a partir de 9, 5 e de um número não definido de bandas RAPD polimórficas.

5.3.3. MICROSSATÉLITES

Microssatélites^[Ilustração 2.2] são sequências de nucleótidos constituídas pela repetição ininterrupta de um único padrão de nucleótidos, de tamanho não superior a 6 pb (e.g. (GA)_n (GATA)_n, etc.)^[Hancock, 1999]. Os microssatélite integram a classe de ADN de tipo repetitivo, também designado de ADN de sequências simples, da qual fazem igualmente parte o ADN satélite e minissatélite. Nesta classe, estes apresentam o nível de repetição mais reduzido, tipicamente cerca de 5 a 100 repetições por *loci*^[Tautz e Schlötterer, 1994]. Foram encontradas sequências deste tipo em todos os organismos estudados até ao momento.

Outros termos, como Simple Sequence Repeats – SSR – ou Short Tandem Repeats – STR –, têm sido utilizados para designar este tipo de sequências. Embora o nome microssatélite tenha começado a ser usado exclusivamente para designar repetições

de dinucleotídeos, hoje usa-se de um modo generalizado para designar qualquer tipo de padrão repetitivo deste tipo de ADN. A generalização do termo tornou-se particularmente útil em pesquisas bibliográficas, uma vez que desta forma diminuem as probabilidades de confusão entre os vários termos^[Hancock, 1999].

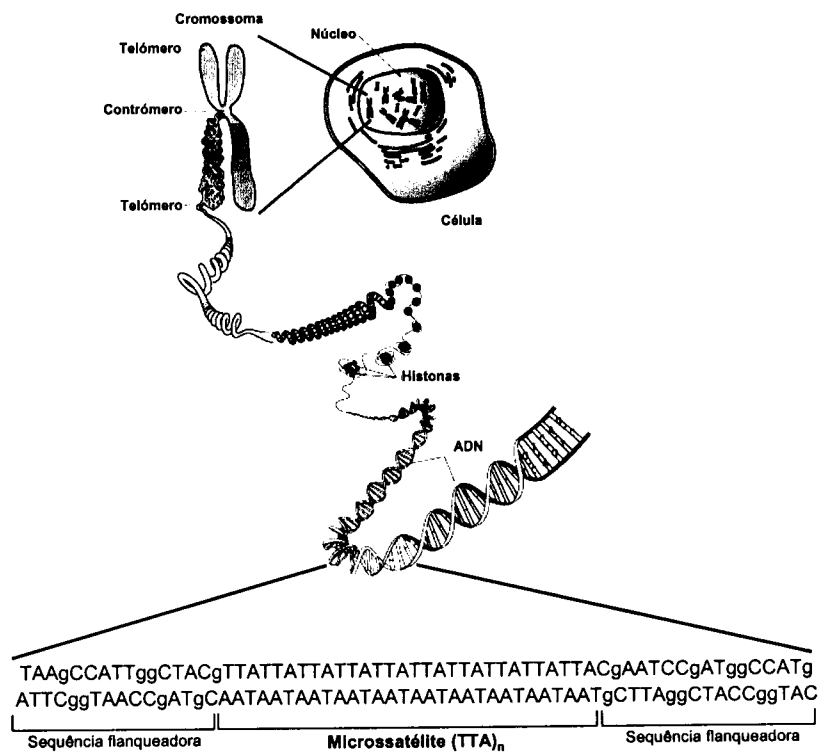


Ilustração 2.2. Representação esquemática exemplificativa de um microssatélite de repetição trinucleotídica (TTA)_n com indicação das sequências flanqueadoras da região repetitiva. Adaptado de Basic Understanding of Genetics.

Estes padrões de sequências simples repetidas, ou microssatélites, representam uma importante fonte de variação genética e têm sido largamente utilizados em estudos genéticos que requerem marcadores mendelianos^[Morgante e Olivieri, 1993; Queller *et al.*, 1993]. O tamanho das populações de organismos, assim como a extensão da consanguinidade, podem ser avaliados por estes marcadores. Também a distribuição espacial dos alelos dos genes – como o estudo do fluxo de genes ou da migração das populações – pode ser determinada segundo estes marcadores. Tirando partido do facto de estes marcadores serem passíveis de amplificação pela PCR, também são possíveis estudos forenses e evolucionários, em amostras de organismos deteriorados. Outras aplicações dos marcadores em questão são o mapeamento genético e estudo de discriminação de variedades, clones ou quaisquer outros tipos de indivíduos pertencentes a populações intimamente relacionadas^[Queller *et al.*, 1993].

A variabilidade genética deste tipo de marcadores é avaliada em termos do número de repetições do padrão de nucleótidos. Por outras palavras, estas regiões apresentam diferentes tamanhos em diferentes indivíduos e os tamanhos das repetições presentes em cada indivíduo é que o caracterizam. Nas plantas diplóides como a videira, cada locus do genoma tem dois alelos correspondentes originados de cada um dos cromossomas do respectivo par. É, portanto, caracterizada por dois fragmentos para cada locus. Todavia, uma planta pode ser caracterizada por um alelo nulo, isto é, não conter o locus em questão ou este ter sofrido uma mutação (pontual, deleções ou inserções)^[Callen *et al.*, 1993].

Na figura^[Ilustração 2.3] representa-se a variabilidade de um *locus* microssatélite para dois indivíduos A e B. As zonas sombreadas representam a zona repetitiva sendo a restante sequência correspondente às regiões flanqueadoras onde os *primers* (representados por setas) se ligam.

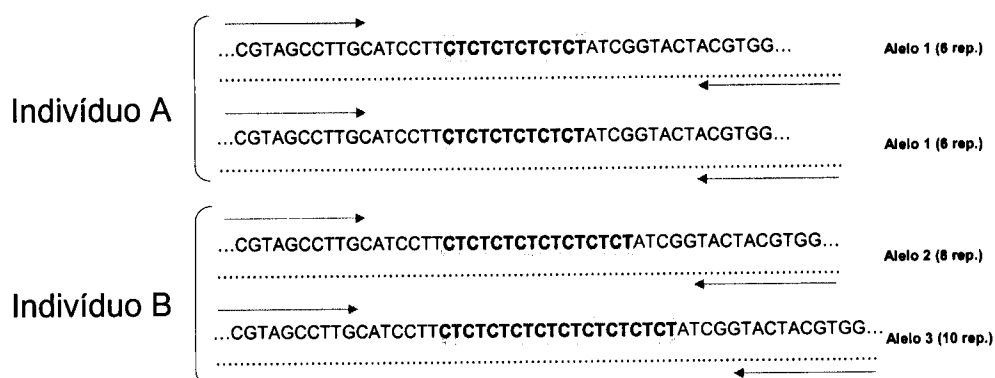


Ilustração 2.3. Representação da variabilidade de um *locus* microssatélite em dois indivíduos.

Sendo as sequências flanqueadoras das regiões repetitivas idênticas nos indivíduos em estudo, com facilidade se elaboram *primers*, ou sequências iniciadoras, que nos permitam, através da reacção de PCR, amplificar individualmente estes fragmentos, ou seja, obter um elevado número de cópias desta região.

Após a sua separação por técnicas electroforéticas, os fragmentos amplificados das regiões microssatélite são, necessariamente, marcados com substâncias radioactivas ou fluorescentes ou revelados quimicamente para que se tornem visíveis para análise. Assim, têm sido utilizados métodos variados incluindo a incorporação de ^{35}S dATP durante a reacção de PCR e a subsequente separação dos produtos amplificados em géis

de poliacrilamida [Thomas e Scott, 1993], a utilização de *primers* marcados com ^{32}P também com separação dos fragmentos em géis de poliacrilamida, revelação de géis nativos de poliacrilamida com brometo de etídio [Scott et al., 2000] e revelação de géis desnaturantes de poliacrilamida com nitrato de prata [Bowers et al., 1996, 1999b, Bowers e Meredith, 1997]. Todos os métodos referidos utilizam a electroforese em acrilamida como técnica de separação dos fragmentos amplificados. No entanto, o método mais eficaz, embora também mais dispendioso e inacessível para muitos laboratórios, consiste na utilização de sistemas automáticos de electroforese (sequenciadores), em géis de acrilamida ou com sistemas de electroforese capilar integrados, usando *primers* marcados com fluorocromos. As vantagens da utilização deste tipo de sistemas são muitas e incluem a possibilidade da análise simultânea, numa única pista, de vários *loci*, desde que estes estejam marcados com fluorocromos diferentes, e a determinação automática do tamanho dos alelos pelo uso de padrões internos. A determinação automática do tamanho dos alelos entre o mesmo tipo de sistemas tem mostrado uma boa reprodutibilidade [Seft et al., 2001]. No entanto, quando se comparam alelos em diferentes sistemas, observam-se pequenas variações no tamanho estimado o que pode facilmente ser ultrapassado através de uma calibração adequada.

Segundo Weber (1990), os microssatélites podem ser classificados, no que diz respeito à estrutura da repetição, como perfeitos, se não existirem interrupções na sequência repetitiva; imperfeitos, quando ocorrem uma ou mais interrupções na sequência; e compostos, quando fragmentos de sequências perfeitas estão adjacentes a sequências imperfeitas. Apesar de, na generalidade, apresentarem níveis elevados de polimorfismo, os microssatélites mais polimorfos, consequentemente os mais úteis, são aqueles que não apresentam interrupções na sequência repetitiva dos padrões de nucleótidos. Porém, muitos dos microssatélites conhecidos e amplificados apresentam

interrupções, facto que não diminui a sua utilidade quando o nível de polimorfismo se apresenta adequado.

De facto, as sequências de muitos microsatélites não são totalmente conhecidas, pois, após a sua localização em bibliotecas genómicas, através de sondas, o seu nível de polimorfismo foi avaliado sem o conhecimento da sua sequência interna. Apesar de se obterem marcadores eficientes em mais curto espaço de tempo, a interpretação dos resultados obtidos, particularmente no estudo de populações, pode estar dificultada devido ao incompleto conhecimento do padrão de repetição^[Hancock, 1999].

Uma sequência repetitiva que adquire múltiplas mutações degenera em sequência não repetitiva. Se o estado das mutações ainda permite que existam alguns padrões de repetição completos estamos perante uma sequência repetitiva encriptada ou sequência simples encriptada. Este tipo de sequências são comuns em genomas eucarióticos e, tal como para as sequências microsatélites, alguns autores são da opinião que estas se encontram preferencialmente em regiões não-codificantes do genoma podendo, no entanto, encontrar-se também em regiões codificantes^[Tautz *et al.*, 1986].

Estima-se que, em organismos eucarióticos, existam cerca de 10^4 a 10^5 *loci* microsatélites distribuídos de uma forma aleatória pelo genoma. Tal abundância de sequências microsatélites constitui uma fonte quase ilimitada de locais no genoma que apresentam polimorfismo e que podem ser usados no desenvolvimento de marcadores genéticos^[Tautz e Schlötterer, 1994].

Em suma, a vasta utilização deste tipo de marcadores fundamenta-se nas características que a seguir se enumeram^[Sefc *et al.*, 2001].

- ' *neutralidade: a maioria não se localiza perto ou dentro de sequências codificantes, onde poderiam causar alterações das funções do gene codificado ou sofrer pressões selectivas inerentes ao gene;*
- ' *elevado polimorfismo;*
- ' *co-dominância – permitindo a discriminação entre homozigóticos e heterozigóticos;*
- ' *possibilidade de representação pelo tamanho dos alelos, expresso em pares de bases, permitindo uma fácil transferência e partilha de resultados;*
- ' *transferibilidade entre espécies relacionadas, muitas vezes possível (e.g. *Vitis vinifera* e *Vitis riparia*), – permitindo assim ultrapassar a fase dispendiosa e morosa da construção e rastreio de bibliotecas genómicas para o desenvolvimento de novos marcadores. Thomas e Scott, 1993, referem a conservação destas regiões entre espécies de *Vitis* e *Muscadinia*;*
- ' *reprodutibilidade dos resultados obtidos com estes marcadores.*

5.3.3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES NOS ORGANISMOS E DISTRIBUIÇÃO NO GENOMA

A existência de microsatélites no ADN nuclear de plantas foi referida, pela primeira vez, por Delseny *et al.* (1983) como repetições (CA)_n. Mais tarde foi demonstrada a sua presença na maioria dos organismos e no genoma de organelas^[Wang *et al.*, 1994], embora diferentes tipos de repetições abundem mais do que outras em cada organismo. Assim, nas plantas, as repetições do tipo GA e AT são mais frequentes do que as do tipo CA, primeiramente descritas. No genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* as sequências AT são as mais frequentes enquanto que nos humanos, e na

maioria dos mamíferos, padrões repetitivos com CA e TG apresentam-se como os mais abundantes^[Hancock, 1999].

Num trabalho que avalia a praticabilidade da utilização destes marcadores em genética vegetal, Morgante e Olivieri (1993) estudaram as sequências repetitivas disponíveis pertencentes a 34 espécies de plantas superiores quanto à presença, abundância e distribuição de repetições di e trinucleotídicas. Estes autores confirmaram a presença destas sequências em todas as plantas estudadas com uma frequência média de 50 Kb cada. Scott *et al.* (2001) refinam estes valores para 21,2 Kb em dicotiledónias e para 64,6 em monocotiledónias. As repetições do tipo AT formam a classe de dinucleotídeos mais abundante enquanto que as repetições do tipo CA, frequentes nos animais, encontram-se entre as muito pouco abundantes nas plantas estudadas. Relativamente às sequências trinucleotídicas, as repetições do tipo TAT apresentaram-se como as mais frequentes.

A distribuição dos microssatélites no genoma é melhor conhecida em humanos e ratos devido à sua intensa utilização na construção de mapas genéticos destes organismos. Alguns autores sugerem uma distribuição aleatória e relativamente uniforme por todo o genoma^[Dib *et al.*, 1996, Dietrich *et al.*, 1996]. Contudo, numa visão mais pormenorizada, Hancock *et al.* (1999) referem que a existência deste tipo de sequências dentro de regiões codificantes é pouco frequente. Não especifica as razões da restrição de microssatélites nestas regiões genómicas. Morgante *et al.* (2002), no estudo das regiões do genoma das plantas às quais os microssatélites estão preferencialmente associados, concluíram que estas sequências são mais frequentes em regiões não codificantes, nomeadamente em regiões genómicas não transcritas (5'UTRs e 3'UTRs).

Como foi mencionado anteriormente, as sequências simples encriptadas podem surgir da acumulação de mutações pontuais em microssatélite, mas o contrário, a acumulação de mutações pontuais em sequências simples encriptadas, também poderá originar um novo microssatélite. Talvez por esta razão nem sempre se distingam os verdadeiros microssatélites de sequências simples encriptadas. Esta instabilidade provocada pelas taxas de mutação relativamente elevadas está na origem da grande utilidade deste tipo de marcadores em estudos evolucionários, genéticos e discriminatórios.

5.3.3.2. FUNCIONALIDADE DOS MICROSSATÉLITES NO GENOMA

Sefc *et al.* (2001), numa referência às principais características dos microssatélites, salientam o facto de estes serem neutros, isto é, não se localizarem perto ou dentro de sequências codificantes - onde poderiam causar alterações das funções do gene codificado ou sofrer pressões selectivas inerentes ao gene - como uma vantagem destes marcadores moleculares. De facto, a maioria dos autores referem-se aos microssatélites como sequências não codificantes, distribuídos aleatoriamente pelo genoma mas raros em zonas codificantes.

Apesar de, como referido, estes marcadores serem considerados como lixo genómico (*i.e.* não terem qualquer função definida), num trabalho de revisão dos estudos efectuados sobre a função dos microssatélites no genoma, Soller e Kashi (1999) indicam que este tipo de sequências, principalmente as trinucleotídicas, desempenha um papel funcional no genoma. Estas conclusões estão de acordo com um estudo previamente realizado por Morgante e Olivieri (1993), exclusivamente em plantas, em que os autores não encontraram repetições dinucleotídicas em sequências codificantes tendo, por sua

vez, associado grande parte das sequências trinucleotídicas a regiões codificantes. As repetições dinucleotídicas encontraram-se, na sua maioria, repartidas entre regiões flanqueadoras 5' e intrões.

Segundo os referidos autores há evidências que estes marcadores desempenhem funções codificantes e funções de regulação do genoma. Como sequências codificantes, alguns microssatélites foram encontrados em variadas proteínas tendo a variação do número de repetições – número de aminoácidos das cadeia polipeptídicas homopoliméricas – sido associada a algumas funções do gene. Como sequências reguladoras são encontrados distribuídos ubiquitariamente pelo genoma, a montante das sequências promotoras (sequências repetitivas integradas em regiões promotoras funcionam como elementos de activação da expressão das regiões codificantes). Da mesma forma os microssatélites também podem ter um papel de activação a montante do gene devido à sua grande capacidade, típica de sequências activadoras, de se ligarem a proteínas.

5.3.3.3. MECANISMOS DE INSTABILIDADE (MODELOS DE MUTAÇÃO) DE MICROSSATÉLITES

Os ritmos de mutação dos microssatélites são bastante elevados quando comparados com os das mutações pontuais, ocorrentes nas regiões não-repetitivas, que rondam as 10^{-10} mutações por replicação^[Hancock., 1999]. Estimativas dos ritmos de mutação, por *locus*, dos microssatélites em sistemas *in vivo* referenciam os seguintes valores: 10^{-2} , por replicação, em bactérias *E. coli*^[Levinson e Gutman, 1987]; 10^{-4} a 10^{-5} em leveduras^[Strand *et al.*, 1993]; 10^{-3} a 10^{-4} , por geração, em ratos^[Dallas, 1992] e 10^{-3} em humanos^[Weber and Wong, 1993]. Em

plantas, encontram-se referências aos ritmos de mutação de microssatélites em milho, que rondam os 10^{-4} [Vigouroux *et al.*, 2002].

A instabilidade elevada destes marcadores torna-os excepcionalmente úteis para estudos genéticos. Embora muitos tipos de mutações ocorram em repetições microssatélites, tal como nas outras regiões do genoma, o elevado ritmo de mutação destas sequências é essencialmente devido a mutações que provocam alterações do número de repetições dos padrões do microssatélite. Este tipo de mutações ocorre a um ritmo muito mais elevado (da ordem dos milhares de vezes superiores em alguma espécies) que as restantes, justificando a alta variabilidade encontrada.

Estão actualmente propostos dois modelos que explicam esta elevada instabilidade. Um dos modelos propõe que a instabilidade dos microssatélites é causada por um elevado ritmo de ocorrências de *crossing-over* irregulares dentro das regiões microssatélites. Um *crossing-over* irregular é o resultado da recombinação de cromossomas homólogos alinhados de uma forma imperfeita e ocorre com elevada frequência em zonas repetitivas devido à também elevada probabilidade de erros no emparelhamento das cadeias de ADN, característica deste tipo de sequências. O segundo modelo [Ilustração 2.4] justifica esta elevada instabilidade pelo elevado número de erros de re-emparelhamento após o deslizamento das cadeias durante o processo de replicação (*Slip-strand mispairing errors* – SSM). Este processo de erros de emparelhamento inicia-se quando a polimerase do ADN desliza durante o processo de replicação provocando o desalinhamento das cadeias [Ilustração 2.4. a)], a cadeia mãe em replicação e a nova cadeia em construção. Para que a replicação prossiga, as cadeias devem voltar a alinhar-se e emparelhar-se de uma forma correcta. Se este re-emparelhamento for imperfeito podem ocorrer mutações [Ilustração 2.4. b)]. A probabilidade de um re-emparelhamento imperfeito

acontecer é elevada, em sequências repetitivas, pois com facilidade se podem formar pregas, com o comprimento de uma ou várias repetições (representadas por rectângulos na ilustração), nas cadeias que se re-emparelam (com complementaridade mas desalinhadas, saltando uma ou várias repetições). Se a replicação da cadeia continuar^[Ilustração 2.4. c] sem intervenção dos mecanismos celulares de reparação de erros, desenvolve-se uma mutação que origina um microsatélite com maior ou menor peso molecular^[Eisen, 1999].

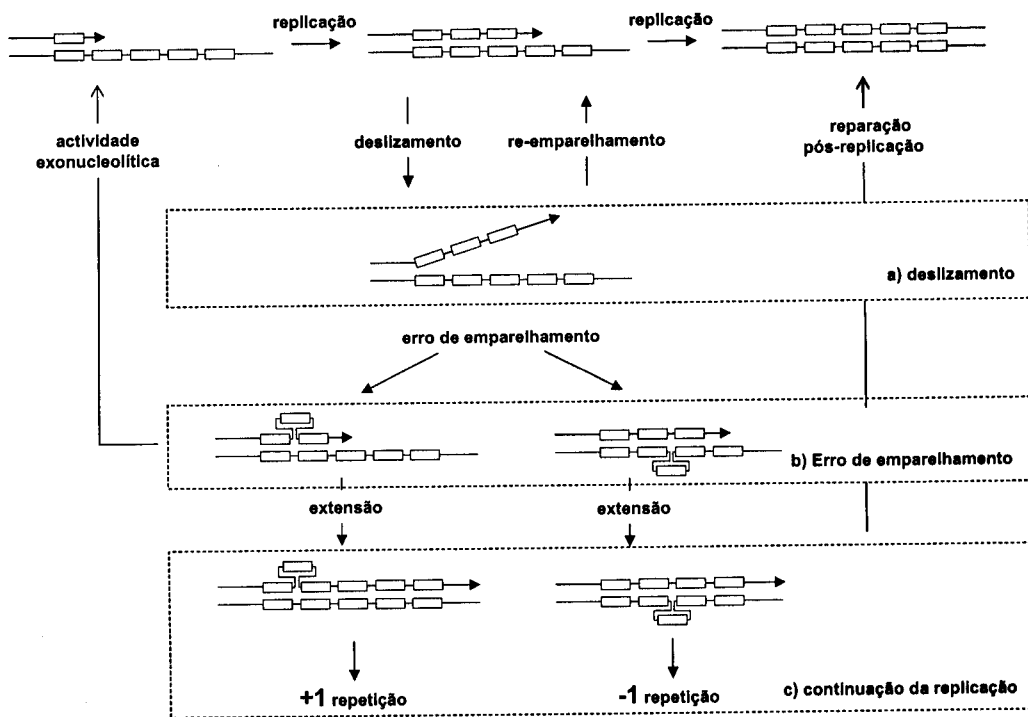


Ilustração 2.4. Modelo do processo de mutação SSM num locus microsatélite

Apesar da elevada probabilidade de ocorrência de erros deste tipo, nem todos originam mutações devido à actuação dos mecanismos celulares de reparação de erros^[Ilustração 2.4] como os mecanismos exonucleolíticos de *proofreading* e de reparação de erros de emparelhamento pós-replicação (*mismatch repair*)^[Eisen, 1999]. A maioria dos autores é da opinião de que a elevada instabilidade dos microssatélites resulta do equilíbrio entre a ocorrência de erros e a sua correcção, segundo o modelo que descreve os erros de re-emparelhamento, após o deslizamento das cadeias (SSM)^[Sia et al., 1997].

Os mecanismos de mutação de microssatélites em diferentes espécies são aparentemente os mesmos. No entanto, e devido ao facto de existir variação inter-específica em alguns factores celulares, como o tipo de polimerases e o tipo de enzimas envolvidas nos mecanismos de reparação de ADN, os ritmos de mutação dos microssatélites variam consideravelmente, como foi referido.

5.3.3.4. ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES

MICROSSATÉLITE

A obtenção dos microssatélites é um processo bastante moroso e que requer grande especialização dos laboratórios. Apesar do recente desenvolvimento de técnicas de obtenção de sequências de microssatélites acessíveis a um maior número de laboratórios, poucos grupos a nível mundial se mostraram capazes da publicação de sequências de *primers* para detecção de polimorfismos em regiões microssatélites da videira. Essas sequências podem, contudo, ser obtidas a partir de várias fontes:^[Scott, 2001].

- bibliotecas genómicas e genómicas enriquecidas;
- bibliotecas BAC;

- ' bibliotecas de cDNA;
- ' bases de dados de acesso público como EMBL e Genbank;
- ' e bases de dados de ESTs.

A tecnologia usada para o desenvolvimento de novos *loci* microssatélites é, na maioria dos casos, baseada na construção de uma biblioteca genómica - pela clonagem de pequenos fragmentos de ADN em estudo, através de vectores de plasmídeos ou fagos, em bactérias *E. coli* cujas colónias serão reservadas - de uma variedade de videira ou porta-enxerto. Estas bibliotecas são posteriormente sujeitas a um rastreio com sondas, contendo sequências típicas de microssatélites, sendo seleccionados para sequenciação os clones que contenham sequências repetitivas, onde as sondas hibridam. A partir das sequências completas dos clones que contenham as repetições procuradas, são desenhados *primers* que flanqueiem estas repetições e optimizadas as condições de PCR para a amplificação eficiente destes fragmentos.

O processo mencionado envolve recursos consideráveis e é muito moroso o que, em parte, justifica a sua utilização restrita a nível internacional. Apenas três grupos de investigadores desenvolveram microssatélites para videira, num total de cerca de 40 *loci* publicados, a partir de bibliotecas genómicas^[Thomas *et al.*, 1993; Bowers *et al.*, 1996, 1999; Sefc *et al.*, 1999]. Por forma a que o processo de desenvolvimento destes marcadores se simplificasse Thomas *et al.* (1994a), propuseram uma alteração à metodologia usada até então, baseada em técnicas de enriquecimento em sequências repetitivas das bibliotecas, a partir da qual obtiveram alguns marcadores válidos.

O rastreio de sequências repetitivas em bases de dados genéticas, como as bases EMBL e Genbank, proporcionou também a identificação de alguns microssatélites em

vários organismos. Mais recentemente, o desenvolvimento destes marcadores utilizando outros tipos de bases de dados, como as bases de cADN ESTs, tem adquirido importância crescente, à medida que estas se tornam mais completas e abrangem um maior leque de organismos. Em plantas, este tipo de estratégia foi utilizada, principalmente, no desenvolvimento de marcadores para arroz [Cho *et al.*, 2000] e videira [Scott *et al.*, 2000a]. Sefc *et al.* (2001), consideram este tipo de estratégia uma forma rápida e pouco dispendiosa de identificar sequências do tipo microssatélite com qualquer padrão de repetição. Uma vez que sequências de ESTs são originárias de regiões do genoma codificantes, os *primers* desenvolvidos com base nesta estratégia ligam-se a regiões altamente conservadas, o que permite uma amplificação específica num leque taxonómico mais alargado, contrariamente ao que acontece com *primers* desenvolvidos em regiões não codificantes do genoma (*viz.* os obtidos pela referida técnica de rastreio de bibliotecas genómicas). No entanto, a pressão de conservação de sequências em regiões codificantes pode resultar num nível reduzido de polimorfismo nestes *loci* quando comparados com sequências efectivamente neutras (de regiões não codificantes).

Apesar de bastante eficiente e extremamente rápida, esta estratégia apresenta a grande limitação por requerer a existência de bases de dados de ESTs do genoma da videira. Contudo, Abblet *et al.* (1998) publicaram um grande conjunto de sequências de ESTs de videira nas quais Scott *et al.* (2001) efectuaram um rastreio e identificaram cerca de 100 microssatélites, mostrando alguns destes suficiente polimorfismo para a identificação de algumas videiras e porta-enxertos.

A partir da identificação da sequência que contenha motivos repetitivos, o desenho dos *primers* que permitem a amplificação do fragmento repetitivo e a sua consequente utilização para estudos de variabilidade dos organismos, executa-se da

mesma forma: de acordo com as regras do desenho de *primers*, tarefa essa facilitada pela utilização de software adequado. Alguns destes programas são de utilização gratuita e de fácil manuseio, como por exemplo o disponibilizado por Rozen e Skaletsky (2000) em <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>.

5.3.3.5. APLICAÇÕES PARA O ESTUDO DA VARIABILIDADE DA VIDEIRA

Os primeiros trabalhos de identificação de castas de videira usando as sequências repetitivas de ADN amplificadas pela reacção de PCR foram conduzidos por Thomas *et al.* (1993). Os autores demonstraram a abundância deste tipo de sequências, assim como a sua grande utilidade na identificação de videiras. Deste modo foi confirmada a utilidade destes marcadores na construção de mapas genéticos e no estudo das relações genéticas entre indivíduos. Este primeiro trabalho de identificação de castas de videira teve como base um trabalho previamente publicado pelos mesmos autores^[Thomas *et al.*, 1993] onde estes avaliaram a possibilidade do uso de sequências repetitivas (microsatélites, minissatélites e genes ribossomais altamente repetitivos) como marcadores moleculares na identificação de espécies e castas de *Vitis*. A técnica usada para a detecção de polimorfismos (sondas *Southern blot* de sequências repetitivas normalmente encontradas em eucariontes hibridadas sobre bibliotecas genómicas), também anteriormente testada por Striem *et al.* (1990), apesar de revelar importantes dados acerca da presença destas sequências nos genomas estudados, não é compatível com uma análise extensiva de polimorfismos no elevado número de variedades de videira disponíveis, devido ao grande dispêndio de tempo na sua execução e resultados pouco reprodutíveis. Tendo em conta os dados obtidos, que indicavam uma forte presença de sequências microsatélites no genoma da videira e as sondas executadas com este tipo de sequências pouco eficientes na detecção de polimorfismos, os autores concluem que usando as sequências destes microsatélites

para o desenvolvimento de metodologias baseadas na técnica de Sequence Tagged Site (STS), será eventualmente conseguida a detecção de polimorfismos por uma via mais fácil.

Desde então o interesse por este tipo de marcadores conheceu um forte crescimento e alguns grupos em todo o mundo iniciaram os trabalhos no seu desenvolvimento, resultando no aparecimento de novas sequências de microssatélites. Algumas destas sequências que têm sido descobertas pelos vários investigadores podem ser encontradas em bases de dados de consulta gratuita disponíveis na internet. Este assunto será tratado com maior profundidade em secções posteriores deste capítulo^[p. 120].

A leitura, ou interpretação, de um gel de acrilamida onde foram separados fragmentos originados pela amplificação de um marcador microssatélite é relativamente simples e os dados – o tamanho ou massa molecular dos alelos – podem ser expressos de uma forma numérica (número de pares de bases ou número de repetições do padrão do microssatélite). Os resultados obtidos podem ser reproduzidos e comparados em laboratórios diferentes ou em diferentes períodos, sempre que a padronização dos tamanhos dos alelos seja efectuada. Esta padronização deverá ser baseada na utilização de um conjunto de castas e marcadores, os quais deverão ser analisadas por um conjunto diverso de laboratórios que estabeleçam o perfil (massa molecular dos alelos) que determinada variedade origina quando amplificada com determinado marcador. A escolha dos pares casta/marcador a usar para a construção dos padrões deverá ser feita de modo a abranger o maior número de alelos possível. Os melhores marcadores para esta finalidade serão aqueles que originam bandas bem definidas onde o fenómeno de *stutter* seja pouco pronunciado. As castas a usar devem, de preferência, ser de fácil acesso (e.g. castas

usadas a nível internacional), podendo, assim, ser facilmente obtidas por qualquer investigador, em qualquer país, que pretenda calibrar o seu método.

O valor de um marcador para a identificação de castas não deve ser estimado exclusivamente a partir da contagem do número de alelos, pois os desvios da distribuição homogénea destes diminui severamente o conteúdo em informação proporcionado por esse marcador, mesmo apresentando este um elevado número de alelos^[Sefc et al., 1999, Tessier et al., 1999]. Desta forma, algoritmos que tenham em consideração a frequência dos alelos reflectem com maior exatidão a variabilidade de um *locus*. Dois desses algoritmos, a seguir listados, foram desenvolvidos para marcadores moleculares de videira pelos autores indicados.

· *Probabilidade de Identidade (PI) – cujo cálculo é baseado na frequência dos alelos*^[Sefc et al., 1999, 2000].

· *Poder Discriminatório (D) – cujo cálculo é baseado nos padrões de bandas ou nas frequências genótípicas (sendo C a probabilidade de confusão ou a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente numa população apresentarem o mesmo perfil de bandas, $D=1-C$)*^[Tessier et al., 1999].

Ambos os indicadores reflectem a probabilidade com que duas castas não relacionadas podem ser distinguidas por um determinado marcador. A um marcador microsatélite apenas pode corresponder um valor de PI igual a 0,05, o que significa que a probabilidade de duas castas não relacionadas apresentarem o mesmo genótipo é igual a 5%. Combinando um maior número de marcadores microsatélite, e.g. cinco, o valor pode descer até 10^{-5} . Valores de D iguais a 0,959 e 0,825 foram calculados por Tessier et

al. (1999) para os *primers* VVMD5 e VVMD8, quando usados isoladamente, o que reflete bem o poder polimórfico destes marcadores.

O parâmetro D pode ser usado para comparar diferentes tipos de marcadores e chegar a uma combinação ideal entre eles. Tessier *et al.* (1999), no trabalho de apresentação do algoritmo D, concluíram que para uma população de 224 castas, onde foram aplicados 23 *primers* (21 RAPD e 2 microssatélites), a combinação de 8 *primers* (6 RAPD e 2 microssatélites) apresentou o maior poder discriminatório.

Tendo em conta a enorme diversidade de castas, a eficiência de determinado marcador pode variar, em diferentes colecções de castas, visto a frequência alélica variar entre grupos genéticos. No entanto, na generalidade, um marcador que se mostre eficiente num determinado grupo genético terá também um bom poder discriminatório quando aplicado a outro grupo. Este facto poderá ser muito útil na escolha de marcadores para aplicação em determinado grupo nunca antes estudado.

Os marcadores do tipo ADN microssatélite rapidamente se tornaram os marcadores de eleição na identificação de castas de videira. Para além da sua grande capacidade discriminatória, estes marcadores propiciam um leque alargado de aplicações^[Quadro 2.3], tão distintas como a reconstituição da linhagem de castas e o mapeamento genético, este último de extrema importância para a definição de marcadores relacionados com o controlo da expressão de características agronómicas desejáveis^[Sefc *et al.*, 2001].

Quadro 2.3.- Perspectivas de avaliação da informação obtida pela utilização de marcadores de ADN microssatélite. Adaptado de *Sefc et al.*, 2001.

Gestão de colecções de germoplasma	Identificação de castas
	Identificação de sinonímias e homonímias
	Reconstrução genealógica
Caracterização dos <i>pools</i> genéticos	Variabilidade genética
	Composição alélica e genotípica
	Diferenciação entre <i>pools</i> de genes
Avaliação de marcadores	Heterozigosidade
	Frequência dos alelos
	Frequência de alelos nulos
Análise de agrupamentos	Determinação da similaridade
	Construção de fenogramas

Na construção de mapas genéticos de *Vitis spp*, este tipo de marcadores têm sido utilizados, como referido, mas frequentemente associados a outros marcadores como os AFLP e RAPD^[Grando et al., 2000b]. Esta vertente da aplicação dos microssatélites foi iniciada, especialmente, a partir do momento em que a quantidade de marcadores disponíveis aumentou substancialmente. Os mapas genéticos têm por objectivo a caracterização da localização física das regiões conhecidas do genoma. Esta caracterização permitirá a localização de QTLs, marcadores extremamente úteis para o melhoramento da videira, mais propriamente para a selecção clonal. Os marcadores de ADN microssatélite têm também sido úteis na construção de mapas genéticos relativamente densos de *Vitis vinifera*^[Doligez et al., 2002; Riaz et al., 2004] e *Vitis rupestris* e *Vitis arizonica*^[Douceff et al., 2004].

5.3.3.5.1. Loci de marcadores microsatélite do género *Vitis*.

As sequências dos *primers* desenvolvidos para a amplificação de *loci* microsatélites podem obter-se, essencialmente, a partir dos artigos publicados relativos à identificação das regiões repetitivas, citados no Quadro 2.4, através de algumas bases de dados de identificação genética de videira e, também, pela base de dados do National Centre for Biotechnology Information (NCBI)⁸ que disponibiliza, entre vários outros tipos de sequências, algumas sequências de marcadores deste tipo. Apesar de descritas nos locais referidos, a sua fonte primária de divulgação é a publicação em revistas da especialidade.

Quadro 2.4 – Origem dos marcadores de ADN microsatélite descritos até Dezembro de 2004.
x: numeração adoptada pelos autores.

Fonte	Identificados	Polimórficos	Denominação da série	Referência
CSIRO, Australia	5	5	VVSx	Thomas e Scott, 1993
Universidade da Califórnia, EUA	17	4	VVMDx	Bowers <i>et al.</i> , 1996a
Universidade da Califórnia, EUA	22	12	VVMDx	Bowers <i>et al.</i> , 1999a
Universidade de Viena, Áustria	18	13	ssrVrZAGx	Sefc <i>et al.</i> , 1999
Universidade de Udine, Itália	9	9	VMC4xx	Di-Gaspero <i>et al.</i> , 2000
Universidade Southern Cross, Australia	16	10	scuxxvv	Scott <i>et al.</i> , 2000a
CSIRO/Universidade Studi di Reggio, Itália	13	7	VMC7xx	Pellerone <i>et al.</i> , 2001
Universidade de Creta, Grécia	12	7	ssrVvUCHx	Lefort <i>et al.</i> , 2002

A maioria dos marcadores aqui referidos foram desenvolvidos recorrendo à construção de bibliotecas genómicas ou bibliotecas genómicas enriquecidas,

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists&cmd=search&term=vitaceae>

metodologias abordadas em secções anteriores. Todavia, mais recentemente, foi utilizada uma nova fonte de sequências microssatélites. A identificação de microssatélites de bases de dados de ESTs (Expressed Sequence Tags) de videira, mais concretamente de uma base de dados de EST de folhas e bagos de Chardonnay^[Scott et al., 2000a].

Os marcadores de microssatélite de videira não são necessariamente desenvolvidos a partir do genoma de *Vitis vinifera*^[Thomas et al., 1993; Bowers et al., 1996a, 1999a] podendo, para tal, ser utilizadas outras espécies como *V. riparia*^[Sefc et al., 1999]. Todavia, utilizando outra espécie que não *V. vinifera* os autores apresentaram, em paralelo, um intensivo estudo de transferibilidade inter-específica – em 6 espécies e alguns híbridos – dos marcadores apresentados, visando a confirmação da sua utilidade nestas outras espécies. Este tipo de estudos da conservação dos *loci* microssatélites dentro do género *Vitis* – transferibilidade inter-específica – tem sido alvo de crescente atenção, pois ainda não foram realizados estudos aprofundados sobre os recursos genéticos de espécies que não a *V. vinifera* – vastamente usadas como porta-enxertos –, constituindo estas também uma fonte de variabilidade genética na produção de uvas^[Di Gaspero et al., 2000].

O Consórcio Internacional de Microssatélites da videira (VMC) fundado em 1997, tem como um dos principais objectivos o desenvolvimento de novos marcadores a partir de uma biblioteca genómica enriquecida. Até ao momento há referências do desenvolvimento de 327 pares de *primers* microssatélite^[Riaz et al., 2004]. Os marcadores moleculares desenvolvidos não foram, até ao momento, disponibilizados para utilização pela comunidade internacional. Este consórcio engloba os esforços de cerca de 21 laboratórios de todo o mundo e de uma companhia privada francesa (Agrogene). O consórcio tem objectivos comerciais de desenvolvimento de um sistema de certificação

global para aplicação no controlo do comércio internacional de vinhas e porta-enxertos através da certificação de variedades^[Sefc et al., 2001].

Alguns autores, em trabalhos de colaboração com grupos de investigação onde estas sequências são desenvolvidas, publicam trabalhos onde os *primers* utilizados não são divulgados, o que em nada contribui para o desenvolvimento científico.

5.3.3.5.2. DISCRIMINAÇÃO DE CASTAS ATRAVÉS DOS MICROSSATÉLITES NUCLEARES

A maioria dos marcadores microsatélite foram desenvolvidos a partir do genoma nuclear e os métodos que utilizam este tipo de marcadores são aqui tratados. Recentemente, no entanto, alguns autores referiram-se à utilização de marcadores microsatélite originários do genoma dos cloroplastos. Este tipo de marcadores, por questões de organização desta dissertação, será abordado noutra secção^[página 110].

O extraordinário potencial discriminatório dos marcadores microsatélite em videiras foi demonstrado num grande número de estudos. O primeiro destes estudos, desenvolvido por Thomas e Scott (1993), descreve o modo como os autores sequenciaram as regiões repetitivas encontradas e, a partir destas sequências, desenharam os 5 primeiros pares de *primers* descritos (VVS1, VVS2, VVS3, VVS4 e VVS5). Apesar de os autores testarem a biblioteca genómica, construída com *Vitis vinifera* da casta Sultana, apenas com sondas oligonucleotídicas do tipo (GA)₁₀ e (GT)₁₀, encontraram, fortuitamente, outros padrões de repetição que foram também convertidos em marcadores STS (*e.g.* VVS1).

Usando os *primers* desenvolvidos, Thomas e Scott (1993), assim como outros autores^[Quadro 2.4] dos *primers* referidos, testaram a sua eficiência na discriminação de

castas. Para tal analisaram 26 castas de videira, encontrando para os *loci* VVS1, VVS2, VVS3, VVS4 e VVS5, respectivamente 13, 12, 8, 5 e 4 alelos diferentes apresentando, alguns, frequências muito diferentes. É de referir que os alelos foram representados por letras pois não era conhecido com exatidão o tamanho dos fragmentos amplificados. O nível de heterozigosidade, para as 26 castas estudadas abrange valores entre 0,69 e 0,88.

Pela aplicação destes marcadores a castas e respectivos progenitores conhecidos, foi também possível verificar, pela primeira vez, a forma codominante como estes marcadores são transmitidos em *Vitis vinifera*. Confirmou-se, também, a transferibilidade inter-específica destes marcadores, pois não só se mostraram eficientes na amplificação de microssatélites de *V. vinifera*, espécie na qual foram desenvolvidos, como também amplificaram fragmentos de espécies de *Vitis* similares (e.g. *V. rotundifolia*).

Mais tarde, outros investigadores iniciaram também o desenvolvimento de *primers* para microssatélites de videira. Bowers *et al.* (1996a, 1999a) aplicaram os *primers* desenvolvidos nos seus dois trabalhos a respectivamente, 77 e 347 variedades de videira para produção de vinho e uva de mesa, tendo encontrado de 5 a 11 alelos, por *locus*, no primeiro trabalho, e de 4 a 19 no trabalho publicado em 1999. Os níveis de heterozigosidade variaram entre os 0,75 e 0,90 para o primeiro grupo de *primers* e 0,42 e 0,90 para o segundo. Cientes da dificuldade de determinação da massa molecular dos alelos de uma forma uniformizada, os autores apresentaram, nestes dois trabalhos, os genótipos de 7 castas para cada um dos *locus* desenvolvidos, que poderão servir de referência a outros autores, na medida em que as castas escolhidas estão disponíveis na maioria das colecções dos diversos países.

No seu trabalho de 1999, Sefc e seus colaboradores descrevem níveis de heterozigosidade de 0,37 a 0,88, para os *primers* desenvolvidos em *Vitis riparia* e aplicados a 120 castas de *V. vinifera*. O número de alelos oscilou entre os 4 e os 15, não tendo sido todos os *loci* testados sobre a totalidade das 120 videiras.

Di-Gaspero *et al.* (2000) descrevem 9 novos *loci* microssatélite e avaliam-nos na perspectiva da conservação entre o género *Vitis*, não fornecendo dados acerca do número de alelos ou heterozigosidade em populações de *Vitis*. Na mesma linha, são avaliados os microssatélites derivados de bibliotecas de ESTs desenvolvidos por Scott *et al.* (2000) onde apenas duas castas de *V. vinifera* são utilizadas, tendo os autores focado a sua atenção no parâmetro transferibilidade inter-específica dos marcadores.

Pellerone *et al.* (2001) utilizaram os marcadores desenvolvidos no estudo de 17 castas de duas regiões Italianas. Encontraram entre 4 e 8 alelos para cada *locus* e avaliaram cada um dos *locus* determinando a diversidade genética e o poder de discriminação (Heterozigosidade esperada) utilizando o programa GENEDIST do conjunto PHYLIP. Os valores de heterozigosidade esperada variaram entre 0,66 e 0,80.

Lefort *et al.* (2002) descrevem 7 novos marcadores microssatélite e testam-nos em 74 a 360 indivíduos de *V. vinifera* e outras espécies ou híbridos. Estes marcadores apresentaram um nível de heterozigosidade muito elevado (0,73 a 0,93) e um número considerável de alelos (12-26), para além de uma boa transferibilidade testada sobre outras 15 espécies e híbridos de *Vitis spp.*

Os trabalhos até agora citados foram aqueles onde os autores apresentaram as sequências dos *primers* que desenvolveram e aplicaram-nos a algumas populações de

castas. São, portanto, referências de grande importância na caracterização molecular da videira.

Muitos outros autores, em diversos trabalhos, bem como no que se apresenta, devido à impossibilidade do desenvolvimento de novos marcadores microsatélites nos seus laboratórios, utilizam as sequências publicadas para o estudo das castas de videira locais. Os dados resultantes destes trabalhos, de elevado interesse para os gestores de germoplasma local, poderão não suscitar o mesmo interesse na comunidade internacional, caso não sejam incluídos em bases de dados internacionais. Deste modo, os trabalhos executados nestes moldes serão alvo de breve referência neste capítulo.

Num estudo sobre a diversidade do grupo de castas usadas na região de Trentino, Itália, Grando e Frisinghelli (1998b) conseguem agrupar 40 destas castas em 35 grupos, isolando 21 variedades com apenas 4 loci microsatélites. Neste trabalho foi também avaliado o grau de polimorfismo proporcionado por 12 marcadores RAPD, tendo os autores concluído que apenas com os 4 *loci* microsatélite conseguiam o mesmo grau de polimorfismo, que aquele conseguido com a conjugação de marcadores, com menor dispêndio de recursos. Num trabalho subsequente^[Grando e Frisinghelli, 1998a], analisam com 8 marcadores cerca de 30 castas, entre as quais cerca de 10 variedades universalmente cultivadas e alguns progenitores de Riesling. Para além do esclarecimento de alguns progenitores, Grando e Frisinghelli (1998a) confirmaram os agrupamentos anteriormente definidos da população de Trentino e compararam o tamanho dos alelos com determinações efectuadas noutros laboratórios, questionando os sistemas de determinação do tamanho dos alelos. Em 2000, o mesmo grupo de investigação analisou a estrutura do mesmo grupo de 40 castas de Trentino com 7 marcadores, 4 dos quais do estudo anterior,

tendo como resultado a inclusão das castas praticamente nos mesmos grupos que os descritos nos trabalhos anteriores^[Grando *et al.*, 2000a].

Foram publicados outros estudos envolvendo a caracterização de castas Italianas^[Botta *et al.*, 1995; Filippetti *et al.*, 1999]. Botta *et al.*, estudaram, respectivamente, 21 castas de colecções Italianas e 24 descendentes de uma casta de Sangiovese autogâmica utilizando 4 e 10 marcadores, tendo sido identificado um caso de sinonímia entre 3 castas (Vermentino, Favorita e Pigato) e discriminadas todas as outras variedades. No outro estudo, Filippetti *et al.*, avaliaram, em paralelo, alguns descritores morfológicos nas 24 descendências de Sangiovese. Apesar de 12 destas 24 plantas serem morfológicamente idênticas à planta mãe, os 10 marcadores microssatélites distinguiram todas as plantas numa clara demonstração do elevado poder discriminatório destes marcadores relativamente às técnicas ampelográficas.

Lopes *et al.* (1999) caracterizaram 49 castas portuguesas com 11 marcadores, tendo identificado alguns casos de sinonímia. Uma vez que estes autores utilizaram algumas combinações casta/marcador comuns às usadas no presente estudo, este trabalho será objecto de uma análise aprofundada no capítulo 4. Os mesmos autores publicaram um outro trabalho^[Lopes *et al.*, 2000] onde estudaram as relações entre 8 castas (autorizadas e recomendadas para a produção de vinhos regionais nos Açores) e um porta-enxerto local, utilizando 12 marcadores microssatélite. A discriminação das castas foi evidente, excepto três do tipo Verdelho (Verdelho Branco, Verdelho da Madeira e Verdelho Roxo) que apresentaram o mesmo perfil genético. Curiosamente, as uvas da casta Verdelho Roxo são tintas e as dos outros dois tipos de verdelho, brancas. Este tipo de polimorfismo morfológico, não correspondendo ao polimorfismo genético nas regiões microssatélites,

tem sido várias vezes descrito nos casos das castas Pinot e atribuído a pequenas mutações genéticas, ou fenómenos de quimerismo, não afectando *loci* microssatélites.

Borrego *et al.* (2001) de modo a esclarecer as relações entre 406 presumíveis castas de uma colecção do Instituto Madrileño de Investigación Agrária e Alimentaria (IMIA) analisaram-nas em 8 *loci* microssatélites e 4 sistemas enzimáticos. Previamente, com base em dados ampelográficos, estes investigadores tinham reduzido o número de presumíveis castas de 406 para 47. Todavia, o elevado grau de polimorfismo proporcionado pelos microssatélites, originou o reagrupamento destas em 116 castas. De facto, muitas das plantas incluídas pelos métodos ampelográficos numa mesma casta eram diferentes.

No decurso da pesquisa dos dados para a construção da base de dados "Greek Vitis Database", Lefort e Roubelakis-Angelakis (2001) utilizaram 11 *loci* microssatélite para caracterizar 50 castas de videira Gregas. A este dados adicionaram os da análise ampelográfica. Dos 11 frequentemente usados por vários grupos, 6 são utilizados como descritores da base de dados Europeia da Videira. As 50 castas originaram 47 perfis únicos, correspondendo a 3 casos de presumível sinonímia. Usando mais marcadores, os autores confirmaram 2 destes casos conseguindo a distinção dos indivíduos do terceiro caso utilizando 7 microssatélites adicionais.

A escolha dos marcadores mais eficazes, como referido anteriormente, poderá ser feita tendo em conta os valores de D e PI de determinados em grupos genéticos já estudados. No entanto, na maioria dos trabalhos citados até aqui, os marcadores não foram sujeitos a este processo de selecção, pois os autores apresentam resultados sobre a avaliação dos marcadores que desenvolveram ou sobre a avaliação de determinados

marcadores, cujas sequências estão publicamente disponíveis, em conjuntos de castas locais nunca anteriormente testadas. Apesar da disponibilidade destes parâmetros, os marcadores são, de uma forma geral, escolhidos, tendo em conta a experiência do grupo de trabalho. Num trabalho patrocinado pelo projecto Europeu de compilação e uniformização de informação sobre recursos genéticos da videira, GENRES81, a escolha dos seis marcadores de referência foi, do mesmo modo, feita não em função de parâmetros objectivos, mas tendo em conta a experiência dos membros do grupo.

Os marcadores em questão foram também utilizados na distinção de variedades de porta-enxertos tendo Sefc *et al.* (1998a) analisado e distinguido 19 variedades de porta-enxertos usando 10 *loci* microssatélites. Concomitantemente, foram analisadas 47 castas, grande parte destas Austríacas, e exceptuando alguns casos de sinonímia, todas as variedades foram discriminadas e perfeitamente separadas dos porta-enxertos de *Vitis riparia*.

5.3.3.5.2.1. Discriminação de castas produtoras de uvas de mesa

A maioria dos trabalhos referidos neste capítulo estão relacionados com a discriminação de castas produtoras de uvas para vinho. Todavia, também as variedades produtoras de uvas de mesa e passas têm sido alvo de estudo com marcadores microssatélites. Sánchez-Escribano *et al.* (1999) caracterizaram 43 variedades de *Vitis vinifera* produtoras de uva de mesa com microssatélites. Observaram a presença de 2 a 8 alelos por *loci* e níveis de heterozigosidade dos marcadores de 0,38 a 0,80. As 43 amostras foram claramente discriminadas com a combinação dos 8 marcadores utilizados. Também Dangl *et al.* (2001) determinaram o perfil de 42 videiras produtoras de uvas de mesa ou com nomes similares a estas, com 11 microssatélites. Os dados obtidos

confirmaram os casos de sinonímia conhecidos e identificaram um novo caso. Também a paternidade de algumas castas foi confirmada.

Todos os trabalhos referidos até este ponto utilizaram folhas ou partes lenhosas da videira como fonte de ADN. Para a identificação da variedade de uvas de mesa, após a sua colheita, Sefc *et al.* (1998b) adaptaram os métodos de extracção de Thomas *et al.* (1993) e Doyle e Doyle (1990) à extracção de ADN de uvas e uvas passas. O ADN extraído de uvas passas, como esperado, apresentava-se muito degradado. Pela aplicação de 11 marcadores, os autores conseguiram a distinção e identificação – através da comparação com os perfis contidos numa base de dados – de todas as variedades de uva de mesa estudadas (18) e identificaram as duas amostras de uvas passas como pertencendo à casta Sultanina.

O desenvolvimento de novas castas de videira, com pequena expressão em variedades destinadas à produção de vinho, é um processo frequente para os produtores de uvas de mesa. É também um processo extremamente moroso e dispendioso que requer um sistema de protecção eficiente da propriedade intelectual da nova variedade e dos direitos inerentes. Consequentemente, Ibañez e Eeuwijk (2003) propõem a utilização dos marcadores microssatélite no processo de protecção de variedades – utilizando cálculos estatísticos idênticos aos usados em ciência forense – comprovando a eficiência de 9 marcadores em 45 variedades de uva de mesa.

5.3.3.5.2.2. Análise do polimorfismo de clones

Enquanto a distinção de castas tem sido facilmente conseguida usando os referidos marcadores, a distinção de clones de uma determinada casta apresenta

difficultades acrescidas fundamentalmente porque, para que a mutação que originou o clone seja detectada por um marcador, terá que ocorrer nesse marcador, sendo a probabilidade dessa ocorrência nesse local específico muito reduzida^[Franks *et al.*, 2002]. Até recentemente, em nenhum trabalho tinha sido conseguida a distinção de *clones* de videira usando marcadores de ADN microssatélite, apesar de alguns trabalhos reclamarem tal êxito.

Alguns autores, após a discriminação de indivíduos que se supunham da mesma casta, equacionaram a possibilidade destes marcadores serem capazes da distinção de clones^[Silvestroni *et al.*, 1997]. Não obstante, estudos mais aprofundados sobre a origem dos clones em questão provaram tratar-se, de facto, de duas castas diferentes mas morfologicamente não distinguíveis por técnicas ampelográficas.

Esta situação foi recentemente alterada devido ao considerável incremento do número de microssatélites identificados, de <40 para >300, pelo esforço conjunto do Consórcio Internacional da Videira. Alguns autores^[Riaz *et al.*, 2002]; utilizando um elevado número de marcadores (100 microssatélites), conseguiram obter polimorfismos dentro de populações clonais. A uniformidade destas populações não é, no entanto, um dos pontos fortes do referido trabalho. Os clones são obtidos de diversos locais o que diminui a probabilidade de uma origem comum e aumenta o nível de polimorfismo. Contrariamente, o nível de polimorfismo entre clones oriundos do mesmo local é, de um modo geral, muito baixo.

A definição de variedade ou casta, em termos restritos, considera a sua origem monoclonal, *i.e.* todas as plantas serem obtidas por reprodução vegetativa a partir de uma mesma planta mãe. Todavia, em viticultura, é frequentemente aceite o conceito de origem

policlonal, *i.e.* uma determinada casta pode ser constituída por um grupo não totalmente homogêneo, em termos genéticos, mas de características fenotípicas idênticas^[Vignani *et al.*, 1996]. Esses indivíduos seriam originados pela propagação vegetativa de plantas com características morfológicas idênticas – *e.g.* originadas de um mesmo cruzamento^[Filippetti *et al.*, 1999] –, cujo erro de identificação se perdeu no tempo, através do cruzamento de indivíduos geneticamente idênticos ou por autopolinização^[Sefc *et al.*, 2001].

Tendo em conta o tipo de reprodução assexuada nas castas de videira, o aparecimento de diferenças genéticas numa mesma casta poderá ser justificado pela referida origem policlonal do grupo de clones ou pelo aparecimento de mutações somáticas (quimeras). Os microssatélites, são, por norma, considerados marcadores estáveis em termos somáticos^[Morgante e Olivieri, 1993] e como tal podem ser usados como definidores da origem policlonal das videiras (*i.e.* um grupo de viderias onde não fossem encontrado polimorfismo através de marcadores microssatélite, poderia ser considerado como um grupo do mesmo clone). Contudo, trabalhos recentes reiteram a possibilidade da ocorrência de mutações somáticas em *loci* microssatélites^[Crespan, 2004]. Se estas mutações ocorrerem a um elevado ritmo podem limitar o uso dos marcadores microssatélite como definidores da origem policlonal pois, desta forma, o polimorfismo entre clones não pode ser justificado unicamente pela origem policlonal.

Crespan (2004), no sentido do esclarecimento da evolução dos marcadores de ADN microssatélite em clones, estudou 4 clones pertencentes a castas italianas. Neste grupo de 27 plantas, de origens (coleções de germoplasma) diferentes, o autor encontrou 4 mutações, sempre pelo aumento de uma unidade do padrão repetitivo GA dos marcadores em estudo. Na maioria das plantas onde foram encontradas mutações, estas foram confirmadas em anos sucessivos, a partir de folhas jovens da mesma planta.

Todavia, numa das plantas, em anos subsequentes, o alelo que tinha sofrido uma mutação desapareceu e voltou a estar presente o alelo original. De entre as várias hipóteses apresentadas pelo autor, incluindo a regressão da mutação, a mais credível seria a atribuída à presença de uma quimera. Em anos distintos foram colhidas da planta, folhas provenientes de rebentos diferentes. Num destes anos, o material vegetal colhido terá sido o pertencente à quimera originada pela mutação. Crespan calcula, também, no seu trabalho, a frequência de mutação dos marcadores microssatélites em videira, tendo estimado o valor de $8,241 \times 10^{-5}$ (dados cumulativos com os trabalhos de outro autores)^[Riaz et al., 2002].

Em trabalhos anteriores, onde se supunha que a diversidade dos clones poderia ser também detectada usando o elevado grau de polimorfismo dos microssatélites, vários grupos de investigação testaram estes marcadores em colecções mais ou menos extensas de clones. Para que a capacidade discriminatória dos microssatélites seja mais concretamente apreciada, os vários trabalhos sobre este assunto serão explanados, resumidamente, no Quadro 2.5.

Quadro 2.5. Grupos de clones estudados por marcadores de ADN microssatélite e sua capacidade discriminatória.

Referência	Loci (série,série/número total)	Castas	Número de origens	Indivíduos estudados/discriminados
Vignani <i>et al.</i> , 1996	VVMx, VVSx/7	Sangiovese	8	11/1
Regner <i>et al.</i> , 2000	VVMDx, VVSx, VrZagxx/47	Riesling	2	10/10
Loureiro <i>et al.</i> , 1998	VVMDx, VVSx/6	Albariño	3	16/0
Bowers <i>et al.</i> , 1994	VVMDx/-	várias	-	-
Cipriani <i>et al.</i> , 1994	VVSx/5	várias	-	-/0
Silvestroni <i>et al.</i> , 1997	VVSx/VVMDx/6	Fortana	1	5/2
González Techera <i>et al.</i> , 2004	VVSx, VVMDx, VrZAGx, VMCx/89	Tannat	1	9/2 (num marcador apenas)
Hocquigny <i>et al.</i> , 2004	VVMDx, VVSx/9	vários	1	-/1 (clone de Pinot)

Regner *et al.* (2000) referem no seu trabalho, citado no Quadro 2.5, que apesar de os 47 marcadores usados terem proporcionado a distinção dos 10 clones analisados, esta não é uma situação frequente. De facto, os marcadores microssatélite têm sido considerados, pela maioria dos autores, pouco polimórficos em estudos intra-varietais. Bowers *et al.* (1994), num trabalho preliminar sobre a capacidade de discriminação de clones pelos marcadores por eles desenvolvidos, referem a ineficácia desses marcadores na distinção de clones de Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Zinfandel e Pinot noir. Loureiro *et al.* (1998), do mesmo modo, não conseguem efectuar a distinção ente clones de Alvarinho e, adicionalmente, verificam tratar-se da mesma variedade que o Alvarinho, cultivado em território Português. Outros autores^[Silvestroni *et al.*, 1997] encontram diferenças ao nível dos marcadores microssatélites em grupos de clones (neste caso da casta Fortana) previamente definidos através de diferenças fenotípicas, sendo, desta forma, clara a origem policlonal desta variedade.

Vários marcadores foram testados para a discriminação de clones. De entre a totalidade dos marcadores disponíveis e numa tentativa de encontrar as diferenças genéticas entre clones, cuja localização no genoma não é conhecida, os marcadores que têm como alvo variados *loci*, os chamados marcadores multi-*loci* são, por norma, os escolhidos. Assim, são descritas na literatura várias técnicas que foram utilizadas para o efeito e às quais se fará referência nas secções subsequentes (*e.g.* ISSR, AFLP, CHS-StSy).

À medida que o genoma da videira vai sendo saturado de marcadores moleculares, a possibilidade da distinção de indivíduos de elevada proximidade genética decerto aumentará.

5.3.3.5.3. ESTUDOS FILOGENÉTICOS

Recentemente, alguns autores dedicaram-se ao estudo mais aprofundado das relações genéticas entre as castas e populações de castas, a sua filogenia. Embora os marcadores microssatélite, devido ao seu elevado ritmo de mutação, não permitam o estudo das relações entre espécies diferentes, possível no seio da mesma espécie. A avaliação das relações filogenéticas entre as castas é particularmente útil na determinação da origem geográfica das mesmas.

Labra *et al.* (1999) esclareceram a origem geográfica da casta Ansonica, cultivada na ilha de Giglio, em Itália, interpretando a proximidade genética entre esta e cerca de mais de 50 variedades. Oito *loci* microssatélite, complementados com marcadores AFLP, possibilitaram a identificação da Grécia como o local de origem desta variedade, pela sua semelhança genética com as castas gregas.

Sefc *et al.* (2000), num estudo com 9 marcadores desenvolvidos pelo seu grupo de investigação, estabeleceram algumas relações entre castas oriundas de sete países Europeus. Com estes 9 marcadores, e sem qualquer outro tipo de informação, os autores afirmam a possibilidade de este método determinar a origem de uma casta, pois o fluxo genético entre países, provocado pela troca de castas, não foi suficiente para a homogeneização dos grupos. Mesmo nos casos de grupos subjacentes como Portugal e Espanha, a diferenciação de dois grupos genéticos foi possível.

Testando a hipótese de que a domesticação directa videiras silvestres, na Alemanha e Áustria, de terá originado grande parte do património cultivado hoje em dia, Perret *et al.* (2000), através de 10 marcadores microssatélite, concluíram que as variedades cultivadas em estudo (Riesling, Sylvaner e Grüner Veltliner) são originadas a partir de uma base genética muito mais alargada do que, simplesmente, as variedades silvestres locais. Isto porque os investigadores encontraram uma grande diversidade genética entre as 35 subespécies silvestres e uma clara diferenciação entre estas e as videiras cultivadas.

Os autores referidos são de opinião que cada região foi sujeita a fontes de variabilidade genética independentes, o que terá originado tão grande leque de castas. Esta elevada variabilidade constitui uma fonte de características agronómicas potencialmente úteis para os vitivinicultores. A manutenção do germoplasma local é, portanto, de extrema importância para prevenir a erosão genética da videira com potenciais vantagens para a viticultura moderna.

Apesar de a maioria dos trabalhos ter como finalidade a identificação de castas e o estudo das relações genéticas entre estas, alguns autores dedicaram-se ao estudo das

relações genéticas entre as várias espécies de *Vitis*, utilizando o mesmo tipo de marcadores. Lamboy e Alpha (1998) estudaram, apenas com 5 marcadores microssatélite, a proximidade genética entre cerca de 25 grupos taxonómicos de *Vitis*.

5.3.3.5.3.1. Polimorfismo de microssatélites cloroplastidiais

O genoma cloroplastidial da maioria das angiospérmicas é uma herança maternal; num cruzamento, apenas a fêmea é transmissora de cloroplastos. Enquanto que os microssatélites nucleares nos dão informações que nos permitem identificar ambos os progenitores, os microssatélites cloroplastidiais indicam-nos a direcção desse cruzamento, isto é, a identificação do sexo de cada um dos progenitores. Bowers e Meredith (1997) determinaram a origem da casta Cabernet Sauvignon como tendo sido obtida pelo cruzamento entre Cabernet Franc e Sauvignon Blanc, através de uma bateria de microssatélites nucleares. No entanto, só a utilização de microssatélites cloroplastidiais permitiu identificar a casta Sauvignon Blanc como o progenitor feminino do cruzamento. Para além da determinação da direcção de um cruzamento entre variedades, a aplicação de microssatélites cloroplastidiais permite-nos obter informações acerca das relações filogenéticas entre as castas porque, ao contrário dos microssatélite nucleares que têm elevados ritmos de mutação, que provocam a eliminação de regiões comuns entre indivíduos, os microssatélites cloroplastidiais apresentam um ritmo de alteração da sua sequência muito baixo (regiões altamente conservadas) e integram o genoma cloroplastidial, onde praticamente o processo de recombinação não existe^[Arroyo-Garcia *et al.*, 2002].

Lefort *et al.* (2000), no primeiro trabalho publicado sobre a utilização destes marcadores em videira, testaram a utilidade de 5 marcadores universais de microssatélites

cloroplastidiais em 77 castas de videira, maioritariamente gregas, mas também de outras origens. A totalidade dos 5 microssatélites originou resultados reprodutíveis. Foram identificados no total 13 alelos cuja combinação segregou 17 haplotipos diferentes para as 77 castas testadas. Os autores referem a necessidade de confirmação do tipo de descendência maternal destes marcadores encontrada na maioria das gimnospérmicas. Esta confirmação surgiu pouco depois e foi efectuada por Arroyo-Garcia *et al.* (2002), pela aplicação de 3 *loci* microssatélites cloroplastidiais a cerca de 20 indivíduos obtidos de um cruzamento entre as castas Dominga (progenitor feminino) e Autumn Seedless (progenitor masculino). Esses mesmos três *loci* foram utilizados para determinar as relações genéticas entre 92 castas de videira provenientes de Espanha e da Grécia, originando um total de 7 alelos e 4 haplotipos diferentes (marcador × alelo). Curiosamente, os haplotipos mais frequentes em Espanha e na Grécia eram claramente diferentes, indiciando que estes dois locais foram centros isolados de domesticação de videiras.

Reiterando a existência de centros de domesticação secundários espalhados pelas várias regiões da Europa, Grassi *et al.* (2003) recolheram evidências de tal consideração. Também estes autores recorreram à comparação dos perfis obtidos usando seis marcadores cloroplastidiais do tipo microssatélite entre 23 variedades cultivadas de *Vitis vinifera* spp. *sativa*, incluindo um grupo de castas denominadas Lambrusco, e 29 silvestres de *Vitis vinifera* spp. *silvestris*. Apenas foram encontradas evidências de um segundo local de domesticação de videira na região de Nuoro, na Sardenha. Curiosamente, o grupo de castas Lambrusco, muito utilizadas em certas regiões de Itália, parece não estar relacionado quer com o grupo *silvestris* quer com o grupo *sativa* quando os investigadores consideravam esta variedade, apresentando características morfológicas idênticas às variedades silvestres, originárias da domesticação de videiras locais.

Costacurta *et al.* (2001), recorrendo a 25 marcadores cloroplastidiais do tipo microssatélite, analisam as relações filogenéticas entre 128 variedades Moscatel de videira. Para além de diversos casos de sinonímia esclarecidos, os autores identificaram três centros de difusão geográfica de variedades Moscatel, correspondendo aos genótipos de três variedades antigas de Moscatel: M. Giallo, M. Bianco e M. d'Alessandria.

5.3.3.5.4. ESCLARECIMENTO DE HOMONÍMIAS E SINONÍMIAS

Devido ao elevado poder discriminatório dos marcadores microssatélites nucleares, o facto de duas plantas, presumivelmente diferentes, apresentarem o mesmo perfil, é uma forte evidência de que estas plantas pertencem à mesma casta^[Seftic *et al.*, 2001]. Pelo contrário, se os perfis forem diferentes, as castas são, muito provavelmente, diferentes. Todavia, Ibáñez *et al.* (2000) alertaram para a possibilidade da existência de mutações nos marcadores microssatélite, que não afectem outros locais do genoma e, portanto, não são suficientes para alterar as características que definem a casta. É o caso de duas castas produtoras de uva de mesa – Black Currant e Mavri Corinthiaki – que são consideradas sinónimas e em 16 microssatélites estudados, apresentam um alelo diferente em apenas um *locus*. Os autores aconselham a não exclusão de determinada variedade de um determinado grupo apenas por uma mutação num só *locus* e consideram que apenas uma discrepância num *locus* pode ser o resultado de uma variação somática. Desde que o trabalho tenha um forte suporte histórico, este *locus* pode ser eliminado, não sendo contabilizado nos cálculos efectuados. Esta mesma indicação é transmitida no trabalho de Vouillamoz *et al.* (2003), referente à construção da árvore genealógica de algumas castas alpinas.

É, deste modo, evidente, a utilidade destes marcadores na identificação de castas que, embora tendo o mesmo nome, são diferentes (homonímia) e, também, castas que tendo nomes diferentes são a mesma (sinonímia). A resolução destes problemas de identificação de castas poderá ser mais facilmente conseguida se estiverem disponíveis bases de dados de perfis de marcadores microssatélite das castas pertencentes ao mesmo grupo. Por comparação com a base de dados, e através desta efectuar os necessários cálculos de probabilidade, poderá ser conseguida a inequívoca identificação. Na ausência de bases de dados adequadas, será necessário efectuar um estudo do grupo de castas em questão para que se fundamente a afirmação em alguns parâmetros estatísticos.

Durante a caracterização de grupos genéticos de castas de diferentes países, os autores têm confirmado casos de homonímias e sinonímias presumidos pelas técnicas ampelográficas e, por vezes, identificado novos casos. No Quadro 2.6 são apresentadas as referências encontradas na bibliografia a esclarecimentos de casos de denominação incorrecta das videiras.

O estudo de algumas denominações de grupos de castas – Malvasia e Torrontes^[Borrego *et al.*, 2002], Schiave^[Fossati *et al.*, 2001], Trebbiano^[Labra *et al.*, 2001] e mais frequentemente os Moscatéis (Muscats)^[Crepam e Milani, 2001] – são também uma interessante abordagem aos fenómenos de sinonímia. A denominação de grupos de castas, comum nalguns países, pode induzir erros de identificação. Com a excepção do referido caso do grupo Moscatel, todos os outros autores, para todos os outros grupos de castas, concluíram que a diversidade genética apresentada era elevada, o que parece contrariar a hipótese da existência de progenitores comuns às castas de um grupo. Deste modo, o nome dado ao grupo de castas está mais relacionado com práticas de viticultura ou com a distribuição geográfica do seu cultivo.

Quadro 2.6 – Casos de homonímias e sinonímias detectados pelos marcadores microsatélites.

*Casos anteriormente desconhecidos identificados apenas pelo recurso a marcadores moleculares.

Referência	Homonímias	Sinonímias	Número loci	PI
Crespan e Milani, 2001	-	(Moscato Bianco, Moscatello, Moscato Rosso, ...)* (Muscat d'Alexandria, Moscatel Blanco, Moscato Francese)* (Muscat of Hamburg, Moscatel Negro)*	25	-
Lopes <i>et al.</i> , 1999	(Arinto de Bucelas, Arinto do Douro)	(Fernão Pires, Maria Gomes) (Moscato de Setúbal, Muscat of Alexandria) (Boal Cachudo, Boal da Madeira, Malvasia Fina) (Síria, Crato Branco, Roupeiro) (Periquita, Castelão Francês, João Santarém, Trincadeira) (Arinto dos Açores, Esgana Cão)* (Verdelho da Madeira, Verdelho dos Açores, Verdelho Roxo)*	11	$7,4 \times 10^{-10}$
Meredith <i>et al.</i> , 1999	Petit Sirah	(Black Malvoisie, Cinsaut) (Mataro, Mourvedre)	1, complementado com resultados polimorfismos RFLP	-
Ulanovsky <i>et al.</i> , 2002	Monastell Miguel de Arco Moscatel Blanco Turruntés	(Maturana, Ribadavia)* (Monastrell, Concejón)* (Monastel, Moristell)* (Moscatel Almizclero, M. del País, M. Grano Menudo, M. Menudo, M. Fino, M. de la Tierra, M. Encarnado, Jaén Colorado)*	4	-
Vouillamoz <i>et al.</i> , 2003	Cornalin	(Humagne Rouge, Cornalin (Vale da Aosta))	50	$1,07 \times 10^{-24}$

Por sua vez, Crespan e Milani (2001) encontraram uma menor diversidade genética nas castas denominadas de Moscatel e distribuíram 64 castas em apenas 20 grupos (genótipos) diferentes, utilizando 25 microsatélites complementados com dois sistemas isoenzimáticos. Foram, assim identificados muitos casos de sinonímias, dos quais se apresentam alguns exemplos no Quadro 2.6. Acresce que, foram identificadas

duas castas das quais, com grande probabilidade, as outras descendem: o Moscato Bianco e o Muscat d'Alexandria, consideradas variedades muito antigas.

Os marcadores em questão também têm sido usados como ferramenta de verificação da correcta identificação das vinhas implantadas. É o caso de um trabalho de Hinrichsen *et al.* (2001) que utilizam 14 microssatélites para confirmar a identidade de três variedades – Carmenère, Cabernet Franc e Merlot - em vinhas do Chile, apesar da distinção morfológica destas castas já ser bastante evidente. De facto, praticamente todas as 93 plantas estavam correctamente denominadas, estando apenas 4 destas incorrectamente identificadas.

5.3.3.5.5. RECONSTRUÇÃO GENEALÓGICA DE CASTAS

Os marcadores do tipo microssatélite são os marcadores genéticos de eleição, quando se pretendem executar estudos para a determinação da genealogia de uma casta. A razão para tal reside no facto de, como anteriormente referido, estes marcadores serem transmitidos de um modo codominante. Uma casta possui, para cada *locus*, um alelo transmitido pelo progenitor feminino e outro pelo masculino^[Ilustração 2.5]. Consequentemente, cada alelo, de cada *locus* microssatélite, apresentado por um indivíduo é comum a um dos progenitores.

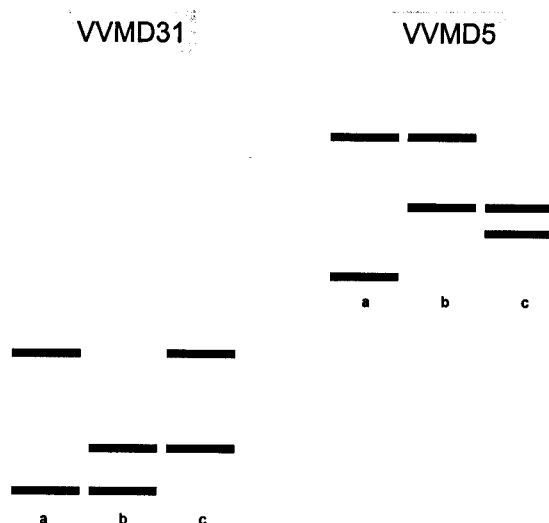


Ilustração 2.5 – Esquematização de um gel de acrilamida. As bandas representam alelos de microsatélite das castas (a) Cabernet Franc, (b) Cabernet Sauvignon e (c) Sauvignon Blanc para cada um dos loci indicados. (b) é descendente do cruzamento (a) x (c). Adaptado de Bowers e Meredith (1997).

Assim, comparando o perfil destes marcadores de um indivíduo e dos potenciais progenitores é possível concluir acerca de veracidade da paternidade. Para que se assegure um nível de confiança satisfatório na definição da paternidade, baseada apenas nos dados fornecidos por este tipo de marcadores, é necessário que se efectuem testes para um grande número de *loci*, de preferência não relacionados. Sefc *et al.*, 2001, recomendam a análise de pelo menos 25 *loci* microsatélite para se obterem resultados credíveis.

Um dos primeiros e mais surpreendentes estudos sobre genealogia de castas de videira foi realizado por Bowers e Meredith, em 1997, tendo por alvo de estudo a ascendência da casta Cabernet Sauvignon (CS). Esta casta, considerada a mais importante produtora de vinhos tintos a nível mundial, teve a sua origem na região de Bordéus, onde

é cultivada pelo menos desde o século XVII. Os autores analisaram 51 castas para 30 microssatélites e concluíram que a probabilidade de os alelos da casta Cabernet Sauvignon serem originários das castas Cabernet Franc e Sauvignon Blanc era cerca de 10^{14} vezes superior à probabilidade da casta ter quaisquer outros dois progenitores, combinados aleatoriamente (*rácio de probabilidade*).

Apesar de parcialmente homónimas, mas de um significado genérico - *sauvignon* significa selvagem - em parte do nome, a afirmação da casta Sauvignon Blanc como uma das progenitoras do CS causou alguma perplexidade visto esta ser uma casta branca e morfológicamente não aparentada à CS. Sefc *et al.* (1997), utilizando 14 *loci* microssatélite concluíram a mesma ascendência da casta CS, num trabalho publicado pouco tempo depois. Num outro trabalho realizado em 1999, Meredith *et al.*, tentaram esclarecer a identidade e ascendência da casta Petit Sirah (PS). Já tinham realizado alguns estudos inconclusivos, sobre esta casta, com marcadores RFLP – utilizados como base deste novo trabalho – onde tinham identificado vários casos de homonímia com esta casta, frequentemente confundida com as variedades morfológicamente aparentadas Peloursin (P) e Durif (D). No desenvolvimento do trabalho foi colocada a hipótese de a casta D ter sido originada de um cruzamento P×PS. Esta origem foi confirmada pelos cálculos efectuados com os resultados obtidos com 25 marcadores microssatélites.

Continuando os trabalhos sobre a origem genealógica de castas muito cultivadas actualmente, dois anos depois, o mesmo grupo de investigação publicou um trabalho esclarecedor, onde analisaram cerca de 300 variedades com 32 microssatélites em busca de cruzamentos desconhecidos^[Bowers *et al.* (1999)]. Deparam com fortes evidências genéticas de as castas Chardonnay, Gamay Noir, Aligoté e Melon, serem descendentes de apenas um par de progenitores, Pinot e Gouais Blanc, com probabilidades cerca de 10^{12} a 10^{15}

vezes superiores a qualquer outro par de progenitores. Num trabalho posterior, Bowers *et al.* (2000) relatam evidências da utilização da casta Gouais Blanc em pelo menos mais dois cruzamentos que terão originado as castas Aubin e Petit Meslier (Gouais Blanc×Savagnin) e Colombard, Meslier St.-François e Balzac Blanc (Gouais Blanc×Chenin). A casta Syrah foi também identificada como descendente de Mondeuse Blache×Dureza. Porém, neste trabalho os autores não apresentaram dados da probabilidade de ocorrência de tais cruzamentos, limitando-se a indicar que os mesmos estavam em preparação.

Por volta de 1997, outros grupos de investigação iniciaram a análise de colecções de germoplasma de videiras locais, no sentido do esclarecimento da ascendência de algumas delas. O grupo de investigação da Universität für Bodenkultur de Viena, Áustria, publicou alguns trabalhos^[Sefc *et al.*, 1997, 1998; Lopes *et al.*, 1999] onde são definidas as genealogias de algumas castas. Num dos trabalhos avaliam 51 castas utilizando 24 marcadores confirmando que a casta Cabernet Sauvignon era resultante de um cruzamento entre Cabernet Franc e Sauvignon Blanc, assim como outros 4 casos de castas Austríacas incluindo a Müller-Thurgau (Rheinriesling×Chasselas de Courtiller). Contudo, este último caso foi recentemente contestado por Dettweiler *et al.* (2000). Estes autores consideraram as castas Riesling e Madeleine Royale como as progenitoras da Müller-Thurgau. Dettweiler aponta os erros de identificação das plantas (neste caso a Chasselas de Courtiller) como a origem das diferentes conclusões entre os autores, pois encontram várias semelhanças fenotípicas entre Madeleine Royale e Müller-Thurgau. Os conhecimentos ampelográficos foram, neste caso, de grande utilidade quando coadjuvados com os marcadores moleculares. Avaliando 52 castas com 32 microsatélites o grupo de investigação de Sefc define, num dos seus trabalhos anteriores^[Sefc *et al.*, 1998c], e

noutro mais recentemente publicado^[Regner *et al.*, 2000], 4 cruzamentos responsáveis pela origem de 5 castas Autríacas (Silvaner, Rotgipfler, Neuburguer, Frühroter Veltliner e Jubiläumsrebe), com rácios de probabilidade de 10^{16} a 10^{20} . Apresentam, também, uma árvore genealógica envolvendo 9 castas cultivadas na mesma região, resultado da avaliação das complexas relações genéticas, com os referidos marcadores.

Também foi avaliado um grupo de 49 castas portuguesas, utilizando 11 marcadores, por este grupo Austríaco^[Lopes *et al.*, 1999]. Neste trabalho, essencialmente de avaliação dos parâmetros genéticos dos marcadores para o caso das castas portuguesas, foram esclarecidos alguns casos de sinonímia, como referido na secção anterior, e descoberta a ascendência da casta Boal Ratinho que teve origem no cruzamento Malvasia Fina × Síria. Para este cruzamento o rácio de probabilidade não foi avaliado, donde a dedução pode não se confirmar.

Com o fim de caracterizar alguns cruzamentos efectuados em Itália para melhoramento das castas locais, Malossini *et al.* (2000) analisaram os possíveis progenitores de 7 destes cruzamentos. Uma vez que existia um registo dos cruzamentos efectuados, os autores puderam compará-los com os resultados obtidos. Curiosamente, dos 7 cruzamentos, apenas os dados registados de 1 deles foi coincidente com os resultados da análise genética. Esta divergência foi considerada pelos autores como resultante de erros de identificação das castas pelo melhorador.

Vouillamoz *et al.* (2003) estudaram as relações genealógicas entre 6 castas alpinas, 3 suíças e 3 italianas. Para além dos casos de sinonímia e homonímia descritos na secção anterior, recorrendo a 50 microssatélites, os autores identificaram os seguintes cruzamentos e respectivos descendentes: Cornalin du Valais = Mayolet×Petit Rouge;

Goron = Cornalin du Valais $\times$? ; Cornalin d'Aosta = Cornalin du Valais $\times$?. As castas não identificadas poderão ter sido extintas. Estes dados foram concluídos com um rácio de probabilidade da ordem dos 10^{15} .

5.3.3.6. BASES DE DADOS DE PERFIS GENÉTICOS DE VARIEDADES DE VIDEIRA

Thomas *et al.* (1994a,b) foram os autores pioneiros a disponibilizar na Internet perfis de castas de videira obtidos a partir de marcadores de ADN microsatélite. Inicialmente, a base de dados reportava-se a cerca de 80 castas e 7 microsatélites nucleares – capazes de distinguir todas as castas – contemplando simultaneamente várias características morfológicas. Esta base de dados continha os seguintes campos: código da casta, origem clonal do material, localização da planta de onde a folha foi colhida, nome da casta, número do extracto de ADN usado na reacção de PCR e massa molecular dos alelos encontrados para cada um dos 7 pares de *primers*.

De modo a automatizar o processo, os autores referidos usaram *primers* marcados com fluoróforos cujos fragmentos amplificados eram separados em gel de acrilamida e analisados através de *software* adequado. Este determinava automaticamente o tamanho dos alelos, contrariamente ao que sucedia previamente à automatização do sistema, em que os alelos eram identificados por letras de uma forma aleatória. O modo codominante como estes marcadores se transmitem, permite a confirmação da paternidade de castas quando são analisados os pressupostos progenitores e descendentes. Estes autores analisaram grupos de castas nestas situações, questionando algumas antigas suposições de ascendência. Assim, a casta Aurelia provavelmente não foi originada pelo cruzamento entre Villard Blanc e Chaouch bem como a casta mais usada actualmente na Alemanha, Müller-Thurgau, não terá sido originada através de um cruzamento entre Riesling e

Sylvaner. Devido à sua vocação comercial, esta base de dados cedo se tornou de acesso restrito.

Tendo por modelo a referida base de dados, foi mais recentemente publicada a intitulada “Greek *Vitis* Database” (Lefort e Roubelakis-Angelakis, 2000). Esta base foi criada para facilitar a gestão dos recursos vitícolas que se encontram muito dispersos por toda a Grécia. Inclui dados obtidos não só a partir de perfis de microssatélites nucleares, mas também cloroplastidiais, uma base de dados combinada dos perfis obtidos com os dois tipos de marcadores referidos anteriormente, um banco de dados ampelográficos, e uma base de dados de porta-enxertos, totalizando seis bases de dados distintas, perfeitamente integradas se incluirmos ainda o banco de dados bibliográficos também disponibilizado.

Também o BAZ “Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof” através da rede Europeia “European Network for Grapevine Genetic Resources Conservation and Characterization GENRES #081” editou na internet a base de dados Europeia da Videira (European *Vitis* Database)^[Dettweiler, 2002]. Neste projecto GENRES #081, onde participaram cientistas de 19 países Europeus, desenvolveu um método uniformizado para a codificação dos alelos obtidos pela utilização de 6 marcadores de ADN microssatélite (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79). Apesar de, como já foi referido, uma das principais vantagens da utilização deste tipo de marcadores ser a possibilidade de expressão do perfil de uma casta em termos numéricos através da indicação das massas moleculares em pares de bases dos alelos para cada *locus* (e.g. *locus*: massa molecular do alelo 1: massa molecular do alelo 2), o desenvolvimento deste método de codificação tornou-se imperativo devido às grandes dificuldades encontradas na uniformização dos métodos de determinação das massas moleculares dos alelos,

usados pelos diversos laboratórios participantes. Os diversos participantes dos grupos utilizaram métodos e equipamentos tão diferentes como um gel de acrilamida com coloração pelo nitrato de prata e um sequenciador automático por electroforese capilar e marcação fluorimérica dos fragmentos amplificados. O método de uniformização desenvolvido, apesar de alguma carência de funcionalidade, foi a única forma de incluir neste projecto instituições com menores recursos laboratoriais mas detentoras de colecções de castas de inegável importância.

O referido método não numérico de uniformização da identificação dos fragmentos amplificados baseia-se na codificação dos alelos, não pela sua massa molecular mas por um código constituído por até 4 caracteres. Os 2 ou 3 primeiros caracteres são alfanuméricos e identificam a casta ou clone que originou o alelo seguidos dos algarismos 1 ou 2 que se referem, respectivamente, ao mais pequeno e maior alelo (*e.g.* CF1 corresponde ao alelo mais pequeno originado pela amplificação de ADN da casta Cabernet Franc com determinado par de *primers*). Os autores avaliaram e codificaram cerca de 46 castas de modo a abarcar todos os alelos possíveis, em intervalos de 2 unidades, *i.e.* entre o de menor massa molecular (contendo n pares de bases) e o de maior massa (correspondente a $n+x$ pares de bases). É aconselhado que o processo de amplificação e separação dos alelos decorra em simultâneo com os padrões, castas que foram usadas para a codificação.

A Vitis - International Variety Catalogue -, uma outra base de dados de grande interesse, compilada pelo Dr. E. Maul e Dr. R. Eibach do mesmo instituto BAZ "Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof", apesar de não contemplar qualquer tipo de informação genética, contém cerca de 16000 nomes de castas registados, o país de origem da variedade, a cor da baga, o tipo de utilização, a ocorrência e indicações de possíveis

sinónimos. Estão também disponíveis fotografias de ápices, folhas e cachos. É a maior compilação de informação sobre castas de videira a nível mundial abarcando 38 países e 128 colecções de videiras.

Thomas *et al.* (1994b) sugeriram o desenvolvimento de uma base de dados mundial para a descrição das castas e a avaliação das inter-relações genéticas que possibilitaria uma melhor gestão dos recursos da videira, a nível mundial, com a consequente melhoria da qualidade da produção vinícola. O esforço desenvolvido pelos grupos acima referidos resultou numa aproximação a tal objectivo, mas é necessária uma maior participação das instituições detentoras de colecções de videiras para que uma base de dados única e, à semelhança do exemplo Grego, de acesso gratuito e integrada com outros dados, possa esclarecer, definitivamente, todos os casos de sinonímia e homonímia a nível mundial.

5.3.3.7. AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP)

A técnica de AFLP foi desenvolvida por Vos *et al.* (1995). Baseia-se na amplificação selectiva de fragmentos de restrição obtidos pela digestão do extracto genómico total. Envolve, assim, três passos: (i) restrição do ADN e ligação dos oligonucleótidos adaptadores, (ii) amplificação selectiva de conjuntos de fragmentos de restrição e (iii) análise dos fragmentos amplificados em gel de acrilamida^[Ilustração 2.6]. Esta técnica combina a versatilidade e alto grau de polimorfismo dos marcadores RFLP com a capacidade de amplificação da reacção de PCR.

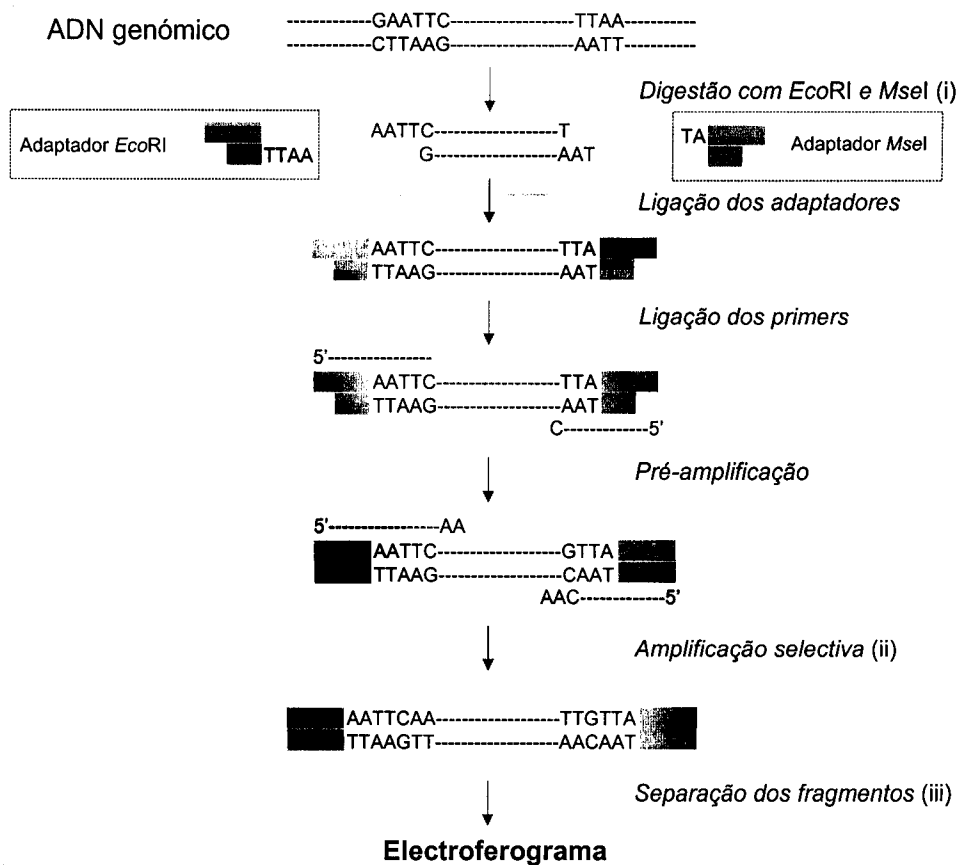


Ilustração 2.6 – Esquema do procedimento para análise por AFLP de genomas complexos.
Adaptado de Goto-Yamamoto, 1998

A amplificação selectiva dos fragmentos de restrição é conseguida usando a sequência do adaptador e do local de restrição como alvos de hibridação dos *primers*. Numa reacção de AFLP são utilizados, geralmente, dois *primers* que amplificam os fragmentos cortados pelas enzimas *EcoRI* e *MseI*. Cada um destes primers é constituído por três partes: uma sequência de base com cerca de 12 nucleótidos complementar à sequência dos adaptadores; uma sequência específica da enzima, complementar à sequência do local de corte da enzima; uma extensão selectiva de 1 a 4 nucleótidos (na

extremidade 3'), que controla o número de bandas amplificadas. Apenas os fragmentos que contenham uma sequência complementar com a da extensão, na região flanqueadora do local de restrição, serão amplificados.

Os fragmentos de restrição são geralmente gerados por duas enzimas de restrição com frequências de corte diferentes (uma de corte raro e outra frequente) o que resulta na amplificação preferencial dos fragmentos cujas extremidades foram originadas pelo corte com duas enzimas diferentes.

Existem duas abordagens diferentes da técnica conforme se pretende analisar genomas simples ou complexos. Sendo a videira um genoma complexo, a amplificação é executada em dois passos conforme o descrito por Vos *et al.* (1995). Num primeiro passo, designado de pré-amplificação, o ADN digerido é sujeito a uma amplificação com *primers* contendo apenas um nucleótido na zona de extensão selectiva. O produto de amplificação é diluído e usado numa segunda amplificação com *primers* cuja zona selectiva é constituída por três nucleótidos. Deste modo, os autores reduziram substancialmente a difusão de fundo que impedia uma correcta leitura dos géis e a pré-amplificação gera uma quantidade de ADN para análise teoricamente ilimitada.

5.3.3.8. DISCRIMINAÇÃO DE CASTAS POR AFLP

Esta técnica tem sido utilizada na distinção de castas e clones de videira, devido ao seu elevado poder de discriminação. A sua utilização não tem sido mais alargada talvez por causa de grande exigência técnica requerida para a sua realização.

As referências bibliográficas relativas à aplicação desta técnica à caracterização de castas e clones de videira são apresentadas no Quadro 2.7 assim como alguns parâmetros utilizados pelos autores e a eficiência do método.

Em todos os trabalhos referidos, e de acordo com as indicações de Vos *et al.* (1995), os extractos, após ligação dos adaptadores, foram submetidos a uma pré-amplificação com *primers* adicionados de um nucleótido na zona de extensão selectiva.

Quadro 2.7 – AFLP: adaptadores, primers e métodos de separação e visualização utilizados na análise de castas e clones de videira.

*Ligados a um resíduo de biotina para posterior enriquecimento do extracto para os fragmentos ligados a este adaptador. ^aPrimers marcados com radioisótopos. ^bPrimer marcado com o fluorocromo 5 Cy amidite.

Referência	Adaptadores	Primers+nucleótidos zona de extensão (número)	Castas e clones	Método separação e visualização
Cervera <i>et al.</i> , 1998	EcoRI MseI	EcoRI+3 ^a (2) MseI+3 (2)	67	Acrilamida Autoradiograma
Cervera <i>et al.</i> , 2000	EcoRI MseI	EcoRI+3 ^a (2) MseI+3 (2)	35	Acrilamida Autoradiograma
Cervera <i>et al.</i> , 2001	EcoRI MseI	EcoRI+3 ^a (2) MseI+3 (2)	28 (Albillo)	Acrilamida Autoradiograma
Fanizza <i>et al.</i> , 2003	EcoRI MseI	EcoRI+3 ^a (8) MseI+3 (8)	33	Acrilamida Autoradiograma
Fossati <i>et al.</i> , 2001	MseI PstI*	MseI+3 (3) PstI+3 (3) dCTP marcado com ³³ P	33 (Schiave)	Acrilamida Autoradiograma
Goto-Yamamoto <i>et al.</i> , 2000	EcoRI MseI	EcoRI+2 ^a (2) MseI+2 (2)	16 (<i>V. vinifera</i> , <i>V. Labrusca</i> , <i>V. ficifolia</i> , <i>V. coignetiae</i>)	Acrilamida Autoradiograma
Imazio <i>et al.</i> , 2002	EcoRI MseI	EcoRI+3 ^a (3) MseI+3 (3)	24 (clones Traminer) 9 castas	Acrilamida Autoradiograma
Labra <i>et al.</i> , 1999	EcoRI* MseI	EcoRI+3 ^a (2) MseI+3 (3)	68	Acrilamida Autoradiograma
Labra <i>et al.</i> , 2001	EcoRI* MseI	EcoRI+3 ^a (2) MseI+3 (3)	24 (Trebbiano)	Acrilamida Autoradiograma
Martínez-Zapater <i>et al.</i> , 2000	EcoRI MseI	EcoRI+3 ^a (2) MseI+3 (6)	23	Acrilamida Autoradiograma
Scott <i>et al.</i> , 2000	EcoRI MseI	EcoRI+2 (8) MseI+3 (8)	4 (3 Flame Seedless e um mutante somático)	Acrilamida Coloração pela prata
Sensi <i>et al.</i> , 1996	EcoRI* MseI	EcoRI+3 (3) MseI+3 (4)	19	Acrilamida Coloração pela prata
Vignani <i>et al.</i> , 2002	EcoRI MseI	EcoRI ^b MseI+CAA	25 (Sangiovese)	Acrilamida Fluorescência

Na generalidade dos trabalhos, a distinção de castas de videira é facilmente conseguida. Muitos autores^[Cervera *et al.*, 1998; Cervera *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000; Vignani *et al.*, 2002; Imazio *et al.*, 2002] analisam em simultâneo com esta técnica alguns clones e apresentam resultados interessantes, talvez devido ao facto da técnica permitir, de uma forma específica, a detecção de polimorfismos (mutações) em milhares de *loci* simultaneamente. Cervera *et al.* (1998), tendo conseguido a distinção de alguns clones cujo processo de divergência era antigo, referem-se às grandes vantagens que podiam advir da transformação das bandas polimórficas dos clones em marcadores SCAR. Esta técnica poderia resultar no desenvolvimento de métodos mais simples de PCR para rastreio da variabilidade de clones. Os mesmos autores^[Cervera *et al.*, 2000], analisando 35 castas, conseguem a sua distinção com apenas uma reacção AFLP (uma combinação de *primers*) através da identificação de 50 bandas polimórficas, demonstrando a elevada capacidade de geração de polimorfismos destes marcadores.

Scott *et al.* (2000) apresentaram a primeira referência à distinção efectiva de uma mutação somática com marcadores moleculares. Para tal, testaram 64 combinações de *primers* que contrastam com o pequeno número de combinações anteriormente usadas. Destas 64 combinações, duas geraram um marcador cada (banda polimórfica) presente ou na mutação somática ou na casta original. Ficou deste modo comprovada a utilidade destes marcadores no rastreio de mutações somáticas, para discriminação de clones, sendo necessário, para tal, a utilização de um grande número de combinações de *primers*.

Cervera *et al.* (2001) analisaram 28 castas com a denominação comum Albillo com 43 descritores morfológicos, 4 sistemas enzimáticos e 2 combinações de *primers* AFLP. Apenas os marcadores AFLP foram capazes de discriminar as castas geneticamente mais próximas e alguma variabilidade intravarietal na discriminação de

clones. Imazio *et al.* (2002) confirmaram a capacidade dos marcadores AFLP ao distinguirem clones. Em 24 clones de Traminer apenas 8 apresentaram perfis de bandas AFLP idênticos, tendo os outros sido distinguidos embora com coeficientes de similaridade de 97%.

Como se pode concluir pelas referências citadas, a maioria dos autores que utilizam marcadores AFLP fazem-no no sentido da tentativa de discriminação de castas geneticamente próximas. Também Fanizza *et al.* (2003) usam estes marcadores para a avaliação das relações genéticas entre variedades aromáticas como Malvasia, Moscato e Fiano. A proximidade encontrada entre as castas grupo Moscato é bastante maior que a apresentada pelo grupo Malvasia, bastante mais heterogéneo.

5.3.4. OUTROS MARCADORES

Outros marcadores moleculares têm sido objecto de experimentação relativamente à sua utilidade na discriminação de castas ou clones de videira. A expressão dos trabalhos realizados com estes marcadores não é tão forte como para aqueles que até aqui foram descritos. Por este motivo, estas técnicas serão apenas brevemente referidas nas secções seguintes.

5.3.4.1. PCR-RFLP

A técnica de PCR-RFLP baseia-se na procura de polimorfismos dos fragmentos de restrição, obtidos pela digestão dos fragmentos amplificados com *primers* específicos. Geralmente, estes *primers* são específicos de uma região conservada entre os indivíduos em estudo. Todavia, no espaço compreendido entre as sequências de hibridação dos

primers existem, entre os diferentes indivíduos, polimorfismos de sequência que podem ser detectados pela digestão com enzimas de restrição, originando fragmentos de tamanhos diferentes, que podem ser facilmente separados em gel de agarose.

No único trabalho encontrada, utilizando esta técnica na detecção de polimorfismos em videira^[Bourquin *et al.*, 1995], os *primers* específicos foram desenhados através da sequenciação de fragmentos de pequeno tamanho, obtidos pela digestão de ADN genómico da casta Chardonnay, com a enzima *Pst*I, utilizados como sondas em estudos anteriores de RFLP pelos mesmos autores. Os autores aplicaram os 4 pares de *primers* desenvolvidos, combinados com 3 enzimas de restrição, à detecção de polimorfismos em 17 variedades de porta-enxertos, tendo conseguido, com as combinações mais polimórficas, a distinção de 6 variedades.

5.3.4.2. INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR)

Esta técnica, desenvolvida por Wu *et al.* (1994) e Zietkiewicz *et al.* (1994), baseia-se na amplificação de ADN genómico com apenas um *primer* composto por uma sequência microssatélite (repetitiva) e uma pequena sequência arbitrária chamada *anchor*, com cerca de 18 pbs. Este *primer* hibrida em regiões microssatélite de sequência complementar e amplifica a região compreendida entre dois microssatélites adjacentes, próximos e de orientação oposta. O produto amplificado, depois de separado em acrilamida, origina um perfil complexo de bandas. Foram propostas outras designações para o método: ISSR-PCR e RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphism). Este método tenta explorar a variabilidade elevada das regiões microssatélite sem necessidade de sequenciação, dispendiosa e morosa, da região em estudo para o desenvolvimento de *primers*.

Moreno *et al.* (1998), usando seis *primers* ISSR, aplicaram esta técnica a 12 clones de Garnacha e uma variedade relacionada, a Alicante. Não foram detectadas diferenças intra-varietais. Todavia, estes marcadores mostraram-se úteis na discriminação das duas castas, originando perfis de bandas reprodutíveis principalmente quando se usavam géis de acrilamida para a separação de fragmentos e as bandas de fraca intensidade eram rejeitadas.

5.3.4.3. REGIÕES 5' NÃO TRANSCRITAS DO GENE StSy

O gene *StSy* é o responsável pela síntese das substâncias antecedentes do estilbeno, molécula base de muitos compostos polifenólicos, que conferem à planta resistência a alguns agentes patogénicos (fitoalexinas), nomeadamente fungos. Geuna *et al.* (1997) isolaram e sequenciaram regiões 5' a montante do gene *StSy* que verificaram conter reminiscências de microssatélites. Desenharam, a partir destas regiões, 6 *primers* que, usados em combinação, possibilitaram a detecção de polimorfismos em 22 castas de videira originárias de várias regiões de Itália. Duas combinações de *primers* mostraram-se particularmente úteis, originando um complexo padrão de bandas polimórficas de tamanho entre 130 e 3000 bps contendo 11 e 13 bandas polimórficas que possibilitaram a distinção das variedades estudadas e a construção de um dendrograma reflectindo as relações entre as castas. Este tipo de marcadores não foi posteriormente utilizado por outros autores, provavelmente devido à forte implementação dos marcadores microssatélite que apresentam graus de polimorfismo bastante mais elevados.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os vários investigadores que apresentam os dados, obtidos pela utilização de marcadores moleculares, tratados estatisticamente, não são unânimes na selecção dos algoritmos que utilizam. A existência de um grande número de possíveis abordagens ao tratamento estatístico de dados deste tipo, em nada contribui para uma desejada uniformização dos métodos utilizados. Esta uniformização, a existir, permitiria que outros investigadores pudessem comparar os seus resultados de uma forma mais segura.

O Quadro 2.8, que a seguir se apresenta, pretende mostrar a diversidade de métodos de análise de dados, utilizados pelos investigadores. Nem todos os autores submetem os seus dados e este tipo processamento, pelo que alguns trabalhos anteriormente citados não serão referidos.

A obtenção dos resultados sob a forma de um gráfico (normalmente um dendrograma) segue, geralmente, a seguinte ordem: (1) os dados compilados sob a forma de uma matriz binária, de ausência ou presença de determinada banda polimórfica, são analisados e a distância genética entre cada par de indivíduos analisados são calculadas, resultando numa matriz de distâncias; (2) a matriz de distância é usada para se agruparem as amostras de acordo com a sua similaridade. Como resultado é obtido uma representação gráfica desses agrupamentos que permite uma rápida análise visual por parte do leitor.

Quadro 2.8 – Métodos de cálculo de distâncias, de agrupamento e software utilizados na análise dos dados fornecidos pelos marcadores moleculares.

n.i.: não indicado pelos autores; ^aprograma desenvolvido pelos investigadores; ^bmódulos de software do pacote PHYLIP; ^ccálculos efectuados pelo software gratuitoMICROSAT.

Referência	Marcador	Cálculo das distâncias	Método de agrupamento	Software utilizado
Bowers e Meredith, 1996	RFLP	Coeficiente de Dice	UPGMA	NTSYS
Paludetti <i>et al.</i> , 1996	RFLP Isoenzimas	n.i.	n.i.	n.i.
Goto-Yamamoto <i>et al.</i> , 1998	RFLP RAPD	Coeficiente de Dice	UPGMA	n.i.
Tschammer e Zyprian, 1994	RAPD	<i>Rapid</i> ^b	Nöbauer e Timischil ^a	n.i. ^a
This <i>et al.</i> , 1997	RAPD	Coeficiente de Jaccard Coeficiente 'Simple matching'	UPGMA	PHYLIP
Grando <i>et al.</i> , 1995	RAPD	n.i.	n.i.	NTSYS
Stavarakakis e Biniari, 1998	RAPD	n.i.	n.i.	NTSYS
Ye <i>et al.</i> , 1998	RAPD	Coeficiente de Dice	n.i.	NTSYS
Ulanowsky <i>et al.</i> , 2001	RAPD	Coeficiente de Dice	UPGMA	NTSYS
Faraj <i>et al.</i> , 2000	RAPD	Coeficiente de Nei	UPGMA	NTSYS
Pellerone <i>et al.</i> , 2001	Microsatélite	GENEDIST ^b	NEIGHBOR ^b	PHYLIP
Di-Gaspero <i>et al.</i> , 2000	Microsatélite	n.i.	Neighbor-Joining	CLUSTALX
Sefc <i>et al.</i> , 1998a	Microsatélite	- log (proporção dos alelos partilhados) ^c	Kitsch ^b	PHYLIP
Lefort e Roubelakis-Angelakis, 2001	Microsatélite	- log (proporção dos alelos partilhados) ^c	Kitsch	PHYLIP
Lopes <i>et al.</i> , 1999, 2000	Microsatélite	- log (proporção dos alelos partilhados) ^c	UPGMA	PHYLIP
Pollefeys e Bousquet, 2003	Microsatélite	- log (proporção dos alelos partilhados) ^c	UPGMA	PHYLIP
Imazio <i>et al.</i> , 2002	AFLP	Coeficiente de Jaccard	UPGMA	GENESTAT
Goto-Yamamoto, 2000	AFLP	Coeficiente de Dice	UPGMA	n.i.
Sensi <i>et al.</i> , 1996	AFLP	Coeficiente de Jaccard	UPGMA	NTSYS
Labra <i>et al.</i> , 1999	AFLP Microsatélite	Coeficiente de Jaccard	UPGMA	SPSS
Cervera <i>et al.</i> , 1998	AFLP	Coeficiente de Dice	UPGMA	NTSYS
Cervera <i>et al.</i> , 1998	AFLP Isoenzimas	Coeficiente de Dice	UPGMA	NTSYS
Geuna <i>et al.</i> , 1997	StSy-CHS	Coeficiente de Dice	UPGMA	STATISTICA

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de conservação das amostras no campo encontradas na bibliografia têm-se desenvolvido no sentido de evitar a utilização de azoto líquido que, apesar da sua grande eficácia, acarreta enormes desvantagens, designadamente no que diz respeito ao peso e volume a transportar.

As metodologias extractivas de ADN, a fonte do material a submeter à análise pelos marcadores moleculares, parecem evoluir no sentido da utilização de reagentes cada vez menos tóxicos, em volumes extremamente pequenos (microescala) tendo, em alguns casos, sido possível a eliminação dos reagentes orgânicos do processo quando se recorreu a técnicas de extracção em fase sólida.

De entre os numerosos marcadores moleculares referidos, os marcadores do tipo microsatélite provaram ser extremamente úteis para a identificação inequívoca de castas de videira, resolvendo casos de sinonímia complicados, esclarecendo as relações genéticas entre as castas, etc. Provavelmente o leque de aplicações deste tipo de marcadores irá alargar-se cada vez mais. Mais difícil será adivinhar por quanto tempo serão os marcadores de ADN microsatélite preferidos em relação a outros que venham a ser conseguidos mas, de qualquer modo, permanecerão como os marcadores de excelência que proporcionaram a obtenção de uma enorme quantidade de informação precisa e de grande utilidade em tão curto lapso.

8. BIBLIOGRAFIA

- Ablett, E. M., Lee, L. S., Henry, R. J., (1998). Analysis of grape ESTs. *Acta. Hort.*, 528, 273-275
- Adam-Blondon, A-F., Roux, C., Claux, D., Butterlin, G., Merdinoglu, D., This, P. (2004). Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theor. Appl. Genet.*, 109, 1017-1027
- Arroyo-García, R., Lefort, F., Andrés, M. T., Ibáñez, J. B., Jouve, N., Cabello, F., Martínez-Zapater, J. M. (2002). Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species. *Genome*, 45, 1142-1149
- Basic Understanding of Genetics*. Consultado em Maio de 2005 em Mount Sinai Hospital: <http://www.mtsinai.on.ca/pdmg/Genetics/basic.htm>
- Bauer, F., Zyprian, E. (1997). Identification of grapevine rootstock cv. Börner and differentiation of 125 AA from 5 BB and SO4. *Vitis*, 36, 185-189
- Böhm, A., Zyprian, E. (1998). RAPD marker in grapevine (*Vitis spp.*) similar to plant retrotransposons. *Plant Cell Rep.*, 17, 415-421
- Borrego, J., Andrés, M. T., Gómez, J. L., Ibáñez, J. (2002). Genetic study of Malvasia e Torrontes groups through molecular markers. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 125-130
- Borrego, J., Rodriguez, I., Andrés, M. T., Martin, J., Chavez, J., Cabello, F., Ibáñez, J. (2001). Characterisation of the most important Spanish grape varieties through isozyme and microsatellite analysis. *Acta Hort.*, 546, 371-375
- Botta, R., Scott, N. S., Eynard, I., Thomas, M. R. (1995). Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. *Vitis*, 34, 99-102
- Bourquin, J. C., Otten, L., Walter, B. (1991). Identification of grapevine rootstocks by RFLP. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 312, 593-598
- Bourquin, J. C., Otten, L., Walter, B. (1993). Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L., *Theoret. Appl. Genet.*, 87, 431-438
- Bourquin, J. C., Otten, L., Walter, B. (1995). PCR-RFLP analysis of *Vitis*, *Ampelopsis* and *Parthenocissus* and its application to the identification of rootstocks. *Vitis*, 34, 103-108
- Bourquin, J. C., Tournier, P., Otten, L., Walter, B. (1992). Identification of sixteen grapevine rootstocks by RFLP and RFLP analysis of nuclear DNA extracted from the wood. *Vitis*, 31, 157-162
- Bowers, J. E., Bandman, E. B., Meredith, C. P. (1993). DNA fingerprinting characterization of some wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 266-274
- Bowers, J. E., Boursiquot, J-M., This, P., Chu, K., Johansson, H., Meredith, C. (1999b). Historical genetics: The parentage of Chardonay, Gamay, and other wine grapes of the northeastern France. *Science*, 285, 1562-1565
- Bowers, J. E., Dangl, G. S., Meredith, C. P. (1999a). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 243-246
- Bowers, J. E., Dangl, G. S., Vignani, R., Meredith, C. P. (1996a). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39, 628-633
- Bowers, J. E., Meredith, C. P. (1994). Microsatellite length polymorphism within ancient wine grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *International Plant genome II conference*, San Diego, EUA, Janeiro
- Bowers, J. E., Meredith, C. P. (1996b). Genetic similarities among wine grape cultivars revealed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121, 620-624

- Bowers, J. E., Meredith, C. P. (1997). The parentage of a classical wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nat. Genet.*, 16, 84-87
- Bowers, J. E., Siret, R., Meredith, C. P., This, P., Boursiquot, J. M. (2000). A single pair of parents proposed for a group of grapevine varieties in the northeastern France. *Acta Hort.*, 528, 129-132
- Büscher, N., Zyprian, E., Bachmann, O., Blaich, R. (1994). On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis*, 33, 15-17
- Büscher, N., Zyprian, E., Blaich, R. (1993). Identification of grapevine cultivars by RAPD analysis: Pitfalls of Random Amplified DNA techniques using 10mer primers. *Vitis*, 32, 187-188
- Caetano-Annoles, G. (1994). A versatile and universal tool for genome analysis. *Plant Mol. Biol.*, 25, 1011-1026
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Philips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C., Sutherland, G. R. (1993). Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Human Genet.*, 52, 922-927
- Campbell, M. A. (2001). RFLP method – Restriction Fragment Length Polymorphism. Consultado em Março de 2005 em Davidson College: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.html>
- Cervera, M. T., Cabezas, J. A., Sánchez-Escribano, E., Cenis, J. L., Martínez-Zapater, J. M. (2000). Characterization of genetic variation within table grape varieties (*Vitis vinifera* L.) based on AFLP markers. *Vitis*, 39, 109-114
- Cervera, M.-T., Cabezas, J. A., Sancha, J. C., Martínez de Toda, F., Martínez-Zapater, J. M. (1998). Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.*, 97, 51-59
- Cervera, M.-T., Rodriguez, I., Cabezas, J. A., Chavez, J., Martínez-Zapater, J. M., Cabello, F. (2001). Morphological and molecular characterization of grapevine accessions known as Albillo. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 127-135
- Chase, M. W., Hills, H. H. (1991). Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, 40, 215-220
- Cho, Y. G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S. R., Park, W. D., Ayres, N., Cartinhour, S. (2000). Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 100, 713-722
- Cipriani, G., Frazza, G., Peterlunger, E., Testolini, R. (1994). Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. *Vitis*, 33, 211-215
- Collins, G. G., Symons, R. H. (1993). Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11, 105-112
- Costacurta, A., Calò, A., Crespan, M., Milani, M., Carraro, R., Aggio, L., Flamini, R., Ajmone-Marsan, P. (2001). Caractérisation morphologique, aromatique e moléculaire des cépages de Moscazo et recherches sur leurs rapports phylogénétiques. *Bulletin O.I.V.*, 74, 133-150
- Crespan, M. (2004). Evidence of the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 231-237
- Crespan, M., Milani, N. (2001). The Muscats: A molecular analysis of synonyms, homonyms and Genetic relationships within a large family of Grapevine cultivars. *Vitis*, 40, 23-30
- Dallas, J. F. (1992). Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*, 3, 452-456
- Dangl, G. S., Mendum, M. L., Prins, B. H., Walker, M. A., Meredith, C. P., Simon, C. J. (2001). Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: A tool for managing a grape germplasm collection. *Genome*, 44, 432-438

- Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.*, 1, 19-21
- Delseny, M., Iaroche, M., Penon, P. (1983). Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116, 113-120
- Dettweiler, E. (2002). European Vitis Database. Consultado em Março de 2005 em German Centre for Documentation and Information in Agriculture: <http://www.genres.de/eccdb/vitis/>
- Dettweiler, E., Jung, A., Zyprian, E., Töpfer, R. (2000). Grapevine cultivar Müller-Thurgau and its true to type descendent. *Vitis*, 39, 63-65
- Dib, C., Fauré, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A. et al. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature*, 380, 152-154
- Dietrich, W. F., Miller, J., Steen, R., Merchant, M. A., Damron-Boles, D., Husain, Z. et al. (1996). A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, 380, 149-152
- Di-Gaspero, G., Peterlunger, E., Testolini, R., Edwards, K. J., Cipriani, G. (2000). Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. *Theor. Appl. Genet.*, 101, 301-308
- Doligez, A., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S., Meredith, C. P., Edwards, K. J., This, P. (2002). Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor. Appl. Genet.*, 105, 780-795
- Doucleff, M., Jin, Y., Gao, F., Riaz, S., Krivanek, A. F., Walker, M. A. (2004). A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. *Theor. Appl. Genet.*, 109, 1178-1187
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15
- Eiras-Dias, J. E., Bruno-Sousa, R. (1998). Isoenzymatic polymorphism differentiation of portuguese grapevine cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 86-90
- Eisen, J. A. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In Goldstein, D. B., Schlöterer, C. (Ed.) *Microsatellites: Evolution and applications*, (pp. 1-9). Oxford: Oxford University Press.
- European Vitis Database. Consultado em Março de 2005, em GENRES: German Center for Documentation and Information in Agriculture: <http://www.genres.de/eccdb/vitis/>
- Fang, G., Hammar, S., Rebecca, R. (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *BioTechniques*, 13, 52-56
- Fanizza, G., Chaabane, R., Lamaj, F., Ricciardi, L., Resta, P. (2003). AFLP analysis of genetic relationships among aromatic grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 107, 1043-1047
- Fanizza, G., Corona, M.G., Resta, P. (2000). Analysis of genetic relationships among Muscat grapevines in Apulia (South Italy) by RAPD markers. *Vitis*, 39, 159-161
- Faraj, S., Sánchez-Escribano, E., Ortiz, J. M., Cenis, J. L. (2000). Evaluation of genetic diversity of grapevine cultivars grown in Morocco with RAPD-PCR. *Acta Hort.*, 528, 169-176
- Filipetti, I., Silvestroni, O., Thomas, M. R., Intrieri, C. (1999). Diversity assessment of seedlings from self-pollinated Sangiovese grapevines by ampelography and microsatellite DNA analysis. *Vitis*, 38, 67-71
- Fossati, T., Labra, M., Castiglione, S., Failla, O., Scienza, A., Sala, F. (2001). The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave". *Theor. Appl. Genet.*, 102, 200-205
- Franks, T., Botta, R., Thomas, M. R. (2002). Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 192-199
- Geuna, F., Scienza, A., Hartings, H. (1997). Discrimination between cultivars of *Vitis vinifera* based on molecular variability concerning 5' untranslated regions of the StSy-CHS genes. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 375-383

- Geuna, F., Scienza, A., Hartings, H. (2000). Discrimination of clones of *Vitis vinifera* L. based on the polymorphism of stilbene synthase-chalcone synthase 5' untranslated genomic regions. *Acta Hort.*, 528, 257-261
- González-Techera, A., Jubany, S., Ponce de León, I., Boido, E., Dellecassa, E., Carrau, F. M., Hinrichsen, P., Gaggero, C. (2004). Molecular diversity within clones of cv. Tanatt (*Vitis vinifera*). *Vitis*, 43, 179-185
- Goto-Yamamoto, N. (1997). DNA analysis of Kosshu-Sanjaku, Riesling, and their cross cultivars. *J. ASEV Jpn.*, 8, 8-13
- Goto-Yamamoto, N. (1998). Effect of the concentration of restriction enzyme on AFLP analysis in grape, and differentiation of Pinot noir e Pinot blanc by AFLP analysis. *J. ASEV Jpn.*, 9, 83-88
- Goto-Yamamoto, N. (2000). Phenetic clustering of grapes (*Vitis* spp.) by AFLP analysis. *Breeding Sci.*, 50, 53-57
- Goto-Yamamoto, N., Mochioka, R., Bonian, L., Hashizume, K., Umeda, N., Horiuchi, S. (1998). RFLP and RAPD análisis of wild and cultivated grapes (*Vitis* spp.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 67, 483-490.
- Grando, M. S., De-Micheli, L., Biasetto, L., Scienza, A. (1995). RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. *Vitis*, 34, 37-39
- Grando, M. S., Frisinghelli, C. (1998a). Grape microsatellite markers: Sizing of DNA alleles and genotype analysis of some grapevine cultivars. *Vitis*, 37, 79-82
- Grando, M. S., Frisinghelli, C. (1998b). Biodiversity of the ancient trentino grapevine germplasm. *Acta Hort.*, 457, 143-148
- Grando, M. S., Frisinghelli, C., Stefanini, M. (2000a). Genotyping of local grapevine germplasm. *Acta Hort.*, 528, 183-187
- Grando, M. S., Frisinghelli, C., Stefanini, M. (2000b). Polymorphism and distribution of molecular markers in a segregating population derives from the cross Moscato bianco x *Vitis* Riparia. *Acta Hort.*, 528, 209-213
- Grassi, F., Imazio, S., Failla, O., Scienza, A., Ocete Rubio, R., Lopez, M. A., Sala, F., Labra, M. (2003). Genetic isolation and diffusion of wild grapevine Italian and Spanish populations as estimated by nuclear and chloroplast SSR analysis. *Plant Biol.*, 5, 1-7
- Grassi, F., Labra, M., Imazio, S., Spada, A., Sgorbati, S., Scienza, A., Sala, F., (2003a). Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 107, 1315-1320
- Guerra, B., Meredith, C. P. (1995). Comparision of *Vitis* Berlandieri x *Vitis* riparia rootstocks cultivars by restriction fragmente length polymorphism analysis. *Vitis*, 34, 109-112
- Hancock, J. M. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In Goldstein, D. B., Schlöterer, C. (Ed.) *Microsatellites: Evolution and applications*, (pp. 1-9). Oxford: Oxford University Press.
- Harding, K. e Roubelakis-Anhelakis, K.A. (1994). The isolation and purification of DNA from *Vitis vinifera* L. plants and in vitro cultures. *Vitis*, 33, 247-248
- Hinrichsen, P., Narváez, C., Bowers, J. E., Boursiquot, J. M., Valenzuela, J., Muñoz, C., Meredith, C. P. (2001). Distinguishing Carmenère from similar cultivars by DNA typing. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 396-399
- Hinrichsen, P., Narváez, C., Valenzuela, J., Bowers, J. E., Meredith, C. P. (2000). Fingerprinting of grape cultivars grown in Chile: Comparison of the methods based on anonymous sequences and a set of microsatellite loci. *Acta Hort.*, 528, 161-167
- Hocquigny, S., Pelsy, F., Dumas, V., Kindt, S., Heloir, M-C., Merdinoglu, D. (2004). Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome*, 47, 579-589

- Ibáñez, J., Andrés, M. T., Borrego, J. (2000). Allelic variation observed at one microsatellite locus between the two synonym grape cultivars Black Currant and Mavri Corinthiaki. *Vitis*, 39, 173-174
- Ibáñez, J., van Eeuwijk, F. A., (2003). Microsatellite profiles as a basis for intellectual property protection in grape. *Acta Hort.*, 603, 41-47
- Imazio, S., Labra, M., Grassi, F., Winfield, M., Bardini, M., Scienza, A. (2002). Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar 'Traminer'. *Plant Breeding*, 121, 531-535
- Jean-Jaques, I., Defontaine, A., Hallet, J. N. (1993). Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Vitis*, 32, 189-190
- Jobes, D. V., Hurley, D. L., Thien, L. B. (1995). Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon*, 44, 379-386
- Jones, A. S. (1953). The isolation of bacterial nucleic acids using cetyltrimethylammonium bromide (Cetavlon). *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 607-612
- Labra, M., Carreño-Sánchez, E., Bardini, M., Basso, B., Sala, F., Scienza, A. (2001). Extraction and purification of DNA from grapevine leaves. *Vitis*, 40, 101-102
- Labra, M., Failla, O., Fossati, T., Castiglione, S., Scienza, A., Sala, F. (1999). Phylogenetic analysis of grapevine cv. Ansonica growing on the island of Giglio, Italy, by AFLP and SSR markers. *Vitis*, 38, 161-166
- Labra, M., Winfield, M., Ghiani, A., Grassi, F., Sala, F., Scienza, A., Failla, O. (2001a). Genetic studies on Trebbiano and morphologically related varieties by SSR and AFLP markers. *Vitis*, 40, 187-190
- Lahogue, F., This, P., Bouquet, A. (1998). Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.*, 97, 950-959
- Lamboy, W. F., Alpha, C. G. (1998). Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis L.*) species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 123, 182-188
- Lefort, F., Andizei, M., Roubelakis-Angelakis, K. A., Vendramin, G. G. (2000). Characterization of grapevine with universal chloroplast microsatellite markers. *Book of abstracts of the 6th International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology*, Heraklion, Grécia, 11-16 Junho. pp. 200
- Lefort, F., Kyvelos, C. J., Zervou, M., Edwards, K. J., Roubelakis-Angelakis, A. (2002). Characterization of new microsatellite loci from *Vitis vinifera* and their conservation in some *Vitis* species and hybrids. *Mol. Ecol. Notes*, 2, 20-21
- Lefort, F., Roubelakis-Angelakis, K. A. *Greek Vitis Database*. Consultado em Março de 2005 em Laboratory of Plant Physiology and Biotechnology, Department of Biology, University of Crete: <http://www.biology.uoc.gr/gvd/>
- Lefort, L., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2000). The Greek Vitis database, a multimedia web-backed genetic database for germplasm management of Vitis resources in Greece. *J. Wine Res.*, 11, 233-242
- Lefort, L., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2001). Genetic comparison of Greek cultivars of *Vitis vinifera* L. by nuclear microsatellite profile. *Am. J. Enol. Vitic*, 52, 101-108
- Levison, G., Gutman, G. A. (1987). High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nuc. Acids Res.*, 15, 5323-5338
- Lodhi, M. A., Weeden, N. F., Reisch, B. I. (1997). Characterization of RAPD markers in Vitis. *Vitis*, 36, 133-140
- Lodhi, M. A., Ye, G.-N., Weeden, F., Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 12, 6-13

- Lohdi, M. A., Daly, M. J., Ye, G.-N., Weeden, N. F., Reish, B. I. (1995). A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome*, 38, 786-794
- Lohdi, M. A., Weeden, N. F., Reish, B. I. (1997). Characterization of RAPD markers in *Vitis*. *Vitis*, 36, 133-140
- Lopes, M. S., Câmara-Machado, A., Steinkellner, H., Sefc, K. M., Câmara-Machado, L., (2000). Genotyping of *Vitis* cultivars used for the production of VQPRD and VLQPRD in the Azores by microsatellite markers. *Acta Hort.*, 528, 189-192
- Lopes, M. S., Sefc, K. M., Eiras-Dias, E., Steinkellner, H., Câmara-Machado, L., Câmara-Machado, A. (1999). The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. *Theor. Appl. Genet.*, 99, 733-739
- Loureiro, M. D., Martínez, M. C., Boursiquot, J.-M., This, P. (1998). Molecular marker analysis of *Vitis vinifera* 'Albariño' and some similar grapevine cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 123, 842-848
- Maliyakal, E. J. (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.*, 20, 2381
- Malossini, U., Grando, M. S., Roncador, I., Mattivi, F. (2000). Parentage analysis and characterization of some Italian *Vitis vinifera* crosses. *Acta Hort.*, 528, 139-145
- Martínez-Zapater, J. M., Cabezas, J. A., Cervera, M. T. (2000). AFLPs in genetic identification and genome analysis of grapevines. *Acta Hort.*, 528, 105-110
- Maul, E., Eibach, R. International Vitis Database. Consultado em Março de 2005, em GENRES: German Center for Documentation and Information in Agriculture: <http://www.genres.de/ldb/vitis/>
- Mejía, N., Hinrichsen, P. (2003). A new, highly assertive SCAR marker potentially useful to assist selection for seedlessness in table grape breeding. *Acta Hort.*, 603, 559-564
- Meredith, C. P., Bowers, J. E., Riaz, S., Handley, V., Bandman, E. B., Dangl, G. S. (1999). The identity and parentage of the variety known in California as Petit Sirah. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 236-242
- Moreno, S., Gogorcena, Y., Ortiz, J. M. (1995). The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hort.*, 62, 237-243
- Moreno, S., Martín, J. P., Ortiz, J. M. (1998). Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica*, 101, 117-125
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genet.*, 30, 194-200
- Morgante, M., Olivieri, A. M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant J.*, 3, 175-182
- Mulkahy, D. L., Cresti, M., Sansavani, S., Douglas, G. C., Linskens, H. F., Bergamini-Mulcahy, G., Vignani, R., Pancaldi, M. (1993). The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Sci. Hort.*, 54, 89-96
- Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8, 4321-4325
- NCBI Database. Consultado em Janeiro de 2005 em National Center for Biotechnology information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>
- Olivieri, A. M., Morgante, A. M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, 3, 175-182
- Paludetti, G., Crespan, M., Zago, S., Calò, A., Costacurta, A., Delledonne, M. (1996). Caratterizzazione di cultivars di *Vitis vinifera* L. con marcatori RFLP. *Riv. Vitic. Enol.*, 49, 59-63
- Paran, I., Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 985-993

- Parffit, D. E., Arulsekhar, S. (1989). Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 114, 486-491
- Parimoo, S., Parimoo, B. (2003). Sample preparation in DNA analysis. In Mitra, S. (Ed.). *Sample preparation techniques in Analytical chemistry*. (pp. 271-300). New York: John Wiley and Sons
- Pellerone, F. I., Edwards, K. J., Thomas, M. R. (2001). Grapevine microsatellite repeats: Isolation, characterisation and use for genotyping of grape germplasm from Southern Italy. *Vitis*, 40, 179-186
- Perret, M., Arnold, C., Gobat, J. M., K pfer, P. (2000). Relationships and genetic diversity of wild and cultivated grapevines (*Vitis vinifera* L.) in central Europe based on microsatellite markers. *Acta Hort.*, 528, 155-159
- Pikaart, M. K., Villeponteau, B. (1993). Suppression of PCR Amplification by High Levels of RNA. *BioTechniques*, 14, 24-25
- Pollefeys, P., Bousquet, J. (2003). Molecular genetic diversity of the French-American grapevine hybrids cultivated in North America. *Genome*, 46, 1037-1048
- Queller, D. C., Strassmann, J. E., Hughes, C. R. (1993). Microstellites and Kinship. *Trends Ecol. Evol.*, 8, 285-288
- Rafalsky, J. A., Tingey, S. V., Williams, G. K. (1991). RAPD markers – a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News and Information*, 3, 645-648
- Regner, F., Wiedeck, E., Stadlbauer, A. (2000). Differentiation and identification of white Riesling clones by genetic markers, *Vitis*, 39, 103-107
- Reisch, B. I. (2000). Molecular markers – the foundation for grapevine genetic mapping, DNA fingerprinting and genomics. *Acta Hort.*, 528, 85-90
- Riaz, S., Dangl, G. S., Edwards, K. J., Meredith, C. P. (2004). A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 864-872
- Riaz, S., Garisson, K. E., Dangl, G. S., Boursiquot, J.-M., , Meredith, C. P. (2002). Genetic divergence and Chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127, 508-514
- Rogstad, S. H. (1992). Saturated NaCl/CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analysis. *Taxon*, 41, 701-708
- Royo, J. B., Cabello, F., Miranda, S., Gogorcena, Y., Gonzalez, J., Moreno, S., Itoiz, R., Ortiz, J. M. (1997). The use of isoenzymes in characterization of grapevines (*Vitis vinifera*, L.). Influence of the environment and time of sampling. *Sci. Hort.*, 69, 145-155
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In. Kravetz, S., Misener, S. (Eds.). *Bioinformatics Methods ans protocols: Methods in molecular Biology*. (365-386). Totowa: Humana Press.
- Sanchez-Escribano, E. M., Martín, J. P., Carre o, J., Cenis, J. L. (1999). Use of sequence-tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars. *Genome*, 42, 87-93
- Schaefer, H. (1971). Enzympolymorphismus in rebenbl ttern. *Phytochemistry*, 10, 2601-2607
- Schneider, A., Carra, A., Akkak, A., This, P., Laucou, V., Botta, R. (2001). Verifying synonymies between grape cultivars from France and Northwestern Italy using molecular markers. *Vitis*, 40, 197-203
- Scott, K. D. (2001). Microsatellite derived from ESTs, and their comparision with those derived from other methods. In R. J. Henry (Ed.), *Plant genotyping: the DNA fingerprinting* (pp. 225-237). Oxfordshire, Reino Unido: CAB International Publishers.
- Scott, K. D., Ablett, E. M., Lee, L. S., Henry, R. J. (2000b). AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. *Euphytica*, 113, 245-249
- Scott, K. D., Eggler, P., Seaton, G., Rosseto, M., Abblet, E. M., Lee, L. S., Henry, R. J. (2000a). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 723-726

- Sefc, K. M., Guggenberger, S., Regner, F., Lexer, C., Glössl, J., Steinkellner, H. (1998b). Genetic analysis of grape berries and raisins using microsatellite markers. *Vitis*, 37, 123-125
- Sefc, K. M., Lefort, F., Grando, M. S., Scott, K. D., Steinkellner, H., Thomas, M. R. (2001). Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In K. A. Roubelakis-Angelakis (Ed.), *Molecular Biology and Biotechnology of grapevine* (pp. 2-30). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Sefc, K. M., Lopes, M. S., Lefort, F., Botta, R., Roubelakis-Angelakis, K. A., Ibanez, J., Pejic, I., Wagner, H. W., Glössl, J., Steinkellner, H. (2000). Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 498-505
- Sefc, K. M., Regner, F., Glössl, J., Steinkellner, H. (1998a). Genotyping of grapevine rootstock cultivars using microsatellite markers. *Vitis*, 37, 15-20
- Sefc, K. M., Regner, F., Turetschek, E., Glössl, J., Steinkellner, H. (1999). Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*, 42, 367-373
- Sefc, K. M., Steinkellner, H., Glössl, J., Kampfer, S., Regner, F. (1998c). Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 97, 227-231
- Sefc, K. M., Steinkellner, H., Wagner, H. W., Glössl, J., Regner, F. (1997). Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevines. *Vitis*, 36, 179-183
- Sensi, E., Vignani, R., Rohde, W., Biricolt, S. (1996). Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis*, 35, 183-188
- Sia, E. A., Jinks-Robertson, S., Petes, T. D. (1997) Genetic control of microsatellite stability. *Mutation Res.*, 383, 61-70
- Siles, B. A., O'Neil, K. A., Fox, M. A., Anderson, D. E., Kuntz, A. F., Ranganath, S. C., Morris, A. C. (2000). Genetic fingerprinting of grape plant (*Vitis vinifera*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and dynamic size-sieving capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5903-5912
- Silvestroni, O., Di Pietro, D., Intrieri, C., Vignani, R., Filippetti, R., Del Casino, C., Scali, M., Cresti, M. (1997). Detection of genetic diversity among clones of cv. Fortana (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. *Vitis*, 36, 147-150
- Sollen, M., Kashi, Y. (1999). Functional role of microsatellites and minisatellites. In Goldstein, D. B., Schlöterer, C. (Ed.) *Microsatellites: Evolution and applications*, (pp. 1-9). Oxford: Oxford University Press.
- Soller, M., Beckmann, J. S. (1983). Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 67, 25-33
- Stavarakakis, M. N., Biniari, K. (1998). Genetic studies of grape cultivars belonging to the muscat family by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis*, 37, 119-122
- Steenkamp, J., Wiid, I., Lourens, A., Van-Helden, P. (1994). Improved method for DNA extraction from *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 102-106
- Storchová, H., Hrdlicková, R., Chrtěk, J., Tetera, M., Fitze, D., Feher, J. (2000). An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon*, 49, 79-84
- Strand, M., Prolla, T. A., Liskay, R. M., Petes, T. D. (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatching repair. *Nature*, 365, 274-276
- Striem, M. J., Ben-Hayyim, G., Spiegel-Roy, P. (1994). Developing molecular genetic markers for grape breeding, using polymerase chain reaction procedures. *Vitis*, 33, 53-54
- Striem, M. J., Spiegel-Roy, P., Ben-Hayyim, G., Beckmann, J., Gidoni, D. (1990). Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes. *Vitis*, 29, 223-227

- Tautz, D., Schlötterer, C. (1994). Simple sequences. *Curr. Opin. Genet. Develop.*, 4, 832-837
- Tautz, D., Trick, M., Dover, G. A. (1986). Cryptic simplicity in DNA is a major source in genetic variation. *Nature*, 322, 652-656
- Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J. M., Charrier, A. (1999). Optimization of the choice of molecular makers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.*, 89, 171-177
- This, P., Cuisset, C., Boursiquot, J. M. (1996). Development of molecular markers in grapevine based on RAPD. *Riv. Vitic. Enol.*, 49, 69-70
- This, P., Cuisset, C., Boursiquot, J. M. (1997). Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 492-501
- Thomas, M. R., Matsumoto, S., Cain, P., Scott, N. S. (1993). Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.*, 86, 173-180
- Thomas, M. R., Scott, N. S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 86, 985-990
- Thomas, M. R., Scott, N. S. (1994a). Microsatellite sequence tagged site markers: simplified technique for rapidly obtaining flanking sequences. *Plant Mol. Biol.*, 12, 58-64
- Thomas, M., Scott, N. (1994b). DNA typing of grapevines: A universal technology for identification, cultivar description and evaluation of genetic relatedness, Adelaide, Australia: CSIRO Division Of Horticulture
- Torres, A. M., Weeden, M. F., Martín, A. (1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 937-945
- Tschammer, J., Zyprian, E. (1994). Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. *Vitis*, 33, 249-250
- Ulanovsky, S., Gogorcena, Y., Martínez-de-Toda, F., Borrego, J., Ibáñez, J., Ortiz, J. M. (2001). Characterisation of grapevine accessions at germplasm banks with RAPD and microsatellites markers. *Acta Hort.*, 546, 271-279
- Ulanovsky, S., Gogorcena, Y., Martínez-de-Toda, F., Ortiz, J. M. (2002). Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hort.*, 92, 241-254
- Vidal, J. R., Delavault, P., Coarer, M., Defontaine, A. (2000). Design of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar-specific SCAR primers for PCR fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.*, 101, 1194-1201
- Vidal, J. R., Moreno, S., Masa, A., Ortiz, J. M. (1998) Study of the genetic homogeneity of Albariño (*Vitis vinifera* L.) growing in Galicia (Spain) using isozyme and RAPD markers. *Vitis*, 37, 145-146
- Vignani, R., Bowers, J. E., Meredith, C. P. (1996). Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* 'Sangiovese'. *Sci. Hort.*, 65, 163-169
- Vignani, R., Scali, M., Masi, E., Cresti, M. (2002). Genomic variability in *Vitis vinifera* L. "Sangiovese" assessed by microsatellite and non-radioactive AFLP test. *Elect. J. Biotech.*, 5, 1-11
- Vigouroux, Y., Jaqueth, J. S., Matsuoka, Y., Smith, O. S., Beavis, W. D., Stephen, J., Smith, C., Doebley, J. (2002). Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1251-1260
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van-de-lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414

- Vouillamoz, J., Maigre, D., Meredith, C. P. (2003). Microsatellite analysis of ancient alpine grape cultivars: pedigree reconstruction of *Vitis vinifera* L. 'Cornalin du Valais'. *Theor. Appl. Genet.*, 107, 448-454
- Walters, T. W., Posluszny, U., Kevan, P. G. (1989). Isosyme analysis of the grape (*Vitis*). I. A practical solution. *Can. J. Bot.*, 67, 2894-2899
- Wang, X-D., Wang, Z-P., Zou, Y-P. (1996). An improved procedure for the isolation of nuclear DNA from leaves of wild grapevine dried with silica gel. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 14, 369-373
- Wang, Y., Chen, J., Lu, J., Lamikanra, O. (1999). Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vitis* species and Florida bunch grapes. *Sci. Hort.*, 82, 85-94
- Wang, Z., Weber, J. L., Zhong, G., Tanksley, S. D. (1994). Survey of plant short tandem repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 88, 1-6
- Weber, J. L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7, 524-530.
- Weber, J. L., Wong, C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 1123-1128
- Weeden, N.F., Reish, B. I., Martens, M. E. (1988). Genetic analysis of isozyme polymorphisms in grape. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 113, 765-769
- Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 19, 303-306
- Williams, J. G. R., Rubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalsky, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535
- Wolf, T., Eimert, K., Bleser, E., Ries, R. (1998). PCR/RAPD to determine the genotype of wooden rootstock cuttings. *Acta Hort.*, 473, 41-47
- Wolf, T., Eimert, K., Ries, R. (1999). Reliable identification of grapevine rootstock varieties using RAPD PCR on woody samples. *Australian J. Grape Wine Res.*, 5, 34-38
- Wu, K., Jones, R., Dannenberger, L., Scolnik, P. A. (1994). Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3257-3258
- Xu, H., Bakalinsky, A. T. (1996). Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. *Hortscience*, 31, 267-268
- Xu, H., Wilson, D. J., Arulsekhar, S., Bakalinsky, A. T. (1995). Sequence-specific polymerase chain reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 120, 714-720
- Ye, G. N., Soylemezoglu, G., Weeden, N. F., Lamboy, W. F., Pool, R. M., Reish, B. I. (1998). Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis*, 37, 33-38
- Zietkiewicz, E., Rafalsky, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183
- Zoghalmi, N., Mliki, A., Ghorbel, A. (2001). Evaluation of genetic diversity among Tunisian grapevines by RAPD markers. *Vitis*, 40, 31-37

CAPÍTULO 3

Reagentes, equipamento e programas
informáticos usados na parte experimental desta
dissertação

1. REAGENTES

Todos os reagentes de utilização frequente no laboratório foram fornecidos pela Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos), Aldrich (Milwaukee, WI, Estados Unidos) ou Fluka (Buchs, Suíça). Sempre que outra especificidade não era requerida, o grau de pureza seleccionado era *p.a.* Alguns desses reagentes são: gel de sílica, laranja e azul, com indicador de humidade; isopropanol; etanol; NaCl; 2-mercaptoetanol; clorofórmio; álcool isoamílico; carbonato de sódio; formaldeído; tiosulfato de sódio; nitrato de prata; ácido acético; ácido clorídrico; cloreto de sódio; hidróxido de sódio; etc.

A água usada em todas soluções foi destilada e posteriormente desionizada num sistema Seralpur Pro 90 CN.

Todos os reagentes usados nos processos extractivos eram previamente autoclavados a 121 °C, de modo a eliminar qualquer enzima com actividade nucleásica ou ADN contaminante. As bancadas de trabalho eram frequentemente lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% para eliminação de vestígios de ADN.

1.1. ENZIMAS, NUCLEÓTIDOS E PADRÕES DE MASSA MOLECULAR

A enzima *Taq* polimerase foi adquirida a diversos fornecedores. Todavia, a mais frequentemente utilizada foi a *Taq* polimerase da Promega (Madison, WI, Estados Unidos) e Ecotaq da Ecogen (Madrid, Espanha). Sempre que se tornava necessário adquirir um novo tipo de polimerase do ADN, esta era testada, comparada com a enzima em uso, nomeadamente no que diz respeito à eficiência de amplificação e tamanho dos alelos amplificados.

A Proteinase K foi adquirida na firma Sigma e, com o pó, preparada uma solução de stock a 20 mg/ml em água e conservada em alíquotas a -20 °C.

A RNase foi também adquirida na Sigma. Preparou-se uma solução de armazenamento a 5mg/ml no solvente indicado pelo fabricante (10 mM Tris, 15 mM NaCl, pH=7,5). Foi igualmente dividida em fracções e conservada a -20 °C.

Os desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) foram adquiridos quer na Promega quer na Sigma, separadamente, em solução a 100 mM. Prepararam-se alíquotas de 100 µl adicionando 2,5 µl de cada desoxinucleótido a 90 µl de água. Estas fracções foram armazenadas a -20 °C.

Os *primers* foram adquiridos à firma MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Alemanha). A partir do pó liofilizado preparavam-se soluções a 100 nmol/ml. A solução de trabalho com o par de *primers* era preparada pela adição de 10 µl da solução referida de cada um dos *primers* a 80 µl de água, originando uma solução de trabalho a 10 pmol/µl.

Os padrões de massa molecular de ADN foram adquiridos às firmas indicadas e usados sem diluição de acordo com as indicações do fabricante. Hyperlader I - Bioline (Boston, MA , Estados Unidos); 100 bp DNA ladder – Promega; 123 bps DNA Ladder.

1.2. REAGENTES ESPECÍFICOS

A polivinilpirrolidona (PVP) usada no processo extractivo foi adquirida com o grau de pureza para biologia molecular e com a massa molecular média de 40000.

No que respeita ao óleo mineral, brometo de etídio, clorofórmio, TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina), persulfato de amónio, aldeído fórmico, Tris (Hidroximetilaminometano), EDTA (Ácido etilenodiaminatetracético), ácido bórico e outros reagentes usados nos processos de extracção e electroforese foram adquiridos na Sigma com o grau de pureza para biologia molecular (isentos de ADN, ARN e nucleases).

A agarose de uso corrente foi adquirida em várias firmas, entre elas a Sigma e a Gibco (actualmente parte integrante da Invitrogen (Barcelona, Espanha)).

No que se refere à agarose LMP (Low Melting Point) usada no processo de purificação de ADN, foi adquirida na Sigma pela referência A9414.

A solução a 40% de acrilamida:bisacrilamida foi adquirida na Sigma, em volumes de 100 ml, contida em frascos escuros para evitar a polimerização pela luz.

Quanto à sílica usada no processo de extracção de ADN de vinhos foi adquirida na Merck (Darmstadt, Alemanha) pela referência 7736.

Por último, as membranas de 43 mm do tipo GF/F, com largura de poro de 0,7 µm, foram adquiridas na empresa Whatman (Middlesex, Inglaterra).

1.3. SOLUÇÕES TAMPONADAS, GÉIS E REAGENTES DE REVELAÇÃO.

As soluções tamponadas e os géis de agarose e acrilamida desnaturante foram preparados de acordo com as indicações de Sambrook *et al.* (1989). Seguidamente,

indicam-se as composições destes meios. Na preparação dos meios tamponados recorreu-se a soluções de armazenamento de tris a 1M e EDTA a 0,5 M.

Tampão TE: 10 mM tris, 1 mM EDTA, pH=8,0

Tampão TAE: 0,04 M tris-acetato, 0,001 M EDTA, pH=8.3

Tampão TBE: 1M Tris, 1M ácido bórico, 20mM EDTA, pH=8.3

Os géis de agarose foram preparados em TAE a 0,8% para ADN genómico e a 2%, para produtos de amplificação. Foram carregados diferentes volumes de amostra (5-15 µl), de acordo com a concentração desta, adicionados de cerca de ¼ de corante de carregamento.

O gel de acrilamida desnaturante a 6% tinha a seguinte constituição (para 1000 ml de gel): 420 g de ureia, 200 ml de água, 200 ml de TBE 5×, 150 ml de solução de acrilamida:bisacrilamida (19:1) a 40%, completar o volume a 1000 ml. Imediatamente antes do carregamento do gel no molde, eram adicionados os reagentes catalizadores da polimerização: para 100 ml de gel, 625 µl de persulfato de amónia a 10% em água e 100 µl de TEMED. No gel de acrilamida eram carregados cerca de 3 a 6 µl de amostra diluída com corante de carregamento na proporção 1:1.

Corante de carregamento dos géis de agarose (concentrado 6×): 4 gramas de dextrose, 25 mg de azul de bromofenol e 2,4 ml de EDTA 0,5 M num volume final de 10 ml.

Corante de carregamento dos géis de acrilamida: 10 mM NaOH, 95% formamida, 0,05% azul de bromofenol e 0,05% de xilenocianol.

O processo de revelação dos géis de acrilamida foi executado de acordo com o protocolo de Bassam *et al.* (1991). Foi dada particular importância à temperatura do reagente carbonato de sódio (30 g/l) que rondou sempre os 10 °C.

2. EQUIPAMENTOS

2.1. TERMOCICLADORES

No decorrer das várias fases do trabalho foram usados três diferentes termocicladores, de acordo com a disponibilidade no laboratório. Consequentemente, no laboratório de Biotecnologia do ICAV foi usado um aparelho Sanyo MIR-D30 (Leicestershire, Inglaterra) com a baixa capacidade de 30 tubos de 500 µl. No laboratório de Bromatologia da FFUP, onde a maior parte do trabalho foi realizada, foi usado um aparelho MJ-Research PTC-100 (Watertown, MA, Estados Unidos) com um bloco de 96 vezes 200 µl. No laboratório de Genética Vegetal do ICAV, foi utilizado um termociclador da marca Biometra (Goettingen, Alemanha) do tipo T3000, com três blocos independentes com capacidade para 48 tubos de 200 µl cada.

2.2. TINAS DE ELECTROFORESE E FONTES DE ALIMENTAÇÃO

Foram utilizados dois tipos de tinas de sequenciação para géis de acrilamida: uma Sequi-Gen GT da Bio-Rad (Hercules, CA, Estados Unidos) e uma Lifetech modelo S2000. Para os géis de agarose foi usada a tina de submersão Sub-Cell GT, da Bio-Rad,

com tabuleiro $7,5 \times 15$ cm. As fontes de alimentação usadas foram da marca Bio-Rad, modelos Power Pac 300 e 3000.

2.3. SISTEMAS DE AQUISIÇÃO DE IMAGENS

No laboratório de Bromatologia da FFUP, a partir do terceiro ano de trabalho, foi utilizado um sistema de aquisição e análise de imagens de géis Kodak EDAS 120 (Rochester, NY, Estados Unidos) acoplado a um transiluminador UVP (Upland, CA, Estados Unidos).

2.4. OUTROS EQUIPAMENTOS

As determinações de pH foram executadas num aparelho Metrohm (Herisao, Suíça), modelo 632, conectado a um eléctrodo de junção líquida da marca Russel (Fife, Escócia).

Todas as centrifugações foram realizadas numa centrífuga da marca Heraeus (Osterode, Alemanha) com a referência BioFuge Pico. Este aparelho estava equipado com um rotor com a capacidade de 24 microtubos de 2 ml e atingia a velocidade de centrifugação de 13000 r.p.m.

Todas as pesagens foram feitas em balanças Mettler Toledo (Greifensee, Suíça), modelos AE200 e AE204.

A agitação das amostras, durante o processo de purificação de extractos de ADN, foi executada num agitador orbital Giro-Rocker modelo STR9 da empresa Stuart Scientific (Staffordshire, Inglaterra).

3. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

3.1. ANÁLISE E TRATAMENTO DE IMAGEM

Para a análise dos géis foi usado o software Kodak EDAS 120 1D image analysis (Rochester, NY, Estados Unidos).

3.2. ANÁLISE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E ESTATÍSTICOS

Os dados obtidos pela análise de microsatélites foram submetidos a análise pelos programas IDENTITY 1.0^[Wagner e Sefc, 1999], MICROSAT^[Minch, 1997], PHYLIP^[Felsenstein, 1989] e TREE VIEW^[Page, 2000], todos disponíveis gratuitamente na Internet, nos endereços referidos.

4. BIBLIOGRAFIA

- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. Gresshoff, P.M. (1992). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 196, 80-83
- Felsenstein, J. (1989). *PHYLIP – Phylogeny Inference Package*. Consultado em Dezembro de 2004 em University of Washington: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- Minch, E. (1997). *MICROSAT version 1.5b*. Consultado em Dezembro de 2004 em Stanford University: <http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat/>
- Page, D. M. (2000) *TREE VIEW*. Consultado em Dezembro de 2004 na Universidade de Glasgow: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Wagner, H. W., Sefc, K. M. (1999). *Identity 1.0*. Consultado em Dezembro de 2004 em Universität für Bodenkultur Wien: <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>

CAPÍTULO 4

Desenvolvimento de uma metodologia de análise de ADN microssatélite: caracterização de castas provenientes das regiões do Douro e Vinhos Verdes

O trabalho explanado neste capítulo originou as seguintes publicações:

Ferreira Monteiro, F., Nunes, E., Faria, M. A., Magalhães, R., Martins, A., Bowers, J. E., Meredith, C. P. (2003). Fingerprinting of the main Vitis vinifera varieties grown in the northern region of Portugal. Acta Hort., 528, 121-127

Magalhães, R., Faria, M. A., Santos, N. M. M., Eiras-Dias, J. E., Magalhães, N., Meredith, C. P., Ferreira-Monteiro, F. (2003). Verifying the identity and parentage of Cruzado de Rabo de Ovelha with microsatellite markers. Am. J. Enol. Vitic., 54, 56-58

1. INTRODUÇÃO

Portugal está entre os países mais ricos em termos de património genético de *Vitis vinifera*. Na base de dados Europeia da Videira^[European Vitis Database], constam 374 nomes de castas, usadas, quase exclusivamente, para produção de vinho. A base de dados de castas do IVV¹ refere a existência de 341 nomes principais de castas para produção de vinho e apresenta os inúmeros sinónimos de cada uma delas. Esta listagem é a mesma constante da Portaria 428/2000 que define os nomes oficiais das castas, sendo, neste caso, bastante menos completa, pois apenas apresenta o nome do sinónimo reconhecido. Apesar da existência destas listagens oficiais, o estudo das relações genéticas entre as castas e a procura de casos de sinonímia ou homonímia nas várias populações regionais ainda não foram concretizados. Neste contexto, a avaliação objectiva, através de marcadores genéticos, da identidade e relações entre as castas portuguesas, afigura-se bastante importante.

O trabalho descrito neste capítulo, tendo em consideração os factos descritos no parágrafo anterior, pretendeu avaliar a eficácia dos marcadores microsatélite na discriminação de castas portuguesas oriundas da região do Douro e da região dos Vinhos Verdes. Tendo em conta a relativa falta de experiência do nosso grupo neste tipo de metodologias, o desenvolvimento do método de aplicação dos marcadores moleculares às amostras centrou-se, numa primeira fase, na definição das condições de análise (processo extractivo, programas do termociclador, preparação dos géis de acrilamida, afinação do processo de revelação, etc.) mais adaptadas às condições existentes. Obviamente, o processo de extracção foi uma das nossas principais e primeiras preocupações.

¹ Disponível no endereço: <http://www.ivv.min-agricultura.pt/vinhos/files/listacastas/listacastas.jsp>

Este processo inicia-se com a obtenção de extractos de ADN, com qualidade adequada à sua amplificação pela reacção de PCR. Como tal, o seu desenvolvimento focou-se na obtenção de extractos de qualidade adequada e, ao mesmo tempo, na sua optimização em termos de consumo de reagentes e tempo. O desenvolvimento do método de extracção foi executado tendo em conta as condições de conservação das amostras.

Após a definição do processo extractivo, foram implementadas as melhores condições de amplificação e, *a posteriori*, as condições de revelação pelo processo do nitrato de prata. Após a afinação de todo o processo, este foi aplicado às amostras em estudo. Os marcadores moleculares foram, então, seleccionados e utilizados nas castas escolhidas.

A interpretação dos dados obtidos com estes marcadores foi também uma das preocupações durante a feitura deste trabalho pelo que se procedeu à selecção dos métodos estatísticos mais adequados, para a interpretação dos resultados com a menor ambiguidade possível. Devido à especificidade do tipo de resultados, perfis de marcadores microssatélite, os dados foram analisados com programas desenvolvidos livremente por diversos investigadores em formatos de difícil maneo, facto que acarreta, por vezes, algumas dificuldades de manipulação e interligação dos mesmos.

Por fim, devido à necessidade do esclarecimento da paternidade de uma casta da região do Oeste, em colaboração com técnicos da EVN, foram estudadas cinco castas desta região. Os resultados sugerem, com grande probabilidade, os progenitores da casta em questão e eliminam algumas hipóteses anteriormente avançadas.

2. AMOSTRAS

Escolheram-se, para a realização deste trabalho, as castas mais representativas de duas regiões vitivinícolas portuguesas do Norte de Portugal^[Ilustração 4.1]. Da região do Douro (D), a primeira Região Demarcada do mundo, em 1756. O “País Vinhateiro” onde teve origem o produto português mais relevante em termos de comércio internacional, o Vinho do Porto. Acresce que esta é a região que maior quantidade de vinho produz, a nível nacional². Tendo em consideração que a programação do trabalho previa a posterior aplicação destes marcadores a mostos e vinhos – de mesa e Porto – obtidos a partir das 5 mais preponderantes castas daquela região, esta foi a região mais focada.

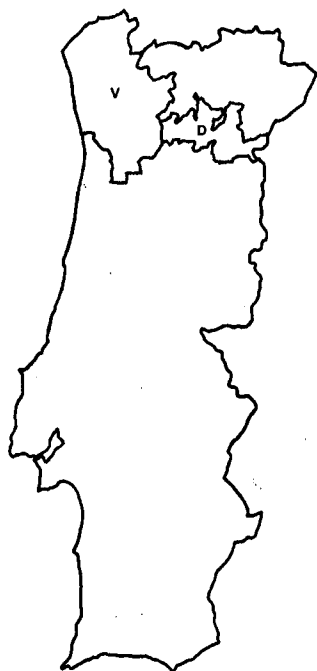


Ilustração 4.1 – Localização geográfica das duas regiões vitivinícolas de origem das castas estudadas. Região do Douro (D) e Vinhos Verdes (V).

A segunda escolha recaiu na região dos Vinhos Verdes (V), por parecer interessante avaliar do grau de proximidade genética das castas de duas regiões contíguas, com características substancialmente diferentes. Esta região produz vinhos, também peculiares, pelo que assume igualmente uma grande importância nacional.

No Quadro 4.1, listam-se as 38 castas estudadas neste capítulo. A sua denominação foi efectuada de acordo com o uso local. Sempre

² Dados provisórios da campanha de 2004/2005 indicam produções de 1646000 HI, para a região do Douro e 988000 HI para a região dos Vinhos Verdes, num total nacional de 7483000. Dados obtidos do Instituto da Vinha e do Vinho (<http://www.ivv.min-agricultura.pt/estatistica/index.html>).

que o nome oficial de uma casta seja diferente do nome utilizado, indica-se também no mesmo quadro.

Quadro 4.1 – Castas da região dos Vinhos Verdes e do Douro, seleccionadas para o presente estudo. B: branco; T: tinto; ^aDenominação constante da Portaria 428/2000; ^bCastas espanholas.

Abreviatura	Nome comum	Nome Oficial ^a	Cor do bago	Região de origem
alb	Albariño	b	B	Vinhos Verdes
alv	Alvarinho	-	B	Vinhos Verdes
avh	Alvarilhão	-	T	Douro
avs	Avesso	-	B	Vinhos Verdes
azl	Azal Branco	Azal	B	Vinhos Verdes
azt	Azal Tinto	Amaral	T	Vinhos Verdes
brc	Brancelho	Alvarelhão	T	Vinhos Verdes
brç	Borraçal	-	T	Vinhos Verdes
brl	Brancellao	b	T	Vinhos Verdes
bst	Bastardo	-	T	Douro
cod	Códega	Síria	B	Douro
crc	Cercial	Cerceal Branco	B	Douro
crf	Cornifesto	-	T	Douro
dzb	Donzelinho Branco	-	B	Douro
egc	Esgana Cão	Sercial	B	Douro
esp	Espadeiro	-	T	Vinhos Verdes
fol	Folgasão	-	B	Douro
loe	Loureiro Espanhol	b	B	Vinhos Verdes
lou	Loureiro	-	B	Vinhos Verdes
mtn	Mourisco Tinto	Marufo	T	Douro
mvf	Malvasia Fina	-	B	Douro
pdl	Pedral	-	T	Vinhos Verdes
pdr	Pedernã	Arinto	B	Vinhos Verdes
rbg	Rabigato	-	B	Douro
ruf	Rufete	-	T	Douro
ssd	Sousão do Douro	Sousão	T	Vinhos Verdes
sso	Sousão	-	T	Douro
tna	Tinta Amarela	Trincadeira	T	Douro
tnb	Tinta Barroca	-	T	Douro
tnc	Tinto Cão	-	T	Douro
tnf	Tinta Francisca	-	T	Douro
tnr	Tinta Roriz	Aragonez	T	Douro
tob	Touriga Brasileira	Touriga Fêmea	T	Douro
tof	Touriga Francesa	Touriga Franca	T	Douro
ton	Touriga Nacional	-	T	Douro
trj	Trajadura	-	B	Vinhos Verdes
vio	Viosinho	-	B	Douro
vnh	Vinhão	-	T	Vinhos Verdes

As castas originárias da região dos Vinhos Verdes foram colhidas na estação Vitivinícola Amândio Galhano (EVAG), em Arcos de Valdevez, de um campo ampelográfico e de um campo de selecção clonal (para as castas Borraçal, Trajadura e Loureiro). As castas Durienses são originárias de várias quintas da região, de acordo com a sua disponibilidade (Quinta do Seixo, Quinta de S^{ta} Bárbara, Quinta da Ataíde e Quinta da Leda) e dos campos ampelográficos da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. De cada casta da região dos vinhos verdes, foram colhidos 2 clones, excepto para as castas Borraçal, Trajadura e Loureiro, para as quais foram colhidos seis clones. Da região do Douro foram colhidos 3 clones, de cada casta, à excepção da Touriga Nacional, em que foram analisados 8 clones, e da Touriga Francesa, com sete clones. Tendo em conta que o perfil genético determinado com os marcadores em estudo foi igual para os clones da mesma casta, apenas se referem a castas e não clones.

Foram também escolhidas 3 castas Espanholas, integradas na colecção ampelográfica da EVAG, homónimas de castas portuguesas, para verificação desta homonímia.

Os nomes oficiais das castas foram definidos pela lista das castas aptas à produção de vinho em Portugal constante da Portaria 428/2000 e da lista de castas do IVV, que inclui uma aplicação informática *on-line*³ onde é possível, de uma forma gratuita, pesquisar castas pelo seu nome principal, sinónimo reconhecido ou sinónimo conhecido. Esta aplicação parece bastante útil e bem concretizada para todos quantos têm interesses nas denominações das castas portuguesas.

³ <http://www.ivv.min-agricultura.pt/vinhos/index.html>

2.1. AS CASTAS DO DOURO

Existem várias castas cultivadas na região do Douro, sendo as mais representativas incluídas no presente estudo. Todavia, as 5 castas seleccionadas em 1981 por José Rosas e João Nicolau de Almeida, após estudo das características dos vinhos por elas produzidos através de microvinificações, são as mais cultivadas actualmente, pois foram consideradas obrigatórias em novas plantações^[Nicolau de Almeida, 1998]. As referidas castas são a Touriga Nacional, o Tinto Cão, a Tinta Barroca, a Tinta Roriz e a Touriga Francesa. A mais importante destas castas é a Touriga Nacional, plantada desde os finais do século XVIII. Origina vinhos com um dos mais complexos e delicados aromas do Douro e representa cerca de 9% do encepamento de castas tinta da região⁴. Já a Tinta Barroca, com uma representação de 13%, é uma casta bastante equilibrada, entrando frequentemente em lotes de *Vintage*. Tem sido bastante utilizada nos países do Novo Mundo. A Tinta Roriz, também muito plantada no Douro (16%), oriunda de Espanha onde é conhecida pelo nome de Aragonesa. Sempre lhe foi atribuído um elevado valor qualitativo e quantitativo. No que respeita à Touriga Francesa, oficialmente Touriga Franca, é a casta mais representativa do Douro, responsável por cerca de 25% do encepamento. Esta representatividade explica-se pela sua regularidade e grande produtividade (2,5 Kg/cepa) e pela sua versatilidade para a elaboração de vinhos do Porto e mesa. A casta Tinto Cão, por seu lado, tem uma representação mínima nas castas tintas do Douro devido à sua baixa produtividade. Porém, pode assumir importância relevante, pois tem qualidades para que seja usada como equilibrante de uma base constituída por qualquer outra das quatro castas referidas.

⁴ A fonte de todos os valores de encepamento referidos foi o trabalho de João Nicolau de Almeida publicado na obra 'O Vinho do Porto e os vinhos do Douro' (Nicolau de Almeida, 1998).

Entre muitas outras castas do Douro, algumas são extensivamente cultivadas como o Mourisco Tinto, com um total de área plantada de 8%, ou a Tinta Amarela, que origina vinhos macios e encorpados e representa ainda cerca de 13% do encepamento. Algumas estão ainda em selecção clonal^[Martins, 2002], numa tentativa de melhorar o seu baixo rendimento, o que conduz à sua não utilização, mesmo originando vinho de boa qualidade. Os processos de caracterização molecular de todas estas castas, conjugados com metodologias de selecção de videira, como a selecção clonal, são decisivos no desenvolvimento rápido e eficiente de castas de alta qualidade (elevado rendimento e valor qualitativo). Desta forma, e tal como se sucedeu com a Touriga Nacional, castas actualmente colocadas de parte, poderão ser melhoradas, mas em muito menos tempo.

2.2. AS CASTAS DA REGIÃO DOS VINHOS VERDES

Até há poucos anos, a cultura da vinha na Região dos Vinhos Verdes prestava pouca atenção à selecção das castas. Felizmente esta situação tem sofrido uma inversão e, neste momento, existem já várias castas em selecção clonal na estação Vitivinícola Amândio Galhano, local de colheita de algumas das amostras em estudo. No universo das castas da região, a casta Alvarinho, da sub-região de Monção, assume especial importância devido à alta qualidade e às características peculiares do vinho varietal produzido, apesar dos seus baixos níveis de produção. Outras castas de assinalável importância são o Avesso, muito produtivo; a Azal, muito produtiva também, originando vinhos de aroma pouco intenso; a Loureiro, casta em expansão devido ao seu maior potencial alcoólico e à intensidade aromática dos seus vinhos, alguns monovariais; a Pedernã, ou Arinto, com larga tradição na região devido ao tamanho grande do cacho e níveis elevados de produção; e a Trajadura, de produção média, que acompanha muito a plantação de

Alvarinho. Existem outras castas brancas na região com importância menor do que as citadas.

No que respeita às castas tintas, as recomendadas para a região são: Azal tinto, Borraçal, Brancelho, Espadeiro, Pedral e Vinhão. Destacam-se a produtividade elevada e a intensidade de cor da casta Vinhão, que produz os característicos vinhos de cor carregada.

2.3. COLHEITA

As amostras foram colhidas no período compreendido entre o mês de Março e Maio, ou seja, pouco depois dos primeiros rebentos aparecerem antes que estes tenham cerca de 50 cm, pois, desta forma, não há cruzamento de ramos entre as videiras sucessivas o que, a acontecer, poderia induzir o colector em erro de identificação da planta. Foram colhidas duas ou três folhas jovens (com diâmetro não superior a 2 cm), sendo estas imediatamente submetidas ao processo de conservação que na secção seguinte se descreve.

No que concerne a cuidados adicionais a ter durante a colheita das amostras, a bibliografia consultada apenas faz referência, de uma forma unânime, à necessidade de se colherem folhas jovens, o que contribui para a obtenção de bons extractos de ADN. O processo de colheita das amostras, propriamente dito, não requer cuidados especiais, desde que se garanta a identificação inequívoca da planta.

2.4. MÉTODO DE CONSERVAÇÃO

Foi usado o seguinte procedimento para a colheita das amostras. A tubos rolhados de plástico, com capacidade de 50 ml, foram previamente adicionados cerca de 30 g de gel de sílica com indicador de humidade - mais recentemente foi usada a versão do reagente sem selénio. Os tubos em excesso, desde que rolhados hermeticamente, foram guardados para futuras colheitas. A quantidade de sílica, segundo os autores do trabalho original, deve ser 15 vezes superior à massa da amostra, tendo o valor escolhido sido calculado para cerca de 2 g de folha de videira.

A localização, por vezes bastante remota, das vinhas das quais se colheram as folhas que constituíram as amostras, implicou a utilização de um método de conservação cujo equipamento necessário pudesse ser facilmente transportável para o campo. De entre os métodos de conservação das amostras descritos no capítulo 2, optou-se pela utilização do método de Chase e Hills (1991), já descrito. Esta escolha deveu-se, essencialmente, ao facto de as amostras assim conservadas poderem ser sujeitas a qualquer processo extractivo, ao contrário de outros métodos em que os reagentes adicionados às amostras para a sua conservação condicionam o método de extracção a seleccionar. Acresce a este facto que, a toxicidade do gel de sílica, causada pelo agente indicador de humidade (contendo selénio), foi recentemente reduzida pela substituição deste reagente por outro de idêntica eficiência mas menos tóxico. Esta nova forma de gel de sílica com indicador de humidade apresenta-se de cor laranja, na ausência de água, tornando-se gradualmente incolor pelo incremento do teor de humidade do meio.

Este material não requer qualquer especificidade em termos de transporte. Durante a colheita, as folhas foram simplesmente colocadas dentro do tubo contendo o agente exsicante e transportadas desta forma para o laboratório. No dia seguinte à colheita, e apenas por precaução, pois a quantidade de gel de sílica usada estava francamente em excesso, verificou-se se a cor da sílica se tinha alterado, sendo esta substituída sempre que isso se observar.

Vinte e quatro horas após a colheita, constatou-se que as folhas estavam completamente desidratadas, pela avaliação da sua friabilidade. Nesta altura, as amostras foram colocadas a -20°C . Quando necessário, estas amostras podem ser utilizadas desde que o aquecimento do tubo até à temperatura ambiente seja respeitado, a fim de evitar a condensação de água na folha o que promove a sua degradação e interfere com o processo de pulverização. De acordo com a experiência adquirida neste trabalho, as amostras podem ser conservadas desta forma pelo menos durante 5 anos, sem perda de qualidade do extracto.

3. PROCESSO DE EXTRACÇÃO DE ADN

No momento da selecção do processo extractivo de ADN existiam, como revisto no capítulo 2, várias alternativas descritas na bibliografia, mas nenhuma delas apresentava um método pouco dispendioso, realizável em microescala sem recurso a reagentes de toxicidade elevada e aplicável ao estado de desidratação das nossas amostras. Após a selecção das melhores abordagens de alguns autores, surgiu a necessidade de testar a sua eficácia nas amostras colhidas. Consequentemente, testaram-se os seguintes parâmetros:

- ' tempo de desidratação antes da congelação das folhas em gel de sílica;
- ' temperatura de conservação (ambiente ou -20 °C);
- ' digestão final do extracto com RNase e proteinase K;
- ' lavagens do extracto final com etanol a 70%.

Tendo em consideração os então poucos recursos do Laboratório de Biotecnologia do CECA/ICETA-UP, a quantificação de ADN extraído não foi executada, pelo que a selecção da melhor metodologia teve em conta apenas uma avaliação visual dos géis de agarose. Deste processo de avaliação de alguns parâmetros com influência na qualidade do extracto final resultou o método de extracção que é descrito no Quadro 4.2.

O tampão de extracção usado no processo proposto foi o descrito por Doyle e Doyle (1990), sendo constituído por: 2% de CTAB, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM e 2% de 2-mercaptoetanol; a pH=8), sendo o mercaptoetanol, como referido, adicionado imediatamente antes da utilização.

Todas as amostras foram, então, submetidas, em duplicado, ao processo de extracção. Após o processo extractivo os extractos obtidos foram separados num gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio na concentração de 10 mg/ml. Este procedimento permitiu visualizar a fragmentação, quantidade e pureza dos extractos, bem como seleccionar as melhores amostras para amplificar. A extracção de uma amostra era repetida sempre que a pureza, a fragmentação ou a quantidade do ADN não parecia adequada.

Quadro 4.2 – Processo de extracção final desenvolvido para folhas desidratadas.

Processo de extracção em microtubos de 2 ml

1. A 30 mg de amostra adicionar, em almofariz apropriado, cerca de 72 mg de PVP.
2. Transferir o pó resultante para dois microtubos de 2 ml contendo, cada um, 600 µl de tampão de extracção.
3. Agitar vigorosamente durante 5 min. até à melhor homogeneização possível.
4. Incubar a 65 °C, agitando os tubos em intervalos de 10 min.
5. Após arrefecimento, adicionar a cada tubo 600 µl da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitar durante 5 min. Centrifugar a 800 ×g durante 5 min.
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.^a
7. Repetir a extracção do ponto 5.
8. Adicionar 350 µl (0,7 volumes) de isopropanol à temperatura de -20 °C. Incubar à mesma temperatura durante pelo menos 30 min.
9. Centrifugar a 10000 ×g durante 15 minutos.^b
10. Decantar, cuidadosamente, o isopropanol e redissolver o precipitado de ADN em 300 µl de TE.
11. Proceder à digestão com RNase adicionando 1,5 µl de solução desta enzima a 5 mg/ml e incubar a 37 °C durante 30 min.
12. Adicionar 1,5 µl de proteinase K a 20 mg/ml e incubar a 50 °C durante 30 minutos.
13. Adicionar 150 µl (0,5 volumes) de NaCl 5 M, homogeneizar, adicionar 900 µl (2 volumes) de etanol absoluto à temperatura de -20 °C. Incubar a -20 °C durante pelo menos 30 min.
14. Repetir a centrifugação do ponto 9.
15. Decantar, cuidadosamente, o etanol, e lavar o precipitado duas vezes com etanol a 70%. Secar o precipitado no vácuo à temperatura ambiente e dissolvê-lo em 50 µl de 0,1× TE.

Os extractos podem ser conservados a 4 °C durante alguns meses.

^aEsta transferência deve ser executada com pontas de pipetas cortadas.

^bA partir do ponto 9, os tubos devem ser mantidos em gelo.

4. AMPLIFICAÇÃO

A preparação da reacção de PCR deve ser executada de modo a evitar a contaminação das amostras, quer cruzada quer com ADN de amostras analisadas anteriormente. Deste modo, este procedimento era executado numa câmara de UV, situada numa sala separada da de extracção das amostras. Todo o material era exposto à radiação UV (256 nm), pelo menos durante 30 min. antes da preparação da reacção. Após cada preparação, a bancada era limpa com uma solução de hipoclorito de sódio a 10%.

4.1. PRIMERS SELECCIONADOS

No Quadro 4.3 listam-se os 6 *loci* e sequências dos respectivos *primers*, seleccionados para o presente trabalho. Esta selecção teve em conta fundamentalmente dois aspectos: (i) a disponibilidade das sequências dos *primers* e (ii) a disponibilidade de padrões de massas moleculares. Factores como a heterozigotidade⁵ dos *loci*, ou o poder discriminatório (D) dos marcadores não foram tidos em conta, devido ao número reduzido de marcadores tornados públicos, embora os valores de heterozigotidade apresentados sejam indicadores do bom nível de polimorfismo dos *primers*.

⁵ Percentagem de indivíduos heterozigóticos

<i>Locus</i>	<i>Sequência dos primers (5'-3')</i>	<i>Tipo de repetição</i>	<i>Heterozigosidade^a</i>
VVS1 ^c	ACAATTggAAACCgCgTggAg CTTCTCAATgATATCTAAAACCATg	Imperfeita composta A ₁₇ , (TAA) ₇	0,69
VVMD5 ^d	CTAgAgCTACgCCAATCCAA TATACCAAAAAATCATATTCCTAAA	Imperfeita composta (CT) ₃ AT(CT) ₁₁ ATAg(AT) ₃	0,90
VVMD6 ^d	ATCTCTAACCCTAAAACCAT CTgTgCTAAgACgAAgAAgA	Imperfeita (CT) ₄ C(CT) ₂ TTAg(CT)TAAT (CT) ₆ C(CT) ₂ C(CT) ₂	0,93
VVMD7 ^d	AgAgTTgCggAgAACAggAT CgAACCTTCACACgCTTgAT	Perfeita (CT) _{14,5}	0,84
VVMD24 ^e	gTggATgATggAgTAgTCACgC gATTTTAggTTCATgTTggTgAAgg	Perfeita (CT) ₆	0,74
VVMD25 ^e	TTCCgTTAAAgCAAAgAAAAAgg TTggATTTgAAATTTATTgAgggg	Perfeita (CT) ₆	0,84

Quadro 4.3. Primers de loci de microssatélites de *V. Vinifera*. ^aValores observados pelos autores e reportados ao número de castas analisado. ^bNão referido na publicação original. ^cThomas e Scott (1993). ^dBowers et al. (1996). ^eBowers et al. (1999b).

4.2. PROGRAMAS E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

A quantidade de ADN a utilizar em cada amplificação foi definida por tentativa erro, experimentando várias diluições do extracto original. Por norma, as diluições de 1:20 e 1:40 eram aquelas que originavam bandas amplificadas mais intensas. A enzima *Taq* polimerase foi usada na concentração de 0,5 unidades por reacção de 20 µl, excepto quando a amplificação não era suficiente. Nesta situação, a quantidade de enzima poderia ser duplicada. Os dNTPs foram usados na concentração de 200 µM cada e adicionados à mistura de amplificação a partir de uma solução mãe, preparada de acordo com o indicado no capítulo 3. No que concerne aos *primers*, 20 pmol de cada um foram adicionadas a cada reacção. Também os *primers*, à chegada ao laboratório, eram dissolvidos numa solução mãe. A concentração de cloreto de magnésio a usar dependia do marcador. Deste modo, para a amplificação do *locus* VVS1, VVMD5, 6 e 7 foi usada a concentração de 1,5 mM, enquanto que para VVMD24 e 25 usou-se 2 mM. Após a adição de todos os componentes da reacção, foi adicionada uma gota de óleo mineral a cada tubo de PCR.

Os programas de amplificação foram inicialmente os referidos nos trabalhos de origem dos marcadores. Todavia, devido às diferenças existentes entre termocicladores de diferentes fornecedores, alguns parâmetros foram, eventualmente, modificados por nós. As condições usadas neste trabalho, para os marcadores em questão, estão indicadas no Quadro 4.4.

Quadro 4.4 – Programas de amplificação para os loci referidos. di: desnaturação inicial; d: desnaturação; h: hibridação, rampa: incremento até à temperatura de extensão; e: extensão; ef: extensão final.

Locus	Programa de amplificação						
	di	d	h	rampa	e	ef	nº ciclos
VVS1	5', 95 °C	1', 94 °C	50", 50 °C	1', 50-72	1', 72 °C	7', 72 °C	30
VVMD5, 24, 25	2', 94 °C	30", 92 °C	30", 56 °C	16", 56-72	2', 72 °C	7', 72 °C	40
VVMD6,7	2', 94 °C	30", 92 °C	30", 52 °C	20", 50-72	2', 72 °C	7', 72 °C	40

5. ELECTROFORESE - SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Os produtos amplificados foram separados em gel desnaturante de acrilamida, com 4 mm de espessura e 38,5 cm de comprimento, cuja composição se indica no capítulo 3. Três a seis microlitros da mistura, em partes iguais de produto de amplificação e corante de carregamento de acrilamida, foram adicionados a cada posição no gel, após desnaturação através da incubação dos tubos a 95 °C durante 5 min. O processo electroforético decorreu durante cerca de 2,5 horas, a uma intensidade de corrente de 35 mA (correspondente a uma diferença de potencial de cerca de 1500 V).

6. TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados obtidos na análise de microssatélites das referidas amostras foram submetidos a análise pelo programa IDENTITY 1.0^[Wagner e Sefc, 1999], que permitiu, para cada locus, o cálculo dos seguintes parâmetros: número de alelos, frequência

dos alelos observada, frequência dos alelos para um intervalo de confiança de 95%, heterozigozidade esperada e observada, probabilidade dos alelos nulos, probabilidade de identidade e probabilidade de exclusão de paternidade. Este programa gera ficheiros contendo as informações referidas e também um ficheiro com os dados formatados, de acordo com o requerido pelo programa MICROSAT^[Minch, 1997] para a construção de uma matriz de distâncias genéticas entre as castas, baseada no inverso do logaritmo da proporção dos alelos partilhados. A matriz então gerada foi submetida a tratamento pelos algoritmos Kitsch e Fitch, componentes do programa PHYLIP^[Felsenstein, 1989], escolhidos de acordo com a bibliografia. Este programa gera representações gráficas das distâncias introduzidas (fenogramas) num formato uniformizado e um pouco rudimentar. De modo a que a representação gráfica fosse melhorada, os dados obtidos com o programa anterior foram tratados por um outro, designado por TREE VIEW^[Page, 2000], que originou as imagens dos fenogramas apresentados neste capítulo.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRACÇÃO

O processo de extracção desenvolvido, já descrito anteriormente, permitiu a extracção de ADN de todas as amostras em estudo, ao mesmo tempo que se mostrou eficiente em termos da diminuição dos resíduos de reagentes, uma vez que foi adaptado à utilização em microescala.

O método final corresponde ao somatório de várias adaptações ao método de Doyle e Doyle (1990) sugeridas isoladamente por vários autores. Usou-se, fundamentalmente, o método de Wang *et al.* (1996), onde é referida a utilização de PVP como coadjuvante da trituração das folhas desidratadas e são executadas duas precipitações de ADN com diferentes álcoois (isopropanol e etanol); e o método de Stewart e Via (1993), focado essencialmente na adaptação de métodos de extracção a microescala (execução em microtubos de 2 ml) com evidentes vantagens. De igual modo, o método de Lodhi *et al.* (1994) através da sugestão da adição de 2-mercaptoetanol imediatamente antes do processo extractivo, contribuiu para a definição da nossa metodologia. Esta prática evita a degradação do reagente, a qual ocorre na presença do calor e humidade (meio extractivo) com libertação de gás sulfídrico, tóxico e, uma vez proveniente da degradação do 2-mercaptoetanol, diminui a actividade do mesmo.

A redução da metodologia para microescala pressupõe a utilização de uma pequena quantidade de amostra. Stewart e Via (1993) utilizaram 25 mg de folhas frescas de culturas de amendoim, castanheiro, arando e malvas. Tendo em consideração que as amostras deste trabalho eram desidratadas, decidiu-se usar 15

mg de folha. Como a homogeneização das amostras foi executada na presença de PVP^[Wang *et al.*, 1996], este reagente acaba por fazer parte do meio extractivo. Os autores consultados referem a eficiência da PVP à concentração de 6%. Deste modo, e como se utilizaram 600 µl de tampão de extracção, as amostras são homogeneizadas na presença de 36 mg de PVP.

A digestão com RNase é praticamente usada por todos os autores porque a eliminação do ARN se torna essencial para um bom comportamento do extracto durante a amplificação. No decurso do desenvolvimento do método verificou-se que a digestão com proteinase K após a acção da RNase melhorava a qualidade do extracto. Este procedimento foi adoptado por Bowers *et al.* (1993) num dos primeiros trabalhos de extracção de ADN de videiras. Na bibliografia não se encontraram mais referência à utilização, especificamente na videira, de proteinase K no final do processo extractivo. Apenas Thomas *et al.* (1993) propõem a eliminação de proteínas, nesta fase, pela adição de meio volume de acetato de amónio 7,5 M e posterior centrifugação para precipitação proteica.

7.2. APLICAÇÃO DAS METODOLOGIAS DESENVOLVIDAS ÀS AMOSTRAS

Trinta e oito castas de *Vitis vinifera* (35 castas portuguesas e 3 sinónimos espanhóis) foram analisadas nos 6 *loci* referidos anteriormente. Não contabilizando os casos de sinonímia com as castas espanholas, 94% das variedades em questão originaram genótipos únicos, *i.e.* foram completamente distinguidas de todas as outras. Os genótipos das castas em estudo para cada um dos *loci* estão indicados no Quadro 4.5. Cada alelo está expresso em pares de bases. Os padrões de massa molecular foram obtidos pela amplificação de variedades, cujo genótipo era

conhecido, fornecidas pela Prof. Meredith da Universidade da Califórnia, em Davis. Na Ilustração 4.6, pode verificar-se o modo como estes padrões foram utilizados, carregados, lado a lado, com as amostras, e repetidos no gel da forma mais abrangente possível. O efeito *stutter*, bastante comum em marcadores microssatélite, aparece claramente nos marcadores apresentados (VVMD7 e 6). Este efeito dificulta, até certo ponto, a leitura correcta dos géis, mas a experiência com o marcador e a contabilização de apenas as bandas mais intensas permitem leituras precisas. Na ilustração, as repetições para a mesma casta correspondem a diferentes clones analisados.

Quadro 4.5 – Genótipo das 38 castas estudadas para os seis *loci*. A massa molecular dos alelos encontra-se em bps. Os espaços assinalados com (-) significam ausência de amplificação.

Casta	Loci					
	VVS1	VVMD5	VVMD6	VVMD7	VVMD24	VVMD25
Alvarinho	181 162	232 222	212 205	239 239	214 214	259 243
Azal Branco	181 162	232 226	214 212	249 239	210 210	263 243
Avesso	181 181	240 222	212 212	239 239	216 214	253 243
Pedernã	190 181	238 226	212 211	253 243	214 210	259 253
Azal Tinto	190 183	232 226	205 205	263 239	210 208	263 259
Vinhão	183 181	226 222	214 205	263 239	210 208	263 245
Espadeiro	190 182	226 222	214 205	263 249	210 210	263 245
Brancelho	181 162	226 222	214 205	239 239	218 210	253 243
Pedral	181 181	226 226	205 205	263 239	214 210	267 243
Sousão do Douro	183 181	226 222	214 205	263 239	210 208	263 245
Brancellao	181 162	226 222	214 205	239 239	218 210	253 243
Albariño	181 162	232 222	212 205	239 239	214 214	259 243
Loureiro Espanhol	183 181	232 232	212 205	263 253	214 208	259 253
Borraçal	190 181	238 232	205 205	239 239	210 208	263 243
Trajadura	190 181	236 226	212 211	251 239	218 214	267 253
Loureiro	183 181	232 232	212 205	263 251	214 208	259 253
Tinto Cão	182 181	234 232	212 205	263 239	214 214	245 245
Tinta Roriz	--	236 236	211 194	253 239	216 210	259 245
Tinta Francisca	--	240 238	214 212	239 239	214 210	245 243
Touriga Francesa	183 181	228 226	205 194	243 239	214 212	259 253
Malvasia Fina	190 181	240 226	212 212	257 239	212 210	259 245
Rabigato	190 181	232 222	212 194	239 239	214 214	245 245
Touriga Brasileira	181 181	240 236	211 205	257 239	214 212	259 259
Sousão	183 181	226 222	214 205	263 239	210 208	263 245
Bastardo	190 181	238 238	212 211	257 239	219 218	259 253
Cornifesto	181 181	238 234	214 212	253 249	210 210	253 245
Tinta Amarela	181 181	238 234	214 205	249 239	212 210	267 245
Mourisco Tinto	181 181	232 228	212 194	243 239	--	--
Cercial	190 181	238 226	214 211	257 249	212 210	245 243
Esgana Cão	190 181	238 226	214 212	253 239	210 210	267 243
Códega	181 181	234 222	214 205	249 239	212 210	267 259
Folgasão	181 181	240 232	214 205	247 243	214 210	253 245
Donzelinho Branco	162 162	238 232	211 211	263 243	218 214	275 253
Rufete	190 181	236 228	214 205	257 239	210 210	--
Alvarilhão	181 181	228 222	214 205	--	218 210	--
Viosinho	190 181	232 232	211 205	243 239	214 214	253 245
Tinta Barroca	183 181	236 228	211 194	243 239	214 212	259 253
Touriga Nacional	183 181	236 226	211 205	239 239	214 210	259 253

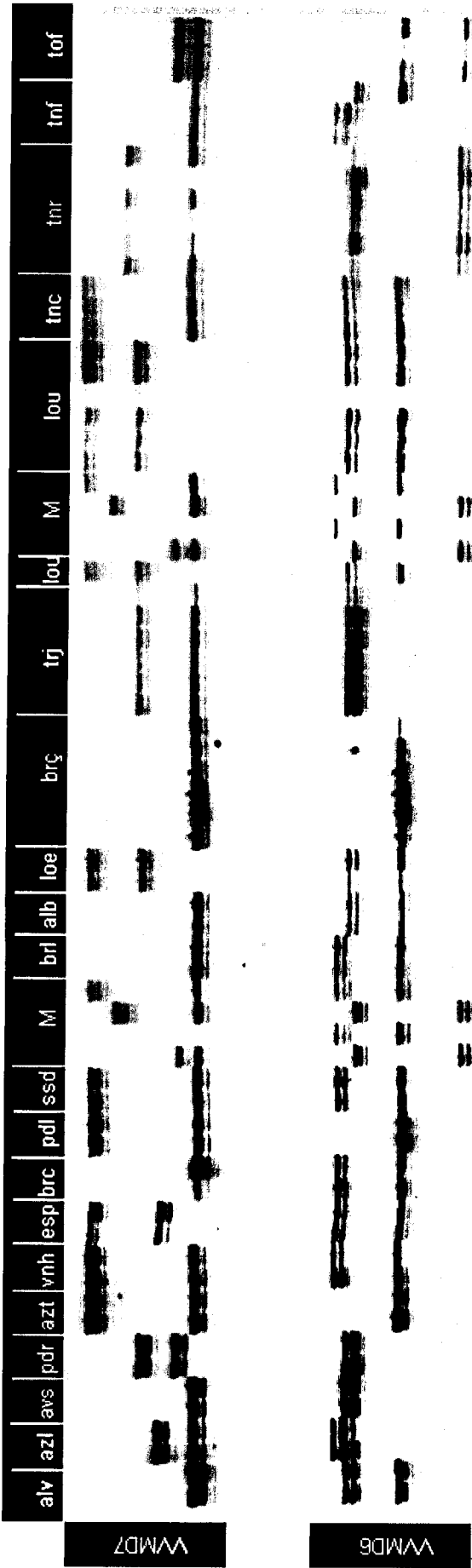


Ilustração 4.2 – Imagem digitalizada de um gel de acrilamida. Na parte superior da imagem, são indicadas as amostras utilizadas e, à esquerda, os *primers*. M: padrão de massa molecular obtido pela amplificação, com os mesmos *primers*, de amostras conhecidas. As abreviaturas das castas encontram-se descritas no Quadro 4.1.

No Quadro 4.6, são apresentados, para cada *locus*, o número de alelos detectados nas populações de castas portuguesas estudadas, a heterozigosidade esperada (*He*) e observada (*Ho*), a probabilidade de se encontrarem genótipos idênticos para cada um e para a combinação de todos os *loci* (*PI*), assim como a probabilidade dos alelos nulos (*r*).

Quadro 4.6 – Parâmetros genéticos para os seis *loci* usados nas 35 castas portuguesas estudadas.

<i>Loci</i>	Nº alelos	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>PI</i>	<i>r</i>
VVS1	5	0,61	0,72	0,27	-0,072
VVMD5	8	0,84	0,84	0,08	0,001
VVMD6	5	0,76	0,84	0,18	-0,048
VVMD7	8	0,69	0,76	0,17	-0,037
VVMD24	7	0,73	0,73	0,19	0,003
VVMD25	7	0,81	0,91	0,11	-0,054
<i>Média</i>	6,7	0,74	0,80		
<i>PI cumulativa</i>				1,41×10⁻⁵	

O número de alelos por *locus* oscilou entre os 5 para VVS1 e VVMD6 e os 8 para VVMD5 e VVMD7, resultando num número médio de alelos igual a 6,7, o que está em concordância com resultados previamente publicados sobre populações de castas portuguesas ^[Lopes *et al.*, 1999], em que o número médio de alelos reportado para 11 *loci*, entre os quais estavam alguns dos usados neste estudo, era igual a 7. O número de alelos para os *loci* VVMD5, 6 e 7 foi o mesmo referido por Lopes *et al.* (1999) para os mesmos *loci*, respectivamente, 8, 5 e 8 alelos. No trabalho original de desenvolvimento dos *loci* VVMD5, 6 e 7, Bowers *et al.* (1996) obtiveram, respectivamente, 8, 5 e 11 alelos. Para os dois primeiros *loci*, os

resultados obtidos estão em plena concordância, tendo os autores descrito mais alelos para o *locus* VVMD7. O *locus* VVMD24 gerou 7 alelos, tal como descrito por Bowers *et al.* (1999a), tendo o *locus* VVMD25 gerado 7 alelos, menos 4 que o reportado originalmente, para uma população de 347 castas internacionais. Relativamente ao *locus* VVS1, relatam-se 5 alelos, um número também inferior ao reportado por Thomas e Scott, em 1993.

Os alelos gerados, em termos gerais, parecem bem distribuídos nas castas estudadas, resultando em probabilidades de identidade (PI) ou probabilidade de se encontrarem genótipos idênticos relativamente baixas (0,08 a 0,19) à excepção dos alelos do *locus* VVS1 - 181 e 190 – cuja frequência ultrapassa os 80 %, causando um valor de PI mais elevado (0,27), sendo, desta forma, o menos informativo dos *loci*. O *locus* VVMD5, como reportado por Lopes *et al.* (1999) e Bowers *et al.* (1993), foi aquele que se apresentou mais informativo, com um valor de PI igual a 0,08, sendo a frequência do alelo mais frequente (226) igual a 23%, o que é demonstrativo de uma boa distribuição pela população e do valor de PI bastante baixo. A probabilidade cumulativa de se obterem genótipos idênticos utilizando estes seis marcadores foi de $1,41 \times 10^{-5}$, o que corresponde a um potencial, do ponto de vista estatístico, para distinguir cerca de 141000 castas. Ou seja, a probabilidade de se encontrar um genótipo idêntico é de 1 em cada 141000 castas.

Outra forma de avaliar a capacidade discriminatória de um *locus* é através da heterozigosidade esperada (H_e). Também por este parâmetro o *locus* mais informativo, mais discriminatório, foi o VVMD5 (H_e : 0,84) e o menos informativo VVS1 (H_e : 0,61). Em todos os *loci*, o valor de heterozigosidade observada (H_o) foi maior ou igual (VVMD5 e VVMD24) ao de H_e . Este excesso de indivíduos heterozigóticos (para os *loci* VVS1, VVMD6, VVMD7 e VVMD25), relativamente

às expectativas, tendo em conta o equilíbrio de Hardy-Weinberg, pode ser justificado pelo facto de as videiras terem sido seleccionadas com base nos critérios de qualidade e quantidade produzidas. São conseguidos melhores rendimentos por indivíduos heterozigóticos, sendo estes, obviamente, seleccionados.

A probabilidade da ocorrência de alelos nulos (r) foi negativa para a maioria dos *loci*, sendo positiva apenas para VVMD5 e VVMD24. No entanto, estes valores são muito baixos, respectivamente 0,001 e 0,003, para pressupor a existência de alelos nulos na população.

A distribuição da frequência dos alelos pode ser avaliada através da Ilustração 4.3, onde esta se representa graficamente. Os gráficos apresentam a frequência dos alelos para cada *loci* e para cada um dos dois subgrupos de castas analisados, Vinhos Verdes e Douro. A frequência dos alelos pode ultrapassar o valor de 1, pois na ilustração são indicados os somatórios das frequências em cada subgrupo (*i.e.* a leitura da frequência no eixo das coordenadas corresponde à frequência desse alelo no respectivo subgrupo). Devido à homogeneidade da população analisada, não foram encontradas muitas diferenças na frequência dos alelos entre os dois subgrupos. Apenas foram encontrados alguns alelos, cerca de um por *loci*, (228, 224 de VVMD5; 194 de VVMD6, 257 de VVMD7; 212 de VVMD24 e 275 de VVMD25), que estão presentes apenas no subgrupo do Douro. O maior número de castas do Douro pode justificar esta maior diversidade de alelos. À excepção do *locus* VVS1, como já referido, e VVMD7, em que os alelos 239 e 263 são responsáveis por mais de 60% das ocorrências, a distribuição dos alelos é bastante uniforme.

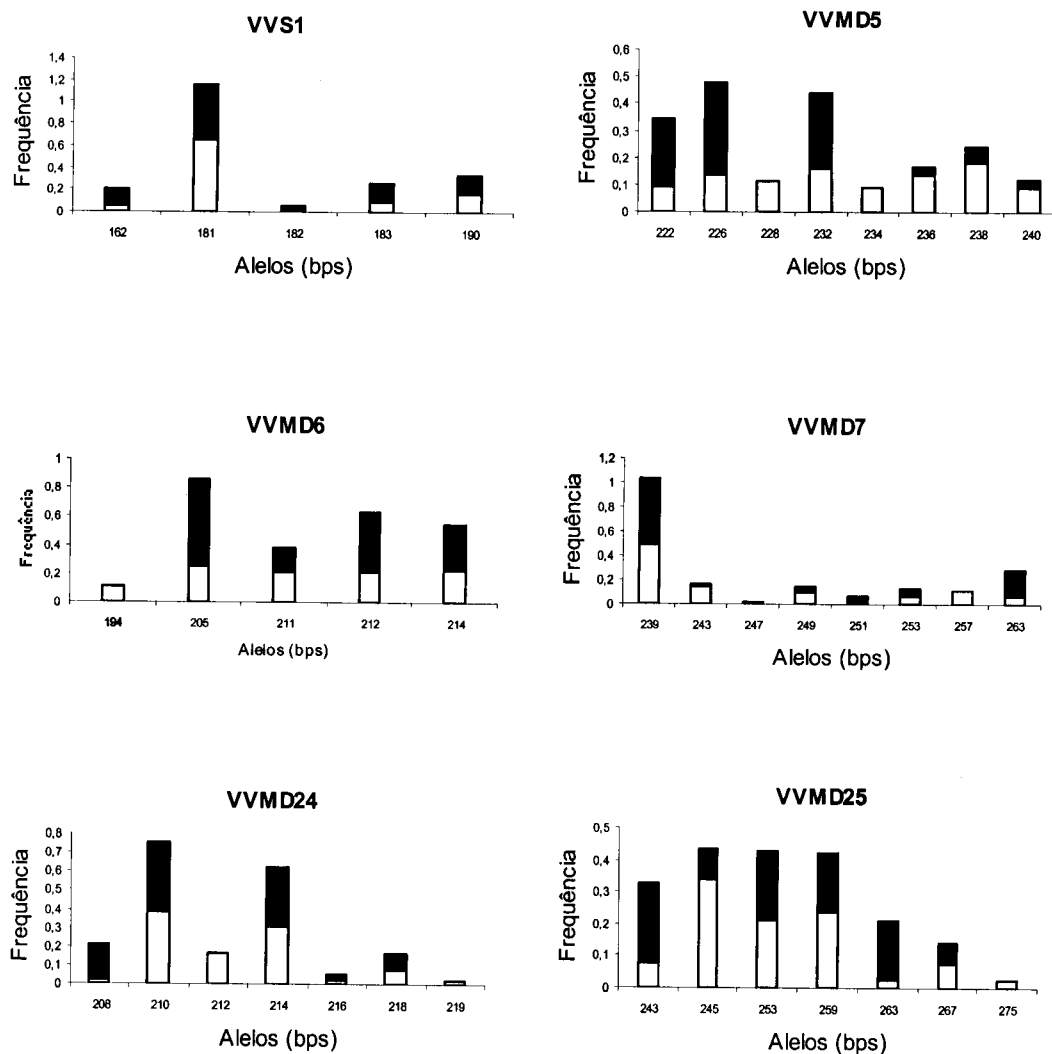


Ilustração 4.3 – Frequência dos alelos para cada locus. As barras pretas referem-se ao subgrupo de castas da região dos Vinhos Verdes e as brancas, ao subgrupo do Douro.

De modo a avaliar a estrutura da população de castas estudadas construíam-se dois tipos de fenogramas, um rectangular^[Ilustração 4.4] (utilizando o algoritmo Kitsch) e um radial^[Ilustração 4.5] (com o algoritmo Fitsh) que agrupam as castas de acordo com a sua similaridade calculada com base em [-log (proporção dos alelos partilhados)]. A similaridade média, calculada com base na matriz de distâncias, está em concordância com os resultados obtidos por Sefc *et al.* (1998a), em castas do norte da Europa, e Lopes *et al.* (1999) para castas portuguesas.

Não foram detectadas diferenças entre os genótipos dos grupos de castas que se julgavam sinónimos (Alvarinho e Albariño), (Bancelho e Brancellao), e (Sousão, Sousão do Douro e Vinhão). Para o valor de PI obtido ($1,41 \times 10^{-5}$), a probabilidade de dois genótipos de castas não relacionadas serem iguais é muito baixa, pelo que se pode considerar com grande probabilidade que os grupos referidos são a mesma casta. Já no putativo caso de sinonímia, entre a casta Loureiro e Loureiro Espanhol, estas não são iguais, embora sejam castas geneticamente muito próximas, diferindo apenas num alelo do *locus* VVMD7. No sentido oposto, os fenogramas indicam que existem duas castas claramente distantes da restante população. Para uma destas castas, a Tinta Roriz, esta situação é perfeitamente justificada pelo facto de estar descrito⁶ que a casta Tinta Roriz é sinónima da Tempranillo, a mais importante casta espanhola, produtora dos vinhos de Rioja, logo de origem diferente das restantes casta portuguesas.

⁶ Conclusão obtida através de métodos ampelográficos e, recentemente, confirmada por métodos moleculares (Lopes *et al.*, 1999; Portaria 428/2000).

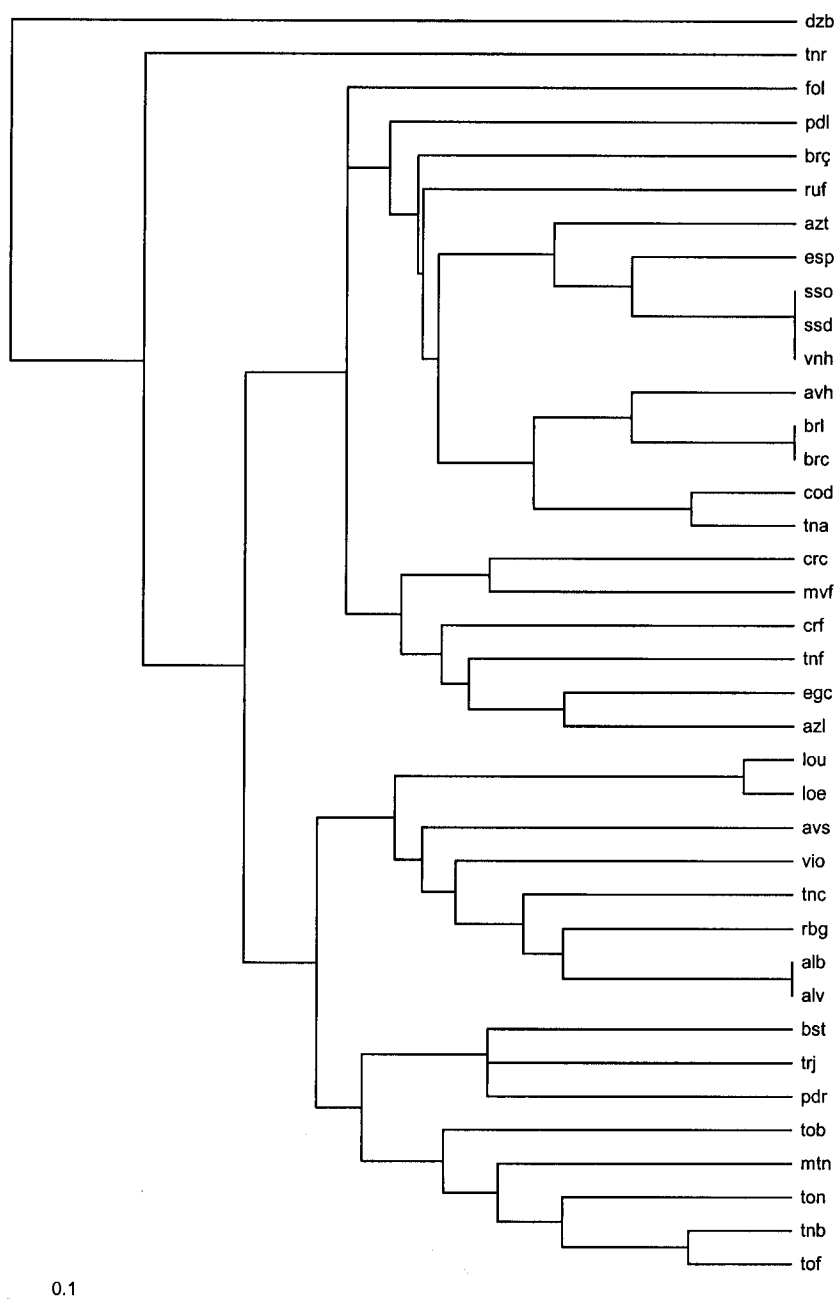


Ilustração 4.4 – Fenograma rectangular das 38 castas estudadas. A distância genética usada para a sua construção foi $(-\log[\text{proporção dos alelos partilhados}])$. No Quadro 4.1 são indicados os nomes das castas correspondentes a cada abreviatura.

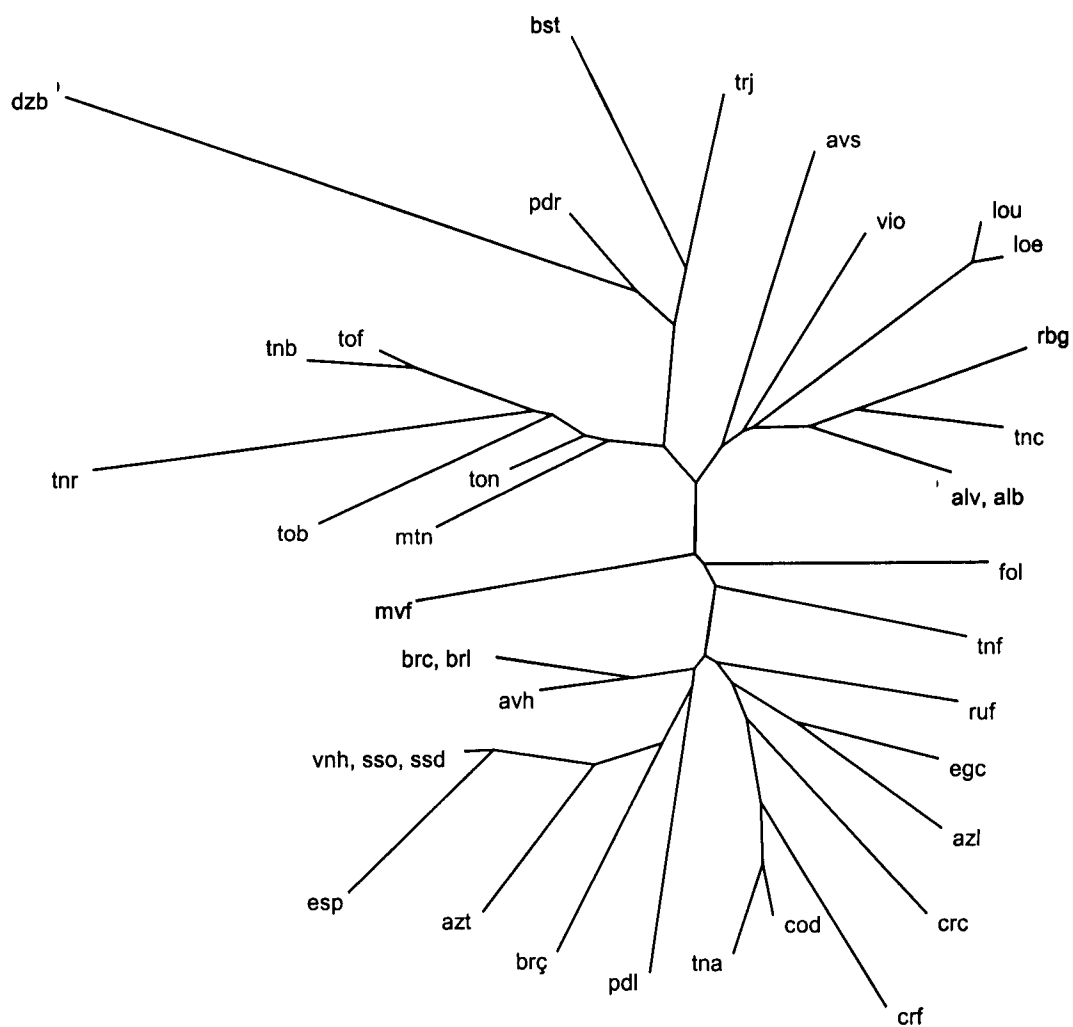


Ilustração 4.5 – Fenograma radial sem raiz das 38 castas em estudo.
 No Quadro 4.1 são indicados os nomes das castas correspondentes a cada abreviatura.

A mesma situação relativamente a esta casta foi descrita por Lopes *et al.* (1999). Já no que respeita ao caso de distanciamento da população, a casta Donzelinho Branco, não se conseguiu uma explicação no imediato, tendo os estudos de ser aprofundados com mais marcadores e aumentando a população da base de dados. Esta casta branca da região do Douro não apresenta sinónimos na lista do IVV e está um pouco abandonada na região devido à sua baixa produção. De qualquer forma, seria interessante aprofundar este estudo, pois o afastamento da população portuguesa é ainda maior do que no caso da Tinta Roriz.

Contrastando com os dois casos referidos anteriormente, as restantes castas apresentam um nível de similaridade considerável. Não é possível distinguir com clareza qualquer separação dos dois subgrupos estudados, Vinhos Verdes e Douro, o que é concordante com a distribuição dos alelos relativamente uniforme. Também a separação em castas brancas e tintas não é visível, o que corresponde ao descrito na maioria dos estudos de populações de videira com marcadores deste tipo^[Sefc *et al.*, 1998a]. Não obstante, é bastante evidente e interessante a distribuição das castas de acordo com a sua similaridade em quatro grupos principais, no caso do fenograma rectangular, e cinco grupos principais, no fenograma radial.

Relativamente ao primeiro grupo, constituído pelas castas Bastardo, Trajadura, Pedernã, Touriga Brasileira, Mourisco Tinto, Touriga Nacional, Tinta Barroca e Touriga Francesa, comum aos dois fenogramas, é um grupo bastante heterogéneo. Contudo, se o dividirmos em dois subgrupos, de acordo com a representação gráfica, encontramos um subgrupo constituído por castas brancas essencialmente da região dos Vinhos Verdes (Bastardo, Pedernã, Trajadura) e outro grupo de castas tintas da região do Douro (Tinta Francisca, Tinta Barroca, Touriga Nacional, Mourisco Tinto e Touriga Brasileira). Curiosamente, estes dois

subgrupos do fenograma rectangular, podem ser considerados no fenograma radial dois grupos independentes, aos quais se juntam, ainda que a uma distância considerável, as castas distantes da população, Tinta Roriz e Donzelinho Branco. Esta última ramifica-se a partir do grupo das castas brancas e a Tinta Roriz, do grupo das castas tintas. Um outro grupo nitidamente separado e igual nos dois tipos de gráficos é o constituído pelas castas Loureiro, Loureiro espanhol, Avesso, Viosinho, Tinto Cão, Rabigato, Albariño e Alvarinho. Este grupo é também bastante heterogéneo, notando-se, no entanto, uma predominância de casta brancas da região dos Vinhos Verdes. Não deixa de ser curiosa a integração da casta *inc* neste grupo.

Já no que concerne ao terceiro grupo de castas discriminado, é composto por Cercial, Malvasia Fina, Cornifesto, Tinta Francisca, Esgana Cão e Azal Branco, na representação rectangular, ao qual se adicionam as castas Tinta Amarela, Códega e Rufete, na representação radial. A junção das últimas castas a um grupo essencialmente constituído por castas do Douro parece mais fiel à realidade. O quarto grupo de castas, por seu lado, maior no fenograma rectangular, é constituído pelos seguintes indivíduos: Pedral, Borraçal, Rufete, Azal Tinto, Espadeiro, Sousão, Sousão do Douro, Vinhão, Alvarilhão, Brancellao, Brancelho, Códega e Tinta Amarela. É igualmente curiosa a subdivisão deste grande grupo noutra contendo as castas tintas da região dos Vinhos Verdes (Espadeiro, Azal Tinto, Vinhão, Sousão, Sousão do Douro). Este pequeno subgrupo é também claro no fenograma radial.

No fenograma radial, nota-se com maior evidência as castas mais distantes da restante população. Para além dos dois casos mais evidentes já referidos (Tinta

Roriz e Donzelinho Branco), também as castas Folgasão, Malvasia Fina e Tinta Francisca parecem não fazer parte de qualquer dos grupos referidos.

Pelas razões que têm vindo a ser apresentadas, o fenograma radial construído com base num algoritmo Fitsh, parece mais fiel à distribuição geográfica e etimológica das castas.

A casta tinta, designada na região dos Vinhos Verdes por Brancelho, não consta da lista de nomes oficiais do IVV. Este nome é apenas indicado como um sinónimo de Alvarelhão nessa mesma lista. Constatou-se, no entanto, que a casta designada por Brancelho não era igual à Alvarelhão, mas, dentro do universo estudado, era a que a esta última mais se aparentava. Também este caso parece ser merecedor de mais estudos.

Apesar de este estudo apresentar dados relativos apenas a um clone, foram analisados vários clones de cada casta. Optou-se por esta simplificação para que se pudessem avaliar devidamente as relações entre as castas e porque, na maioria dos casos, todos os clones apresentavam o mesmo genótipo. Todavia, um dos clones de Tinta Barroca era diferente dos outros e igual aos clones de Mourisco Tinto. Trata-se, provavelmente, de um erro de identificação de clones no campo de ensaio. Um outro caso de diferenças entre os *clones* foi identificado quando um dos *clones* de Tinta Francisca era diferente dos outros e também de todas as outras castas avaliadas.

De igual modo, um dos clones de Malvasia Fina, uma das castas não integrada em qualquer dos grupos referidos aquando da análise dos fenogramas, se apresentava diferente dos outros. Contudo, neste caso, a diferença consistia no

aparecimento de um terceiro alelo para um dos *loci*, o VVMD7, como se pode verificar na Ilustração 4.6.

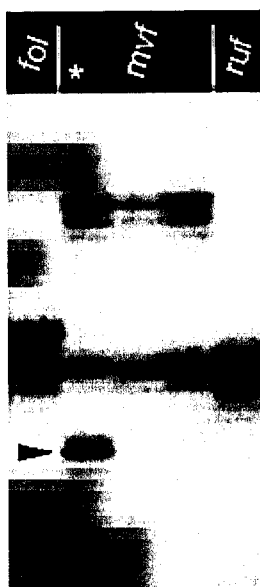


Ilustração 4.6 – Gel de acrilamida com os fragmentos amplificados usando o *primer* VVMD7 para as castas indicadas. Malvasia Fina está representada por três clones. A amostra assinalada com * exemplifica um caso de quimerismo. A banda assinalada com seta a negro corresponde ao alelo adicional. fol: Folgazão, mvf: Malvasia Fina e ruf: Rufete.

Este terceiro alelo apresenta uma massa molecular superior. Este parece ser um clone em estado de quimera, que é caracterizado pelo aparecimento de 3 alelos, em vez de dois. Este fenómeno, frequente na maioria das plantas^[Crespan, 2004], constitui um dos processos do aparecimento de mutações na videira, podendo ser responsável pelo polimorfismo fenotípico em clones. Franks *et al.* (2002), tendo em conta a sua experiência na identificação de castas por marcadores microsatélite, referem um fenómeno idêntico em que, ocasionalmente, observam mais que dois alelos para o mesmo *locus* em determinados indivíduos. Os autores

comprovaram a hipótese de este fenómeno ser devido ao aparecimento de uma quimera periclinal no meristema apical da videira. Como apontado anteriormente, na videira o meristema apical é composto por duas camadas distintas de células. A justificação mais provável da presença de um terceiro alelo no clone de Malvasia Fina reside na ocorrência de uma mutação em um dos dois alelos (planta diplóide) e, através da propagação vegetativa, esta mutação se ter mantido numa das camadas do meristema juntamente com a camada nativa. O genótipo final da planta será o resultado destas duas camadas. Enquanto que um dos alelos ocorre em ambas as camadas do meristema, o alelo mutado é diferente do segundo alelo da camada nativa, resultando na presença de três alelos na totalidade da planta^[Franks *et al.*, 2002]. Os autores referem que este tipo de fenómeno pode modificar inclusivamente o fenótipo da planta tendo, originando variabilidade genética com consequências no melhoramento da videira. A confirmação da estrutura em duas camadas do meristema das videiras foi referida por Riaz *et al.* (2002), que, no processo de caracterização molecular de clones de Pinot Noir e Chardonnay, identificaram alguns com três alelos e verificaram a presença do terceiro alelo apenas nas folhas, não o encontrando em tecidos como a raiz ou partes lenhosas da planta. De igual modo, Hocquigny *et al.* (2004), num estudo mais recente sobre microssatélites (50 *loci*) em clones de Pinot, reafirmaram a presença de quimeras periclinais em algumas plantas e referiram que a diversificação dos clones passa, essencialmente, pelo aparecimento de estados de quimera.

8. APLICAÇÃO AO ESTUDO DA PATERNIDADE DE UMA CASTA DA REGIÃO DO OESTE

8.1. INTRODUÇÃO

Cruzado de Rabo de Ovelha corresponde a uma casta cultivada na região da Estremadura e, embora não sendo uma variedade recomendada, está bastante disseminada pela região, recolhendo a preferência de alguns vitivinicultores, que a identificam como o resultado de um cruzamento com Fernão Pires e, tendo em conta uma interpretação literal do seu nome, Rabo de Ovelha.

Todavia, peritos em ampelografia da Estação Vitivinícola Nacional notaram a elevada semelhança morfológica entre Cruzado de Rabo de Ovelha e uma outra casta denominada Castelo Branco. Esta casta foi obtida em 1948 pelo Eng. Leão Ferreira de Almeida, a partir de um cruzamento entre Fernão Pires e Diagalves. Colocou-se, então, a hipótese de Cruzado de Rabo de Ovelha ter sido também obtida no mesmo cruzamento, hipótese esta fundamentada pelas semelhanças morfológicas evidentes entre esta e a casta Castelo Branco.

No presente trabalho, e partindo da hipótese anteriormente referida, as cinco castas em questão, Cruzado de Rabo de Ovelha, Fernão Pires, Castelo Branco, Diagalves e Rabo de Ovelha, foram analisadas, recorrendo a vários microsatélites que, em vários estudos alvo de revisão, e pelas razões apontadas no estudo anterior, provaram ser os marcadores mais eficazes para o esclarecimento da origem das castas.

A direcção do cruzamento não foi determinada, pois, para tal, seria necessária a utilização de microssatélites cloroplastidiais, como referido no capítulo 2.

8.2. MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal das castas *cbr*, *dia*, *fpr*, *rov*, foi colhido na EVN, em Dois Portos, de três plantas diferentes, representando 3 clones de cada casta. As amostras da casta *cro* foram colhidas, também de três vinhas diferentes, no Casal do Telhadouro, em Torres Vedras. Os extractos de ADN, o processo de amplificação com os *primers* e a separação dos fragmentos foram executados nas mesmas condições do estudo anterior que incidiu sobre as relações genéticas de 38 castas.

Foram usados para o estudo da paternidade da casta *cro* 4 *loci*: VVS1, VVMD5, VVMD6 e VVMD24. Estes mesmos *loci* foram aplicados simultaneamente às 38 castas anteriormente estudadas, o que constitui uma boa base de dados para o cálculo das frequências dos alelos essenciais para o cálculo dos rácios de probabilidade, indicadores que nos permitem concluir acerca da probabilidade de a hipótese em teste ser confirmada. A definição do número de marcadores utilizados, que permitiu chegar a uma conclusão, como se verá, com elevado grau de probabilidade, encontra a sua justificação nas opções seguidas no Laboratório de Biotecnologia, situado no Instituto de Ciências Agrárias de Vairão, Universidade do Porto, onde a maioria dos ensaios desta secção foram então realizados. O trabalho que contemplava exactamente os quatro *loci* descritos, iniciado nesse mesmo laboratório, entretanto extinto, teve continuidade no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Por essas razões, decidiu-se apresentar este trabalho com os resultados obtidos enquanto nele houve uma participação directa.

O número de castas usadas no cálculo das frequências dos alelos, 43 (38 do estudo anterior mais as 5 em questão), é da mesma ordem do utilizado por outros autores para o mesmo tipo de estudos. Sefc *et al.* (1997) usaram 51 castas, Sefc *et al.* (1998a), 52, Bowers e Meredith, (1997). 51. O número de castas utilizadas na construção da base de dados foi largamente ultrapassado em dois trabalhos mais recentes^[Bowers *et al.*, 1999a; Vouillamoz *et al.*, 2003]. Nestes, os seus autores têm construído, ao longo dos anos, bases de dados de perfis microssatélites muito completas e de representatividade quase internacional.

8.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No quadro Quadro 4.7, indicam-se os genótipos das cinco castas em questão relativos aos quatro *loci* estudados. Cada um dos alelos está indicado em pbs.

Quadro 4.7 – Genótipos das cinco castas da região do Oeste para os quatro *loci* estudados. O tamanho dos alelos é expresso em pbs. ^a*Loci* para os quais Rabo de Ovelha foram excluídos da paternidade de Cruzado de Rabo de Ovelha.

<i>Locus</i>	Castelo Branco		Diagalves		Cruzado de Rabo de Ovelha		Fernão Pires		Rabo de Ovelha	
VVS1 ^a	186	190	186	186	186	190	181	190	181	181
VVMD5	238	240	234	238	238	240	226	240	226	240
VVMD6	212	214	211	214	212	214	212	214	211	214
VVMD24 ^a	210	210	210	210	210	210	210	214	212	214

Em concordância com os estudos ampelográficos efectuados pelos técnicos da EVN, os dados obtidos pela análise dos quatro *loci* microssatélite indicam, com uma forte probabilidade, que as castas Cruzado de Rabo de Ovelha e Castelo Branco são a mesma. Os dados de probabilidade obtidos através da frequência dos alelos da base de dados de 43 castas mostram que a probabilidade de duas castas diferentes apresentarem o mesmo genótipo, em todos os *loci* investigados, é $6,53 \times 10^{-4}$. Este valor dá-nos um potencial estatístico de distinção de cerca de 65300 castas. Estes dados dão-nos uma forma objectiva de concluir, com grande probabilidade, que estas duas castas são efectivamente iguais. De forma a aumentar exponencialmente esta probabilidade, mais marcadores poderiam ser utilizados. No entanto, o principal objectivo desta parte do trabalho foi provar a exclusão da casta Rabo de Ovelha do par de progenitores de Cruzado de Rabo de Ovelha.

Na Ilustração 4.7, é apresentada a título de exemplo, uma imagem de um gel de acrilamida representando os genótipos das 5 castas em questão amplificadas com o *primer* VVMD6.

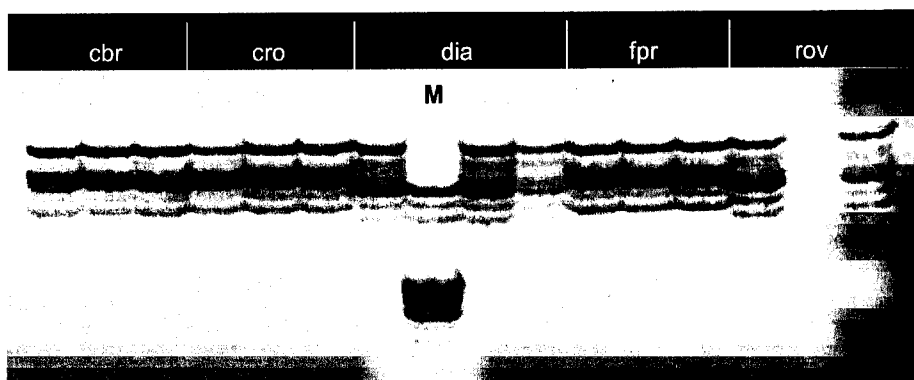


Ilustração 4.7 – Gel de acrilamida dos fragmentos amplificados pelo *primer* VVMD6 das amostras cbr: Castelo Branco; cro: Cruzado de Rabo de Ovelha; dia: Diagalves; fpr: Fernão Pires e rov: Rabo de Ovelha. M: padrão de fragmentos de massa molecular 212, 211 e 205 bps.

No Quadro 4.8 são também indicados os rácios de probabilidade das castas Diagalves (*dia*) e Fernão Pires (*fpr*) serem os progenitores da casta Cruzado de Rabo de Ovelha (*cro*). Os dados de probabilidade foram calculados utilizando as frequências dos alelos, obtidos pela amplificação dos 4 *loci*, calculadas na população de 43 castas previamente estudadas, e as frequências dos mesmos alelos para um intervalo de confiança de 95%, de modo a contabilizar a possibilidade de frequência dos alelos ser efectivamente mais elevada do que as calculadas para a população em questão^[Magalhães *et al.*, 2003]. Por não ser possível identificar o progenitor feminino e masculino, cada uma das castas pode ter desempenhado o papel de qualquer um dos sexos. Os valores dos rácios de probabilidade comparam a probabilidade da paternidade do par sugerido, em teste, com a probabilidade de:^[Seife *et al.*, 1998a] (1) duas castas não relacionadas seleccionadas de um modo aleatório serem as progenitoras [X e Y]; (2) uma das castas sugeridas e outra qualquer serem as progenitoras ['Diagalves × X' ou 'Fernão Pires × X']; e (3) um dos progenitores

ser uma das castas sugeridas, sendo a outra uma casta próxima ao segundo progenitor sugerido ('Diagalves × próx. Fernão Pires' ou 'Fernão Pires × próx. Diagalves'). Todos estes cálculos foram efectuados através do programa informático IDENTITY, versão 1.0.

Quadro 4.8 – Rácios de probabilidade da casta Cruzado de Rabo de Ovelha (cro) ser originária de um cruzamento entre as castas Diagalves (dia) e Fernão Pires (fpr), em relação a outras possibilidades. ^aOs valores apresentados entre parêntesis referem-se aos rácios de probabilidade calculados, usando os valores de frequência dos alelos para o intervalo de confiança de 95%; ^bbaseadas no estudo de 43 castas.

Locus	Genótipo		Frequência dos alelos			Rácios de probabilidade				
	dia	cro	fpr	Obs. ^b	95%	X × Y ^a	dia × X ^a	dia × próx. fpr ^a	fpr × X ^a	fpr × próx. dia ^a
VVS1			181	0,54	0,63	28,02	2,73	1,46	20,50	1,91
	186	186		0,04	0,10	(9,12)	(1,90)	(1,31)	(9,59)	(1,81)
		190	190	0,18	0,26					
VVM5			226	0,22	0,30	7,90	4,78	1,65	3,31	1,54
	234			0,05	0,11	(3,23)	(2,92)	(1,49)	(2,22)	(1,38)
	238	238		0,15	0,22					
		240	240	0,10	0,17					
VVM6	211			0,15	0,22	2,10	2,05	1,34	1,02	1,01
		212	212	0,24	0,33	(1,17)	(1,53)	(1,21)	(0,76)	(0,87)
	214	214	214	0,24	0,33					
VVM24	210	210	210	0,42	0,50	2,88	1,20	1,09	2,40	1,41
			214	0,30	0,38	(1,95)	(0,99)	(0,99)	(1,97)	(1,33)
	Rácios cumulativos					1,34×10 ³	32,1	3,55	167	4,18
						(67,1)	(8,36)	(2,34)	(32,1)	(2,87)

Os resultados são também consistentes com a hipótese de Fernão Pires e Diagalves serem os progenitores de Cruzado de Rabo de Ovelha e Castelo Branco. Os rácios (Quadro 4.8) calculados indicam que a probabilidade de Fernão Pires e Diagalves serem os progenitores de Cruzado de Rabo de Ovelha e Castelo Branco é $1,34 \times 10^3$ vezes superior à probabilidade de qualquer outro par de castas o serem. Esta análise é, todavia, limitada pelo tamanho da base de dados de partida e pelo número relativamente pequeno de *loci* utilizados. Assim, quando para o cálculo dos rácios de probabilidade se usam as frequências dos alelos, para um intervalo de

95% de confiança, a probabilidade da paternidade Fernão Pires/Diagalves desce para os 67,1 vezes. Uma outra limitação destes resultados, também derivada do tamanho da base de dados e, principalmente, do número de marcadores usados, reside no facto de a probabilidade de as referidas castas serem originárias de um cruzamento Fernão Pires×Diagalves ser apenas 3,55 vezes maior do que a de serem descendentes de um cruzamento entre Diagalves e uma casta próxima de Fernão Pires e 4,18 vezes superior à probabilidade de serem descendentes de Fernão Pires e uma casta próxima de Diagalves. Estes dados implicam a impossibilidade da exclusão com grande probabilidade da paternidade de castas próximas a Fernão Pires e Diagalves.

Contudo, e talvez de grande relevância para os objectivos do trabalho, a casta Cruzado de Rabo de Ovelha foi excluída da paternidade de Diagalves em dois (VVS1 e VVMD24) dos quatro *loci* utilizados, pois não partilhava com esta nenhum alelo, conforme se pode verificar pelos genótipos indicados no Quadro 4.7 para as cinco castas em estudo e os quatro marcadores.

9. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu afirmar-se que a distinção das mais importantes castas cultivadas na região Norte de Portugal foi possível utilizando marcadores do tipo microsatélite. Foram esclarecidos alguns casos de sinonímia com as castas espanholas relacionadas (Alvarinho e Albariño; Loureiro e Loureiro Espanhol) e também a sinonímia entre as castas Sousão, Sousão do Douro e Vinhão. Sendo o número de castas estudadas apenas uma pequena porção da totalidade das castas portuguesas e tendo-se esclarecido os referidos casos, assim como estabelecido algumas relações de proximidade genética interessantes entre este grupo de castas, a caracterização genética do germoplasma do nosso País ajudará, certamente, a clarificar um grande número de casos de sinonímia e homonímia e a estabelecer um quadro de relações de proximidade genética entre as castas mais próximo da realidade. Com uma base de dados mais completa e usando mais alguns marcadores, será possível, no futuro, resolver alguns casos de identificação duvidosa de castas, comparando o perfil dos indivíduos em questão com os contidos na base de dados.

No que concerne ao estudo da paternidade da casta Cruzado de Rabo de Ovelha, da região do Oeste, tendo por base as ilações dos estudos ampelográficos, confirmou-se a exclusão da casta Rabo de Ovelha da paternidade da Cruzado de Rabo de Ovelha para dois dos *loci* estudados. Os dados obtidos apontam no sentido de um cruzamento entre Fernão Pires e Diagalves, confirmando as suspeitas dos trabalhos ampelográficos. Foram também recolhidos dados que indicam, com elevada probabilidade, a sinonímia entre Cruzado de Rabo de Ovelha e Castelo Branco. Este trabalho demonstra também a importância de se manterem em

coleções de videiras castas actualmente em desuso, pois podem ser importantes no esclarecimento de relações filogenéticas entre as castas.

10. BIBLIOGRAFIA

- Bowers, J. E., Bandman, E. B., Meredith, C. P. (1993). DNA fingerprinting characterization of some wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 266-274
- Bowers, J. E., Boursiquot, J.-M., This, P., Chu, K., Johansson, H., Meredith, C. (1999a). Historical genetics: The parentage of Chardonay, Gamay, and other wine grapes of the northeastern France. *Science*, 285, 1562-1565
- Bowers, J. E., Dangi, G. S., Meredith, C. P. (1999b). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 243-246
- Bowers, J. E., Dangi, G. S., Vignani, R., Meredith, C. P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39, 628-633
- Bowers, J. E., Meredith, C. P. (1997). The parentage of a classical wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nat. Genet.*, 16, 84-87
- Chase, M. W., Hills, H. H. (1991). Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, 40, 215-220
- Crespan, M. (2004). Evidence of the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 231-237
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15
- European Vitis Database. Consultado em Março de 2005, em GENRES: German Center for Documentation and Information in Agriculture: <http://www.genres.de/eccdb/vitis/>
- Feijó, R. G., Cardoso, A. H. (1996). As castas. In: Chaves Ferreira, F. D. *O Vinho Verde*. Enciclopédia dos Vinhos de Portugal. Chaves Ferreira Publicações. Lisboa.
- Felsenstein, J. (1989). *PHYLIP – Phylogeny Inference Package*. Consultado em Dezembro de 2004 em University of Washington: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- Franks, T., Botta, R., Thomas, M. R. (2002). Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 192-199
- Hocquigny, S., Pelsy, F., Dumas, V., Kindt, S., Heloir, M.-C., Merdinoglu, D. (2004). Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome*, 47, 579-589
- Lodhi, M. A., Ye, G.-N., Weeden, F., Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 12, 6-13
- Lopes, M. S., Sefc, K. M., Eiras-Dias, E., Steinkellner, H., Câmara-Machado, L., Câmara-Machado, A. (1999). The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. *Theor. Appl. Genet.*, 99, 733-739
- Magalhães, R., Faria, M. A., Santos, N. M. M., Eiras-Dias, J. E., Magalhães, N., Meredith, C. P., Ferreira-Monteiro, F. (2003). Verifying the identity and parentage of Cruzado de Rabo de Ovelha with microsatellite markers. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 56-58
- Martins, A. (2002). Selecção de castas de videira, onde estamos, para onde vamos. III Conferência da revista de vinhos. Porto
- Meredith, C. P., Guerra, B. (1995). Comparison of *Vitis Berlandieri* x *Vitis riparia* rootstocks by restriction fragment length polymorphism analysis. *Vitis*, 34, 109-112
- Minch, E. (1997). *MICROSAT version 1.5b*. Consultado em Dezembro de 2004 em Stanford University: <http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat/>

- Nicolau de Almeida, J. (1998). As castas do Douro. In: Chaves Ferreira, F. D. O *Vinho do Porto e os Vinhos do Douro*. Enciclopédia dos Vinhos de Portugal. Chaves Ferreira Publicações. Lisboa.
- Page, D. M. (2000) *TREE VIEW*. Consultado em Dezembro de 2004 na Universidade de Glasgow: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Parimoo, S., Parimoo, B. (2003). Sample preparation in DNA analysis. In Mitra, S. (Ed.). *Sample preparation techniques in Analytical chemistry*. (pp. 271-300). New york: John Wiley and Sons
- Riaz, S., Garisson, K. E., Dangl, G. S., Boursiquot, J.-M., , Meredith, C. P. (2002). Genetic divergence and Chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127, 508-514
- Sefc, K. M., Regner, F., Glössl, J., Steinkellner, H. (1998b). Genotyping of grapevine rootstock cultivars using microsatellite markers. *Vitis*, 37, 15-20
- Sefc, K. M., Steinkellner, H., Glössl, J., Kampfer, S., Regner, F. (1998a). Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 97, 227-231
- Sefc, K. M., Steinkellner, H., Wagner, H. W., Glössl, J., Regner, F. (1997). Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevines. *Vitis*, 36, 179-183
- Stewart, C. N., A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 14, 748-749
- Stewart, C. N., Via, L. E., A rapid CTAB DNA isolation technique useul for RAPD fingerprinting and other PCR applications, *BioTecniques*, 14, 748-749
- Thomas, M. R., Matsumoto, S., Cain, P., Scott, N. S. (1993). Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.*, 86, 173-180
- Thomas, M. R., Scott, N. S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analised as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 86, 985-990
- Vouillamoz, J., Maigre, D., Meredith, C. P. (2003). Microsatellite analysis of ancient alpine grape cultivars: pedigree reconstruction of *Vitis vinifera* L. 'Cornalin du Valais'. *Theor. Appl. Genet.*, 107, 448-454
- Wagner, H. W., Sefc, K. M. (1999). *Identity 1.0*. Consultado em Dezembro de 2004 em Universität für Bodenkultur Wien: <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>
- Wang, X-D., Wang, Z-P., Zou, Y-P. (1996). An improved procedure for the isolation of nuclear DNA from leaves of wild grapevine dried with silica gel. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 14, 369-373

CAPÍTULO 5

Desenvolvimento de metodologias de discriminação de clones de videira: caracterização de clones de Touriga Nacional

O trabalho explanado neste capítulo originou as seguintes publicações:

Faria, M. A., Beja-Pereira, M., Martins, A., Ferreira, M. A., Nunes, M. E. S. (2004). Grapevine clones discriminated using stilbene synthase-chalcone shynthase markers. J. Sci. Food Agric., 84, 1186-1192

Faria, M. A., Nunes, M. E. S., Ferreira, M. A.. A simple method for the purification of Vitis vinifera DNA extracts for PCR amplification. Submitted.

1. INTRODUÇÃO

A detecção de polimorfismos em populações de clones é uma tarefa que reúne o interesse de muitos investigadores em *Vitis vinifera*. A razão de tal interesse reside no facto de que, como vimos no capítulo 1, a descoberta de um método que permitisse a correcta identificação de clones, aceleraria o processo de selecção clonal. Esta forma mais célere de fazer selecção clonal teria enormes repercussões na viticultura moderna, com reflexos na melhoria da qualidade dos vinhos, na produtividade das castas e na diversificação do património genético de *Vitis vinifera* usado de um modo intensivo para produção de vinho.

Neste contexto, o objectivo principal deste estudo foi a discriminação de 21 clones de Touriga Nacional, usando marcadores StSy-CHS – regiões genómicas não transcritas 5' do gene da StSy (Stilbene-Synthase) – CHS (Chalcone-Synthase). Foram também usados 9 marcadores microsatélite, de modo a identificar uma possível origem policlonal desta população de clones. Na hipótese de os clones serem distinguidos pelos marcadores microsatélite, a possibilidade de origem policlonal seria grande e a aplicação dos marcadores StSy-CHS desnecessária.

Para resolver algumas dificuldades encontradas durante o desenvolvimento do método, designadamente ao nível da amplificação da maioria das amostras, provavelmente devido a extractos de ADN com insuficiente pureza, desenvolveu-se, paralelamente, um método prático de purificação de extractos de ADN, obtido a partir de qualquer matriz e por qualquer método de extracção. O desenvolvimento deste método é também descrito neste capítulo.

2. AMOSTRAS

Este capítulo trata do desenvolvimento de um método de análise de ADN para a diferenciação de clones de videira. A casta seleccionada para a realização deste estudo foi a Touriga Nacional devido à sua inequívoca importância no panorama vitivinícola Português, como anteriormente referido, e ao avançado estágio do respectivo processo de selecção clonal, iniciado em 1978 pelo Prof. Antero Martins^[Martins *et al.*, 1990]. A uniformidade clonal (e.g. a garantia de que todas as plantas pertencem à mesma variedade) estará mais assegurada nesta fase da selecção.

Actualmente existem cerca de 42 castas portuguesas em processo de selecção^[Eiras-Dias *et al.*, 1998]. Este trabalho de selecção permitiu a identificação dos clones com as melhores características de produção (quantitativas) e de qualidade dos vinhos originados (qualitativas).

Foram colhidas amostras em dois locais distintos: Quinta da N. Senhora de Lurdes (Baixo-Corgo), Vila Real, colecção mantida pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; e na Quinta de Leda (Douro Superior), em Almendra, ensaio este da responsabilidade do Instituto Superior de Agronomia através da pessoa do Prof. Antero Martins. Baseados nos resultados de 20 anos de selecção clonal no Douro Superior, foram escolhidos os 10 clones mais produtivos e os 10 menos produtivos de modo a aumentar a probabilidade de detecção de polimorfismos entre estes. Foi introduzido no estudo um clone do Baixo-Corgo e a casta internacional branca Chardonnay, como controlos.

No Quadro 5.1 são indicados os clones escolhidos para a realização deste trabalho e, nos casos em que os dados foram disponibilizados, são indicados resultados médios da avaliação da produção recolhidos durante a campanha de 2003.

Quadro 5.1 – Descrição das amostras (origem e rendimento) usadas neste estudo. ^aA casta Chardonnay foi colhida na Quinta de Sta. Bárbara, sob a responsabilidade do Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro, Régua.

Amostra N°	Clone	Origem	Rendimento (Kg/cepa)	microssatélites	StSy-CHS
1	TN 3811	Douro Superior	1.410	x	x
2	TN 4707	Douro Superior	0.547	x	x
3	TN 0103	Douro Superior	1.381	x	x
4	TN 4506	Douro Superior	0.539	x	x
5	TN 4106	Douro Superior	1.332	x	x
6	TN 4301	Douro Superior	0.521	x	x
7	TN 5107	Douro Superior	1.299	x	x
8	TN 1024	Douro Superior	0.499	x	x
9	TN 4502	Douro Superior	1.289	x	x
10	TN 4505	Douro Superior	0.484	x	x
11	TN 4227	Douro Superior	1.273	x	x
12	TN 1027	Douro Superior	0.457	x	x
13	TN 0906	Douro Superior	1.251	x	x
14	TN 5316	Douro Superior	0.470	x	x
15	TN 4124	Douro Superior	1.245	x	x
16	TN 2503	Douro Superior	0.451	x	x
17	TN 1610	Douro Superior	1.244	x	x
18	TN 5108	Douro Superior	0.445	x	x
19	TN 3817	Douro Superior	1.242	x	x
20	TN 5217	Douro Superior	0.357	x	x
21	TN 3932	Baixo Corgo	-	-	x
22	Chardonnay ^a	Internacional	-	-	x

Todas as amostras foram submetidas a análise nos *loci* StSy-CHS. Relativamente à análise dos *loci* microssatélite, esta foi executada sobre as amostras do Douro Superior, pois as restantes duas amostras foram introduzidas como controlos no estudo StSy-CHS.

As amostras foram colhidas, conservadas e o seu ADN extraído, de acordo com os métodos desenvolvidos e referidos no capítulo 4.

3. EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ADN

Tendo em vista o estudo do polimorfismo das referidas amostras foram executadas duas extracções independentes para cada planta. O processo de extracção de ADN, propriamente dito, foi executado de acordo com descrito no capítulo 4, a partir de folhas de videira desidratadas das castas Tinta Roriz, Tinto Cão, Touriga Francesa, Touriga Nacional e Tinta Barroca e dos vários clones de Touriga Nacional em estudo.

Considerando as dificuldades encontradas no decorrer do processo de amplificação e o facto de as deficiências de amplificação não serem notadas em todas as amostras, levantou-se a hipótese de o problema residir na insuficiente pureza dos extractos. Este insuficiente grau de pureza poderia ser resolvido, testando novos processos extractivos, entretanto descritos na bibliografia. Contudo, o grande número de amostras já extraídas, nesta fase do estudo, levou à procura de uma metodologia de purificação que pudesse ser utilizada nas amostras já extraídas. Ao mesmo tempo que se garantia o aproveitamento dos extractos obtidos, poderia desenvolver-se um método altamente versátil com inúmeras aplicações para além do caso referido.

Optou-se, assim, pelo desenvolvimento de um processo de purificação de extractos de ADN. O método de purificação resultante destes ensaios foi aplicado às amostras em estudo e encontra-se descrito no Quadro 5.2.

Quadro 5.2 – Processo de purificação de extractos de ADN por oclusão numa matriz de agarose.

Processo de purificação de extractos de ADN

1. A cerca de 50 µl de extracto cru adicionar um igual volume de agarose LMP, fundida, à concentração de 1,6% em água. Homogeneizar num banho de água a 70 °C.
2. Após uma breve centrifugação, de modo a reunir a totalidade da amostra no fundo do tubo, levar as amostras a 4 °C.
3. Após a solidificação, completar o volume dos tubos (2ml, de preferência) com TE e soltar o bloco de agarose do fundo dos tubos por agitação.
4. Colocar os tubos na posição horizontal num agitador orbital ou similar durante duas horas, à temperatura ambiente.
5. Rejeitar o tampão com o cuidado indispensável para não perder o bloco de agarose (uma breve contrifugação poderá promover a aderência do bloco ao fundo do tubo e facilitar o processo).
6. Completar novamente o volume dos tubos com TE e repetir a agitação durante 2 horas. Rejeitar, do mesmo modo, o excesso de tampão.
7. Adicionar água ultrapura até que a concentração de agarose desça aos 0,3% e homogeneizar a mistura a 70 °C. Após breve centrifugação, armazenar as amostras a 4 °C.

3.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

Devido ao facto de os polifenóis e os polissacarídeos terem aproximadamente a mesma solubilidade do ADN, são os dois grupos de substâncias considerados os mais importante inibidores da reacção de PCR. Estão presentes em extractos de ADN não purificado, não sendo removidos completamente pelos protocolos clássicos de extracção^[Wilson, 1997].

Desde a publicação dos primeiros trabalhos de análise do ADN de videira, foram desenvolvidas várias metodologias de extracção^[Capítulo 2] e alguns *kits* comerciais para o mesmo efeito. Apesar da disponibilidade de grande número de metodologias, a obtenção de extractos mais ou menos puros de ADN, a partir de matrizes contendo elevadas concentrações de polifenóis, açúcares, e outras substâncias inibidoras da reacção de PCR (e.g. folhas, mostos e vinhos), continua dependente, em grande parte, de protocolos baseados na utilização de CTAB.

Por vezes, e devido à necessidade especiais de purificação dos extractos, é incontornável a utilização de uma metodologia de purificação pós-extracção. Estas metodologias baseiam-se, na maioria dos casos, no uso de colunas descartáveis de sílica, disponíveis no mercado para purificação de produtos de PCR. Todavia, a utilização deste material aumenta o número de passos do processo (com as consequentes desvantagens da manipulação acrescida dos extractos) e sobe, consideravelmente, o custo final da extracção.

Tendo em conta a grande variabilidade composicional dos inúmeros tipos de amostras sujeitas a processos de extracção de ADN, em metodologias de avaliação de

autenticidade, cada vez mais frequentes, e a impossibilidade do desenvolvimento de um método de extracção universal, adaptado à composição específica de cada amostra, afigura-se bastante útil o desenvolvimento de um método de purificação de extractos de ADN funcional em todos os tipos de extractos. Uma solução bastante elegante foi a apresentada por Moreira (1998), cuja aplicação teve resultados positivos em extractos obtidos de matrizes tão variadas como bactérias, algas castanhas, protoplastos e microrganismos do solo rico em húmus. Resumidamente, o método baseia-se no seguinte: o extracto obtido por qualquer metodologia é retido em agarose do tipo LMP (Low Melting Point) e, após solidificação, os blocos de agarose são mergulhados num excesso de tampão TE. Deste modo, as moléculas de ADN de grande tamanho ficam retidas na matriz de agarose, enquanto os contaminantes hidrofílicos, de menor tamanho, difundem através da matriz de agarose e solubilizam-se no meio aquoso tamponado. Sucessivas lavagens do bloco, neste meio aquoso, eliminam, quase por completo, as substâncias contaminantes. Após a eliminação do tampão em excesso, o bloco de agarose é então fundido e diluído em água. Este extracto pode ser directamente usado na reacção de PCR, pois a agarose LMP, em determinada concentração, não tem efeitos inibidores da reacção.

Neste trabalho, desenvolveu-se esta metodologia, de modo a que todo o processo pudesse decorrer no tubo original que contem o extracto cru, a fim de evitar perda de amostra ou qualquer tipo de contaminação. No processo original, o extracto cru é retirado do tubo e incluído na matriz de agarose, utilizando pequenas formas rectangulares externas, o que aumenta o número de passos do processo e a consequente probabilidade de contaminação.

3.2. ENSAIOS EXECUTADOS PARA A AVALIAÇÃO DO PROCESSO

DESENVOLVIDO

De modo a avaliar a eficiência do processo de purificação, no que concerne à eventual perda de ADN durante a sua execução, foi feito um gel de agarose, onde se compararam amostras sujeitas ao processo e num estado não purificado (cru). Para tal, os extractos iniciais foram divididos em duas partes, tendo uma delas sido submetida à purificação.

Com vista a avaliar a eficácia deste processo extractivo, amplificou-se com primers para os *loci* microssatélite (VVMD6 e VVMD31) e StSy-CHS vários extractos obtidos das variedades referidas antes e após o processo de purificação. As condições de amplificação foram as descritas no capítulo 4, para os microssatélites, e neste capítulo para os marcadores StSy-CHS. Ambos os extractos foram também analisados num gel de agarose a 0,8%, a fim de ser possível uma comparação quantitativa do ADN presente entre os dois tipos de extracto. Os extractos não sujeitos ao processo de purificação foram diluídos, tendo em conta o factor da diluição efectuada nos extractos purificados de modo a que a concentração final de agarose seja igual a 0,3%.

4. MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares foram seleccionados de acordo com a sua capacidade de discriminação, segundo a bibliografia. Para o estudo do polimorfismo dos marcadores microssatélite nos clones foram usados 9 *loci*: VVMD8^[Bowers *et al.*, 1996], VVMD21, VVMD27, VVMD28, VVMD29, VVMD31, VVMD32, VVMD36 e VVMD37^[Bowers *et al.*, 1999]. Relativamente ao estudo de polimorfismo dos marcadores StSy-CHS, foram usadas

duas combinações de três *primers* cuja sequência se indica no Quadro 5.3. As combinações foram seleccionadas de acordo com as conclusões de Geuna *et al.* (1997), que indicavam como geradoras de mais polimorfismos as combinações SS1/SS10 e SS1/SS13.

Quadro 5.3– Sequência e posição no gene *StSy* dos *primers* usados na discriminação de clones.

^aPosição do primeiro nucleótido do *primer* relativamente ao codão ATG da sequência cDNA *StSy*.

Primer	Sequência (5'-3')	Posição ^a
SS1	gAAgCCATTgATCCCAgC	+8
SS10	gCTgCTATgTTTgATCCC	-137
SS13	ggTCTAAggAgTACAgAg	-220

Como revisto anteriormente, têm sido usados diversos marcadores moleculares na caracterização de castas de *Vitis vinifera*. Todavia, os resultados obtidos pela aplicação destes marcadores na distinção de clones de videira não são, por vezes, muito esclarecedores. Há autores que referem a capacidade destes marcadores para a distinção clonal^[Regner *et al.*, 2000], referindo, contudo, os marcadores ISSR como mais apropriados para a distinção de clones devido à sua grande estabilidade e grau de polimorfismo. Outros autores^[Sefc *et al.*, 2001] são da opinião que, tanto os marcadores microsatélite como os ISSR, não possibilitam a distinção de clones. Referem ainda que a origem policlonal de algumas populações de clones mais antigas pode justificar a detecção de polimorfismos entre os indivíduos. Mais recentemente, foram adicionalmente reportados resultados positivos na identificação de clones, utilizando a técnica de AFLP^[Martinez-Zapater *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000; Cervera *et al.*, 2000]. Não obstante poder gerar resultados efectivamente úteis, a metodologia AFLP é bastante complexa e exige equipamento não disponível em grande parte dos laboratórios.

Um outro método, menos complexo, foi também descrito como capaz de gerar elevados níveis de polimorfismo em castas de videira^[Geuna et al., 1997]. Os mesmos autores^[Geuna e Scienza, 2000] aplicaram esta metodologia à discriminação de clones de Chardonnay, Pinot e Sangiovese. Por seu lado, Bavaresco et al. (2000) avaliaram este marcador molecular na discriminação de clones da casta Italiana Barbera, tendo conseguido encontrar diferenças entre clones resistentes e susceptíveis a fungos, como é exemplo o mofo cinzento. O referido método, seleccionado para o nosso estufo, baseia-se na pesquisa de polimorfismos nas regiões genómicas não transcritas 5' do gene da *StSy* (Stilbene-Synthase) – CHS (Chalcone-Synthase) ou marcadores *StSy*-CHS. O gene *StSy* é o responsável pela síntese das substâncias antecedentes do estilbeno, molécula base de muitos compostos polifenólicos, que conferem à planta resistência a alguns agentes patogénicos^[Schroder et al., 1993] (fitoalexinas), nomeadamente fungos. Geuna et al. (1997) isolaram e sequenciaram regiões 5' a montante do gene *StSy*, que verificaram conter reminiscências de microsatélites, logo com elevado potencial polimórfico. Esta enzima foi já identificada em amendoim^[Schroder et al., 1993], pinheiro^[Fliegmann et al., 1992] e videira^[Melchior e Kindl, 1991]. Neste último caso parece ser codificada por um mutante do *chalcone synthase* (*CHS*), pois o gene *StSy* apresenta uma elevada analogia de sequência com a família de genes *CHS*. Na videira, foram já identificados e clonados sete tipos diferentes de genes *StSy*^[Melchior e Kindl, 1991; Wiese et al., 1994].

5. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

Os *loci* microsatélite foram amplificados de acordo com os programas descritos por Bowers et al. (1996, 1999) que correspondem às condições utilizadas no capítulo 4.

As condições de amplificação usadas para os marcadores StSy-CHS foram: 2 min. a 94 °C; seguidos de 39 ciclos (30 seg a 94 °C, 30 seg a 58 °C, 1 min a 72 °C); e cinco minutos de extensão final a 72 °C. O meio reaccional de amplificação, num total de 20 µl, era composto por: 4 µl de extracto de ADN, 0,02 nmol de cada *primer*, 4 µmol de cada dNTP, 1 unidade de Taq polimerase, 2 µl de tampão concentrado da reacção e cloreto de magnésio suficiente para atingir a concentração indicada no adequada a cada par de *primers* utilizado (SS1/10: 1,5 mM e SS1/13: 2 mM). Estas condições de amplificação foram definidas tendo em conta as dificuldades encontradas e os ensaios de optimização executados de acordo com o referido na secção seguinte.

Depois de definidas as condições óptimas de amplificação e de modo a avaliar a reprodutibilidade do método foram usados dois termocicladores diferentes, em diferentes laboratórios¹, para cada uma das amostras em duplicado.

5.1. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES STSY

A necessidade da optimização das condições de amplificação surgiu devido à falta de eficiência da amplificação dos marcadores StSy-CHS utilizando as condições descritas na bibliografia. Enquanto os *loci* microsatélite foram amplificados de acordo com os programas descritos nos trabalhos originais^[Bowers *et al.*, 1996, 1999], os marcadores StSy-CHS mostraram-se bastante difíceis de amplificar com a temperatura de hibridação de 50 °C sugerida por Geuna *et al.* (1997). Quando ocorria amplificação a esta temperatura, os perfis de bandas obtidos não eram bem definidos e polimórficos.

¹ Laboratório de Bromatologia da FFUP e Laboratório de Genética Vegetal da Secção Autónoma de Ciências Agrárias da FCUP.

Com vista a melhorar a amplificação e o grau de polimorfismo destes marcadores, decidi testar-se a amplificação em algumas amostras para 6 temperaturas de hibridação diferentes e três concentrações de cloreto de magnésio, os dois parâmetros que podem influenciar, efectivamente, a especificidade da ligação dos *primers*. Definiram-se, deste modo, diversos tratamentos (diferentes condições de amplificação) a que as amostras seriam submetidas, de acordo com o Quadro 5.4.

Quadro 5.4 – Tratamentos (combinações de diferentes temperaturas de hibridação e concentrações de cloreto de magnésio) usados para a selecção das condições óptimas de amplificação.

Tratamento	Temperatura de Hibridação (°C)	Concentração de MgCl ₂		
		1.5 mM	2.0 mM	3.0 mM
1	50	x		
2	50		x	
3	50			x
4	52	x		
5	52		x	
6	52			x
7	58	x		
8	58		x	
9	58			x
10	60	x		
11	60		x	
12	60			x

6. SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS E TRATAMENTO DOS DADOS

Os produtos de amplificação foram então separados em géis de acrilamida desnaturante² corados com nitrato de prata. Foi analisada, para cada amostra, o perfil complexo de bandas obtido. Depois de contabilizadas todas as bandas polimórficas, foi construída uma matriz binária em que, para cada amostra, a presença de uma banda foi assinalada com o algarismo 1 e a ausência com 0. Esta matriz serviu de base para os cálculos dos coeficientes de similaridade entre pares de clones, de acordo com Dice (1945) e Nei e Li (1979): $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, sendo GS o coeficiente de similaridade entre os clones *i* e *j* (genetic similarity). *N_{ij}* expressa o número de bandas comuns para *i* e *j*. *N_i* e *N_j* correspondem ao número total de bandas dos clones *i* and *j*, respectivamente. A dois clones iguais corresponderá um valor de GS igual a 1, enquanto clones totalmente não relacionados originam um valor de GS igual a 0.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

Como se pode verificar pela análise da Ilustração 5.1 (a) não existem diferenças significativas ao nível da quantidade ou qualidade do ADN entre extractos purificados e não purificados, o que confirma a eficiência da matriz da agarose relativamente à retenção das moléculas de ADN.

² Os processos de separação electroforética quer com géis de agarose quer com géis de acrilamida, foram executados de acordo com o referido no capítulo 4.

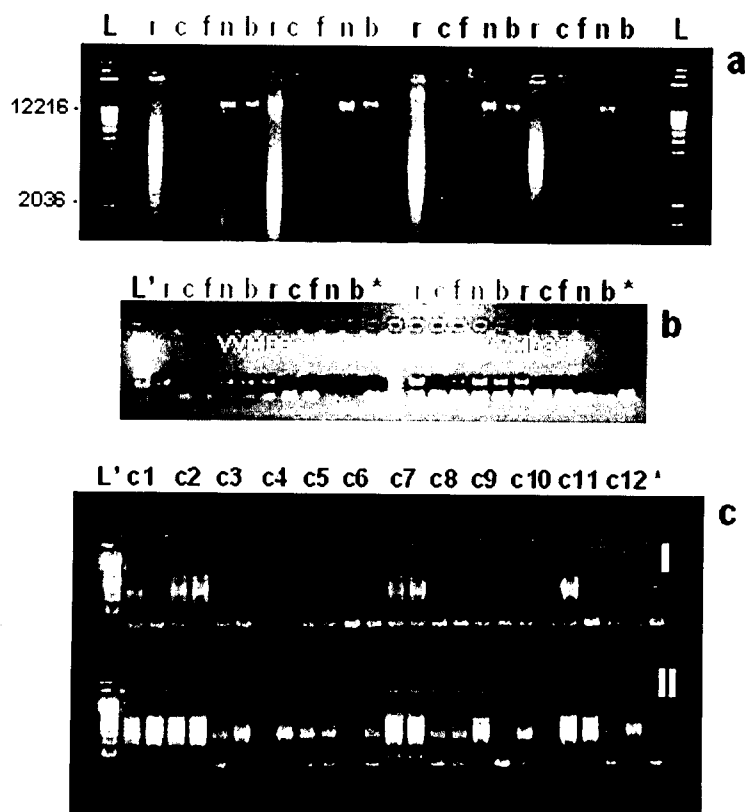


Ilustração 5.1 – Géis de agarose mostrando o efeito do processo de purificação na qualidade, quantidade e na eficiência de amplificação dos extractos de ADN usando marcadores microssatélite e StSy-CHS. r, c, f, n e b são respectivamente as castas Tinta Roriz, Tinto Cão, Touriga Francesa, Touriga Nacional e Tinta Barroca. C1 a C12 são diferentes clones (em replicado) da casta Touriga Nacional. L: 1 Kb DNA ladder. *ensaios em branco.

- a.** Estratos de DNA genómico crus (a preto) e purificados (a cinza) das variedades indicadas.
- b.** Produtos de amplificação dos extractos crus (a preto) e purificados (a cinza) para os loci indicados.
- c.** Produtos de amplificação dos extractos crus (I) e purificados (II) para o locus StSy-CHS

No que respeita à avaliação da eficiência de amplificação dos extractos antes e depois do processo de purificação com os *loci* microsatélite VVMD6 e VVMD31 (Ilustração 5.1 – b), nota-se claramente um incremento na eficiência de amplificação nos extractos que, antes da purificação, não originaram qualquer sinal. Os extractos cuja pureza permitia a amplificação na forma crua, continuaram a originar o mesmo nível de amplificação após o processo purificativo. Da mesma forma, em alguns extractos onde o grau de pureza ou a quantidade extraída eram demasiado baixos após purificação, a amplificação continuava a não ser possível. Foi claro, todavia, um significativo incremento no número de amostras amplificadas.

Também os marcadores StSy-CHS foram usados em amostras cruas e purificadas tendo sido, aliás, as dificuldades encontradas na amplificação deste tipo de marcadores a motivação ao desenvolvimento desta metodologia. Assim, alguns extractos obtidos de clones de Touriga Nacional foram submetidos ao processo de purificação e amplificados juntamente com a fracção restante dos extractos não tratados (Ilustração 5.1–c). Pode verificar-se, igualmente, um aumento (superior a 2 vezes) do número de amostras, cuja amplificação resultou em produtos visíveis no gel de agarose.

Os resultados obtidos, tendo em conta os dois tipos de marcadores e amostras utilizados, permitem concluir que poderá ser considerada a utilização deste processo simples sempre que a subsequente reacção de PCR exigir extractos mais puros. Parece, inclusivamente, que esta técnica é suficientemente versátil e possivelmente poderá ser utilizada em extractos originado de qualquer tipo de amostra por variadas técnicas extractivas.

Tendo em consideração a experiência adquirida, extractos purificados deste tipo podem ser conservados a 4 °C, pelo menos durante 6 meses. A concentração de 0,3 % de agarose corresponde ao limite até ao qual o processo de medição de volumes, por aspiração por pipeta, pode ser utilizado, pois a viscosidade do meio a 0,3 % tal permite.

Todo o processo foi executado em microtubos de 2 ml, fundamentalmente por duas razões: (i) pelo maior volume, comparando com os microtubos de 1,5 ml, o que permite uma maior eficácia na remoção dos contaminantes e, (ii) por facilitarem a descolagem do bloco de agarose devido aos seu fundo redondo³.

Notou-se que o material acastanhado – provavelmente de origem polifenólica – que por vezes co-precipita com o ADN (principalmente em folhas de videira mais velhas), difundia do bloco de agarose com facilidade, durante as lavagens com TE, permitindo a obtenção de blocos de agarose transparentes e incolores. Este facto possibilita o acompanhamento visual do processo de purificação.

7.2. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

As condições de amplificação resultantes deste processo de optimização foram as aplicadas nas amostras em estudo e encontram-se descritas na página 205. Como foi mencionado, a temperatura de hibridação de 50 °C sugerida pela bibliografia ou resultava na não amplificação do ADN ou em perfis de bandas com demasiado arrastamento, impossibilitando a leitura dos géis de acrilamida.

³ Os microtubos de 1,5 ml, frequentemente usados em biologia molecular, caracterizam-se por terem um fundo afunilado para uma melhor aglomeração dos precipitados. Este formato, todavia, não é útil nesta aplicação pois dificulta a descolagem do bloco de agarose.

Este arrastamento das bandas é visível num gel de agarose executado para a definição da melhor temperatura, como pode ser observado na Ilustração 5.2 (géis 1 e 2), em ambas as combinações de *primers* StSy-CHS.

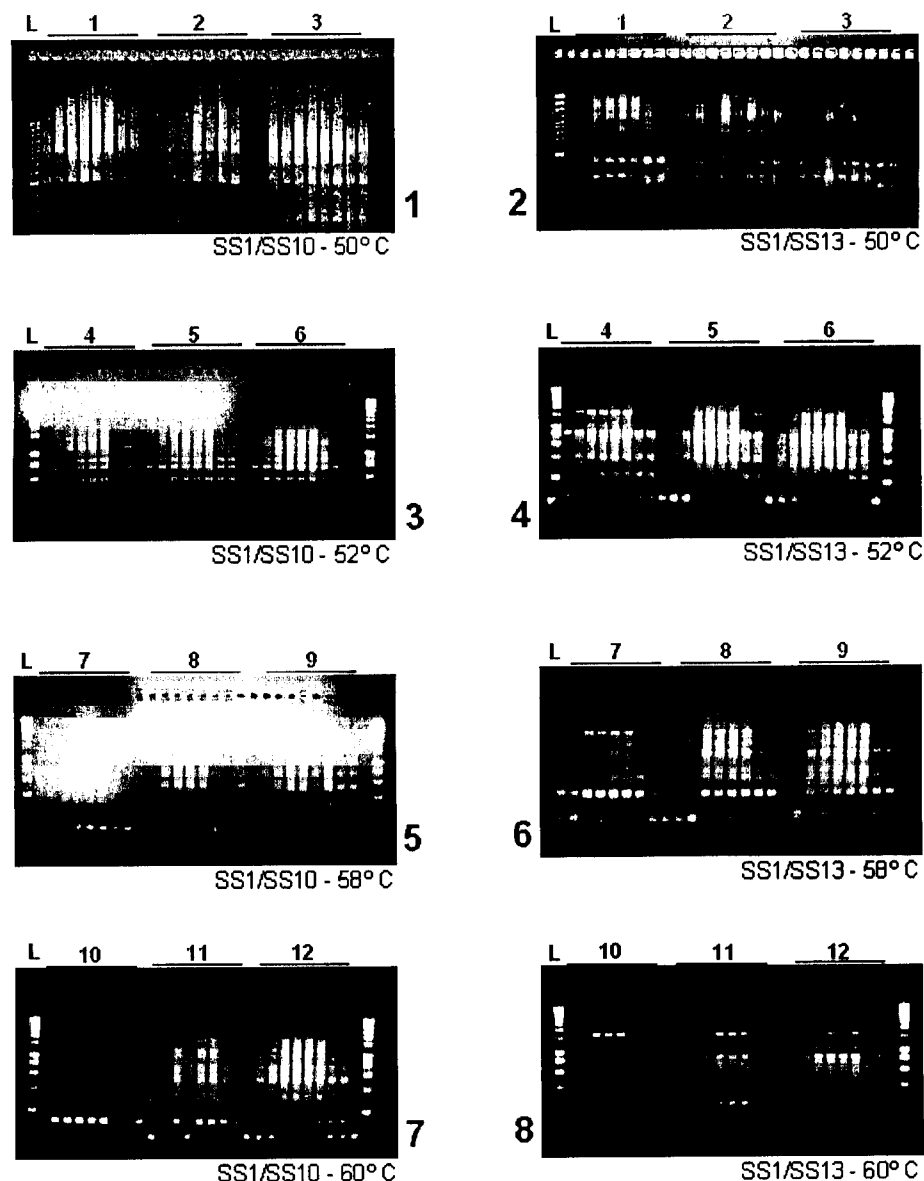


Ilustração 5.2 – Oito géis de agarose contendo os resultados dos 12 tratamentos aplicados a ambas as combinações de *primers* para 4 amostras: 21, 17, 4 e 22, nesta mesma ordem. Cada tratamento (1-12) contém oito posições correspondendo às 4 amostras referidas em duplicado. L: Hyperladder I.

O incremento da resolução e a diminuição do arrastamento foram notórios com o aumento da temperatura de hibridação de 50 para 58 °C (Ilustração 5.2: géis 2 a 6). Esta diminuição do arrastamento e da complexidade do gel pode ser explicada pelo aumento da severidade das condições de amplificação, o que aumenta a selectividade da mesma.

Para a maioria das amostras foi notada uma amplificação deficiente quando se usava a temperatura de 60 °C (Ilustração 5.2: géis 7 e 8). Esta observação resultou na eliminação desta temperatura de hibridação das hipóteses iniciais.

Tendo em conta que o critério inicial era a selecção da mais elevada temperatura de hibridação para a qual a amplificação ainda fosse eficiente, gerando perfis mais ou menos complexos, seleccionámos a temperatura de 58 °C (Ilustração 5.2: géis 5 e 6).

Na generalidade, o efeito do aumento da severidade das condições da amplificação, com o aumento da concentração de cloreto de magnésio do meio, não foi tão evidente como com o aumento da temperatura de hibridação nos géis de agarose apresentados. Não obstante, foram notadas algumas diferenças nos correspondentes géis de acrilamida^[Ilustração 5.3] executados com os produtos de amplificação resultantes da temperatura de hibridação de 58 °C e três níveis de concentração de cloreto de magnésio (tratamentos 7, 8 e 9). Através de uma análise cuidada dos géis então obtidos, definiu-se que as condições óptimas para a combinação de *primers* SS1/SS10 eram atingidas com a concentração de 1,5 mM de MgCl₂ (tratamento 7) e para a combinação SS1/SS13 2 mM de MgCl₂ (tratamento 8).

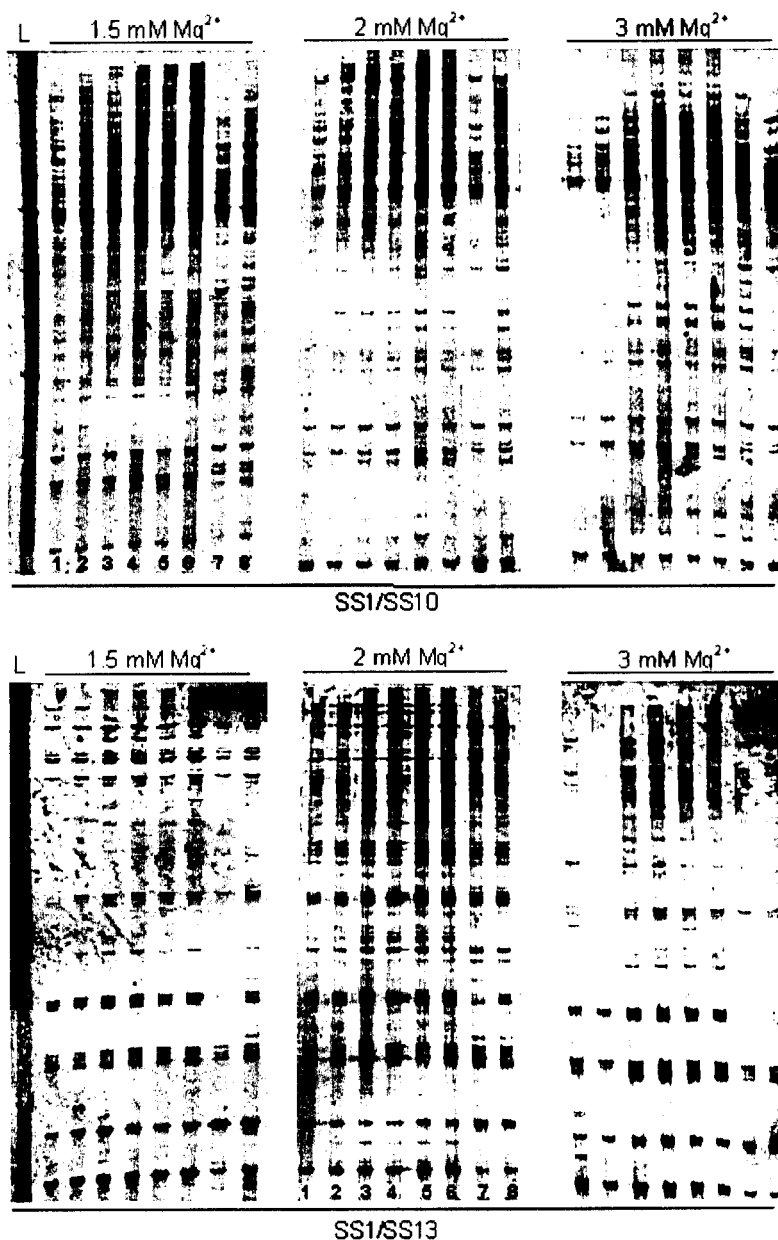


Ilustração 5.3 – Gel de acrilamida dos produtos de amplificação obtidos com as combinações SS1/SS10 e SS1/SS13 para a temperatura de hibridação de 58 °C e três níveis de concentração de cloreto de magnésio. A ordem das amostras é a seguinte: 1 e 2: amostra 21; 3 e 4: amostra 17; 5 e 6: amostra 4; 7 e 8: amostra 22. L: 100 bp DNA ladder.

7.3. APLICAÇÃO AO ESTUDO DE CLONES DE TOURIGA NACIONAL

No que concerne à avaliação do polimorfismo dos clones com os 9 loci microssatélite, nenhum destes marcadores detectou qualquer diferença entre os clones de Touriga Nacional estudados, o que está em concordância com a afirmação de Sefc *et al.* (2001) relativa à baixa eficiência destes marcadores na distinção de clones. A Ilustração 5.4 apresenta um gel de acrilamida com os produtos de amplificação do *primer* VVMD31 em 10 clones onde se nota a total ausência de polimorfismo.

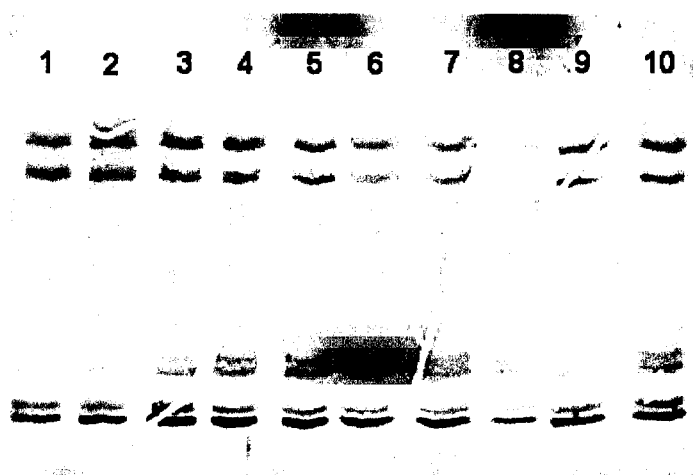


Ilustração 5.4 – Gel de acrilamida dos produtos de amplificação do *primer* VVMD31 para 10 clones de Touriga Nacional. A numeração das amostras corresponde à indicada no Quadro 5.1.

Os autores que reclamam a distinção de clones através da utilização de microssatélites (*vd* Cap. 2) conseguem-no, na maioria dos casos, devido à origem policlonal da casta em questão. Esta origem policlonal é tanto mais provável quanto mais diversas forem as origens dos clones e, nalguns casos^[Silvestroni *et al.*, 1997], é comprovada pelo

polimorfismo fenotípico dos indivíduos em estudo. Bowers *et al.* (1997) definem a casta Cabernet Sauvignon como de origem monoclonal (originária de uma só planta, uma só semente) devido à inexistência de polimorfismo entre 11 marcadores microssatélite estudados, *i.e.*, utilizam os marcadores microssatélite como marcadores de definição do tipo de origem clonal da casta. É com base nestes dados que se utilizam os marcadores microssatélites na verificação da origem policlonal das amostras de Touriga Nacional. Perante esta indefinição, se uma casta deve ser apenas constituída por um grupo de plantas de origem monoclonal ou policlonal, parece interessante definir um marcador, neste caso os *loci* microssatélite, que consiga essa distinção de um modo bastante simples.

Todas as amostras foram então analisadas usando as condições de amplificação recentemente optimizadas. A Ilustração 5.5 é representativa de todas as amostras analisadas para as combinações de *primers* SS1/SS10.

São apresentados os perfis para as amostras 4, 17, 18, 19 e 21, sendo as amostras 19 e 21 representativas de todas as outras não mostradas. Os géis representam a região compreendida entre aproximadamente os 100 e 300 bps, região onde foi possível com clareza (sem arrastamento ou sobreposição de bandas) identificar e registar as bandas usadas nos cálculos de similaridade genética.

Relativamente ao estudo de reprodutibilidade efectuado com os marcadores StSy-CHS em dois termocicladores/laboratórios, assim como nas repetições dos extractos das amostras, este não mostrou diferenças significativas, confirmando-se, assim, a reprodutibilidade do método.

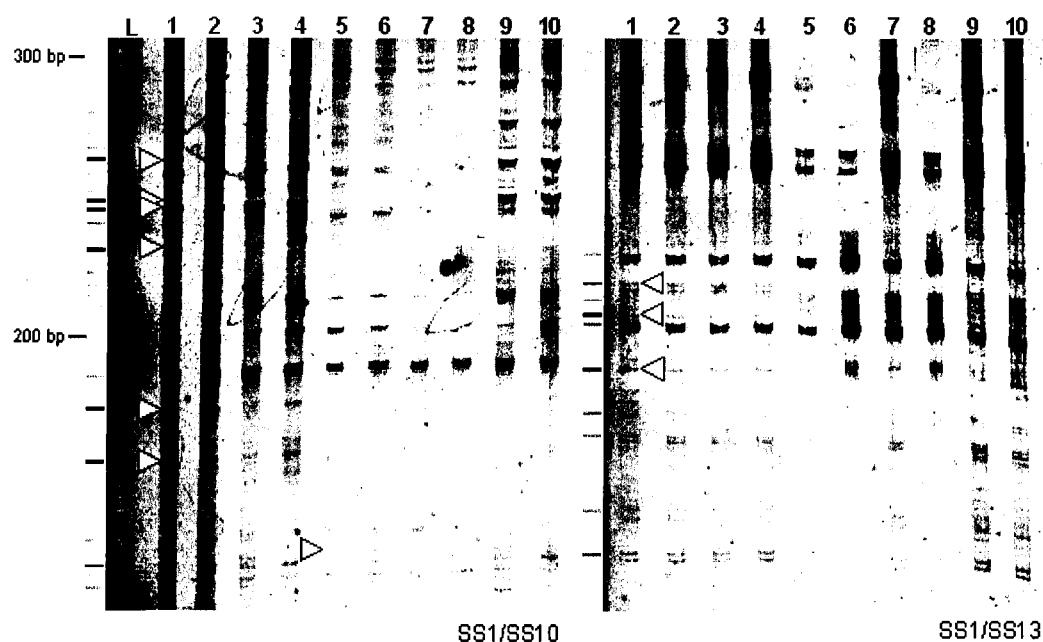


Ilustração 5.5 – Géis de acrilamida dos produtos de amplificação para as combinações de *primers* SS1/SS10 e SS1/SS13 usando as condições de amplificação optimizadas. A ordem das amostras é a seguinte: 1 e 2: amostra 4, 3 e 4: amostra 17, 5 e 6: amostra 18, 7 e 8: amostra 19, 9 e 10: amostra 21. À esquerda de cada gel, os traços a preto indicam as bandas polimórficas e a cinzento, as bandas não polimórficas. L: 100 bp DNA Ladder.

Foi possível, através da leitura destes géis, a identificação de dois grupos de clones, conforme se pode facilmente visualizar no fenograma da Ilustração 5.6.

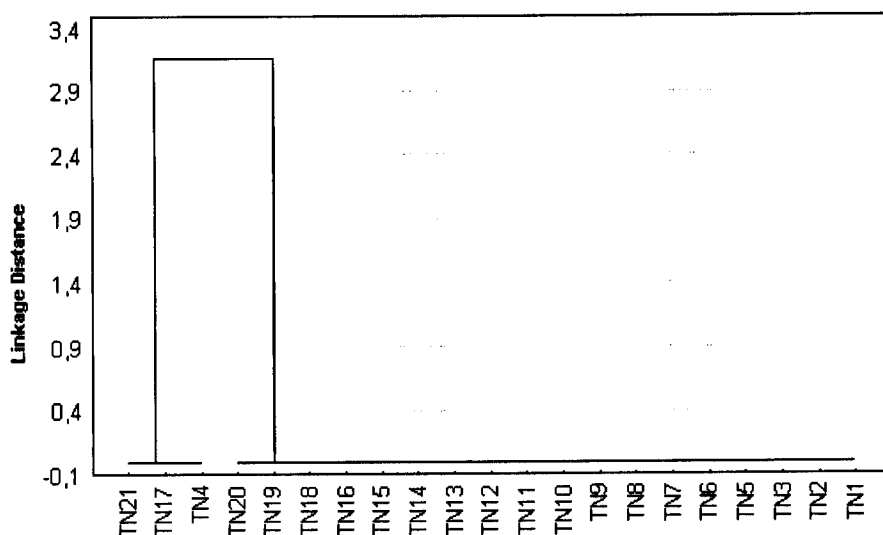


Ilustração 5.6 – Fenograma dos 21 clones de Touriga Nacional estudados, usando distâncias Euclidianas e o método UPGMA.

Um dos grupos referidos consistia nas amostras 21, 17 e 4, sendo o outro composto por todas as restantes amostras. O clone 21 corresponde ao único clone oriundo de uma quinta no Baixo-Corgo, sendo os outros dois, 17 e 4, oriundos do Douro Superior, cujas produções são, respectivamente, 1,244 e 0,539 kg/cepa, ou seja, alta e baixo rendimento. O polimorfismo encontrado nestes três clones parece não estar relacionado com o parâmetro de produção da videira. Todavia, parece importante salientar o facto de estar incluído no grupo discriminado o clone oriundo de uma localização diferente daquela de onde provém a maioria dos demais.

Foram identificadas 56 bandas, na totalidade, originadas pela combinação de *primers* SS1/SS10 (Quadro 5.5). Destas, 7 eram polimórficas e tinham uma massa

molecular compreendida entre os 100 e 300 bps. Seis das 7 bandas polimórficas surgem nas amostras 4, 17 e 21, e uma das restantes amostras. Por seu lado, o marcador SS1/SS13 originou um total de 50 bandas compreendidas entre os 100 e 250 bps. Três destas bandas apresentaram polimorfismo, surgindo apenas nas amostras 4, 17 e 21. O coeficiente de similaridade entre os dois grupos de clones discriminados resultou nos valores de 0,93 e 0,97 para a combinação de *primers* SS1/SS10 de SS1/SS13, respectivamente.

Quadro 5.5 – Número de bandas e similaridade genética (GS) obtidos com as combinações de *primers*, indicadas nas amostras estudadas.

Tipo de banda	Número de bandas	
	SS1/SS10	SS1/SS13
Polimórficas ^a	6	3
Polimórficas ^b	1	0
Não polimórficas	49	47
Total	56	50
GS	0,93	0,97

Este trabalho de discriminação de clones poderá ter continuidade com a aplicação desta mesma técnica a outras populações de clones originárias de outros pontos do país e pertencentes a outras castas. Inclusivamente, outras técnicas com elevado potencial de detecção de polimorfismos, como a técnica TRAP^[Hu e Vick, 2003] - Target Region Amplification Polymorphism -, parecem promissoras para detecção de polimorfismos nas referidas populações de clones.

8. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do método de purificação de ADN, baseado na oclusão do extracto cru numa matriz de agarose e eliminação dos contaminantes hidrofílicos, resultou numa eficiente metodologia para a obtenção de um extracto suficientemente puro para amplificação. A aplicação desta purificação mostrou-se essencial para a obtenção de resultados positivos nas reacções de amplificação subsequentes.

Com base na utilização de marcadores microssatélite como avaliadores da origem policlonal da população de clones, pode considerar-se a população em questão monoclonal. No que diz respeito ao estudo realizado com os marcadores StSy-CHS, optimizou-se, uma metodologia reprodutível, capaz de detectar diferenças entre clones de *Vitis vinifera*. Deste modo, foi possível atingir 14% de discriminação entre os clones de Touriga Nacional. O poder discriminante da metodologia descrita pode ser usado no futuro como ferramenta adjuvante da selecção clonal.

9. BIBLIOGRAFIA

- Bavaresco, L., Giachino, E., Pezzutto, S., Fregoni, C., Fogher, C. (2000). PCR specific analysis of Barbera clones. *Bulletin OIV*, 73, 296-311
- Bowers, J. E., Dangl, G. S., Meredith, C. P. (1999). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 243-246
- Bowers, J. E., Dangl, G. S., Vignani, R., Meredith, C. P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39, 628-633
- Bowers, J. E., Meredith, C. P. (1997). The parentage of a classical wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nat. Genet.*, 16, 84-87
- Cervera, M. T., Cabezas, J. A., Sánchez-Escribano, E., Cenis, J. L., Martínez-Zapater, J. M. (2000). Characterization of genetic variation within table grape varieties (*Vitis vinifera* L.) based on AFLP markers. *Vitis*, 39, 109-114
- Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26, 297-302
- Eiras-Dias, J. E., Bruno-Sousa, R. (1998). Isoenzymatic polymorphism differentiation of portuguese grapevine cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 86-90
- Fliegmann, J., Schroder, G., Sanches, S., Britsch, L., Schroder, J. (1992). Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus silvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol. Biol.*, 18, 489-503
- Geuna, F., Scienza, A. (2000). Discrimination of clones of *Vitis vinifera* L. based on the polymorphism of stilbene synthase-chalcone synthase 5' untranslated genomic regions. *Acta Hort.*, 528, 257-261
- Geuna, F., Scienza, A., Hartings, H. (1997). Discrimination between cultivars of *Vitis vinifera* based on molecular variability concerning 5' untranslated regions of the StSy-CHS genes. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 375-383
- Hu, J., Vick, B. A. (2003). Target Region Amplification Polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 21, 289-294
- Martínez-Zapater, J. M., Cabezas, J. A., Cervera, M. T. (2000). AFLPs in genetic identification and genome analysis of grapevines. *Acta Hort.*, 528, 105-110
- Martins, A., Carneiro, R., Castro, L. (1990). Progress in mass and clonal selection of grapevine varieties in Portugal. *Vitis*, 85, 489-491
- Melchior, F., Kindl, H. (1991). Coordinate and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis vinifera* cv. Optima. *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 552-557
- Moreira, D. (1998) Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res.*, 26, 3309-3310
- Nei, M., Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 5269-5273
- Regner, F., Wiedeck, E., Stadlbauer, A. (2000). Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. *Vitis*, 39, 103-107
- Schroder, J., Schanz, S., Tropft, S., Karcher, B., Schroder, G. (1993). Phytoalexin biosynthesis: Stilbene synthase and co-action of a reductase with chalcone synthase. In: Fritig, B., Legrand, M. (Eds.) *Mechanisms of Plant Defense Response* (p. 257-267). Dordrecht. Kluwer Academic Publishers.

- Scott, K. D., Ablett, E. M., Lee, L. S., Henry, R. J. (2000). AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. *Euphytica*, 113, 245-249
- Sefc, K. M., Lefort, F., Grando, M. S., Scott, K. D., Steinkellner, H., Thomas, M. R. (2001). Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In K. A. Roubelakis-Angelakis (Ed.), *Molecular Biology and Biotechnology of grapevine* (pp. 2-30). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Sefc, K. M., Lefort, F., Grando, M. S., Scott, K. D., Steinkellner, H., Thomas, M. R. (2001). Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In K. A. Roubelakis-Angelakis (Ed.), *Molecular Biology and Biotechnology of grapevine* (pp. 2-30). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Silvestroni, O., Di Pietro, D., Intrieri, C., Vignani, R., Filippetti, R., Del Casino, C., Scali, M., Cresti, M. (1997). Detection of genetic diversity among clones of cv. Fortana (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. *Vitis*, 36, 147-150
- Wiese, W., Vornam, B., Krause, E., Kindl, H. (1994). Structural organization and differential expression of the three stilbene synthase genes located on the 23-Kb grapevine DNA fragment. *Plant Mol. Biol.*, 23, 667-677
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3741-3751

CAPÍTULO 6

Desenvolvimento de uma metodologia de avaliação da autenticidade de mostos obtidos de castas usadas na produção de Vinho do Porto

Este trabalho foi a base de duas comunicações orais apresentada em congressos internacionais e de dois artigos:

Faria, M. A., Ferreira-Monteiro, F., Ferreira, M. A. Relative quantitative Polymerase Chain Reaction method of determining *Vitis vinifera* grape juice varietal composition. Comunicação oral no 11th World Congress of Food Science and Technology, Seul - Coreia do Sul, 22-27 Abril, 2001

Faria, M. A., Magalhães, R., Meredith, C. P., Martins, A., Ferreira, M. A., Ferreira Monteiro, F. Varietal characterization of grape juices using DNA analysis (SSR). Comunicação oral no Fifth European Symposium on Food Authenticity, Atlantia - La Baule - França, 9-11 Junho, 1999

Faria, M. A., Magalhães, R., Ferreira, M. A., Meredith, C. P., Ferreira-Monteiro, F. (2000). *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR). J. Agric. Food Chem., 48, 1096-1100

Faria, M. A., Ferreira, M. A. (2003). Relative quantification of *Vitis vinifera* L. varieties in musts by microsatellite DNA analysis. Submetido

1. INTRODUÇÃO

Na União Europeia, o vinho é identificado pela sua Denominação de Origem (origem geográfica), sendo a regulamentação vigente em cada país determinante do tipo de castas que devem ser usadas para vinificação em cada região (composição varietal). Em alguns países, como a França e os países do novo mundo, para certas castas de alto valor, o nome do vinho é dado pelo nome da própria variedade (*e.g.* Cabernet Sauvignon, Sirah, Pinot Noir, Riesling, etc.). Existe, aliás, uma tendência internacional para a produção de vinhos monovarietais (produzidos a partir de uma só casta) originados de castas de grande valor regional, nacional ou internacional. Assim, facilmente se depreende que a casta usada para a produção do mosto que vai dar origem a determinado vinho é de importância crucial para as características finais deste.

Neste panorama, o facto de diferentes castas terem, por vezes, valores económicos substancialmente diferentes para os vinicultores, induziu a procura de métodos mais eficazes de discriminação de castas, mostos e vinhos. Embora a identificação de castas seja, como se constatou, por vezes bastante complicada, havendo necessidade de recurso a métodos extremamente discriminantes, essas dificuldades crescem exponencialmente com a mudança da matriz de folhas para mostos. Deste modo, como é importante para o responsável pela vinha assegurar a correcta identificação das plantas, é para o enólogo a garantia de que o mosto com o qual está a trabalhar seja efectivamente proveniente das castas pretendidas. Deste ponto de vista, torna-se importante, sendo um dos objectivos deste trabalho, a transposição dos métodos de identificação de castas através das suas folhas para a identificação através do sumo dos seus frutos.

A autenticação de mostos tem sido baseada essencialmente na análise de parâmetros químicos dos mesmos, através do doseamento ou determinação do perfil de metais residuais^[Day *et al.*, 1994] ou aminoácidos^[Vasconcelos e Chaves das Neves, 1989] ou grupos de outras substâncias^[Forcen *et al.*, 1992]. Todavia, estas metodologias requerem a utilização de técnicas estatísticas avançadas e morosas e, na maioria dos casos, não respondem à necessidade do conhecimento da origem botânica das uvas utilizadas. A ineficácia destes métodos na definição da casta de origem dos mostos prende-se, muito provavelmente, com o facto de o alvo ser parte do fenótipo da planta (composição química das uvas) dependente de variações das condições ambientais, de produção e sanitárias que afectam as videiras.

A diferenciação varietal dos mostos foi, em parte, conseguida através de abordagens bioquímicas, *i.e.* através da determinação de perfis electroforéticos originados por proteínas extraídas dos mostos^[González-Lara *et al.*, 1989; Pueyo *et al.*, 1993; Moreno-Arribas *et al.*, 1999; Hayasaka *et al.*, 2001]. Os autores referem a possibilidade de, na maioria dos casos, ser possível identificar a casta da qual o mosto foi produzido. Contudo, esta identificação não foi conseguida em mostos contendo misturas de castas. A identificação das castas de origem de um mosto constituído por uma mistura varietal é essencial, visto ser esta a situação mais frequente na maioria das adegas.

Neste contexto, o objectivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de uma metodologia que permita a identificação das castas constituintes de um mosto feito a partir de uma só ou de uma mistura de castas.

Para tal, os marcadores moleculares seleccionados foram os microsatélites tendo em conta a experiência adquirida e, essencialmente, a sua comprovada capacidade de discriminação que, no presente caso de análise de mostos contendo

misturas de castas, é fundamental. Uma das características dos microsatélites, fundamental nesta aplicação, reside no facto de cada marcador gerar apenas duas bandas por casta, o que permitirá a leitura clara dos géis de acrilamida obtidos a partir de misturas de mostos.

2. AMOSTRAS

Para o desenvolvimento deste trabalho, pareceu adequada a utilização de apenas um pequeno número de castas, visto terem sido já recolhidos dados suficientes para formar uma base de trabalho, no decorrer de estudos anteriores^[capítulo 4]. Desta forma, a escolha das castas a utilizar recaiu sobre as oriundas do Douro, região de origem da maioria das castas estudadas.

Em 1981, José Rosas e João Nicolau de Almeida seleccionaram - com base em dados obtidos de microvinificações num período de 5 anos – cinco castas essenciais para a vitivinicultura Duriense: Tinta Roriz, Tinto Cão, Touriga Francesa, Touriga Nacional e Tinta Barroca. Estas castas, de uma forma cada vez mais evidente, são responsáveis pela maioria da produção vinícola da região.

No que respeita às amostras, folhas, foram recolhidas no Quinta de Sta. Bárbara, pertencente ao Centro de Estudos Vitivinícolas do Douro (Régua), localizada próximo da vila do Pinhão, conservadas e o seu ADN extraído de acordo com o descrito no capítulo 4. Os mostos foram fornecidos pelo mesmo centro, obtidos de uvas colhidas na quinta de origem das folhas entre 15 e 22 de Setembro de 1998. Após a sua obtenção foram imediatamente colocados à temperatura de -20 °C, em frascos plásticos de 200 ml, e assim conservados até ao momento da preparação das misturas de mostos. No Quadro 6.1 são indicadas as amostras de

folhas utilizadas, bem como as 26 misturas de mostos utilizadas para este estudo. Estas misturas foram preparadas em volumes de 100 ml e planeadas de modo a cobrir todas as possíveis combinações das castas.

Quadro 6.1 – Amostras analisadas. Castas, mostos monovarietais e misturas de mostos (mostos polivarietais). As misturas de mostos foram executadas, juntando os seus componentes em partes iguais, como indicado.

Amostra	Castas constituintes					Tipo
R _F	Tinta Roriz					Folha
C _F	Tinto Cão					Folha
F _F	Touriga Francesa					Folha
N _F	Touriga Nacional					Folha
B _F	Tinta Barroca					Folha
R _M	Tinta Roriz					Mosto monovarietal
C _M	Tinto Cão					Mosto monovarietal
F _M	Touriga Francesa					Mosto monovarietal
N _M	Touriga Nacional					Mosto monovarietal
B _M	Tinta Barroca					Mosto monovarietal

Amostra	N	F	R	C	B	Tipo
1	1/2	1/2				Mosto polivarietal
2	1/2		1/2			Mosto polivarietal
3	1/2			1/2		Mosto polivarietal
4	1/2				1/2	Mosto polivarietal
5		1/2	1/2			Mosto polivarietal
6		1/2		1/2		Mosto polivarietal
7		1/2			1/2	Mosto polivarietal
8			1/2	1/2		Mosto polivarietal
9			1/2		1/2	Mosto polivarietal
10				1/2	1/2	Mosto polivarietal
11	1/3	1/3	1/3			Mosto polivarietal
12	1/3	1/3		1/3		Mosto polivarietal
13	1/3	1/3			1/3	Mosto polivarietal
14	1/3		1/3	1/3		Mosto polivarietal
15	1/3		1/3		1/3	Mosto polivarietal
16	1/3			1/3	1/3	Mosto polivarietal
17		1/3	1/3	1/3		Mosto polivarietal
18		1/3	1/3		1/3	Mosto polivarietal
19		1/3		1/3	1/3	Mosto polivarietal
20			1/3	1/3	1/3	Mosto polivarietal
21	1/4	1/4	1/4	1/4		Mosto polivarietal
22	1/4	1/4	1/4		1/4	Mosto polivarietal
23	1/4	1/4		1/4	1/4	Mosto polivarietal
24	1/4		1/4	1/4	1/4	Mosto polivarietal
25		1/4	1/4	1/4	1/4	Mosto polivarietal
26	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	Mosto polivarietal

2.1. EXTRACÇÃO DE ADN

O método de extracção de ADN de folhas utilizado foi o descrito no capítulo 4. No que concerne à extracção de ADN de mostos, não se encontrou na bibliografia qualquer referência, pelo que surgiu a necessidade de adaptação do método referido para as folhas à extracção de ADN de mostos. A adaptação da metodologia foi focada na parte inicial da extracção dada a natureza fluida dos mostos. Deste modo, 2 ml de mosto homogeneizado contendo 2% de 2-mercaptoetanol foram colocados num microtubo de 2 ml e este centrifugado a $300\times g$ durante 2 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado e o precipitado lavado duas vezes com tampão TE (durante esta lavagem, é fundamental desfazer o aglomerado do precipitado para melhorar a eficiência da remoção de interferentes hidrossolúveis, caso dos açúcares presentes no mosto em alta concentração). Imediatamente após esta lavagem, foram adicionados 600 μ l de tampão de extracção, idêntico ao usado para a extracção em folhas (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 2% 2-mercaptoetanol; pH=8), suplementado com 6% de PVP. O protocolo de extracção, a partir da adição do tampão, segue os mesmos procedimentos que para a extracção de folhas. Após a extracção, o ADN foi quantificado, em cada extracto, por fluorimetria^[Labarca e Paigen, 1980], pois o CTAB remanescente nas amostras, após o processo extractivo, interfere na determinação por espectrometria UV a 260/280 nm^[Guerra e Meredith, 1995].

2.2. MARCADORES MOLECULARES, CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E DE SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS

Os marcadores microssatélite foram seleccionados, tendo em consideração os seguintes parâmetros: (i) disponibilidade na bibliografia, (ii) polimorfismo apresentado para o grupo de castas em questão e (iii) definição e clareza das bandas apresentadas. Desta forma, usaram-se para este estudo quatro *loci* microssatélite. Três descritos por Bowers *et al.* (1996) – VVMD5, VVMD6 e VVMD7 -, já anteriormente utilizados com bons resultados para a caracterização das castas, e um – VVS2 - descrito por Thomas *et al.* (1993) em substituição do *locus* VVS1, que se apresentou pouco polimórfico para os genótipos em questão. As condições de amplificação foram as descritas no capítulo 4, para os *loci* VVMD5, 6 e 7. Relativamente ao *locus* VVS2, este foi amplificado, utilizando as condições descritas para o *locus* VVS1.

Obtiveram-se, deste modo, os genótipos representados graficamente na Ilustração 6.1 de modo a facilitar a interpretação dos resultados. O *primer* VVMD5, mostrou-se o mais polimórfico atendendo a que, se usado isoladamente, é capaz de distinguir as cinco castas. Por outro lado, o *primer* VVS2 mostrou-se o menos polimórfico.

Salienta-se que, os processos de separação electroforética, quer em gel de agarose quer em acrilamida, foram executados de acordo com o referido no capítulo 4, para os ensaios de caracterização das castas, e no capítulo 3 – Materiais e Métodos.

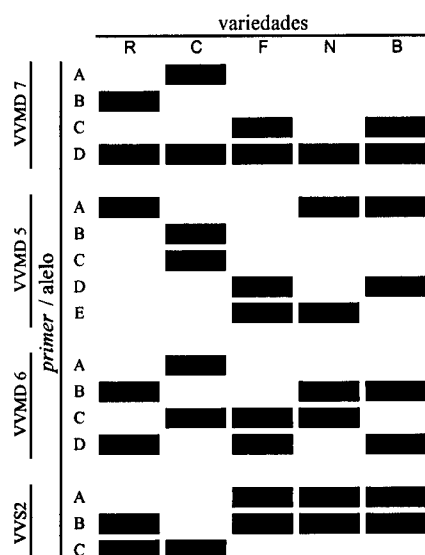


Ilustração 6.1 – Genótipos das cinco castas em estudo para os *loci* referidos. R: Tinta Roriz, C: Tinto Cão, F: Touriga Francesa, N: Touriga Nacional e B: Tinta Barroca. Os diferentes alelos estão representados por letras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. EXTRACÇÃO DE ADN DE MOSTOS

O protocolo de extracção de ADN de folhas de videira foi adaptado e aplicado à extracção a partir de mostos, com sucesso.

Como se pode comprovar através da Ilustração 6.2, foi extraído ADN de elevado peso molecular de mostos congelados a -20 °C até ao momento da análise.

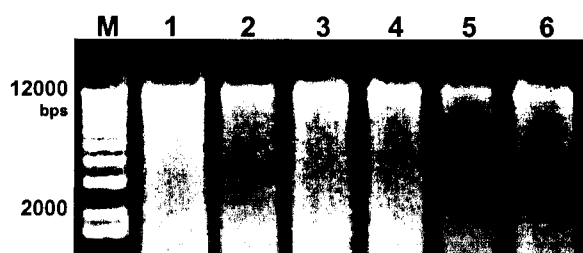


Ilustração 6.2 – Gel de agarose de extractos de ADN obtidos a partir de mostos congelados. M: padrão de massa molecular (bps); posições 1-6: extractos de mostos.

Procedeu-se à determinação da concentração de ADN nos extractos e os valores encontrados estavam incluídos no intervalo de 23 a 52 $\mu\text{g/ml}$, que correspondem a 0,77 e 1,73 μg por mililitro de mosto. Tendo em consideração o teor médio – avaliado para as cinco castas - de matéria precipitada por centrifugação e seca em estufa a 100 °C dos mostos (matéria sólida) de 38 mg/ml, o teor de ADN neste extracto seco dos mostos será igual a 33 $\mu\text{g/g}$. Parimoo e Parimoo (2003) referem o valor 10-14 $\mu\text{g/g}$ de ADN como o rendimento médio da

extracção de folhas. É de referir que o valor obtido neste estudo para os mostos é da mesma ordem de grandeza, considerando o teor de humidade das folhas.

Como os extractos obtidos a partir de mostos apresentavam um teor de ARN excepcionalmente elevado, por vezes, tornou-se necessário o aumento da concentração de RNase durante o processo extractivo visto que, como é referido por PCR^[Pikaart e Villeponteau, 1993], o ARN em concentrações elevadas pode tornar-se um inibidor da reacção de PCR.

3.2. IDENTIFICAÇÃO DAS CASTAS CONSTITUINTES DE UM MOSTO

Todas as amostras de mostos indicadas no Quadro 6.1 foram analisadas com os quatro marcadores. A Ilustração 6.3 representa um gel de poliacrilamida dos produtos de amplificação, separados em simultâneo, dos *loci* VVMD6 e VVMD7. A separação destes dois *loci* num só gel é possível devido à não sobreposição dos alelos de cada um.

Como esperado, não foram detectadas diferenças nos genótipos obtidos a partir de folhas ou mostos. Por conseguinte, torna-se possível a comparação dos resultados obtidos com marcadores microssatélite em mostos com os perfis que constam nas bases de dados destes marcadores. Sublinha-se que a autenticação de mostos por este processo é pela primeira vez referida na bibliografia pela publicação deste trabalho^[Faria *et al.*, 2000].

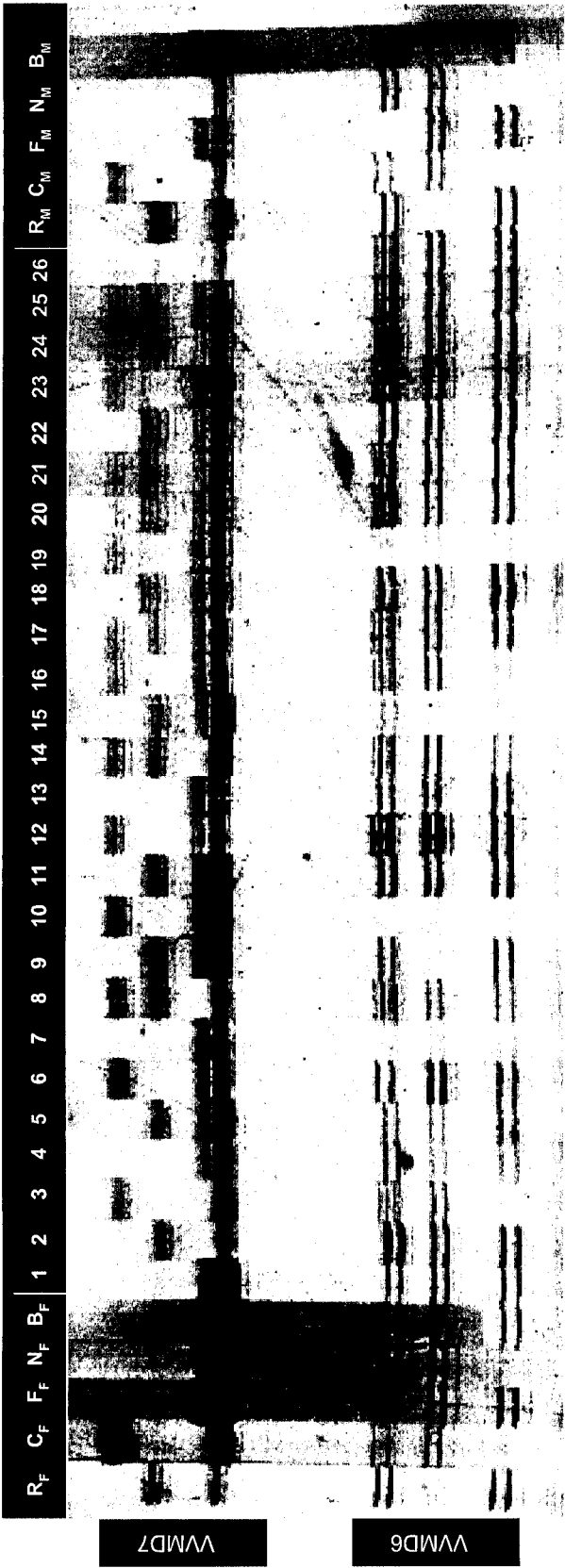
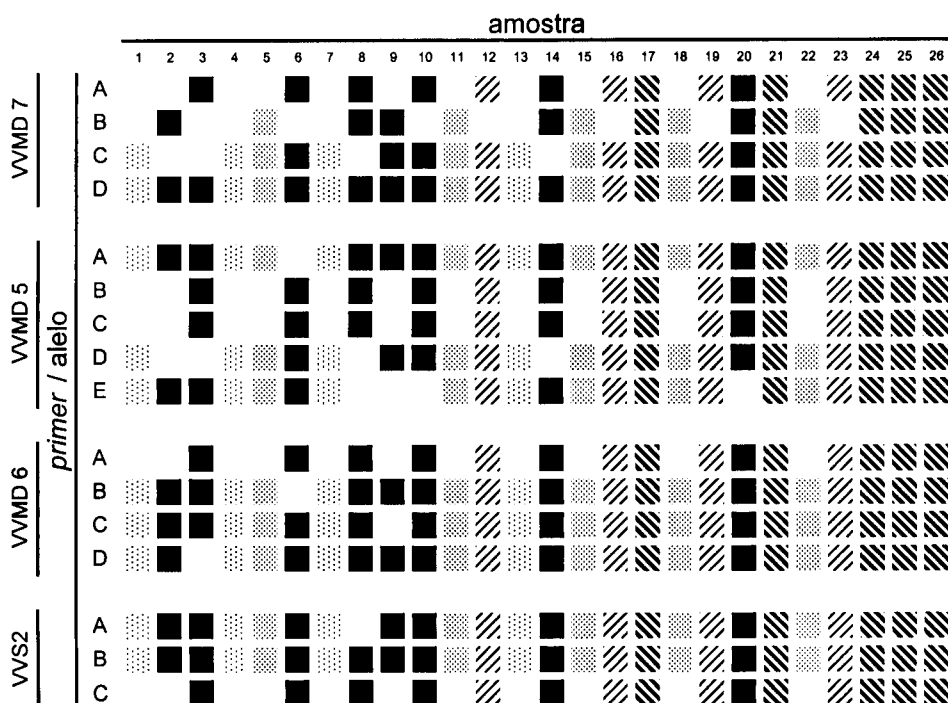


Ilustração 6.3 – Gel de acrilamida dos produtos de amplificação obtidos com os loci VVMD6 e VVMD7. As amostras são folhas, mostos e mostos polivarietais de acordo com o Quadro 6.1.

No que concerne aos mostos polivarietais, os perfis de bandas obtidos correspondem à sobreposição dos perfis obtidos dos mostos monovarietais que os compõem. Pode, deste modo, afirmar-se que é possível, de um modo preciso, avaliar o conteúdo varietal de um mosto, dentro das limitações inerentes ao método, seguidamente indicadas. Os resultados obtidos pela genotipagem dos mostos polivarietais são esquematicamente representados na Ilustração 6.4.

Ilustração 6.4 – Representação esquemática dos perfis de bandas obtidos pela análise dos 26 mostos polivarietais (vd. Quadro 6.1.) para os quatro loci. Os perfis a negro são únicos e podem ser discriminados de todos os outros.



Assume especial relevância que, entre as 26 misturas de mostos que resultaram da combinação das cinco castas, oito foram completamente discriminadas apresentando perfis únicos (amostras 2, 3, 6, 8, 9, 10, 14 e 20) representados na figura a preto. Destas oito combinações, seis estão incluídas nas combinações de duas castas e duas, nas de três. Para as combinações de 4 castas e para a combinação de todas as castas não foi possível a obtenção de um perfil único. Estas são algumas das limitações do método. Todavia, há que ter em conta que a grande maioria dos vinhos de qualidade, cuja manipulação fraudulenta pode ser apeteável, são constituídos por menos de cinco castas.

Devido ao seu elevado nível de polimorfismo, o *locus* VVMD5 proporciona, isoladamente, a discriminação completa de quatro combinações (50 % das discriminadas), enquanto que, usando simultaneamente os *loci* VVMD6 e 7, apenas duas misturas são discriminadas. É de referir ainda que, ao analisarmos apenas o *locus* VVS2, este promove a discriminação apenas de uma mistura.

Sublinha-se que os perfis representados graficamente por vários padrões, são grupos de perfis similares, não completamente discriminados, porque existem pelo menos dois iguais. Pese embora a menor quantidade de informação fornecida por estes perfis, a sua análise cuidada pode fornecer um número provável de castas constituintes do mosto, constituindo estes uma informação eventualmente decisiva em determinados casos de avaliação de autenticidade. Acrescente-se que a experimentação de mais marcadores pode resultar no incremento do número de perfis completamente discriminados.

4. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA

4.1. INTRODUÇÃO

Os vinhos monovarietais e aqueles obtidos pela combinação de apenas duas variedades são, geralmente, produzidos com castas de grande qualidade de modo a enfatizar as características organolépticas da casta. Dado que, como se referiu, diferentes castas apresentam diferente valor económico, e que a inclusão de percentagens diminutas de outras castas em vinhos monovarietais poderá ser permitida, o desenvolvimento de métodos que permitam o doseamento de castas em mostos assume grande importância para a avaliação da autenticidade dos mesmos e decorrente garantia da autenticidade dos vinhos finais.

Após a publicação do trabalho descrito anteriormente têm sido publicados alguns outros relacionados com a autenticação de mostos e vinhos através da análise do seu ADN constituinte, utilizando marcadores do tipo microssatélite^[Siret *et al.*, 2000, 2002; Garcia-Beneytez *et al.*, 2002]. Não obstante, nenhuma tentativa de quantificação da percentagem de castas constituintes foi levada a cabo. Apesar disso, Siret *et al.* (2000) referem o limite de detecção de 10% (v/v) em misturas de ADN extraído de folhas de videira e 30% em misturas de mostos ou vinhos.

Nesta secção do trabalho descreve-se o desenvolvimento de um método para a determinação da percentagem relativa de cada casta presente num mosto. Esta quantificação foi conseguida por medição densitométrica das bandas correspondentes aos produtos de amplificação de dois mostos misturados, obtidos com marcadores microssatélite. Estas medições da densidade das bandas foram efectuadas sobre géis de acrilamida, corados pelo processo do Nitrato de Prata.

4.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Pacek *et al.* (1993) propuseram a análise de um extracto de ADN constituído pela mistura dos extractos, em partes iguais, de uma população, de modo a determinar, de uma forma extremamente rápida, a frequência dos alelos dessa população para esse *locus*. Isto para um *locus* microssatélite ligado a um gene relacionado com o aparecimento da doença de Von Willebrand, uma deficiência congénita de coagulação do sangue em humanos. No mesmo sentido, Kirov *et al.* (2000) mediram a intensidade relativa das bandas dos produtos de amplificação de extractos compostos (mistura de extractos de várias amostras) para detectar diferenças na frequência dos alelos de *loci* microssatélite relacionados com a doença afectiva bipolar, em dois grupos de indivíduos. Os bons resultados obtidos nestes dois trabalhos incentivaram a aplicação desta abordagem às amostras, particularmente porque estas correspondem a extractos compostos de várias castas.

Os autores citados foram unânimes na afirmação de que o principal obstáculo à obtenção de bons resultados com esta metodologia residia no fenómeno de amplificação diferencial (*i.e.* amplificação menos eficiente dos alelos mais longos). Este fenómeno foi tido em consideração durante o desenvolvimento da metodologia apresentada.

Este tipo de abordagem semi-quantitativa da reacção de PCR pode ser classificada, segundo Raeymaekers *et al.* (1995, 2000), como PCR competitiva baseada na determinação de um rácio (*Ratio PCR*). Como tal, todas as reacções devem ser levadas à fase de *plateau* de modo a melhorar a sensibilidade do

método^[Hirano *et al.*, 2002], dado que a técnica é insensível ao efeito da saturação^[Raeymaekers, 2000].

4.3. AMOSTRAS E MARCADORES

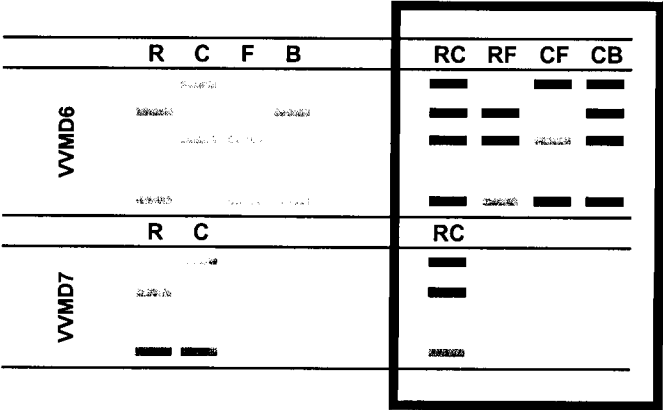
Considerando as dificuldades do desenvolvimento de novas metodologias e sendo o presente trabalho uma primeira abordagem à quantificação de castas em mostos, decidi iniciar-se os trabalhos usando misturas de mostos de apenas duas variedades e utilizando dois *loci* (VVMD6 e VVMD7)^[Bowers *et al.*, 1996], visto que são aqueles que originam perfis de bandas mais bem definidos.

As misturas de mostos foram preparadas em volumes de 100 ml, ainda que fossem necessários para cada extracção apenas cerca de 2 ml, de modo a minimizar erros volumétricos. Cada casta foi analisada nas seguintes percentagens (v/v): 10, 15, 25, 50, 75, 85 e 90%, em misturas de duas castas. As misturas de mostos foram codificadas da seguinte forma: casta 1 + casta 2 + percentagem da casta 1, sendo as castas designadas pelas letras R, C, F, e B, como indicado no Quadro 6.1. Assim, RC10 corresponde a uma mistura contendo 10% de mosto de Tinta Roriz e 90% de mosto de Tinto Cão. A selecção das combinações a estudar foi baseada na possibilidade de obter perfis de bandas bem definidos nos quais, de preferência, não ocorra sobreposição de bandas (castas com alelos comuns). O Quadro 6.2 mostra os genótipos obtidos para cada uma das castas estudadas com os *primers* VVMD6 e VVMD7.

As bandas a cinzento, uma vez que correspondem a sobreposições, não foram contabilizadas nos cálculos da percentagem das castas. De acordo com o Quadro 6.2 o *primer* VVMD6 origina duas combinações onde não existe

sobreposição de bandas e duas combinações com apenas uma sobreposição. Utilizando o *primer* VVMD7, foi analisada apenas uma combinação, pois as restantes amostras apresentavam perfis de bandas não muito bem definidos (com acentuado arrastamento), para além do baixo polimorfismo e do também acentuado efeito *stutter*, o que provocou a sua eliminação deste estudo.

Quadro 6.2 – Representação gráfica dos genótipos de cada uma das castas estudadas para os *primers* VVMD7 e 6. A caixa a negro delimita os genótipos das misturas analisadas. Bandas não sobrepostas são representadas a preto e as sobrepostas a cinzento.



A extracção do ADN das misturas de mostos foi executada seguindo o mesmo protocolo utilizado na secção 2.1 deste capítulo e os extractos quantificados, segundo o protocolo fluorimétrico referido. As reacções de amplificação foram executadas de acordo com os parâmetros referidos no capítulo 4, sendo a quantidade de ADN adicionada, a cada reacção, igual a 10 ng.

4.4. ANÁLISE DOS GÉIS DE ACRILAMIDA

Após a electroforese, os géis foram corados pela técnica de Bassam *et al.* (1991), devidamente secos em estufa a 50 °C, e destes foram obtidas imagens

digitais, em tons de cinzento, de alta resolução (1200 dpi). Os perfis de intensidade das bandas foram obtidos por densitometria utilizando o *software* do sistema de análise de géis Kodak EDAS 120, 1D *image analysis software*. Este programa inclui uma ferramenta que possibilita a resolução de bandas muito próximas com modelos de ajuste Gaussianos, permitindo uma determinação mais exacta que a simples integração das bandas^[Wood e Shapiro, 1997]. Deste modo, após o ajuste das bandas de interesse para cada amostra (correspondentes aos alelos não sobrepostos), obteve-se o valor da intensidade de cada banda de interesse^[Ilustração 6.5], valor usado posteriormente para o cálculo da percentagem da intensidade da banda, ou soma de bandas (uma casta) num total correspondente à soma das intensidades de todas as bandas de interesse das duas castas.

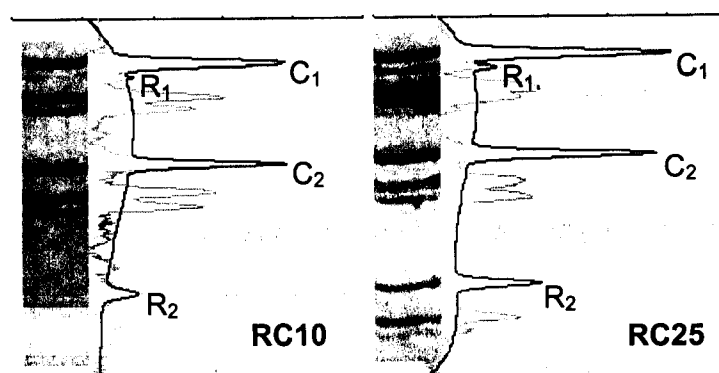


Ilustração 6.5 – Densitogramas das amostras RC10 e RC25. A linha a cinzento representa o densitograma não tratado e a preto o obtido após o ajustamento Gaussiano que considera apenas as bandas de interesse. R1, R2, C1 e C2 são os dois alelos da cada uma das variedades Tinta Roriz e Tinto Cão.

A Ilustração 6.5 representa os densitogramas obtidos pelo *software* acima referido para as misturas RC10 e RC25. As bandas não incluídas no ajuste Gaussiano são fragmentos originados pelo fenómeno de *Stutter*.

No que diz respeito ao tratamento estatístico dos dados, a percentagem obtida por leitura densitométrica foi usada na construção de curvas de correlação. Obtiveram-se, desta forma, os valores do declive e do coeficiente de correlação para cada combinação/*primer*, o que permite fazer uma avaliação objectiva do método. Determinou-se, também, o coeficiente de variação dos replicados das amostras. O teste *t* de *Student* foi usado para avaliar a significância estatística entre as percentagens de cada variedade adicionada a cada amostra e encontrada pelo método.

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo a avaliar a intensidade do efeito da amplificação diferencial acima referido, foram determinadas as intensidades relativas das bandas de cada um dos alelos de cada uma das castas amplificadas isoladamente. No Quadro 6.3, são indicados os valores obtidos.

Quadro 6.3 – Intensidade relativa das bandas correspondentes aos dois alelos, 1 e 2, para cada casta e *loci*.

		R	C	F	B
VMD6	1	0.55	0.52	0.45	0.51
	2	0.45	0.48	0.55	0.49
VMD7	1	0.47	0.55	0.43	0.42
	2	0.53	0.45	0.57	0.58

As diferenças observadas não foram consideradas significativas sempre que não correspondiam a mais de 5% (0,05 pontos no quadro) do total das bandas.

Por conseguinte, para o *locus* VVMD6 não se encontraram diferenças significativas para as quatro castas, nem para as castas R e C com o *locus* VVMD7. Relativamente às castas F e B para o *locus* VVMD7, as diferenças encontradas foram na ordem dos 7-8% o que contribuiu, juntamente com as razões já referidas, para a eliminação destas duas castas para este *primer*. Os valores apresentados correspondem à média de três amplificações independentes.

No Quadro 6.4 são indicados os valores médios de três determinações das percentagens varietais em mostos encontradas pela aplicação da presente metodologia às misturas indicadas. Para cada valor, o coeficiente de variação e o nível de significância – intervalo de confiança de 95% - para o teste de *t* foram também calculados.

Quadro 6.4 – Média, coeficiente de variação (CV) e nível de significância (Sig.) relativos às percentagens varietais indicadas e encontradas pela aplicação do método descrito. Cada valor apresentado corresponde à média de três determinações. O coeficiente de variação médio (CV*) corresponde à média dos CV encontrados para cada percentagem de 10 a 90%. O declive (m) e o coeficiente de correlação (r) foram calculados comparando as percentagens adicionadas e encontradas. Nível de significância para um intervalo de confiança de 95%.

		10	15	25	50	75	85	90	CV*	m	r
VVMD6	RC	média	13,9	16,7	23,5	47,6	62,5	70,9	55,1		
		CV	22,59	5,38	6,35	0,75	1,32	0,11	2,83	5,6	0,66
		Sig.	0,163	0,083	0,217	0,007	0,001	0,000	0,001		
	RF	média	8,2	23,9	30,6	46,8	62,1	79,1	61,7		
		CV	15,4	3,6	4,3	2,9	0,3	4,5	1,6	4,6	0,71
		Sig.	0,135	0,003	0,018	0,054	0,000	0,121	0,000		
	CF	média	67,7	34,6	24,4	59,6	70,4	79,7	82,5		
		CV	0,7	21,1	6,5	0,3	1,3	1,5	0,3	4,5	0,48
		Sig.	0,000	0,043	0,571	0,000	0,013	0,016	0,000		
	CB	média	20,1	31,2	38,2	58,0	74,2	87,3	90,6		
		CV	8,9	13,0	1,0	4,1	0,9	3,9	1,3	4,7	0,82
		tSig.	0,010	0,020	0,000	0,028	0,173	0,373	0,503		
VVMD7	RC	média	10,3	14,4	21,1	28,7	44,5	88,3	75,6		
		CV	44,8	4,2	27,6	4,8	2,6	1,3	0,7	12,3	0,90
		Sig.	0,910	0,253	0,371	0,001	0,004	0,039	0,000		

O coeficiente de variação médio de todas as misturas de 10 a 90% para cada combinação é também calculado. O declive (m) pode ser visto como uma medida de proximidade dos valores encontrados aos adicionados e o coeficiente de correlação (r) está relacionado com a linearidade do método. Os valores de m e r foram obtidos das rectas de regressão apresentadas na Ilustração 6.6.

Através da observação do Quadro 6.4, podemos concluir que foram as combinações RC e CB aquelas que apresentaram níveis de significância > 0.05 , indicando que quando os quatro alelos das duas variedades não são sobrepostos é conseguida uma melhor proximidade aos valores esperados (percentagens adicionadas). As combinações contendo Touriga Francesa (CF e RF) apresentaram os resultados menos favoráveis de todos os grupos analisados. Uma possível explicação pode residir nas diferenças da constituição das castas, em termos de substâncias interferentes com a reacção de PCR. O aperfeiçoamento desta metodologia deverá incluir a avaliação da correlação entre substâncias interferentes da reacção de PCR e a qualidade dos resultados.

Um outro ponto que ressalta da análise do Quadro 6.4 e Ilustração 6.6 é o facto de as combinações RC e CB, originarem melhores resultados quando a casta Tinto Cão está presente numa concentração superior a 50%. Este pode também ser um efeito varietal (efeito da maior concentração, em algumas castas, de substâncias interferentes da reacção de PCR).

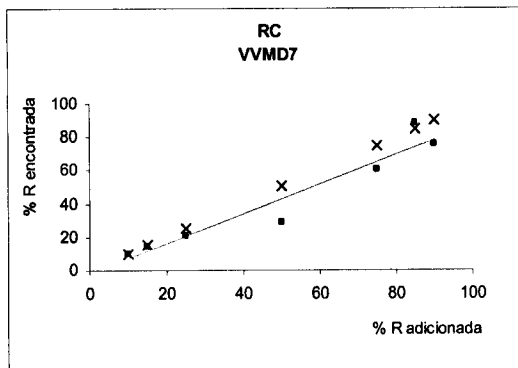
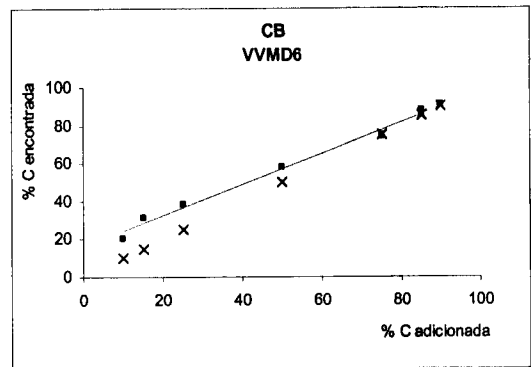
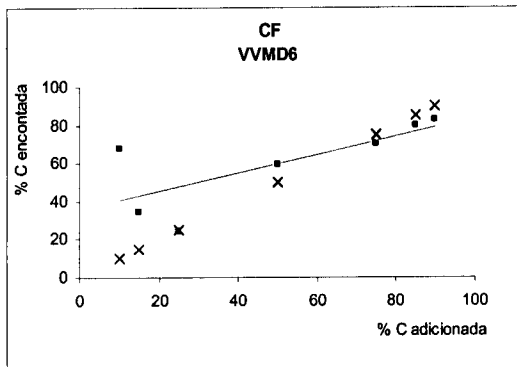
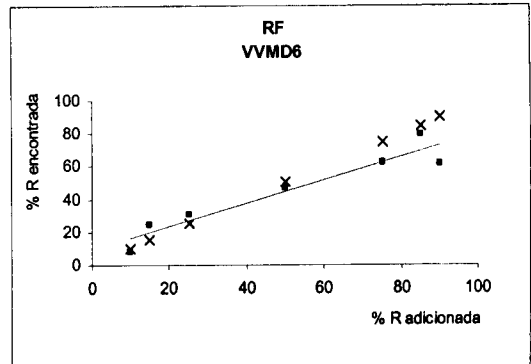
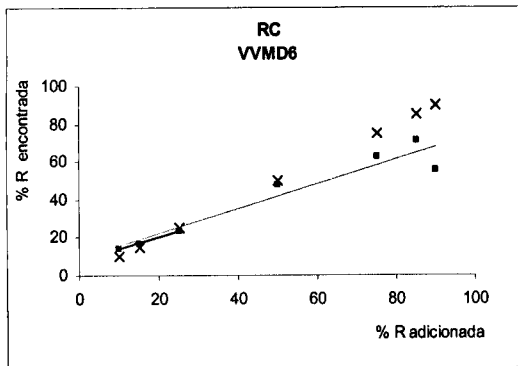


Ilustração 6.6 – Rectas de regressão obtidas pela comparação dos valores adicionados e encontrados (quadrados) para cada combinação e *primer*. As cruces representam a situação teórica em que os valores encontrados são iguais aos adicionados.

O *locus* VVMD6 mostrou-se um *loci* adequado para este tipo de metodologia. Por seu lado, o *locus* VVMD7, apesar de apresentar um bom declive e coeficiente de correlação, origina resultados com um coeficiente de variação elevado entre medições. Este facto deve-se à impossibilidade de obtenção de uma separação electroforética com o nível de clareza exigido pelo método, provavelmente devido à natureza complexa dos produtos de amplificação que não permitem uma boa definição do perfil electroforético.

A Ilustração 6.6 permite uma visualização da correlação entre os valores adicionados e encontrados. É de referir que, desta forma, pode ser confirmada a proximidade entre estes dois tipos de valores sempre que estes correspondam a níveis de significância $> 0,05$, o que significa que não foram encontradas diferenças significativas.

Finalmente, o limite de sensibilidade do método não foi determinado, visto que a detecção de percentagens inferiores a 10% não parece de grande utilidade. Todavia, no decorrer dos ensaios, verificou-se, em alguns casos, que a sensibilidade poderia alcançar o valor de 1%.

5. CONCLUSÕES

A técnica de caracterização genética de castas de videira foi adaptada com bons resultados à avaliação da autenticidade de mostos mono e polivarietais. Esta técnica torna-se mais eficaz se conjugada com a presença de uma boa base de dados de perfis de castas nacionais, o que permite não só procurar no mosto as castas normalmente usadas na sua produção, mas fundamentalmente identificar possíveis adições fraudulentas de castas não utilizadas na região. Não obstante tudo isto, a autenticação, pelo ponto de vista positivo, de um mosto proveniente de uma Região Demarcada, onde normalmente apenas uma pequena variedade de castas é utilizada, é perfeitamente aplicável, dado que uma pequena base de dados de perfis de microssatélites de castas da região para os *loci* em análise pode rapidamente ser construída paralelamente à análise dos mostos.

No que concerne ao método desenvolvido para a quantificação de castas em mostos, pode concluir-se que existe uma correlação entre as densidades das bandas lidas em gel de acrilamida e a percentagem em que as castas estão presentes na mistura. Todavia, estes são resultados preliminares, sobre um tipo de abordagem à quantificação que, na nossa opinião, merecem ser estudados e aperfeiçoados. Talvez em futuros desenvolvimentos desta metodologia se devessem incluir *primers* marcados com fluoróforos, o que poderá aumentar a linearidade e a facilidade de leitura dos géis. Também a aplicação de mais marcadores moleculares poderá levar a resultados interessantes, pois estes apresentam, como referido, comportamentos muito diferentes neste tipo de abordagens.

6. BIBLIOGRAFIA

- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. Gresshoff, P.M. (1992). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 196, 80-83
- Bowers, J. E., Dangl, G. S., Vignani, R., Meredith, C. P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39, 628-633
- Day, M. P.; Zhang, B. L.; Martin, G. J. (1994). The use of trace-element data to complement stable-isotope methods in the characterization of grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 79-85.
- Faria, M. A., Magalhães, R., Ferreira, M. A., Meredith, C. P., Ferreira-Monteiro, F. (2000). *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1096-1100
- Forcen, M.; Mulet, A.; Berna, A. (1992). Contribution of gas-chromatographic and conventional data to the characterization of Majorcan musts and wines by means of pattern-recognition techniques. *J. Sci. Food Agric.*, 60, 229-238.
- García-Beneytez, E.; Moreno-Arribas, M. V.; Borrego, J.; Polo, M. C.; Ibáñez, J. (2002). Application of a DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental and commercial wines of *Vitis vinifera* L. using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6090-6096.
- González-Lara, R.; Correa, I.; Polo, M. C.; Martín-Alvarez, P. J.; Ramos, M. (1989). Classification of variety musts by statistical analysis of their electrophoretic protein pattern. *Food. Chem.*, 34, 103-110.
- Guerra, B., Meredith, C. P. (1995). Comparison of *Vitis Berlandieri* × *Vitis riparia* rootstocks cultivars by restriction fragment length polymorphism analysis. *Vitis*, 34, 109-112
- Hayasaka, Y.; Adams, K. S.; Pocock, K. F.; Baldock, G. A.; Waters, E. J.; Høj, P. B. (2001). Use of Electrospray Mass Spectrometry for mass determination of grape (*Vitis vinifera*) juice pathogenesis-related proteins. A potential tool for varietal differentiation. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1830-1839.
- Hirano, T.; Haque, M.; Utiyama, H. (2002). Theoretical and experimental dissection of competitive PCR for accurate quantification of DNA. *Anal. Biochem.*, 303, 57-65
- Kirov, G.; Williams, N.; Sham, P.; Craddock, N.; Owen, M. J. (2000). Pooled genotyping of microsatellite markers in parent-offspring trios. *Genome Res.*, 10, 105-115
- Labarca, C., Paigen, K. (1980). A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.*, 102, 344-352
- Moreno-Arribas, M. V.; Cabello, F.; Polo, M. C.; Martín-Alvarez, P. J.; Pueyo, E. (1999). Assessment of the native electrophoretic analysis of total grape must proteins for the characterization of *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food. Chem.*, 47, 114-120.
- Pacek, P.; Sajantila, A.; Syvänen, A.-C. (1993). Determination of allele frequencies at loci with length polymorphism by quantitative analysis of DNA amplified from pooled samples. *PCR Methods Applic.*, 2, 313-317.
- Parimoo, S., Parimoo, B. (2003). Sample preparation in DNA analysis. In Mitra, S. (Ed.). *Sample preparation techniques in Analytical chemistry*. (pp. 271-300). New York: John Wiley and Sons
- Pikaart, M. J.; Villeponteau, B. (1993). Suppression of PCR amplification by high-levels of RNA. *Biotechniques*, 14, 24-25.

- Pueyo, E.; Dizy, M.; Polo, M. C. (1993). Varietal differentiation of musts and wines by means of protein fraction. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 255-260.
- Raeymaekers, L. (1995). A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Res.*, 5, 91-94.
- Raeymaekers, L. (2000). Basic principals of quantitative PCR. *Mol. Biotechnol.*, 15, 115-122
- Siret, R.; Boursiquot, J. M.; Merle, M. H.; Cabanis, J. C.; This, P. (2000). Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera*, L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5035-5040.
- Siret, R.; Gigaud, O.; Rosec, J.-P.; This, P. (2000). Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3822-3827
- Vasconcelos, A. M. P.; Chaves das Neves, H. J. (1989). Characterization of elementary wines of *Vitis vinifera* varieties by pattern recognition of free amino acids profiles. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 931-937
- Wood, D.; Shapiro, C. (1997). Improved stained gel measurements using gaussian band deconvolution. *The Journal of NIH Research*, 9, 50.

CAPÍTULO 7

Autenticidade de vinhos pela análise do seu ADN
residual

1. INTRODUÇÃO

A descrição fraudulenta dos componentes no rótulo de um produto alimentar é um problema universal, particularmente se pensarmos em produtos de alto valor comercial como os vinhos de qualidade^[Wolf e Primrose, 2004]. Actualmente, os métodos analíticos que respondem aos problemas de autenticidade com o maior grau de certeza são os métodos baseados na análise do ADN constituinte dos alimentos. Porém, o processamento ao qual a maioria dos alimentos está sujeita pode levar à degradação acelerada da molécula de ADN, inviabilizando estes estudos. Esta degradação parece ocorrer nos vinhos, muitos dos quais, dependendo do tipo de vinificação, são altamente processados. Pelas razões enumeradas, a extracção de ADN de vinhos em comercialização não foi conseguida até à data.

Neste capítulo, dá-se a conhecer as experiências efectuadas na tentativa de extrair ADN de vinhos. Atendendo à ineficiência dos métodos testados propõem-se, adicionalmente, algumas abordagens de extracção/reconstituição do ADN, a testar futuramente.

1.1. METODOLOGIAS CLÁSSICAS DE AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE DO VINHO

A avaliação da autenticidade de um vinho pode ter como objectivo a determinação da sua origem geográfica ou botânica (castas constituintes), sendo a

avaliação da origem geográfica¹ o assunto com maior número de referências bibliográficas^[Etievant *et al.*, 1989; Baxter *et al.*, 1997; Sivertsen *et al.*, 1999; Ogrinc *et al.*, 2001].

Vários compostos têm sido avaliados quanto à possibilidade de se tornarem marcadores de castas. Todavia, a análise das proteínas constituintes do vinho, à semelhança da análise dos sistemas isoenzimáticos nas castas, assume a maior importância neste tipo de metodologias. Assim, Pueyo *et al.* (1993), num estudo sobre 10 mostos e 14 vinhos monovariais, em que utilizaram várias técnicas de separação de proteínas – géis de poliacrilamida, géis de SDS/poliacrilamida e focagem isoelectrica^[Moreno-Arribas *et al.*, 2002] – conseguem a distinção de todos os vinhos monovariais. Os mesmos autores encontram contudo diferenças significativas entre o perfil de proteínas de um mosto e esse mesmo perfil após vinificação. Parece assumir particular importância que, não obstante ter sido conseguida a discriminação dos mostos, um perfil proteico típico de determinada variedade não seja referido, indicando que, muito provavelmente, esse perfil se alterará com as condições climáticas e tipo de solo de onde o vinho foi produzido. A referida variação da constituição proteica, quer entre o mosto e vinho, quer entre mostos de anos diferentes feitos com a mesma castas, teoricamente não poderá ocorrer com o ADN, pelo que a sua utilização possibilitaria a obtenção de resultados mais credíveis.

Aires de Sousa (1996) utilizou redes neuronais, uma ferramenta informática com capacidade de aprendizagem quando sujeita a treino com um número significativo de amostras capaz de extrapolar a informação adquirida para novas situações, para tentar a discriminação de 8 vinhos monovariais Portugueses de 7 colheitas diferentes (obtidos das castas Roupeiro, Manteúdo, Tamarez, Rabo de Ovelha, Moreto, Trincadeira,

¹ Tendo em conta que a determinação da origem geográfica dos vinhos não é o objectivo do presente trabalho mas sim a avaliação da autenticidade botânica, estes trabalhos não serão objecto de revisão.

Periquita e Aragonez) através do perfil (composição percentual) de 22 aminoácidos livres. Este autor encontrou algumas relações entre a composição de aminoácidos e a origem do vinho, contudo a sua discriminação em concreto não é referida. O mesmo tipo de análise química, perfis de 22 aminoácidos, foi também utilizado por Vasconcelos e Chaves das Neves (1989), tendo os autores conseguido a caracterização dos vinhos monovarietais em estudo, através da análise de componentes principais. Os autores encontraram também relações entre o perfil de aminoácidos e a casta, para as amostras estudadas, identificando quais os aminoácidos mais discriminantes.

Arvanitoyannis (2003), numa excelente revisão das metodologias de avaliação da autenticidade dos vinhos, para além da determinação das castas de origem e região de origem, inclui o envelhecimento nos parâmetros de autenticidade dos vinhos. Este autor refere vários marcadores químicos utilizados em tentativas de avaliação da autenticidade botânica do vinho. A análise de minerais, em particular Na, K, Ca, Mg, Mn, Li, Fe, Cu e Pb, foi extensivamente empregue (15 referências). Também o trans-resveratrol foi utilizado como marcador químico, tendo sido encontradas algumas relações entre a sua concentração e a casta utilizada no fabrico do vinho. A análise de fenóis, substâncias voláteis e aminoácidos, contribui com um total de 33 referências bibliográficas, sendo a maioria delas referentes à classificação botânica do vinho. O autor refere igualmente a análise sensorial como uma ferramenta de autenticidade muito útil, sendo de notar, porém, que a necessidade da avaliação por um painel qualificado inviabiliza muitas vezes esta abordagem. Técnicas como RMN (Ressonância Magnética Nuclear) ou FT-IR (Fourier Transform Infra Red) são adicionalmente usadas na caracterização e autenticidade de vinhos.

Não obstante os inúmeros marcadores químicos referidos, os métodos estatísticos envolvidos, como a análise de componentes principais (PCA), acabam por tomar um peso semelhante à análise química propriamente dita, na medida em que, pela análise directa dos marcadores químicos, não é possível chegar a qualquer conclusão.

1.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE ADN DE VINHOS

As dificuldades inerentes à análise de ADN proveniente de mostos e vinhos são bem ilustradas pelo facto de apenas terem sido encontradas 4 referências relativas a trabalhos nesta área. A primeira delas corresponde ao trabalho de Siret *et al.* (2000)², na qual os autores descrevem a utilização de 4 *loci* - VVMD5, VVMD27, VVMD32 e VVMD36 – como o objectivo de identificar as variedades constituintes de um mosto. Estes autores extraíram ADN dos mostos por um processo similar ao usado neste trabalho, após centrifugação das partes sólidas. Todavia, o volume utilizado era substancialmente maior (100 ml vs 2 ml). Utilizando um método de precipitação de ADN, na presença de acetato de sódio à concentração de 0,3 M, pela adição de 1 volume de 2-propanol, o ADN das fracções líquidas restantes da centrifugação foi igualmente extraído. Neste mesmo trabalho, foi executado um estudo da evolução da concentração de ADN nos mostos (precipitado e fase aquosa) ao longo de 15 dias de fermentação. Notou-se um decréscimo da quantidade de ADN extraído sendo, no entanto, sempre visível na agarose e amplificável, quando extraído do precipitado.

Relativamente ao ADN extraído da fase sólida, na generalidade, não era visível na agarose, mas foi possível a sua amplificação até ao final do estudo (15 dias) para 2 das

² No número 10 da mesma revista onde foi por nós publicado, no número 4, o trabalho de base do capítulo anterior: Faria, M. A., Magalhães, R., Ferreira, M. A., Meredith, C. P., Ferreira-Monteiro, F. (2000). *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1096-1100

6 castas estudadas. Não obstante estes resultados, nas amostras obtidas nos últimos dias do ensaio, as amplificações tornaram-se erráticas e pouco eficientes. Os autores reclamaram a extracção de ADN de vinhos experimentais.

Tendo em conta o facto de que esta metodologia se mostrou ineficiente a partir do momento em que não foi possível o isolamento da fracção celular dos mostos, não é possível a sua aplicação a vinhos comerciais. Não foi experimentada, neste trabalho, qualquer mistura de mostos. Apenas foram analisados mostos monovariais.

Pouco tempo depois, os mesmos autores, Siret *et al.* (2002), publicaram um novo trabalho, desta vez utilizando misturas de duas castas, em que analisam mostos e vinhos. O mesmo tipo de testes é aplicado durante o processo fermentativo, mas apenas foram executadas extracções das partes sólidas dos mostos e vinhos (mostos em fermentação). Em misturas de mostos, os autores conseguem identificar uma casta, numa mistura de duas castas, até à percentagem de 10%, no início da fermentação, e 30% no final da mesma, devido à diminuição da quantidade de ADN extraído.

Outro trabalho em que são analisadas misturas de mostos, com sucesso até à proporção de 20%, foi o publicado por Garcia-Beneytez *et al.* (2002). Este grupo de investigação introduz duas inovações na análise de ADN de vinhos. A primeira prende-se com a utilização de *primers* fluorescentes, em reacções *multiplex*³ com os fluoróforos HEX, 6-FAM e TET. Esta metodologia origina perfis com menor ruído de fundo, logo maior definição. A segunda inovação relaciona-se com a utilização de vinhos prontos, caracterizados quimicamente pelos parâmetros convencionais (teor alcoólico, acidez volátil e total, açúcares redutores e SO₂). Estes vinhos, chamados comerciais, foram

³ Reacções de PCR em que se usam em simultâneo mais do que um par de *primers*, amplificando mais do que um *locus*.

engarrafados ao fim de seis meses, após a fermentação maloláctica, no caso dos tintos, e mantidos a 4 °C até ao momento da análise. Foram utilizados neste estudo 7 marcadores moleculares, entre os quais o *locus* VVMD5, já avaliado ao longo deste trabalho e por Siret *et al.* (2000). Os autores indicam que não foi possível a amplificação dos extractos de mostos com este marcador e invocam razões relacionadas com o efeito varietal (constituintes inibidores dos mostos em determinadas castas). Este tipo de situação foi também identificado, no capítulo anterior, onde a presença maioritária de uma casta aparentemente inibiu a amplificação, interferindo com o processo de quantificação, então avaliado.

No que respeita aos vinhos comerciais, estes foram sujeitos a vários processos de concentração até à obtenção de um produto sólido que seria posteriormente extraído pelo processo de extracção dos mostos (os autores usaram o processo descrito neste trabalho). Assim, 750 ml de vinho, foram tratados de três formas diferentes: (i) precipitação por centrifugação a 15300g a 4 °C; (ii) precipitação de ADN pela adição de 0,7 volumes de 2 propanol e (iii) diálise contra água durante 48h. Posteriormente ao processo de diálise, as amostras foram concentradas por dois processos adicionais: precipitação com 2-propanol e liofilização. Apesar de não visualizarem qualquer vestígio de ADN em géis de agarose, os autores mencionados decidiram amplificar os extractos com os referidos marcadores, pois a reacção de PCR é muito mais sensível que a fluorescência provocada pelo brometo de etídio. É de salientar que não foram obtidos quaisquer sinais de amplificação. Alguns extractos foram, então, sujeitos a purificação adicional com colunas comerciais de sílica, mas os resultados da amplificação foram idênticos. A fim de certificar a hipótese de ausência de ADN, e não de elevada concentração de substâncias inibidoras, foi adicionada a algumas amostras uma pequena quantidade de ADN de uma casta não presente. Após amplificação, os alelos da casta adicionada foram correctamente

amplificados, o que comprova a inexistência de ADN nos extractos ou a sua excessiva fragmentação. Consequentemente, o método provou ser ineficiente em vinhos comerciais.

Por seu lado, Leopold *et al.* (2003) referem o sucesso de um método de extracção de ADN em vinhos até à idade de 6 meses. O trabalho, comunicado no VIII Congresso Internacional da Videira, está descrito de uma forma abreviada e apenas aponta que o método de extracção se baseia numa técnica descrita por Manning *et al.* (1991) onde é executada a precipitação selectiva de polissacarídeos e ácidos nucleicos pela adição de diferentes volumes de butoxietanol. Espera-se a publicação deste trabalho na íntegra.

Os vários autores que têm desenvolvido trabalhos tendo em vista o controlo da autenticidade dos vinhos, à excepção de Garcia-Beneytez *et al.* (2002), nem sempre fazem a separação clara entre mosto e vinho. Este facto talvez esteja associado à impossibilidade de extrair com sucesso ADN de vinhos engarrafados tal e qual estão no circuito de comercialização.

2. METODOLOGIAS DE EXTRACÇÃO EXPERIMENTADAS

O objectivo deste trabalho foi o de desenvolver e aplicar uma metodologia capaz de extrair ADN de vinhos comerciais (disponíveis no mercado). Para tal, decidiu testar-se vinhos brancos e tintos das seguintes origens: (A) adquiridos no mercado, (B) recolhidos após a primeira decantação (fornecidos pela firma Barros e Almeida, SA) e conservados a 4 °C até ao momento da análise, cuja constituição varietal era conhecida e (C) Vinhos do Porto oriundos do mesmo produtor, conservados de forma idêntica, recolhidos logo após a adição de aguardente vínica e acerto do teor alcoólico.

Estas amostras foram então sujeitas a 4 processos extractivos baseados em diferentes técnicas: (1) precipitação das partes sólidas do vinho e extracção do precipitado pelo método descrito para os mostos; (2) extracção directa de um pequeno volume de vinho pelo mesmo método; (3) adsorção do ADN potencialmente presente na amostra numa matriz dispersa de sílica e (4) filtração dupla através de uma membrana de GF/F (fibra de vidro).

No método número 1 a precipitação por centrifugação a 10000g de qualquer um dos vinhos originava um precipitado. O volume de precipitado apresentou-se maior para os vinhos de mesa acima indicados como B (vinhos jovens). Após uma primeira centrifugação em microtubos de 2 ml, devido ao limitado volume permitido pela centrífuga, os tubos eram novamente completados com vinho e centrifugados. Após cerca de 10 volumes, em média, o volume de precipitado foi idêntico ao obtido de 2 ml de mosto, procedendo-se, então, ao processo extractivo propriamente dito. De igual forma, foi analisado o precipitado natural (borras) de alguns vinhos do Porto e de mesa disponíveis no laboratório.

Com o método número 2 pretendia-se a precipitação do ADN dissolvido e não de restos celulares que eventualmente pudessem ainda existir no vinho. Este ADN dissolvido em matrizes alimentares tem sido descrito na literatura como ADN residual^[Hotzel *et al.*, 1999]. Para tal, em microtubos de 1,5 ml, a 0,9 ml de vinho foram adicionados 100 µl de tampão de extracção⁴, concentrado 10 vezes. Tendo em conta o volume de vinho e de tampão concentrado, este último, após homogeneização, ficou à concentração à qual foi usado para a extracção de ADN de mostos. A esta solução foi adicionado PVP à concentração

⁴ Tampão utilizado já para a extracção de ADN de folhas e mostos: 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 2% 2-mercaptoetanol; a pH=8

de 6%. O processo de extracção prosseguiu segundo descrito no protocolo de extracção referido no capítulo 6, para os mostos.

Relativamente ao processo de extracção número 3, pretendia testar-se nas nossas amostras a utilização de partículas de sílica que, em determinadas condições, nomeadamente na presença de elevadas concentrações de tiocianato de guanidina, adsorvem na sua superfície, com grande eficiência, as moléculas de ADN. A interacção entre os grupos hidroxilo da sílica e os grupos fosfato do ADN são, provavelmente, a causa desta situação. Esta técnica é utilizada com frequência na extracção de ADN, existente em pequenas quantidades e bastante degradado, de tecidos humanos mumificados^[Fricker *et al.*, 1997; Hoss e Paabo, 1993]. O protocolo de extracção consistiu no seguinte: a 0,5 ml de vinho adicionaram-se 1 ml de solução de adsorção (4% dióxido de silício; tiocianato de guanidina 10M; Tris-HCl 0,1M, pH=6,4; EDTA 0,2M). Incubou-se a suspensão a 65 °C durante 10 minutos e centrifugou-se a 10000g durante cerca de 20 seg. O sobrenadante foi rejeitado e o precipitado de sílica lavado com 1 ml de solução de lavagem (solução de adsorção sem sílica). Centrifugou-se e repetiu-se a lavagem. Rejeitou-se o sobrenadante tendo sido o precipitado lavado sucessivamente com etanol a 70% e acetona. Após secagem, ressuspendeu-se a sílica em 100 µl de tampão TE e incubou-se a cerca de 50 °C durante 20 min. Centrifugou-se novamente e o sobrenadante, contendo o ADN, foi transferido para novo tubo onde a amostra foi conservada, a 4 °C.

Para o método de extracção (4) efectuaram-se adições de ADN padrão (de timo de vitela) a cada um dos vinhos a executar o ensaio, paralelamente, com vinho não suplementado com ADN. Preparou-se também um vinho artificial⁵ ao qual foi adicionada

⁵ 120 ml de etanol, 6 g de glicerol, 200 mg de frutose, 3 g de ác. tartárico, 500 mg de ác. málico, 500 mg de ác. láctico, 400 mg de ác. cítrico, 500 mg ác. acético, 1 g de ác. succínico, 200 mg de ác. fosfórico, 1,8 g ác. tânico, 100 mg de acetaldeído, água destilada q.b.p. 1000 ml.

a mesma quantidade de ADN. Para o cálculo da quantidade de ADN a adicionar ao vinho, teve-se em consideração a quantidade de ADN doseada nos mostos, o que corresponde a cerca de 0,9 mg/l. Tendo em conta tratar-se de um método onde o precipitado é retido por filtração, pode utilizar-se um volume grande de amostra, 750 ml. O método iniciou-se por uma preparação prévia da amostra que consistiu na sua alcalinização de modo a que o vinho atingisse o pH=8. Com esse intuito, adicionou-se hidróxido de sódio 2M até pH ligeiramente superior a 8 sendo posteriormente acertado com HCl 0,1M. Esta mistura foi, então, passada por um filtro de 47 mm, num suporte apropriado, para remover qualquer precipitado formado de imediato. A esta solução adicionaram-se 2% de CTAB, a fim de promover a complexação do ADN. Após 30 minutos à temperatura ambiente, foi novamente filtrada por um filtro idêntico, que foi imediatamente colocado a 4 °C, num microtubo de 2ml. Uma vez feita a lavagem do filtro com a solução utilizada na extracção dos mostos, sucederam-se extracções com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e a precipitação do ADN com etanol e isopropanol, conforme o referido protocolo. Esta metodologia foi adaptada de um trabalho de avaliação da distribuição de vírus na costa do mar Adriático^[Weinbauer *et al.*, 1993], onde o ADN dissolvido na água do mar é extraído de um volume de 5000 ml e posteriormente amplificado para avaliação do tipo de vírus presente. Apenas se conseguiu terminar o processo descrito com o vinho artificial, posto que todas as outras amostras colmatavam os filtros quando ainda menos de 10% tinham sido filtrados. Deste modo, o efeito de concentração possibilitado por esta técnica não foi conseguido tendo sido, portanto, impossível a obtenção de qualquer resultado.

A análise em gel de agarose do extracto obtido com o vinho artificial revelou que o ADN se encontrava muito fragmentado, provavelmente devido às condições iniciais de baixo pH do vinho, desfavoráveis à conservação deste. As condições que podem

influenciar o processo de degradação de ADN, justificando parte dos resultados obtidos, são revistas na secção seguinte.

Os quatro ensaios executados resultaram em extractos onde o ADN não era visível em gel de agarose. Todavia, procedeu-se à amplificação destes extractos com os *primers* para os *loci* VVS1, VVMD5, VVMD6 e VVMD7 com os quais se tinham obtido bons resultados em mostos. Nenhum dos extractos resultou em amplificação positiva. À semelhança do procedimento de Garcia-Beneytez *et al.* (2002) para verificação da presença de substâncias inibidoras da reacção de PCR nos extractos, adicionou-se, a alíquotas de cada extracto, ADN extraído de folhas da casta Chardonnay, o que resultou em amplificações positivas em cerca de 20%. Este resultado indica que a presença de impurezas nos extractos não justifica a ineficiência da amplificação em todos eles. Relativamente aos extractos aos quais se adicionou ADN de Chardonnay que resultaram em amplificações positivas, pode-se afirmar que não continham ADN de *Vitis vinifera*. Quanto a todos os outros, não continham ADN de videira ou continham impurezas suficientes para inibir a reacção de PCR.

Seleccionaram-se para este tipo de estudo os marcadores microssatélite, pelas razões que se apresentam: (i) são os marcadores que demonstraram ser os que mais polimorfismo apresentam; (ii) podem ser amplificados pela PCR, facto extremamente necessário quando se pretende estudar ADN deteriorado e; (iii) devido ao seu pequeno tamanho (100-250 pbs), a possibilidade de se encontrar – no seio de um extracto deteriorado de ADN – um fragmento que contenha um destes marcadores intacto é consideravelmente maior do que para qualquer outro marcador com sequências alvo de maior dimensão. Têm sido usados microssatélites em estudos efectuados sobre amostras

degradadas, como é exemplo cadáveres em decomposição, penas de aves com centenas de anos e múmias egípcias com cerca de 2000 anos^[Roewer et al., 1991].

3. O PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DE ADN DURANTE A VINIFICAÇÃO

Após a morte de qualquer organismo inicia-se de imediato o processo de degradação do ADN pelas nucleases endógenas. Todavia, em condições excepcionais, como temperaturas negativas, rápida desidratação ou altas concentrações salinas, as nucleases são inactivadas evitando-se a degradação dos ácidos nucleicos a mononucleótidos. Mesmo neste hipotético caso, a degradação do ADN prosseguiria embora através de processos bastante mais lentos^[Hofreiter et al., 2001; Pääbo et al., 2004] como processos oxidativos, processos hidrolíticos de desaminação e despurinação e reacções cruzadas com outras substâncias presentes na célula (*viz.* açúcares). No Quadro 7.1 resumem-se os principais processos de degradação de ADN e os seus efeitos na molécula.

Quadro 7.1 – Principais processos de degradação de ADN.

^aSubstâncias inibidoras da amplificação pela reacção de PCR. Adaptado de Pääbo et al. (2004).

Tipo de dano	Processo de degradação	Efeitos na estrutura do ADN
Estruturais	Degradação microbiana	Redução do tamanho
	Nucleases <i>postmortem</i>	Redução da quantidade total de ADN
Oxidativos	Danos nas bases	Fragmentação das bases
	Danos nos resíduos de desoxiribose	Fragmentação dos açúcares
Hidrolíticos		Modificação nucleotídica
	Lise dos grupos aminados (desaminação)	Alteração do código genético
	Lise das purinas (despurinação)	
Reacções cruzadas	Reacção com açúcares	Produtos de Maillard ^a

No processo de vinificação o ADN proveniente das uvas está sujeito a todos estes tipos de reacções de degradação a partir do momento da vindima. Os danos estruturais ocorrem imediatamente após a colheita, como em qualquer outro organismo vivo. O subsequente processo de esmagamento das uvas, promove a lise celular, libertando os ácidos nucleicos da estrutura da célula. Desta forma, a molécula de ADN, em solução aquosa e na presença de água e oxigénio, ficará extremamente vulnerável aos danos oxidativos e hidrolíticos. A reacção dos ácidos nucleicos com os açúcares, presentes no mosto em grande quantidade durante o processo de fermentação, não parece ter grande relevância na degradação da molécula, pois estas são reacções lentas à temperatura ambiente.

Para além dos referidos processo de degradação, as técnicas de vinificação (*viz.* clarificação), cada vez mais agressivas acompanhando a tendência para a produção de vinhos de grande limpidez, são, certamente, responsáveis pela remoção de grande parte dos ácidos nucleicos que possam ter resistido aos processos degradativos.

4. TRABALHO FUTURO

A extracção de ADN de vinhos afigura-se de tal forma crucial que se pretende, em trabalhos futuros, testar outras abordagens de extracção e de reconstituição do ADN extraído, referidas na bibliografia.

Relativamente ao processo extractivo, é nossa opinião que as metodologias de concentração das amostras devem ser executadas antes do processo extractivo e não durante o mesmo, como se fez com o processo 4, anteriormente referido. O número cada vez maior de soluções comerciais de extracção, baseadas em colunas ou partículas de

sílica magnéticas, pela pureza dos extractos que originam, poderá ser uma fonte de técnicas promissoras. Igualmente, a extracção de regiões específicas de ADN, neste caso microsatélites, através da hibridação de sondas ligadas a moléculas de streptavidina em substratos magnéticos, também parece uma situação prometedora.

No que se refere aos extractos de ADN obtidos com as metodologias referidas no ponto anterior e no trabalho de Garcia-Beneytez *et al.* (2002), não dão sinais de amplificação positivos devido à ausência de ADN ou à sua excessiva degradação. Considera-se que devem ser feitos mais estudos, nomeadamente através de técnicas altamente sensíveis de doseamento de ADN, *e.g.* a utilização do fluoróforo SYBR Green®⁶.

Na eventualidade de se provar a existência de ADN nesses extractos, mesmo que muito degradado e em pequeníssimas quantidades, existem técnicas como as de amplificação do genoma completo (WGA - Whole Genome Amplification) ou a utilização de enzimas reparadoras de ADN (RestoraseTM, Sigma) talvez capazes de ultrapassar estas limitações.

Particularmente a técnica de WGA, que configura uma pré-amplificação do genoma, poderá mostrar-se bastante útil, por já ter sido utilizada em extractos de ADN humano para amplificação de *loci* microsatélite. Esta técnica, mais especificamente a sua variante que utiliza um DOP (oligonucleótido degenerado)⁷ como *primer*^[Cheung e Nelson, 1996], baseia-se na execução de uma amplificação iniciada por várias hibridações e extensões, a baixa temperatura, de modo a criar inúmeros locais de hibridação do próprio *primer*. A temperatura de hibridação é aumentada *a posteriori* com vista a permitir uma ligação

⁶ SYBR Green é a designação comercial de uma substância patenteada pela firma Molecular Probes capaz de detectar ADN na ordem dos picogramas.

⁷ CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG (5'-3')

mais específica do *primer*, agora apenas nos fragmentos entretanto amplificados que contenham a sequência deste *primer*. Gera-se, desta forma, uma grande quantidade de ADN igual ao original que pode ser analisado como qualquer extracto.

5. CONCLUSÕES

Os métodos utilizados na tentativa de extracção de ADN de vários tipos de vinho deram origem a extractos a partir dos quais não se conseguiu amplificar qualquer dos marcadores testados. Estes resultados estão de acordo com os dados referidos nas poucas referências bibliográficas encontradas. Todavia, algumas abordagens de extracção de ADN foram concretizadas, traçando-se, assim, um caminho a não repetir.

Não obstante estes resultados, a procura de novos métodos de extracção e, especialmente, de métodos de pré-amplificação do genoma são estratégias a seguir na procura de soluções para a efectiva avaliação da autenticidade de vinhos comerciais por métodos moleculares.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aires-de-Sousa, J. (1996). Verifying Wine Origin: A Neural Network Approach, *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 410-414.
- Arvanitoyannis, I. S. (2003). Wine authenticity. In: *Food authenticity and traceability*. (Ed. Lees, M.). Woodhead Publishing Limited. Cambridge
- Baxter, M. J., Crews, H. M., Dennis, M. J., Goodall, I., Anderson, D. (1997). The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. *Food Chem.*, 60, 443-450
- Cheung, V. G., Nelson, S. F. (1996). Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14676-14679
- Etievant, P., Schlich, P., Cantagrel, R., Bertrand, A., Bouvier, J. C. (1989). Varietal and geographic characterization of French red wines in terms of major acids. *J. Sci. Food Agric.*, 46, 421-438
- Fricker, E. J., Spigelman, M., Fricker, C. R. (1997). The detection of *Escherichia coli* DNA in the ancient remains of Lindow Man using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 351-354
- Garcia-Beneytez, E., Moreno-Arribas, M. V., Borrego, J., Polo, M. C., Ibáñez, J. (2002). Application of a DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental wines and commercial wines of *Vitis vinifera* L. using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6090-6096
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M., Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Genetics*, 2, 353-359
- Hoss, M., Paabo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.*, 21, 3913-3914
- Hotzel, H., Müller, W., Sachse, K. (1999). Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients. *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 192-196.
- Leopold, S., Uehlein, N., Kaldenhoff, R., Scharl, A. (2003). Fate of DNA during must fermentation. *Acta Hort.*, 603, 133-134
- Manning, K. (1991). Isolation of nucleic acids from plants by different solvent precipitation. *Anal. Biochem.*, 195, 45-50
- Moreno-Arribas, M. V., Pardo, E., Polo, M. C. (2002). Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. *Anal. Chim. Acta*, 458, 63-75
- Ogrinc, N., Iztok, J. K., Kocjancic, M., Kidric, J. (2001). Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1432-1440
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., Hofreiter, M. (2004). Genetic analysis from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 645-679
- Pueyo, E.; Dzy, M.; Polo, M. C. (1993). Varietal differentiation of musts and wines by means of protein fraction. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 255-260
- Roewer, L., Riess, O., Prokop, O. (1991). Hybridization and polymerase chain reaction amplification of simple repeated DNA sequences for the analysis of forensic stains. *Electrophoresis*, 12, 181-186

- Siret, R., Bloursiquot, J. M., Merle, M. H., Cabanis, J. C., This, P. (2000). Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5035-5040
- Siret, R., Gigaud, O., Rosec, J. P., This, P. (2002). Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3822-3827
- Sivertsen, H. K., Holen, B., Nicolaysen, F., Risvik, E. (1999). Classification of French red wines according to their geographic origin by the use of multivariate analyses. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 107-115
- Vasconcelos, A. M. P., Chaves das Neves, H. J. (1989). Characterization of elementary wines of *Vitis vinifera* varieties by pattern recognition of free amino acids profiles. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 931-937
- Weinbauer, M. G., Fuks, D., Peduzzi, P. (1993). Distribution of viruses and dissolved DNA along a coastal trophic gradient in the northern Adriatic sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4074-4082
- Wolf, M., Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotech.*, 22, 222-226

CONCLUSÕES FINAIS

1. CONCLUSÕES FINAIS

Esta dissertação pretendeu contribuir para o desenvolvimento de (i) métodos que permitam a correcta identificação das castas de videira, (ii) processos que possibilitem certificação da constituição dos mostos em termos varietais qualitativos e quantitativos, durante o processo fermentativo, e (iii) técnicas de extracção de ADN de vinhos comerciais para posterior análise genética.

Foram atingidos os dois primeiros objectivos. No que concerne ao terceiro, apenas se contribuiu com a definição de estratégias que, após divulgação, não serão objecto de estudo de outros investigadores.

Consequentemente, uma vez sumariadas as conclusões dos vários capítulos, considera-se merecedores de destaque os seguintes pontos:

1. Os marcadores microssatélite mostraram-se perfeitamente adequados a todas as aplicações propostas.
2. A distinção das castas mais importantes cultivadas na região a Norte de Portugal foi facilmente conseguida utilizando 6 *loci* microssatélite. Foram esclarecidos alguns casos de sinonímia (Sousão, Sousão do Douro, Vinhão; Alvarinho e Albariño; Brancelho e Brancellao) a genealogia de uma casta (Cruzado de Rabo de Ovelha). Foram estabelecidas, as relações de proximidade genética entre as castas, para os seis *loci*, salientando-se a distanciação das castas Tinta Roriz e Donzelinho Branco da restante população.

3. O desenvolvimento do método de purificação de ADN, baseado na oclusão do extracto cru numa matriz de agarose, resultou numa eficiente e prática metodologia para a obtenção de um extracto suficientemente puro para amplificação.
4. Os marcadores microssatélite não apresentaram polimorfismo na população de clones estudada tendo, no entanto, sido úteis como marcadores da origem monoclonal destes.
5. Foi optimizada uma metodologia reprodutível, utilizando marcadores StSy-CHS capaz de detectar diferenças - 14% de discriminação - entre clones de Touriga Nacional.
6. O método de extracção de ADN de mostos desenvolvido, em microescala, apresenta-se perfeitamente adequado, tendo sido posteriormente utilizado com êxito por outros autores¹.
7. A técnica de caracterização genética de castas de videira foi adaptada com excelentes resultados para a avaliação da autenticidade de mostos, que apresenta particular utilidade na produção dos vinhos monovariais de valor acrescido. Foi possível a detecção, no mosto, de até cinco variedades na proporção de 20% cada.

¹ Garcia-Beneytez, E., Moreno-Arribas, M. V., Borrego, J., Polo, M. C., Ibáñez, J. (2002). Application of a DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental wines and commercial wines of *Vitis vinifera* L. using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6090-6096
Leopold, S., Uehlein, N., Kaldenhoff, R., Scharl, A. Fate of DNA during must fermentation. *Acta Hort.*, 603, 133-134.

8. O método de quantificação de castas em mostos permitiu detectar uma correlação positiva entre a intensidade das bandas dos alelos de cada casta e a quantidade percentual da mesma presente no mosto. A linearidade foi severamente afectada pelo efeito varietal.

9. Os métodos utilizados na tentativa de extracção de ADN de vários tipos de vinho resultaram em extractos a partir dos quais não se conseguiu amplificar qualquer dos marcadores testados. Não foi possível a extracção de ADN de vinhos.

GLOSSÁRIO

ADNc	ADN complementar. Molécula de ADN de cadeia simples, sintetizada <i>in vitro</i> , de sequência complementar à de uma determinada cadeia mãe de RNA mensageiro. O ADN complementar representa a parte do gene que é expressa numa célula para a produção de proteína.
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism. Método de elevada sensibilidade para a detecção de polimorfismos em ADN. Após digestão dos extractos genómicos com enzimas de restrição adequadas, uma porção dos fragmentos são amplificados pela reacção de PCR, originando perfis de bandas complexos e altamente polimórficos.
Alelo	Uma das diferentes formas de um gene. Cada indivíduo herda dois alelos de cada gene, um de cada um dos progenitores. Estes alelos podem ser iguais (indivíduo homozigótico) ou diferentes (heterozigótico).
Alelos codominantes	Dois alelos diferentes do mesmo gene que são igualmente expressos (e.g. uma flor cuja cor é determinada por um gene com um alelo vermelho e outro branco apresenta a coloração rosa). São alelos expressos de uma forma independente da presença do outro.
Alelos nulo	Alelo inactivo ou inexistente, que não se exprime, ou que não amplifica durante a reacção de PCR.
Ampelografia	Ramo da botânica que trata da identificação e descrição detalhada das características morfológicas das castas de videira, especialmente das suas folhas (forma e textura), cachos (tamanho e configuração) e bagos (tamanho, forma e cor). O termo ampelografia deriva do Grego onde <i>ampelos</i> significa vinha. No século I, um tratado de agricultura da autoria de Columela já fazia referência à Ampelografia.
Ampelometria	Aplicação de métodos e termos estatísticos para a descrição das características morfológicas de uma videira.

Autogâmica	Auto fertilização que ocorre em organismos hermafroditas onde os dois gametas que se fundem são oriundos do mesmo indivíduo.
BAC	Bacterial Artificial Chromosome. Vector usado para clonar fragmentos de ADN (100000 a 300000 bps) em células de <i>Escherichia coli</i> . Baseado na presença do plasmídeo F que ocorre naturalmente na bactéria e tem a capacidade de entrelaçar com ADN estranho. Após a clonagem do ADN estranho nas bactérias anfitrião, podem ser feitas inúmeras cópias por replicação bacteriana em cultura.
Biblioteca genómica	Colecção de clones obtida a partir de fragmentos de ADN sobreponíveis, gerados de uma forma aleatória. Representa o genoma completo de um organismo.
Casta	Variedade de videira.
Centrómero	Zona central do cromossomal que separa os dois braços. Local onde se dá a ligação das fibras do fuso acromático durante a meiose e mitose. Região de junção dos dois cromatídeos.
Clone	Do gr. <i>klón</i> «rebento», um clone é um indivíduo derivado de outro e que possui o mesmo património genético do indivíduo original, produzido por reprodução assexuada. Um clone é, portanto, e de forma simplista, como que um gémeo desfasado no tempo.
Coefficiente de Dice	O coeficiente de Dice é usado para o cálculo da similaridade genética entre indivíduos. Corresponde à proporção das bandas partilhadas e a sua aplicação origina uma tabela de similaridade.
Dendrograma	Um Dendrograma (do gr. <i>déndron</i> «árvore») é um tipo específico de diagrama que organiza determinados factores e variáveis. Resulta de uma análise estatística de determinados dados, em que se emprega um método quantitativo que leva a agrupamentos e à sua ordenação hierárquica ascendente. Em termos gráficos se assemelha aos ramos de uma árvore que se vão dividindo noutros sucessivamente.

Desnaturação	Destruição da estrutura tridimensional natural das moléculas biológicas de grande massa molecular (e.g. proteínas ou ADN), normalmente através do calor. No caso particular das moléculas de ADN o processo de desnaturação conduz à separação das cadeias duplas em duas cadeias simples.
EcoR1	Primeira enzima de restrição originária da bactéria <i>Escherichia coli</i> .
Enzima de restrição	Proteína capaz de reconhecer, com elevada especificidade, uma sequência nucleotídica curta e cortar a molécula de ADN nesse local. As bactérias contêm mais de 400 tipos de enzimas deste tipo, capazes de reconhecer e cortar cerca de 100 sequências de ADN diferentes.
Exão	Fragmento de um gene que codifica as instruções para a síntese de uma proteína. Em muitos genes os exões são separados por segmentos de ADN que não codificam proteínas, os intrões, removidos durante a fase de <i>splicing</i> com vista à síntese do RNA mensageiro.
F (F₁, F₂, F₃ ...)	Filial Generation. Os descendentes de um determinado cruzamento entre plantas constituem a descendência F1. O cruzamento entre indivíduo F1 origina a segunda geração filial, ou descendência F2, e assim sucessivamente.
Fenograma	Tipo de dendrograma em que os agrupamentos são feitos de acordo com a similaridade geral entre os indivíduos. Ao contrário de um cladograma, o fenograma não exprime relações filogenéticas, apenas similaridade geral.
Fenótipo	Características observáveis de um organismo que resultam da interacção entre o genótipo e o ambiente.
Filogenia	Relação evolucionária entre os organismos. Um <i>phylum</i> é um grupo de indivíduos relacionados.
Fitsch	Módulo de agrupamento do <i>software</i> PHYLIP. Permite a construção de filogenias utilizando o método de Fitch-Margoliash, ou dos mínimos quadrados de Cavalli-Sforza. Idêntico ao Kitsh apenas não assume a existência de um relógio biológico.

Fragmento de restrição	Fragmento de ADN obtido a partir de uma molécula mais longa pela acção de enzimas de restrição.
GenBank	Base de dados genética do NIH (National Institute of Health)*
Genealogia	Relações genéticas entre seres vivos estabelecidas através de gerações. Linhagem. Procedência.
GENEDIST	Módulo de agrupamento do <i>software</i> PHYLIP. Permite o cálculo de distâncias genéticas entre indivíduos.
Genepool	Totalidade da informação genética, de uma determinada população, num dado momento.
Genoma	Totalidade da informação genética de um organismo.
Genótipo	Identidade genética integral de um indivíduo, incluindo os alelos não expressos em características morfológicas.
Germoplasma	Termo usado para descrever os recursos genéticos de determinada planta normalmente armazenado sob a forma de sementes ou células germinativas.
Haplotipo	Um conjunto de alelos relacionados (genes ou regiões polimórficas) transmitidos como uma unidade integral. Advém da contracção dos vocábulos anglo-saxónicos (<i>haploid</i> e <i>genotype</i>). Corresponde à constituição genética de um único cromossoma. A definição é aplicável a todo o genótipo ou a apenas um <i>locus</i> .
Heterozigosidade esperada	Proporção esperada dos indivíduos heterozigóticos para um determinado <i>locus</i> (exprime-se com valores de 0 a 1). Equivale a: $1 - \text{soma dos quadrados da frequência de cada locus}$. Também conhecida como <i>Gene Diversity</i> (D).
Heterozigosidade observada	Proporção dos indivíduos heterozigóticos para um determinado <i>locus</i> (exprime-se com valores de 0 a 1). É uma medida da variação genética de uma população.

Hibridação	União de duas cadeias complementares de ADN que origina uma cadeia dupla (duplex).
Homonímia	Situação em que dois ou mais géneros, espécies ou variedades diferentes têm o mesmo nome.
Intrão	Sequências de ADN de um gene que não codificam qualquer parte da proteína produzida. Também conhecidos pelo termo lixo genómico. O intrão é inicialmente transcrito na molécula de RNAm mas é eliminado durante o processo de maturação (<i>splicing</i>) do RNA. Os intrões interrompem as sequências que codificam proteínas, os exões.
Isoenzimas	Formas diferentes da mesma enzima. Um dos primeiros marcadores moleculares utilizados. Sinónimo de aloenzima.
Klt	Jogo de elementos que atendam em conjunto a um mesmo propósito ou utilidade.
Kitsh	Módulo de agrupamento do software PHYLIP. Permite a construção de filogenias utilizando o método de Fitch-Margoliash, ou dos mínimos quadrados, assumindo a existência de um relógio evolutivo e que todos os braços do diagrama são contemporâneos.
Loci	Plural de <i>locus</i> .
Locus	Local ou posição onde um gene particular ou uma sequência de ADN se encontra no cromossoma. Usado frequentemente como sinónimo do termo gene ou marcador, embora de significado mais genérico.
Marcador molecular	Sequência de ADN (pode ser um gene) usado para identificar um organismo, uma espécie, uma variedade ou uma característica fenotípica associada.
Meristema	Tecido vegetal indiferenciado, do qual se originam novas células para a formação de outros tecidos. Encontra-se na zona apical de uma planta em crescimento.

Microsatélite	Sequência repetitiva de ADN usada como marcador molecular devido ao elevado polimorfismo apresentado. Os padrões de repetição são constituídos por 2 a 6 bases.
Microsatélite cloroplastidial	Região repetitiva polimórfica do genoma dos cloroplastos.
Mismatch repair	Processo de reparação de ADN que corrige bases incorporadas na cadeia de uma forma errada durante o processo de replicação.
MseR1	Primeira enzima de restrição originária de várias espécies de <i>Micrococcus</i> .
Multiplex	Combinação de dois ou mais pares de <i>primers</i> , correspondentes a mais que um <i>loci</i> , durante o processo de amplificação de ADN pela PCR e análise dos fragmentos amplificados.
Nuclease	Enzima que catalisa a degradação dos ácidos nucleicos pela quebra das ligações fosfodiéster. Denominam-se DNases, se actuam especificamente em ADN, e RNases se degradam apenas ARN.
Ontogénese	Sequência normal do desenvolvimento de um organismo, desde o embrião até à fase adulta, passando por todas as fases do ciclo de vida.
Par de bases	As duas bases nucleotídicas pertencentes a cada uma das cadeias de ADN, ligadas por pontes de hidrogénio.
Partenogénese	Crescimento e desenvolvimento de um embrião sem fertilização, isto é, por reprodução assexuada. Este processo, em plantas, origina frutos sem sementes.
PCR	Polimerase Chain Reaction. Reacção em cadeia da polimerase do ADN. Amplificação <i>in vitro</i> de ADN pela acção da enzima <i>Taq.</i> polimerase.
Phylip	Conjunto de programas informáticos para determinação de relações filogenéticas entre indivíduos. Desenvolvido por Joe Felsenstein da Universidade de Washington. Disponível gratuitamente na Internet em: http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html .

Polimorfismo	Diferenças na sequência do ADN que ocorrem naturalmente numa população. Substituições de apenas um nucleótido, inserções e deleções de sequências a sequências repetitivas (microsatélites) são exemplos de polimorfismos. O local onde essa sequência se encontra é uma região polimórfica.
Porta-enxerto	Variedade de videira, que constitui o sistema radicular da planta, onde é enxertada a casta desejada.
Primer	Pequena cadeia de nucleótidos que serve como ponto de partida da replicação do ADN. Designação anglosaxónica para sequência iniciadora da replicação ou polimerização do ADN.
Proofreading	Processo de correcção de erros que ocorrem durante a replicação do ADN, transcrição do ARN, ou durante a síntese proteica.
PstI	Primeira enzima de restrição originária da bactéria <i>Providencia stuartii</i> .
QTLs	Quantitative Trait Loci. Sequência com relação quantitativa com parâmetro agronómico.
Quimera	Organismo composto por dois tipos de tecidos geneticamente diferentes. Ocorre nas plantas por mutação durante a divisão celular, em zonas de crescimento rápido.
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA. Polimorfismo de ADN por amplificação aleatória. <i>Primers</i> oligonucleotídicos (10 pbs) são usados para amplificar por PCR regiões indefinidas da molécula de ADN. São gerados inúmeros fragmentos, de um modo aleatório, que, após separação por electroforese, originam perfis polimórficos.
Região flaqueadora	Sequências de ADN que se encontram imediatamente a seguir, flanqueiam, ambos os lados de um <i>locus</i> ou gene específico.
Retrotransposição	Elementos genéticos móveis de distribuição ubiquitária nos genomas de muitos organismos eucarióticos. São particularmente abundantes nas plantas onde, por vezes, constituem o principal componente do ADN nuclear.

RFLP	Restriction Fragment Length polymorphism - Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição. Técnica de detecção de polimorfismos entre indivíduos, originados pela variação dos locais de corte de enzimas de restrição específicas.
RT-PCR	PCR de transcriptase reversa. Reacção capaz de gerar cópias de uma região específica de ADNc sintetizado a partir de ARN. Processa-se em dois passos: primeiro o ADN complementar é produzido a partir de uma molécula mãe de ARN, através da enzima transcriptase reversa, e posteriormente amplificado pela reacção de PCR.
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region – Técnica de detecção de polimorfismos em <i>loci</i> específicos. Os <i>primers</i> utilizados (16 a 24 bps) são desenvolvidos a partir do isolamento e sequenciação de bandas polimórficas obtidas pela amplificação de um genoma com um <i>primer</i> RAPD. Uma vez conhecida a sequência da banda polimórfica, são desenhados novos <i>primers</i> SCAR (um par de <i>primers</i>) pela adição de 10 a 14 bases complementares ao fragmento RAPD.
Sinonímia	Situação em que dois ou mais géneros, espécies ou variedades iguais têm nomes diferentes.
Sonda	Molécula de ADN ou ARN de cadeia simples com uma sequência específica, usada para detectar a sequência de bases complementar por hibridação.
Southern blot	Procedimento de transferência dos fragmentos de ADN separados por electroforese em gel de agarose, para uma membrana de nitrocelulose onde posteriormente será hibridada uma sonda marcada complementar a uma sequência de interesse. A hibridação indica qual dos fragmentos separados é complementar à sonda utilizada.
STR	Short Tandem Repeats. O mesmo que microssatélites.
STS	Sequence Tagged Site. O mesmo que microssatélite.
Stutter	Fenómeno que se caracteriza pelo aparecimento de bandas fantasma nos produtos de amplificação de <i>loci</i> microssatélites.

Taq.	Polimerase do ADN termostável obtida da bactéria <i>Thermus aquaticus</i> , isolada de nascentes quentes do parque de Yellowstone, nos Estados Unidos da América. Usada para a polimerização <i>in vitro</i> do ADN pela reacção de PCR.
Telómero	Pequeno segmento terminal dos cromossomas, altamente repetitivo, que encurta em cada replicação da célula. O partir de determinado ponto de encurtamento o ADN deixa de se replicar e a célula entra em senescência.
Transcriptase reversa	Enzima encontrada nos retrovirus capaz de sintetizar ADNc a partir de uma cadeia mãe de ARN.
Treeview	<i>Software</i> para o desenho de dendrogramas, a partir de um formato cru, desenvolvido por Roderic D. M. Page, da Universidade de Glasgow, Inglaterra, disponibilizado gratuitamente em: http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean. Método de agrupamento que usa uma matriz de distâncias genéticas para o desenho de um dendrograma, assumindo iguais ritmos de mutação em todos os braços.
UTR	Untranslated Region. Porção do ADN num cromossomal não transcrita, não envolvida na síntese proteica.
Varição somaclonal	Alteração genética das plantas que normalmente ocorre em células somáticas (não reprodutivas) durante os processos de cultura de tecidos vegetais em laboratório. Algumas destas mutações podem ser hereditárias e resultar na mudança do genótipo da planta.
Variedade	Subdivisão taxonómica da espécie. Grupo de indivíduos geneticamente distintos uns dos outros mas pertencentes à mesma espécie. Sinónimo de cultivar (variedade cultivada).
WGA	Whole Genome Amplification - Amplificação integral do genoma. Técnica que origina ADN amplificável para posterior análise utilizando qualquer tipo de marcador molecular. Utilizada quando a quantidade inicial de ADN é escassa.