

DM

**Caracterização de variedades tradicionais *Vitis vinifera* L.
da Região Autónoma da Madeira por técnicas moleculares**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

António José Jardim Branco
MESTRADO EM BIOLOGIA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

fevereiro 2025

**Caracterização de variedades tradicionais *Vitis vinifera* L.
da Região Autónoma da Madeira por técnicas moleculares**
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

António José Jardim Branco

MESTRADO EM BIOLOGIA APLICADA

ORIENTAÇÃO

Miguel Ângelo Almeida Pinheiro de Carvalho

COORIENTAÇÃO

Carla Aparecida Ragonezi Gomes Lopes

Esta dissertação teve o apoio financeiro do projeto AGROSUS (financiado pela União Europeia – *Horizon Europe research and innovation programme under Grant agreement N° GA 101084084*), no âmbito do programa de investigação do ISOPlexis (Centro de Agricultura Sustentável e Tecnologia Alimentar).



Agradecimentos

Este é um dos momentos significativos, em que posso expressar em palavras as experiências vividas ao longo da realização deste projeto. O seu sucesso resultou da confluência de esforços, apoio e dedicação de diversas pessoas e instituições que, de forma direta ou indireta, disponibilizaram os recursos, o conhecimento e as condições essenciais para a sua concretização.

Expresso a minha profunda gratidão ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Ângelo Almeida Pinheiro de Carvalho, à minha coorientadora, Professora Doutora Carla A. Ragonezi Gomes Lopes, e à Professora Doutora Patrícia Alexandra da Silva Rosa, a quem me refiro como “co-coorientadora”, pelo apoio inestimável, pela orientação científica e pela disponibilidade constante ao longo do desenvolvimento deste projeto. O vosso conhecimento, dedicação e incentivo foram fundamentais para a sua concretização.

Ao ISOPlexis, Centro em Agricultura Sustentável e Tecnologia Alimentar, pela disponibilização das instalações e pelos recursos essenciais para a realização desta tese, bem como pelas facilidades concedidas ao longo do trabalho. Expresso ainda a minha gratidão a toda a equipa pelo apoio, com especial reconhecimento a Gregório Freitas pelo empenho no trabalho de campo e pelo acompanhamento ao longo deste percurso.

Ao LGH pela disponibilização de espaço e equipamentos essenciais para a realização deste trabalho. Expresso um agradecimento especial a Rita Gonçalves pela sua boa disposição, incentivo e partilha de conhecimentos durante a componente prática molecular.

Ao Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, pela informação disponibilizada, relevante para este trabalho na pessoa da Eng^a Carlota Ferreira.

Aos colegas do Mestrado em Biologia Aplicada, pelo apoio constante, pelo incentivo e pela boa disposição ao longo deste percurso. A partilha de conhecimentos, as discussões e o espírito de cooperação foram fundamentais para tornar esta jornada mais enriquecedora e motivadora.

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão à minha família, aos meus pais, Jacinta e António, e aos meus irmãos, Marta, Alexandre e Miguel, pelo apoio incondicional.

Um agradecimento especial à minha esposa, Teresa, e ao meu filho, Martim, pelo amor, paciência e apoio ao longo desta jornada. A vossa compreensão e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse concluir a tese, mesmo nos momentos em que o tempo que deveria ser vosso, foi dedicado a este trabalho. Sou imensamente grato pelo vosso amor e pela força que me deram em cada dia.

Resumo

A viticultura da Região Autónoma da Madeira desempenha um papel fundamental na preservação do património genético da videira, *Vitis vinifera* L., associada à produção do Vinho Madeira, um produto de Denominação de Origem Protegida. A identificação precisa das castas tradicionais é essencial para garantir a autenticidade do material vegetal, assegurando a conformidade com as normas de certificação e evitando erros de classificação. No entanto, a distinção varietal baseada exclusivamente em características morfológicas apresenta limitações, tornando imprescindível a aplicação de metodologias moleculares.

Neste estudo, foram utilizados 9 *loci SSRs* (*VVS2*, *VVMD5*, *VVMD7*, *VVMD25*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32*, *VrZAG62* e *VrZAG79*) para a caracterização genética de 11 castas tradicionais cultivadas na Região Autónoma da Madeira conforme recomendado pela base de dados do *Vitis International Variety Catalogue*, permitindo a obtenção de perfis genéticos específicos para cada variedade. Estes dados viabilizaram a distinção varietal com elevada precisão, a determinação de relações filogenéticas entre as castas, a sua comparação com a base de dados do VIVC e integração de dados no GrinGlobal.

Adicionalmente, a técnica *SSR-High Resolution Melting* foi explorada como método complementar para a autenticação varietal. Embora a diferenciação dos perfis de *melting* tenha permitido discriminar algumas castas como o Caracol, Malvasia Cândida e Verdelho, para os *loci VVMD5* e *VVMD27*, a insuficiente diferenciação nos perfis de fusão e a limitação do *locus VrZAG79* comprometeram a distinção completa entre as variedades analisadas.

Este estudo reforça a relevância da caracterização molecular na viticultura da Região Autónoma da Madeira, evidenciando a aplicação de técnicas moleculares como uma abordagem inovadora para a identificação e futura rastreabilidade do material vegetal. Esta metodologia oferece uma ferramenta eficaz para viveiristas, produtores e entidades reguladoras, fortalecendo o controle da autenticidade das plantas utilizadas na produção de Vinho Madeira e assegurando a conformidade com os padrões de certificação.

Palavras-chave: *Vitis vinifera* L., Marcadores moleculares, *SSRs*, *SSR-HRM*, DOP, Vinho Madeira.

Abstract

The viticulture of the Autonomous Region of Madeira plays a fundamental role in preserving the genetic heritage of the grapevine (*Vitis vinifera* L.), being closely associated with the production of Madeira Wine, a product with Protected Designation of Origin (DOP). The precise identification of traditional grape varieties is essential to ensuring the authenticity of plant material, guaranteeing compliance with certification standards, and preventing classification errors. However, varietal distinction based solely on morphological characteristics presents limitations, making the application of molecular methodologies indispensable.

In this study, nine *SSR loci* (*VVS2*, *VVMD5*, *VVMD7*, *VVMD25*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32*, *VrZAG62*, and *VrZAG79*) were used for the genetic characterization of 11 traditional grape varieties cultivated in the Autonomous Region of Madeira, following the recommendations of the Vitis International Variety Catalogue (VIVC) database. This approach enabled the generation of specific genetic profiles for each variety, allowing for high-precision varietal differentiation, the determination of phylogenetic relationships among varieties, comparisons with the VIVC database, and data integration into GrinGlobal.

Additionally, the Microsatellite-High Resolution Melting technique was explored as a complementary method for varietal authentication. While the differentiation of melting profiles allowed for the discrimination of certain varieties, such as Caracol, Malvasia Cândida, and Verdelho at *loci* *VVMD5* and *VVMD27*, the insufficient resolution of fusion profiles and the limitations of *locus* *VrZAG79* compromised the complete differentiation of all analyzed varieties.

This study reinforces the relevance of molecular characterization in the viticulture of the Autonomous Region of Madeira, highlighting the application of molecular techniques as an innovative approach for varietal identification and future traceability of plant material. This methodology provides an effective tool for nurseries, producers, and regulatory entities, strengthening the control of plant authenticity in Madeira Wine production and ensuring compliance with certification standards.

Keywords: *Vitis vinifera* L., Molecular markers, *SSRs*, *SSR-HRM*, DOP, Madeira wine.

Índice

Agradecimentos	II
Resumo.....	III
Abstract	IV
Índice.....	V
Índice de figuras.....	VII
Índice de tabelas.....	VIII
Lista de abreviaturas	IX
1. Introdução	1
1.1 Família Vitaceae.....	2
1.2 Diversidade genética	3
1.3 A Vitivinicultura na RAM: Reconhecimento e Identidade Vinícola.....	4
1.4 Identificação varietal.....	5
1.5 Marcadores moleculares	6
1.5.1 Marcadores <i>SSR</i> em videira	7
1.6 <i>High Resolution Melting</i> (HRM)	9
2. Objetivos	12
3. Metodologia experimental	13
3.1 Amostragem	13
3.2 Extração de DNA	15
3.3 Genotipagem de <i>SSRs</i> (<i>Simple Sequence Repeats</i>).....	16
3.3.1 Seleção dos <i>SSRs</i>	16
3.3.2 Otimização e amplificação dos <i>SSRs</i> por PCR	16
3.3.3 Análise de fragmentos por eletroforese capilar.....	18
3.3.4 Sequenciação de DNA	18
3.3.5 Cálculo de índices de diversidade genética, por <i>SSR</i>	18
3.3.6 Construção da árvore filogenética.....	19

3.4 HRM (<i>High Resolution Melting</i>)	19
3.4.1 Seleção dos <i>SSRs</i> e amostras a analisar	19
3.4.2 Otimização e amplificação qPCR	20
3.4.3 Análise HRM.....	20
4. Resultados e Discussão	21
4.1 Extração de DNA	21
4.2 Genotipagem de <i>SSRs</i> (<i>Simple Sequence Repeats</i>).....	22
4.2.1 Índices de diversidade genética, por <i>SSR</i>	27
4.2.2 Análise filogenética.....	28
4.3 SSR-HRM	32
4.3.1 <i>Locus VVMD5</i>	33
4.3.2 <i>Locus VVMD27</i>	35
4.3.3 <i>Locus VrZAG79</i>	38
5. Conclusões e Perspetivas futuras	41
6. Referências.....	43
7. Anexos	49
7.1 Extração de DNA	49
7.1.1 Preparação de soluções	49
7.1.2 Protocolos de extração	50
7.1.3 Eletroforese em gel de agarose	54
7.1.4 Revelação dos géis para os 9 loci.....	55

Índice de figuras

Figura 1 – Localização das 11 áreas de recolha, distribuídas pelo Arquipélago da Madeira.....	13
Figura 2 – Fenograma obtido a partir da matriz de distância genética, gerada com base nos dados alélicos para os 9 SSRs, utilizando o método UPGMA e distância euclidiana, avaliada pelo coeficiente de correlação cofenética ($r = 0,9656$), robustez de análise com 1.000 replicações de bootstrap.....	30
Figura 3 – Amplificação do DNA e eficiência da PCR para o locus VVMD5.	32
Figura 4 - Amplificação do DNA e eficiência da PCR para os loci VVMD27 e VrZAG79.....	33
Figura 5 – Curva de fusão normalizada para VVMD5.	33
Figura 6 – Diferença de melting para VVMD5.	34
Figura 7 - Curva de fusão normalizada para VVMD27.....	36
Figura 8 - Diferença de melting para VVMD27.	37
Figura 9 - Curva de fusão normalizada para VrZAG79.....	38
Figura 10 - Diferença de melting para VrZAG79.	39

Índica de tabelas

Tabela 1 - Listagem das amostras recolhidas para análise, incluindo a casta, o local de recolha, a área de plantação e código de amostra.	14
Tabela 2 – Características dos 9 loci de SSRs recomendados pelo VIVC.....	16
Tabela 3 – Sequência de primers analisados.	17
Tabela 4 – Protocolos, concentração e qualidade de DNA (rácios de absorvância).	22
Tabela 5 - Resultados da genotipagem dos 9 SSRs nas diferentes amostras em estudo, com a indicação do tamanho dos alelos em pb por alelo 1 (A1) e alelo 2 (A2) para cada locus.....	23
Tabela 6 - Índices de diversidade genética dos 9 SSRs nas amostras de <i>Vitis vinifera</i> L. analisadas. Número de amostras (n), Número de alelos (Na), heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He), conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e frequência de alelos nulos (F(Null)).	27

Lista de abreviaturas

DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
ASJ	-	Arco de São Jorge
B	-	Boal
C	-	Caracol
CAN	-	Coleção Ampelográfica Nacional
Ct	-	Threshold Cycle
DO	-	Denominação de Origem
DOP	-	Denominação de Origem Protegida
ECL	-	Estreito de Câmara de Lobos
EDTA	-	Tris-acetato-etilenodiaminotetracético
F(Null)	-	Frequência de alelos nulos
FO	-	Fajã da Ovelha
He	-	Heterozigosidade esperada
Ho	-	Heterozigosidade observada
HRM	-	<i>High Resolution Melting</i>
IG	-	Indicação Geográfica
INIAV	-	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.
IPGRI	-	<i>International Plant Genetic Resources Institute</i>
IVBAM	-	Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira
MC	-	Malvasia Cândida
MCR	-	Malvasia Cândida Roxa
MFR	-	Malvasia Fina Roxa
MSJ	-	Malvasia de São Jorge
OIV	-	<i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>
PCR	-	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIC	-	Conteúdo informativo de polimorfismo
PM	-	Porto Moniz
qPCR	-	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
QTLs	-	<i>Quantitative trait locus</i>
QV	-	Quinta das Vinhas
R	-	Raposeira
RAM	-	Região Autónoma da Madeira
RDM	-	Região Demarcada da Madeira
S	-	Sercial
SJ	-	São Jorge
SL	-	Santa Luzia
SNP	-	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSR	-	<i>Simple Sequence Repeats</i>
SSR-HRM	-	<i>Microsatellite-High Resolution Melting</i>
ST	-	Santana
SV	-	São Vicente
SX	-	Seixal

T	- Terrantez
TAE	- Tris-acetato-etilenodiaminotetracético
TE	- Tris-etilenodiaminotetracético
T _m	- Temperatura de <i>melting</i>
TN	- Tinta Negra
TNFB	- Tinta Negra de Folha Branca
Tris	- Tris (hidroximetil) aminometano
UPGMA	- <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
V	- Verdelho
VIVC	- <i>Vitis International Variety Catalogue</i>
VM	- Vinho Madeira
ZR	- <i>Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof</i>

1. Introdução

Em todo o mundo, estima-se que existam cerca de 10.000 castas de *Vitis vinifera* L. [1]. Em Portugal, são reconhecidas cerca de 340 castas de vinha, mas apenas algumas são de interesse para a produção de vinho [2]. Quando se trata de vinhos com Denominação de Origem Protegida (DOP), o número de castas de vinha com interesse é ainda mais restrito [3, 4, 5], embora amplamente reconhecidas pela União Europeia, como é o caso do Vinho Madeira (VM), cuja produção é rigorosamente regulamentada para garantir a autenticidade e a tipicidade do produto, ostentando o prestigiado estatuto de DOP «Madeira» [3].

A atividade vitivinícola na Madeira teve início no século XV, em paralelo com o processo de colonização da região, consolidando-se como a principal atividade económica local no século XVII. Em 1913, a Madeira oficializou a sua regulamentação ao conquistar o estatuto de Região Demarcada da Madeira (RDM), sendo uma das mais antigas regiões demarcadas de Portugal [6].

No final da década de 1950, em resposta à propagação de agentes patogénicos como o filoxera e o míldio, que dizimaram grande parte de *V. vinifera* [7], a seleção clonal surgiu como uma ferramenta para o melhoramento de muitas destas castas de vinha [1], no entanto, esta ferramenta resultou numa erosão genética. Se por um lado, esta baixa diversidade genética se refletiu numa baixa adaptabilidade a diferentes fatores abióticos [8], por outro lado, pode facilitar a identificação de marcadores moleculares que permitam distinguir as diferentes castas [9].

A diferenciação de castas por métodos clássicos como, a ampelografia e a ampelometria, baseiam-se no reconhecimento de características morfológicas de folhas, ramos jovens e frutos, pelo que implicam um vasto conhecimento e experiência na sua aplicação [10]. Surge assim a necessidade de complementar estes métodos clássicos com técnicas baseadas em marcadores moleculares, provando o seu valor na distinção das castas de videira e que sejam passíveis de serem implementados de uma forma precisa e de fácil interpretação.

De entre os tipos de marcadores moleculares estudados neste âmbito, os microssatélites *SSR* (*Simple Sequence Repeats*) têm provado ser os mais informativos, uma vez que produzem perfis distintos em eletroforese capilar e permitem assim a correta identificação de castas, sendo independentes dos fatores externos [11, 12]. Para além disso, os *SSRs* são loci-específicos, pelo que permitem a inferência de relações filogenéticas entre castas [13]. Embora os *SSRs* sejam amplamente reconhecidos pela sua eficácia na identificação de castas, a utilidade na distinção de clones é limitada, devido à mínima variabilidade genética que os separa [7], sendo que, a análise de *SSRs* exige técnicas

laboratoriais complexas, como extração, purificação e amplificação de DNA, seguidas de métodos de eletroforese, o que aumenta o tempo e os custos envolvidos [14].

De forma a agilizar a genotipagem, a técnica *High Resolution Melting* (HRM) tem sido utilizado com sucesso na genotipagem de variantes bialélicas *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) e na identificação de outras variações genéticas em vários organismos [15, 16, 17, 18]. É um método de alta resolução que permite detetar pequenas diferenças entre sequências de DNA, por diferenças da temperatura de fusão de cada variante genética, produzindo uma curva de fusão característica e distinta para cada amostra. Além disso, permite a análise simultânea de várias amostras de uma forma sensível, reproduzível e célere [16].

Os marcadores *SSR* conjugados com a análise de HRM foram usados com sucesso na identificação de castas de uvas de mesa em vinhos brancos fermentados e mostos [19], mostrando assim a sua utilidade no rastreio e deteção de adulterações, destacando-se como protocolo para garantir a qualidade e a autenticidade. Recentemente, Barrias *et al.* [15], utilizou *SSR-Multiplex PCR* e genotipagem SNP-HRM, para identificar 19 castas antigas portuguesas. Os resultados evidenciaram a robustez do SNP-HRM em relação ao *SSR-Multiplex PCR*, com a identificação molecular bem-sucedida, ao compararem com material de referência e identificando possíveis novas castas.

As técnicas moleculares vieram assim agilizar o processo de verificação da autenticidade das castas de *V. vinifera*, dificultada pela existência de uma grande variedade de sinónimos, homónimos e erros de identificação. Na Região Autónoma da Madeira (RAM), a autenticidade e preservação das castas regionais ligadas à produção e comercialização do Vinho Madeira são fundamentais para garantir a qualidade e a identidade deste produto, contribuindo para o seu prestígio mundial. Segundo Rodrigues [20], os perfis de *SSR-Multiplex PCR* foram aplicados para caracterizar castas de vinha da RAM. Contudo, o método *SSR-HRM* não foi até a data aplicado para o estudo de vinhas da RAM, permanecendo assim por explorar o potencial da sua aplicação no contexto da caracterização e identificação das castas regionais.

1.1 Família Vitaceae

As Vitaceae pertence ao Reino Plantae, Filo Magniophyta, Classe Magnoliopsida e Ordem Vitales. De acordo com evidências científicas, acredita-se que a sua origem remonta ao final do período Cretáceo, há aproximadamente 90 milhões de anos, com uma subsequente diversificação no início do Terciário [21]. A evolução desta família tem sido objeto de estudo complexo e contínuo na área científica, encontrando-se atualmente descritos 17 géneros e aproximadamente 950 espécies [21, 22].

O género *Vitis* abrange cerca de 60 espécies e divide-se em dois subgéneros distintos: *Muscadinia* e *Euvinis* [23]. Esta classificação baseia-se nas diferenças anatómicas e morfológicas presentes nas espécies de cada grupo. O subgénero *Muscadinia* agrupa plantas com 40 cromossomas ($2n = 40$), enquanto o subgénero *Euvinis* reúne plantas com 38 cromossomas ($2n = 38$). Neste último, encontram-se duas espécies de grande importância económica para a agricultura: *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L., valorizadas tanto para a produção de vinhos, como para o consumo *in natura* dos frutos [24, 25]. A maioria das espécies do género *Vitis* tem origem na América do Norte e na Ásia, enquanto *V. vinifera* é indígena da Europa e da Ásia Central, sendo responsável por mais de 90% da produção global de vinhos [26]. No género *Vitis*, a *Vitis vinifera* é a espécie mais importante e mais utilizada, sendo responsável pela produção de vinho, que a torna de grande relevância na viticultura global [24, 25].

A espécie *V. vinifera* divide-se em duas subespécies: *V. vinifera sylvestris* e *V. vinifera sativa*. A subespécie *sylvestris*, corresponde à forma selvagem, ocorre em diversos países, incluindo Alemanha, Itália, Portugal e França. Os registos fósseis mais antigos de videiras foram encontrados em Reims, França, datado do período Eocénico, cerca de 54-55 milhões de anos, enquanto em Portugal, fósseis estimados em cerca de 53 milhões de anos foram descobertos em Silveirinha, Coimbra [27]. A subespécie *sativa* representa a forma domesticada de populações da subespécie *sylvestris*, e que ocorre nas regiões mais quentes do norte da bacia Mediterrânea e próximas aos mares Negro e Cáspio [28]. Estudos baseados em DNA, realizados em videiras em Portugal, especialmente em regiões ribeirinhas, revelaram a presença de populações selvagens de *V. vinifera sylvestris*, que contradizem a hipótese de que a cultura da vinha teve início exclusivamente na região do Cáucaso, evidenciando um foco de diversidade na Península Ibérica [2, 29]. Além disso, foram observadas diferenças significativas entre as videiras ibéricas e as originárias do Cáucaso, reforçando a importância desta região para a variabilidade genética da espécie [2, 30, 31].

1.2 Diversidade genética

Apesar da possível origem e evolução independentes, presume-se que a diversidade genética da videira sofreu uma drástica redução, tanto na sua forma cultivada quanto na forma selvagem, em grande parte devido à propagação de agentes patogénicos no final do século XIX [26]. Entre os principais responsáveis por esta crise estão o afídio *Daktulosphaira vitifoliae* (filoxera) e o oomiceto *Plasmopara viticola* (míldio), que devastaram e destruíram inúmeras vinhas na Europa [32]. Em resposta, foram introduzidas espécies americanas do género *Vitis* que não *V. vinifera*, que são mais resistentes a estas doenças, e que foram utilizadas como porta-enxertos e na criação de híbridos

interespecíficos, permitindo a recuperação da viticultura europeia [26]. Este processo foi impulsionado pelo crescimento da indústria vinícola no final do século XX, com predominância de algumas castas francesas amplamente adaptadas ao mercado internacional, levando ao abandono progressivo das castas tradicionais e a uma significativa redução da diversidade de castas [32]. No entanto, a conservação dos recursos genéticos das castas tradicionais tem sido, nas últimas décadas, alvo de esforços em diversas regiões vitícolas, com iniciativas voltadas para a identificação, localização, caracterização e preservação das castas regionais [33, 34].

O aumento da diversidade de castas de *V. vinifera* e a expansão da viticultura para novas regiões [26, 35] foi possível devido a diversos fatores, como a plantação por semente, os cruzamentos espontâneos ou controlados, a domesticação de videiras selvagens e os programas de melhoramento vegetal. Globalmente, estima-se a existência de 10.000 castas de *V. vinifera* cultivadas numa área aproximada de 7,3 milhões de hectares [1, 36]. Na Europa, o cultivo ocupa aproximadamente 3,3 milhões de hectares, enquanto em Portugal a vinha abrange cerca de 192 mil hectares, sendo uma das principais culturas agrícolas do país [37]. A cultura da videira ocupa uma posição central na produção frutícola global, com uma colheita anual que ultrapassa 60 milhões de toneladas de uvas [24, 26]. A Europa concentra a maior parte desta produção, representando cerca de metade do total global (50%), enquanto a Ásia (23%) e a América (20%) seguem como os principais concorrentes. A maior parte da colheita de uvas (aproximadamente 70%) é destinada à vinificação, enquanto 22% são utilizadas para consumo fresco e 8% para produção de passas [38].

Em Portugal, o setor vitivinícola desempenha um papel de grande relevância económica e social, posicionando o país entre os dez maiores produtores mundiais e os cinco maiores da Europa [39]. O país abriga uma Coleção Ampelográfica Nacional (CAN - <https://www.iniav.pt/can>), composta por 450 castas de *V. vinifera* maioritariamente típicas de Portugal [31], e possui cerca de 340 castas de videira reconhecidas, das quais 313 estão oficialmente autorizadas para a produção de vinho [2]. Esta coleção desempenha um papel crucial na preservação das castas tradicionais portuguesas em material vegetal vivo, permitindo a realização de estudos ampelográficos e moleculares [5].

1.3 A Vitivinicultura na RAM: Reconhecimento e Identidade Vinícola

Na Região Autónoma da Madeira (RAM), presentemente, a vitivinicultura apresenta uma área vitícola de aproximadamente 500 hectares [40]. O interesse na vinha remonta ao período da colonização do arquipélago no século XV, consolidando-se como a principal atividade económica da região no século XVII [6]. Em 1913, a RAM obteve o estatuto oficial de Região Demarcada da Madeira (RDM), abrangendo as ilhas da Madeira e Porto Santo, região caracterizada pela qualidade

e tipicidade dos vinhos, resultado da conjugação de uma série de fatores naturais e humanos [37]. Na RDM, as condições agro-edafoclimáticas únicas, como a origem vulcânica do solo, o clima insular atlântico, a seleção criteriosa de castas nobres e as práticas agronômicas ajustadas à orografia da ilha, combinadas com métodos tradicionais de vinificação, resultam em vinhos com características organoléticas singulares. Este reconhecimento fez da RDM uma das primeiras Regiões Demarcadas de Portugal, amplamente conhecida pela produção do renomado Vinho Madeira (VM) [41].

Atualmente, o VM possui o estatuto de Denominação de Origem Protegida (DOP) «Madeira», reconhecido pela União Europeia, com a sua produção rigorosamente regulamentada para assegurar a qualidade, autenticidade e tipicidade do produto [3]. Além do Vinho Madeira, a RDM ampliou seu portfólio para incluir vinhos de mesa com a Denominação de Origem (DO) «Madeirense» e vinhos com Indicação Geográfica (IG) «Terras Madeirenses» [3, 4, 5]. Estes produtos também estão submetidos a legislação específica, que regula todas as etapas do processo produtivo, desde a seleção e plantação das videiras até a comercialização sob tutela do Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira (IVBAM) [3, 5]. Estas regulamentações têm como principal objetivo não apenas assegurar a qualidade dos vinhos produzidos na RDM, mas também preservar e valorizar as características únicas e tradicionais do território madeirense, consolidando sua identidade vinícola. O VM é um vinho licoroso de renome internacional, produzido maioritariamente a partir das castas Tinta Negra, Sercial, Verdelho, Boal, Malvasia Cândida, Malvasia de São Jorge e Terrantez [3, 5]. Estas castas são reconhecidas pela sua produtividade e qualidade, destacando-se especialmente por sua elevada acidez, um atributo que contribui significativamente para a longevidade característica do VM [41].

De uma forma genérica, a DO refere-se a um vinho produzido exclusivamente em uma Região Demarcada, utilizando castas pertencentes à espécie *V. vinifera*. Esta espécie é caracterizada por apresentar ampla variabilidade morfológica e genética, o que pode dificultar a identificação precisa das castas, gerando ambiguidade na sua distinção [39]. Por isso, a sua identificação e caracterização corretas são essenciais para viticultores e produtores, uma vez que a qualidade e a quantidade da produção estão diretamente relacionadas à casta cultivada. Além disso, a identificação precisa das castas auxilia na preservação do seu valor comercial e previne o uso indevido de nomes prestigiados em produtos adulterados, contribuindo para a integridade do setor vitivinícola da região [39].

1.4 Identificação varietal

Durante o desenvolvimento da videira, a interação entre o genótipo e o ambiente determina a expressão fenotípica, sendo este processo influenciado por fatores como o clima, a presença de

agentes patogénicos, as propriedades do solo e o estado nutricional das plantas (*terroir*) [42]. Além disso, a identificação de plantas jovens, com até quatro ou cinco anos, é desafiadora, pois estas ainda não exibem as características morfológicas típicas de exemplares adultos [10, 43].

Tradicionalmente, a identificação varietal tem sido realizada por meio da ampelografia e da ampelometria, disciplinas que utilizam a descrição detalhada das características morfológicas das plantas em diferentes estágios de desenvolvimento [44]. Em Portugal, os primeiros estudos ampelográficos caracterizavam-se por uma abordagem bastante empírica, sobretudo no que diz respeito aos aspetos culturais e de vinificação das variedades. Na década de 1940, um trabalho pioneiro detalhava os principais traços distintivos de cada casta, incluindo medições angulares realizadas nas folhas adultas, representando um avanço significativo para a época, descrevendo 44 castas brancas e 48 castas tintas [45, 46]. Em 1983, a *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV) apresentou o *Code des caractères descriptifs des variétés et espèces de Vitis*, um documento criado para unificar os critérios de descrição morfológica das videiras entre os países vitícolas. Já em Portugal, em 1980, foi iniciado o Projeto Nacional de Ampelografia e Sinonímia das Variedades de Videira, que resultou na descrição de 271 castas, tornando os métodos ampelográficos e ampelométricos ferramentas essenciais para uma identificação e classificação mais precisa das variedades de videira [45, 46].

No entanto, estes métodos requerem um elevado nível de conhecimento técnico e experiência, além de estarem sujeitos à influência de fatores ambientais, o que pode comprometer a sua precisão e reprodutibilidade [10]. Existe, assim, a necessidade de complementar estes métodos clássicos com técnicas baseadas em marcadores moleculares, que provem o seu valor na distinção das castas de *V. vinifera*, e que sejam passíveis de serem implementados de uma forma precisa e de fácil interpretação.

1.5 Marcadores moleculares

Um marcador molecular baseado em DNA corresponde a um locus genómico com variação biológica, que pode ser utilizado como referência para estudos de identificação, filogenéticos mapeamento genético ou associação a características. O seu estudo é frequentemente realizado pela amplificação por PCR, com *primers* específicos, seguida de corrida de fragmentos ou sequenciação da região de interesse. Entre as suas principais vantagens está a ampla aplicabilidade, abrangendo qualquer região do genoma, seja em intrões, exões ou regiões reguladoras, o que possibilita a identificação de uma grande variedade de polimorfismos no DNA entre diferentes indivíduos, incluindo inserções, deleções, translocações, duplicações e mutações pontuais [47].

As regiões polimórficas do genoma de *Vitis* podem ser usadas como marcadores moleculares, tornando-se ferramentas indispensáveis para estudos genéticos [9, 48, 30]. Certos marcadores possibilitam a criação de um perfil genético único, devido ao elevado nível de polimorfismo entre castas [49], sendo amplamente utilizados em estudos, pelo que encontram aplicação em diversas áreas, como a identificação de castas, a análise de relações filogenéticas, a proteção de cultivares, o mapeamento genómico, a distinção de clones e a resolução de casos de sinonímias e homonímias [50, 51].

Os marcadores moleculares apresentam vantagens significativas em relação aos marcadores morfológicos, pois oferecem um número praticamente ilimitado de polimorfismos, distribuídos aleatoriamente ao longo do genoma, permitindo uma identificação precisa dos genótipos mesmo em fases iniciais de desenvolvimento da planta [52], sendo fundamental para a indústria vitivinícola, especialmente na implementação e gestão de vinhas monovarietais, garantindo a autenticidade varietal e a uniformidade das plantações [53].

No estudo da diversidade genética de *Vitis vinifera*, existem cinco tipos de marcadores moleculares mais utilizados como, *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), sendo os primeiros a serem aplicados na identificação de DNA específico em variedades e porta-enxertos, baseando-se na digestão do DNA genómico com enzimas de restrição [45, 54, 55], *RAPD* (*Random Amplified Polymorphic DNA*), uma variação da técnica de PCR que utiliza um único *primer* de dez nucleótidos com sequência arbitrária, permitindo a amplificação de múltiplos fragmentos de DNA em diferentes regiões do genoma, de forma não direcionada, *AFLP* (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) recomendada para a caracterização da videira por permitir a análise de múltiplos *loci* simultaneamente e gerar padrões de amplificação estáveis e reprodutíveis [56] e *SSR* (*Simple Sequence Repeats*) que são sequências de nucleótidos constituídas pela repetição em *tandem* de um padrão de nucleótidos [57]. Estas abordagens, fornecem ferramentas robustas para caracterizar e quantificar a diversidade genética, permitindo discriminações precisas e complementares entre diferentes castas de videira [9].

1.5.1 Marcadores *SSR* em videira

De entre os marcadores moleculares estudados pela comunidade científica, os *SSRs* provaram ser os mais informativos, uma vez que, para muitas das castas, produzem perfis genéticos distintos em eletroforese capilar e permitem assim um elevado poder discriminatório e a correta identificação das castas, sendo independentes dos fatores externos [11, 12, 30, 55, 58].

Estes marcadores consistem em regiões não codificantes do DNA, formadas por motivos repetitivos de 1 a 6 nucleótidos organizados em bloco. A presença destas repetições no genoma de plantas que foi inicialmente demonstrada por Delseny *et al.* [59], e, posteriormente, Sefc *et al.* [48], evidenciou a sua ubiquidade na maioria dos organismos, destacando o seu papel como uma importante fonte de variação genética. A maioria dos microsatélites estudados são dinucleótidos, sendo as repetições “AC” predominantes em organismos animais e as “AT” mais frequentes em plantas. O polimorfismo nos *loci* de microsatélites resulta principalmente de variações no número de unidades repetitivas, atribuídas a erros no mecanismo de replicação do DNA, como, por exemplo, o deslizamento da DNA polimerase [60, 61, 62]. Além de sua aplicação na genotipagem, estes marcadores apresentam ampla utilidade em diversas áreas, incluindo a análise de pedigree [58], o mapeamento genético e físico [63], a identificação de *Quantitative Trait Loci* (QTLs) [64] e a distinção entre variedades sinónimas e homónimas [65].

Conhecidos pelo seu elevado grau de polimorfismo, os *SSRs* destacam-se como marcadores genéticos robustos e versáteis, e a sua identificação e caracterização têm sido realizadas em diversas espécies de plantas frutíferas, incluindo *V. vinifera* [66]. Os investigadores australianos Thomas e Scott, foram pioneiros na aplicação destes marcadores à identificação de diferentes castas de videira [55], tendo sido demonstrados como altamente abundantes e polimórficos, e por tal capazes de caracterizar e identificar diferentes variedades de *V. vinifera*, uma vez que produzem perfis genéticos distintos, independentes dos fatores externos [11, 12]. Os primeiros estudos identificaram 6 espécies de *Vitis* e 26 castas de *V. vinifera*, demonstrando através de análises filogenéticas que os microsatélites são codominantes e comportam-se de acordo com a herança mendeliana, tornando-os adequados para mapeamento genético [55]. Estudos posteriores expandiram a análise para mais de 80 genótipos, que impulsionaram pesquisas adicionais, e levaram ao desenvolvimento de metodologias baseadas em PCR, com *primers* específicos para o género *Vitis* [50, 58, 67, 68].

Inicialmente, um conjunto de 6 *SSRs* foi incluído na lista de descritores para castas e espécies de *Vitis* estabelecida pela *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV), para determinar a identidade de uma casta e identificar material vegetal de origem desconhecida, ao comparar o genótipo obtido com genótipos de referência Sauvignon e Chardonnay [48]. Em Portugal, diversos estudos evidenciaram a eficácia dos *SSRs* na identificação de castas portuguesas [31, 40, 67, 69]. Um dos estudos mais relevantes realizou a genotipagem de 313 castas oficialmente autorizadas para a produção de vinho no país, utilizando seis *SSRs* amplificados por PCR e sujeitos a eletroforese capilar [5]. Este trabalho permitiu identificar 244 genótipos distintos, bem como sinónimos em 40 castas, demonstrando que os *loci* analisados são muito informativos. De entre os sinónimos encontram-se algumas das castas da RAM, como Terrantez, Molar, Esgana-Cão, Boal e Malvasia, correspondendo

às castas Folgasão, Tinta Negra, Sercial, Malvasia Fina e Malvasia de São Jorge respetivamente [3, 5].

Com o objetivo de padronizar a informação genética, documentar os recursos genéticos da videira, facilitar o intercâmbio de material e informação entre viveiristas, pesquisadores e viticultores, em 1996, foi criada a base de dados *Vitis International Variety Catalogue* (VIVC), em colaboração do *Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof* (ZR), com a OIV e a *Bioversity International* (antigo *International Plant Genetic Resources Institute* - IPGRI). O VIVC incorporou três novos *loci* aos seis já utilizados, elevando para nove *SSRs*, o que aumentou significativamente a capacidade discriminatória destes marcadores. Esta base de dados tornou-se uma ferramenta essencial para confirmar e definir sinónimos, permitindo a identificação de genótipos idênticos registados sob diferentes denominações, sendo a maior base de dados de *SSR* disponível publicamente e atualizada periodicamente, promovendo uma gestão eficiente dos recursos genéticos da videira [70].

A abordagem molecular assume também particular relevância em coleções de germoplasma, onde a identificação de duplicados é fundamental para maximizar a preservação da variabilidade genética e reduzir o número de castas redundantes. Na Coleção Ampelográfica Nacional de Portugal foram identificados vários casos de sinónimos, como Boal da Madeira/Malvasia Fina/Boal Cachudo e Verdelho da Madeira/Verdelho dos Açores/Verdelho Roxo, que compartilham perfis idênticos de *SSRs* [67]. Embora os *SSRs* sejam amplamente reconhecidos por sua eficiência na identificação de castas, a sua capacidade para distinguir clones é limitada, devido à reduzida variação genética entre estes [32].

Os perfis de *SSRs* obtidos por *Multiplex PCR* e corrida de fragmentos foram utilizados para caracterizar castas de vinha da RAM em coleções sob a responsabilidade do INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.), em Torres Vedras, Portugal Continental, obtendo perfis idênticos aos previamente registados na base de dados do VIVC, mas também contribuindo para a ampliação do perfil genético das variedades Caracol e Malvasia de São Jorge, ao adicionar os alelos identificados nos *loci SSRs VVMD25, VVMD28 e VVMD32* [20].

1.6 High Resolution Melting (HRM)

Embora os *SSRs* sejam amplamente utilizados no estudo de diversas espécies vegetais, a sua análise pode ser tecnicamente exigente. Os métodos tradicionais frequentemente requerem técnicas de extração, purificação e amplificação de DNA, que podem necessitar de muitos esforços de otimização, seguidas do uso de eletroforese em géis de poliacrilamida, ou eletroforese capilar em

sequenciador automático de produtos de PCR marcados com fluorescência, que resultam num acréscimo de tempo e custo de análise [14].

De forma a agilizar a genotipagem, a técnica do *High Resolution Melting* (HRM) tem sido utilizada com sucesso na análise de variações na sequência de DNA em diversos organismos, incluindo plantas. Este método destaca-se sobretudo na identificação de variantes bialélicas, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), identificando perfis distintos que refletem diferentes mutações pontuais, bem como na análise de *loci* de microssatélites (*SSRs*), identificando diferenças no número de repetições [15, 16, 17, 18]. É um método sensível e reprodutível, desenvolvido como uma extensão avançada das curvas de fusão de fragmentos de DNA, previamente amplificados por PCR. Durante o PCR, são utilizados corantes fluorescentes que se intercalam no DNA de dupla cadeia, gerando um sinal fluorescente máximo no final da reação de amplificação [71]. Na etapa de HRM, a temperatura é gradualmente aumentada, sendo que os produtos de PCR em dupla cadeia desnaturam progressivamente e ocorre uma redução na fluorescência, que é registada como uma curva de fusão. As curvas de fusão produzidas pelo HRM são específicas para cada produto de PCR e influenciadas por fatores como a sequência de DNA, o seu conteúdo em “GC” e o seu comprimento [71, 72]. A otimização e comparação destas curvas permitem, de uma forma rápida e de baixo custo, identificar diferenças ou semelhanças entre os produtos de PCR, evidenciando a precisão da técnica [73]. O HRM pode apresentar-se assim como uma alternativa viável para a análise de microssatélites, especialmente em laboratórios que não dispõem de sequenciadores capazes de realizar corrida de fragmentos por eletroforese capilar [74]. Embora a análise por HRM não seja tradicionalmente considerada um método baseado em padrões de bandas, esta pode ser incluída nessa categoria de forma conceitual, pois utiliza a amplificação por PCR e pode permitir a deteção de variantes de sequência, incluindo diferenças de tamanho, com base em padrões de *melting*, sem a necessidade de sequenciamento ou hibridização [75].

O estudo de *SSRs* por HRM tem se provado útil na identificação de variedades de plantas altamente heterozigóticas, como a videira, ao se comparar a curva de fusão de uma casta suspeita com uma amostra de referência [74]. Possui também aplicação no rastreio varietal de cultivares e deteção de adulterações em produtos processados com DOP, como por exemplo doce de cereja [14] e azeite [16] e, mais recentemente, demonstrando a sua eficácia na identificação de castas de uvas de mesa em vinhos brancos fermentados e mostos [76]. O estudo de Awad *et al.* [77] expandiu ainda mais as aplicações da técnica, utilizando *SSR/SNP*, caracterizando a variação genética de características fenológicas em 192 castas de vinha, que resultou em curvas de fusão únicas para um número elevado de amostras. Em Portugal, um estudo recente de SNP-HRM em vinha foi comparado com os perfis dos 9 *SSRs* recomendados pelo VIVC, obtidos por PCR e eletroforese capilar, tendo demonstrado a

maior robustez do SNP-HRM, para identificação molecular em relação a material de referência, e revelado potenciais novas castas [15].

Como referido acima, determinadas castas de vinha da RAM, originárias de cultivos em Portugal Continental sob a responsabilidade do INIAV, foram caracterizadas para os 9 *loci SSRs* através da análise de fragmentos, permitindo a obtenção de perfis genéticos específicos [20], contudo, o método *SSR-HRM* ainda não foi aplicado ao estudo das vinhas da RAM. Isso deixa inexplorado o potencial desta metodologia, no contexto da caracterização e identificação das castas regionais de *V. vinifera*, um desafio intensificado pela presença de sinónimos, homónimos e erros de identificação.

2. Objetivos

O presente estudo tem como objetivo principal a caracterização genética de 11 castas tradicionais de *Vitis vinifera*, cultivadas na RAM e utilizadas na produção de Vinho Madeira com designação DOP, utilizando 9 marcadores moleculares *SSRs*. Os resultados permitirão aferir se as diferentes castas possuem perfis genéticos distintos, que possam ser aplicados na sua identificação, assim como permitirão estabelecer relações filogenéticas entre as castas analisadas, compará-las com o banco de dados internacional VIVC e integrar a informação obtida na genotipagem no sistema de informação e documentação do banco de germoplasma (BG ISOPlexis) do Centro ISOPlexis, cuja base de dados é disponibilizada, através da plataforma GrinGlobal (<https://www.grin-global.org/>). O projeto AGROSUS também beneficiará da informação gerada, pois permitirá a confirmação da variedade utilizada nos ensaios deste projeto do programa Horizonte Europa.

Objetiva-se também desenvolver e otimizar um protocolo *SSR-HRM* (*Microsatellite-High Resolution Melting*), que permita validar a autenticidade de *V. vinifera* de forma rápida, sensível e reprodutível, otimizando tempo e recursos.

Prevê-se que, num futuro breve, os resultados do presente estudo permitam colaborar com o setor viveirista, promovendo a rastreabilidade do material vegetal e contribuindo para um maior conhecimento das origens das castas, evitando o uso de plantas fora das normas legais e preservando o património genético vitivinícola da RAM.

3. Metodologia experimental

O plano de investigação a que este estudo se reporta englobou duas abordagens. Numa primeira abordagem, procedeu-se à amostragem, à extração de DNA, e à genotipagem dos 9 *SSRs* recomendados pelo VIVC, por PCR e corrida de fragmentos em sequenciador automático, para a caracterização genética de 11 castas de *V. vinifera* da RAM, o estabelecimento de relações filogenéticas entre estas e a sua comparação com os perfis genéticos depositados no VIVC.

Numa segunda abordagem, pretendeu-se desenhar e otimizar um protocolo SSR-HRM, no sentido de verificar se esta metodologia permite a verificação da autenticidade de *V. vinifera*, economizando tempo e esforço relativamente à primeira abordagem.

3.1 Amostragem

Visando assegurar uma amostra homogénea e representativa das castas presentes nas áreas seleccionadas, foram seleccionadas 11 castas de *V. vinifera* L., representativas das castas tradicionais cultivadas na RAM com interesse no VM, nomeadamente Verdelho, Sercial, Terrantez, Boal (Malvasia fina), Malvasia Fina Roxa, Malvasia Cândida, Malvasia Cândida Roxa, Malvasia de São Jorge, Tinta Negra, Tinta Negra de Folha Branca e Caracol. A amostragem compreende onze áreas de vinha, estando algumas áreas representadas por mais do que uma amostra. (Figura 1).



Figura 1 – Localização das 11 áreas de recolha, distribuídas pelo Arquipélago da Madeira.

A recolha foi realizada após a vindima, em estrita conformidade, com a autorização e a colaboração dos produtores das mencionadas áreas, onde colheram-se 10 folhas jovens de 3 plantas

de cada casta, colocadas em sacos individuais para cada planta, devidamente etiquetadas com o código da amostra, a casta, a data e o local de recolha (Tabela 1). O material foi preservado e conservado em caixas térmicas, equipadas com cuvetes de gelo e, uma vez no laboratório do ISOPlexis-UMa, foram armazenadas a -80 °C até serem processadas.

Tabela 1 - Listagem das amostras recolhidas para análise, incluindo a casta, o local de recolha, a área de plantação e código de amostra.

Casta	Local de recolha	Área (m²)	Código
Caracol	Porto Santo	1906	PS-C
Malvasia Cândida	Quinta das Vinhas	963	QV-MC
Malvasia Cândida	São Jorge	207	SJ-MC
Malvasia Cândida	Santa Luzia	89	SL-MC
Malvasia Cândida Roxa	Quinta das Vinhas	332	QV-MCR
Malvasia de São Jorge	Santana	89	S-MSJ
Malvasia de São Jorge I	São Jorge	4658	SJ-MSJ I
Malvasia de São Jorge II	São Jorge	265	SJ-MSJ II
Malvasia Fina/Boal	Quinta das Vinhas	603	QV-B
Malvasia Fina/Boal	Raposeira	112	R-B
Malvasia Fina/Boal	Santa Luzia	1206	SL-B
Malvasia Fina Roxa	Santa Luzia	700	SL-MFR
Sercial	Quinta das Vinhas	945	QV-S
Sercial	São Jorge	90	SJ-S
Sercial	São Vicente	450	SV-S
Sercial	Seixal	100	SX-S
Sercial	Porto Moniz	998	PM-S
Sercial	Estreito Câmara de Lobos	853	ECL-S
Sercial I	Estreito Câmara de Lobos	988	ECL-S I
Sercial II	Estreito Câmara de Lobos	974	ECL-S II
Terrantez	Quinta das Vinhas	933	QV-T
Terrantez	Fajã da Ovelha	741	FO-T
Terrantez	São Jorge	111	SJ-T
Terrantez	Santa Luzia	699	SL-T
Terrantez	Estreito Câmara de Lobos	916	ECL-T
Tinta Negra Folha Branca	Estreito Câmara de Lobos	315	ECL-TNFB
Tinta Negra I	Estreito Câmara de Lobos	2049	ECL-TN I
Tinta Negra II	Estreito Câmara de Lobos	87	ECL-TN II
Tinta Negra I	São Vicente	1002	SV-TN I
Tinta Negra II	São Vicente	1278	SV-TN II
Verdelho	Quinta das Vinhas	414	QV-V
Verdelho	Raposeira	824	R-V
Verdelho	São Jorge	3022	SJ-V
Verdelho	Arco de São Jorge	1711	ASJ-S
Verdelho	São Vicente	833	SV-V
Verdelho	Seixal	177	SX-V
Verdelho	Porto Moniz	4298	PM-V
Verdelho	Santa Luzia	1365	SL-V

3.2 Extração de DNA

As 10 folhas jovens, coletadas de 3 plantas distintas de cada casta, foram misturadas uniformemente, visando assegurar uma amostra homogênea e representativa das castas presentes em cada local de colheita.

O protocolo aplicado para a extração de DNA a partir de folhas de videira baseou-se no método descrito por Lodhi *et al.* [78], com algumas adaptações (Protocolo E, Anexo 7.1.2). Folhas jovens foram maceradas em azoto líquido, utilizando um almofariz até obter uma quantidade superior a 5 g de tecido vegetal, que foi transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL e armazenado a -80 °C. Para cada amostra, adicionou-se 5 mL de tampão de extração (composição descrita no Anexo 7.1.1) a 0,5 g de tecido vegetal congelado, num tubo de polipropileno de 15 mL e agitou-se vigorosamente utilizando um vórtex (*Genie 2*, Scientific Industries). Colocado em banho-maria (Julabo) incubou-se a 60 °C durante 25 minutos, agitando ocasionalmente para manter o extrato ressuspensionado. Deixou-se arrefecer os tubos à temperatura ambiente, e adicionou-se 6 mL de clorofórmio: octanol (Sigma), na proporção de 24:1, invertendo os tubos gentilmente 20 a 25 vezes até se formar uma emulsão. Já na centrífuga (*Centrifuge 5430R*, Eppendorf), centrifugou-se a 6.000 rpm, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionou-se 6 mL de clorofórmio: octanol, agitando gentilmente 20 a 25 vezes até se formar uma emulsão e submetidas à centrifugação a 6.000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionou-se 0,5 volumes de 5M NaCl (Riedel-de Haën). Misturou-se bem por inversão durante 30 segundos. Adicionou-se 2 volumes de etanol a 96% frio (-20 °C) e agitou-se gentilmente. Após agitação, os tubos ficaram em repouso, durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente foram centrifugados a 3.000 rpm durante 3 minutos, aumentando a velocidade para 5.000 rpm por mais 3 minutos, e o sobrenadante descartado. Os tubos foram invertidos sobre papel por 1 minuto como confirmação da eliminação do sobrenadante. Adicionou-se 500 µL de etanol 76% frio (0 a 4 °C) ao precipitado e centrifugou-se por 30 minutos a 7.000 rpm. Descartou-se o etanol e os tubos foram novamente invertidos sobre papel por 1 minuto como confirmação da eliminação do sobrenadante. Após este passo, os tubos foram invertidos e deixados descobertos a 37 °C durante 30 minutos, sem secar o DNA. Ressuspendeu-se o precipitado de DNA em 50 µL de TE (pH 8,0), deixando à temperatura ambiente por 30 minutos. Por fim, adicionou-se 1 µL de RNase A por 100 µL de solução de DNA e incubou-se a 37 °C durante 15 minutos. Realizou-se a purificação com o *Genomic DNA Clean & Concentrator-10* (Zymo Research), posteriormente, procedeu-se à quantificação e análise de pureza das amostras de DNA, por densidade óptica a 260/280 nm e 260/230

nm com recurso ao espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific) e por fluorometria através do *Qubit 4* (Invitrogen). Os extratos finais de DNA foram conservados a -20 °C.

3.3 Genotipagem de *SSRs* (*Simple Sequence Repeats*)

3.3.1 Seleção dos *SSRs*

Com base nas recomendações da OIV [79] e da base de dados VIVC (<https://vivc.de/index.php?r=eva-analysis-mikrosatelliten-vivc%2Findex>), foram analisadas 9 *SSRs* (Tabela 2).

Tabela 2 – Características dos 9 *loci* de *SSRs* recomendados pelo VIVC.

Nome do <i>SSR</i>	Tamanho	Sequência nucleotídica	Obtentor
<i>VVS2</i>	123 - 161	[GA]19	Thomas and Scott [55]
<i>VVMD5</i>	222 - 268	[CT]3AT[CT]11ATAG[AT]3	Bowers <i>et al.</i> [58]
<i>VVMD7</i>	231 - 265	[CT]14,5	Bowers <i>et al.</i> [58]
<i>VVMD25</i>	241 - 275	[CT] <i>n</i>	Bowers <i>et al.</i> [58]
<i>VVMD27</i>	171 - 219	[CT] <i>n</i>	Bowers <i>et al.</i> [58]
<i>VVMD28</i>	221 - 279	[CT] <i>n</i>	Bowers <i>et al.</i> [58]
<i>VVMD32</i>	239 - 273	[CT] <i>n</i>	Bowers <i>et al.</i> [58]
<i>VrZAG62</i>	174 - 220	[AG]9	Sefc <i>et al.</i> [30]
<i>VrZAG79</i>	235 - 261	[GA]19	Sefc <i>et al.</i> [30]

3.3.2 Otimização e amplificação dos *SSRs* por PCR

Todos os *primers* (Alfagene), foram preparados e ressuspensos em água ultrapura, a uma concentração de 100 µM (solução stock) e a 10 µM (solução de trabalho), sendo que os *primers forward*, foram encomendados marcados com o fluoróforo FAM (*fluorescein amidite* - azul), de forma a serem detetados pelo equipamento de eletroforese capilar (Tabela 3).

Tabela 3 – Sequência de *primers* analisados.

SSR	Primer Forward (5'- 3')	Primer Reverse (5'- 3')	T annealing
<i>VVS2</i>	CAGCCCGTAAATGTATCCATC	AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	58,3 °C
<i>VVMD5</i>	CTAGAGCTACGCCAATCCAA	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	55,3 °C
<i>VVMD7</i>	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	CGAACCTTCACACGCTTGAT	63,8 °C
<i>VVMD25</i>	TTCCGTTAAAGCAAAAGAAAAAGG	TTGGATTGAAAATTATTGAGGGG	61,0 °C
<i>VVMD27</i>	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	64,9 °C
<i>VVMD28</i>	AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGAGA	TCATCAATTTTCGTATCTCTATTTGCTG	62,8 °C
<i>VVMD32</i>	TATGATTTTTTTAGGGGGGTGAGG	GGAAAGATGGGATGACTCGC	63,2 °C
<i>VrZAG62</i>	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	69,1 °C
<i>VrZAG79</i>	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	TGCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	69,4 °C

Para garantir a especificidade e a eficiência da amplificação do DNA, começou-se por otimizar a reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com os *primers* sugeridos pelo VIVC (Tabela 3). A otimização evita produtos inespecíficos, permitindo a detecção de pequenas quantidades de DNA alvo, garantindo resultados consistentes e reproduzíveis [80]. Uma vez que o kit de PCR a utilizar foi o *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Scientific), recorreu-se à calculadora da temperatura de hibridação dos *primers* (Temperatura de *annealing*) disponibilizada online com o algoritmo do fabricante, para cálculo da temperatura de *annealing* mais adequada de acordo com a sequência de cada par de *primers* (<https://www.thermofisher.com/pt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>). Com base nesta informação, e usando os volumes de reação recomendados pelo fabricante, realizaram-se PCRs de gradiente para cada *SSR*, em equipamento *Thermal Cycler 2720* (Applied Biosystems), a um limite de +/- 4 °C da temperatura de *annealing* sugerida.

Uma vez otimizadas as condições de PCR para cada *SSR*, e seguindo as condições do fabricante, procedeu-se à amplificação das amostras, com a seguinte mistura reagente: volume final de 20 µL contendo: 10 µL PCR Master Mix; 7 µL de água ultrapura; 1 µL de *primer forward* (marcado com FAM); 1 µL de *primer reverse*; 1 ng de DNA extraído (volume final 20 µL). Utilizou-se o seguinte programa de PCR: desnaturação inicial de 30s a 98 °C, seguido de um ciclo de 35 repetições de desnaturação a 7s a 98 °C, hibridação a 20s temperatura de *annealing* selecionada para cada *primer* (Tabela 3), extensão a 20 segundos a 72 °C, e uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos de PCR obtidos das amostras para os 9 *SSRs* foram visualizados com recurso à eletroforese em gel de agarose LE Standard (Blirt) a 1,5% em sistema de eletroforese *Wide Mini-Sub Cell GT* (BIO-RAD), a 95V durante 35 minutos. Como tampão, utilizou-se uma solução de Tris-

Acetato-EDTA (TAE 1X – pH 8). Cada poço foi carregado com um volume final de 9 μ L, composto por 4 μ L de corante *PAGE GelRed* (Nucleic Acid Gel Stain – Biotium) e 5 μ L do produto de PCR. O marcador de peso molecular *HyperLadder 50bp* (Bioline, Meridian-Bioscience) foi adicionado nas extremidades do gel em cada corrida. Os resultados foram verificados pela presença ou ausência de bandas no gel e pelo seu tamanho relativo (Anexo 7.1.4).

3.3.3 Análise de fragmentos por eletroforese capilar

Após a amplificação dos *SSRs* por PCR, preparou-se as amostras para a eletroforese capilar em sequenciador automático, como serviço externo no laboratório STAB VIDA. A purificação dos fragmentos amplificados foi realizada utilizando partículas magnéticas *Dr Vida MagBeads* (STAB VIDA) previamente à corrida de fragmentos, sendo depois submetidas à eletroforese capilar em sequenciador automático *ABI 3730 XL* (Applied Biosystems), utilizando o padrão de tamanho fluorescente *GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard* (Applied Biosystems) para garantir a precisão na determinação dos tamanhos dos fragmentos. Após recepção dos resultados, a análise bioinformática dos perfis de picos de cada amostra e cada marcador foi realizada por meio do software *Peak Scanner™ v1.0* (Applied Biosystems), permitindo a atribuição de tamanhos e identificação dos genótipos obtidos.

3.3.4 Sequenciação de DNA

Tendo-se verificado desvios de 1-2 pb no tamanho dos alelos de alguns *SSRs* (*VVS2*, *VVMD5*, *VVMD25*, *VVMD27* e *VVMD28*), comparativamente ao descrito na literatura e no VIVC, e que podem dever-se a particularidades técnicas do sequenciador automático em que foi realizada a corrida de fragmentos, realizou-se a sequenciação de amostras selecionadas, preferencialmente homocigóticas, em ambos os sentidos *forward* e *reverse*, para todos os *loci*. A sequenciação foi realizada como serviço externo no laboratório STAB VIDA. Para a purificação foram utilizadas partículas magnéticas *Dr Vida MagBeads* (STAB VIDA), kit de sequenciação *BigDye™ Terminator v3.1* em sequenciador automático *ABI 3730 XL* (Applied Biosystems). Os eletroferogramas obtidos foram analisados com o software *MEGA v11*.

3.3.5 Cálculo de índices de diversidade genética, por *SSR*

Para avaliação da variabilidade genética e o poder de cada *loci* na discriminação entre os genótipos analisados, foi utilizado o cálculo do número médio de alelos por *locus* (N_a), da heterozigosidade observada (H_o), da heterozigosidade esperada (H_e), do índice de conteúdo

informativo de polimorfismo (*PIC*), assim como a frequência de alelos nulos ($F(Null)$) para cada *locus* de microssatélites, utilizando o software *Cervus v3.0.7* (Field Genetics).

3.3.6 Construção da árvore filogenética

Utilizando os resultados da genotipagem dos *SSRs*, para as 38 amostras em estudo, a árvore filogenética foi construída utilizando o software *PAST v4.03*. As distâncias genéticas foram calculadas a partir de uma matriz de distância euclidiana construída com base nos dados *SSRs*. Para gerar a filogenia, foi aplicado o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), a qualidade do dendrograma foi avaliada por meio do coeficiente de correlação cofenético, obtido pela correlação de Pearson entre a matriz de distâncias original e a matriz cofenética. A robustez das ramificações foi avaliada através de 1.000 replicações de *bootstrap*.

3.4 HRM (*High Resolution Melting*)

Após a análise dos perfis de *SSRs* obtidos pela corrida de fragmentos das amostras de *V. vinifera*, foi realizada a otimização da técnica de HRM com o objetivo de caracterizar os perfis associados a alguns *loci SSRs* selecionados. Esta abordagem combinou a amplificação específica de cada *locus* de interesse, realizada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), com a análise detalhada das curvas de *melting* geradas durante o aumento gradual da temperatura.

3.4.1 Seleção dos *SSRs* e amostras a analisar

A seleção dos marcadores *SSRs* a analisar por HRM foi realizada com base nos resultados da análise preliminar, priorizando *loci* que demonstraram alto conteúdo informativo de polimorfismo e poder na discriminação genética, preferencialmente *loci* que produziram produtos de amplificação robustos para análise por eletroforese capilar, e subsequentemente validados por sequenciação. A análise por HRM foi realizada em um subconjunto representativo das amostras de *V. vinifera*, selecionado de acordo com: i) a robustez na amplificação por PCR anteriormente demonstrada, ii) os diferentes perfis de *SSRs*, em termos de alelos com diferentes tamanhos e iii) a quantidade de DNA genómico disponível. Todas as análises foram conduzidas em duplicado, para assegurar a precisão e a reprodutibilidade dos resultados. Apesar da limitação da quantidade de DNA extraído, esta abordagem permitiu obter dados complementares para a caracterização genética das castas avaliadas.

3.4.2 Otimização e amplificação qPCR

Para garantir o sucesso e a especificidade da amplificação do DNA por qPCR, seguiram-se as especificações do fabricante para otimização da reação, tendo por referência a temperatura de *melting*, (<http://insilico.ehu.es/tm.php?formula=basic>).

Após a otimização da técnica de qPCR para os *SSRs* *VVMD5*, *VVMD27* e *VrZAG79*, utilizando uma mesma amostra num gradiente de temperaturas de hibridação dos *primers*, procedeu-se então à análise de amostras representativas de Malvasia Cândida, Verdelho, Sercial e Caracol, em duplicado, por qPCR no equipamento *LineGene 9600* (BIOER), usando o software do próprio equipamento. Para cada amostra, a reação de qPCR ocorreu num volume final de 20 µL, contendo 4 µL de *HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX) 5x*; (Solis BioDyne); 14 µL de água ultrapura; 0,5 µL de *primer forward*; 0,5 µL de *primer reverse*; 1 µL de DNA, superior a 10 ng/µL, com medição efetuada no fluorómetro *Qubit 4* (Invitrogen). Utilizou-se o seguinte programa de qPCR: incubação de 12 min para ativação da polimerase a 95 °C, seguido de um ciclo de 40 repetições de desnaturação 15 s a 95 °C, 30 s à temperatura de *annealing* para cada par de *primers* (Tabela 3), 30 segundos a 72 °C para a extensão.

3.4.3 Análise HRM

Após a amplificação, os produtos de qPCR foram diretamente submetidos à análise por HRM. A variação de fluorescência em tempo real foi monitorizada utilizando o *software* de análise HRM integrado do sistema. O protocolo experimental seguiu as especificações do fabricante, com uma variação controlada de temperatura: uma fase inicial a 95 °C por 15 s, seguida de uma fase de estabilização a 60 °C por 1 hora, e uma fase final de *melting* a 95 °C por 15 s, com incrementos de 4 °C/s. Para cada *SSR* e para cada amostra, os dados de fluorescência obtidos durante o processo, que se baseiam nas temperaturas de *melting* (T_m) e nos perfis de dissociação, foram processados para gerar curvas de *melting*, que refletem as propriedades térmicas e estruturais dos produtos de PCR. As curvas foram submetidas a normalização e agrupamento utilizando o *software* do equipamento, e foram analisadas no sentido de verificar se permitem a distinção das diferentes amostras/castas, com base em variações na sequência amplificada para cada *SSR*.

Foram realizadas múltiplas análises comparativas sem a utilização de castas de referência, destacando individualmente cada casta em relação às demais em estudo, de modo a avaliar as variações nos perfis de fusão e a sua capacidade de discriminação varietal.

4. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos neste estudo proporcionam uma análise abrangente dos perfis genéticos de *Vitis vinifera* com base na combinação de marcadores *SSRs* e na técnica de HRM. A análise inicial por corrida de fragmentos permitiu a identificação de *loci* polimórficos e a obtenção de perfis alélicos para cada amostra. Posteriormente, a aplicação da técnica de HRM foi otimizada, permitindo a discriminação de variantes alélicas com base em diferenças nas curvas de *melting* e temperaturas de dissociação. Nesta secção, são discutidos os padrões de polimorfismo identificados, sua relevância para a caracterização genética das castas avaliadas, e a eficácia da abordagem HRM na complementação dos dados obtidos por *SSRs* tradicionais. Além disso, os resultados são comparados com estudos prévios, destacando-se as implicações para estudos de diversidade genética, identificação varietal e seleção de castas com base em marcadores moleculares.

4.1 Extração de DNA

Na primeira abordagem metodológica deste estudo, buscou-se caracterizar e comparar amostras representativas de 11 castas tradicionais de *Vitis vinifera* na RAM utilizando 9 marcadores moleculares do tipo *SSR*, cujos perfis genotípicos foram obtidos por meio de análise de fragmentos.

Após a colheita do material biológico, prosseguiu-se com a extração de DNA, utilizando algumas amostras como teste, e submetidas aos métodos de extração de DNA com base nos protocolos ISOPlexis (Protocolo A), Rodrigues [20] (Protocolo B) e Lodhi *et al.* [78] (Protocolo C), que apresentaram baixo rendimento e a presença de impurezas indicadas pelos rácios de absorvância (Tabela 4). Embora existam diversos protocolos de extração de DNA para *V. vinifera* descritos na literatura, a variabilidade do material vegetal e as condições específicas de cada laboratório dificultam a sua reprodutibilidade. Esta dificuldade é ainda mais acentuada pela presença de polissacarídeos, que se associam ao DNA durante o processo de extração, formando uma matriz viscosa que compromete a separação eficiente do DNA [81]. Adicionalmente, os polifenóis presentes no tecido vegetal podem oxidar e interagir com o DNA, resultando na degradação da sua qualidade e complicando a etapa de purificação, o que frequentemente impede a obtenção de amostras puras e isentas de contaminantes [78].

Com o intuito de aprimorar a quantidade e a qualidade/pureza do DNA extraído, foram elaboradas e testadas diferentes adaptações aos protocolos de extração, denominados Protocolo D e Protocolo E (Tabela 4).

Tabela 4 – Protocolos, concentração e qualidade de DNA (rácios de absorvância).

Protocolo de trabalho	Conc. (ng/μL)	A 260/280	A 260/230
Protocolo A (ISOPlexis)	49,6	1,28	0,27
Protocolo B (Rodrigues [20])	54,9	1,70	0,57
Protocolo C (Lodhi <i>et al.</i> [78])	283,1	1,89	0,74
Protocolo D	439,6	1,99	1,48
Protocolo E (Protocolo D + Kit purificação de DNA)	380,4	1,91	1,79

Todos os resultados obtidos foram expressos em termos de mediana, uma vez que é menos suscetível a influências de valores extremos e oferece uma representação mais robusta do comportamento central dos dados obtidos. O Protocolo D apresentou o melhor desempenho, alcançando a maior concentração de DNA (439,6 ng/μL) e índices de pureza, com a razão A260/280 de 1,99, indicando contaminação mínima por proteínas, e a razão A260/230 de 1,48, refletindo uma redução significativa de outros contaminantes (Tabela 4). O Protocolo E, que consistia no Protocolo D mais purificação, manteve a qualidade de DNA, com uma leve redução na concentração (380,4 ng/μL), como esperado, e uma melhoria notável na razão A260/230 (1,79), demonstrando maior pureza das amostras (Tabela 4). Assim, o Protocolo E, mostrou-se a estratégia mais eficiente para obter DNA adequado para as análises moleculares subsequentes.

4.2 Genotipagem de SSRs (*Simple Sequence Repeats*)

A caracterização genética das 38 amostras de castas, de 11 castas, permitiu a obtenção de perfis genéticos através de análise de fragmentos de 9 *loci* SSR, através de fragmentos (Tabela 5). Paralelamente, no sentido de confirmar a amplificação do *locus* correto, o motivo de repetição, o número de repetições e tamanho dos alelos obtidos na análise de fragmentos, em amostras selecionadas preferencialmente homozigóticas, foi realizada a sequenciação de produtos de PCR dos *loci* *VVS2*, *VVMD5*, *VVMD7*, *VVMD25*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32*, *VrZAG62* e *VrZAG79*, no sentido *forward* e *reverse*.

Tabela 5 - Resultados da genotipagem dos 9 SSRs nas diferentes amostras em estudo, com a indicação do tamanho dos alelos em pb por alelo 1 (A1) e alelo 2 (A2) para cada locus.

Local	Casta	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		VrZAG62		VrZAG79	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
PS	Caracol	133	145	239	239	238	246	239	241	178	193	237	245	251	259	186	194	246	256
QV	Malvasia Cândida	143	145	225	225	242	248	243	257	178	182	237	259	253	273	186	200	242	246
SJ	Malvasia Cândida	-	-	-	-	242	248	243	257	178	182	237	259	273*	273	200*	200	242	246
SL	Malvasia Cândida	143	145	225	225	-	-	243	257	178	182	237	259	273*	273	200*	200	242	246
QV	Malvasia Cândida Roxa	-	-	225	225	242	248	243	257	178	182	237	259	273*	273	200*	200	242	246
S	Malvasia São Jorge	-	-	221	225	238	238	241	243*	180	192	229	249	257	261	194*	194	246	250
SJ	Malvasia São Jorge I	-	-	-	-	238	238	241	243*	180	192	229	249	257	261	194*	194	246	250
SJ	Malvasia São Jorge II	133	145	-	-	238	238	241	243*	180	192	229	249	257	261	194*	194	246	250
QV	Malvasia Fina/Boal	143	145	225	239	238	256	243	257	178	192	237*	237	257*	257	186	186	246	250
R	Malvasia Fina/Boal	143	145	225	239	238	256	243	257	178	192	237*	237	257*	257	186	186	246	250
SL	Malvasia Fina/Boal	143	145	225	239	238	256	243	257	178	192	237*	237	257*	257	186	186	246	250
SL	Malvasia Fina Roxa	143	145	225	239	238	256	243	257	178	178*	237*	237	257*	257	186	186	246	250
QV	Sercial	133	151	225	237	238	252	241	263	180	184	235	259	241	241	192*	192	246	258
SJ	Sercial	133	151	225	237	238	252	241	263	180	184	235	259	241	241	192*	192	246	258
SV	Sercial	133	151	225	237	238	252	241	263	180	184	235	259	241	241	192*	192	246	258
SX	Sercial	133	151	225	237	238	252	241	263	180	184	235	259	241	241	192*	192	246	258
PM	Sercial	133	151	225	237	238	252	241	263	180	184	235	259	241	241	192*	192	246	258
ECL	Sercial	133	151	225	237	238	252	241	263	180	184	235	259	241	241	192*	192	246	258
ECL	Sercial I	133	151	225	237	238	252	241	263	180	184	-	-	241	241	192*	192	246	258
ECL	Sercial II	133	151	-	-	238	252	241	263	180	184	235	259	241	241	192*	192	246	258
QV	Terrantez	133	151	231	239	242	246	243	251	184	188	237	259	273*	273	192	202	244	250
FO	Terrantez	133	151	-	-	242	246	243	251	184	188	237	259	273*	273	192	202	244	250
SJ	Terrantez	133	151	231	239	242	246	243	251	184	188	237	259	273*	273	192	202	244	250
SL	Terrantez	133	151	231	239	242	246	243	251	184	188	237	259	273*	273	192	202	244	250
ECL	Terrantez	133	151	231	239	242	246	243	251	184	188	237	259	273*	273	192	202	244	250
ECL	Tinta N. Folha Branca	133	151	225	237	238	256	241	251	180	188	235	249	257	273	192*	192	244	260
ECL	Tinta Negra I	133	151	225	237	238	256	241	251	180	188	235	249	257	273	192*	192	244	260
ECL	Tinta Negra II	-	-	225	237	238	256	241	251	180	188	235	249	257	273	-	-	244	260
SV	Tinta Negra I	133	151	225	237	238	256	241	251	-	-	235	249	257	273	192*	192	244	260
SV	Tinta Negra II	133	151	225	237	238	256	241	251	180	188	235	249	257	273	192*	192	244	260
QV	Verdelho	133	151	221	231	238	256	243	251	180	188	235	247	257	273	192	194	246	250
R	Verdelho	133	151	221	231	238	256	243	251	180	188	235	247	257	273	192	194	246	246*
SJ	Verdelho	133	151	221	231	238	256	243	251	180	188	235	247	257	273	192	194	-	-
ASJ	Verdelho	133	151	231*	235*	238	256	243	251	180	188	235	247	255	257	192	194	246	246*
SV	Verdelho	133	151	221	231	238	256	243	251	180	188	235	247	257	273	192	194	246	246*
SX	Verdelho	133	151	221	231	238	256	243	251	180	188	235	247	257	273	192	194	246	246*
PM	Verdelho	133	151	221	231	238	256	243	251	180	188	235	247	257	273	192	194	246	246*
SL	Verdelho	133	151	221	231	238	256	243	251	180	188	235	247	257	273	192	194	246	250

* Valores que não estão de acordo com VIVC.

- Amostras sem os valores dos tamanhos do fragmento.

A obtenção das sequências exatas dos vários *loci* permitiu identificar e, para alguns dos *loci*, corrigir algumas das discrepâncias em relação aos tamanhos dos fragmentos detetados na análise inicial. Para os *loci* *VVMD7*, *VVMD28*, *VrZAG62* e *VrZAG79*, os resultados das duas abordagens foram consistentes, não havendo necessidade de ajustes. No entanto, para os *loci* *VVS2*, *VVMD5*, *VVMD25*, *VVMD27* e *VVMD32*, foi detetada uma discrepância sistemática de +2 pares de bases, conhecido como *Shift +2*. Este desvio foi corrigido em todas as amostras destes *loci*, garantindo que os tamanhos dos fragmentos refletissem com precisão as reais variações nos microssatélites.

Os microssatélites são conhecidos por apresentar uma alta frequência de alelos nulos, ou alelos que não amplificam, portanto, são recessivos e indetetáveis em heterozigotos [82]. Estes alelos podem gerar problemas na análise genética, influenciando as medidas de diferenciação genética ou sendo erroneamente interpretados como homozigotos [83]. Considerando essa possibilidade, os tamanhos dos fragmentos obtidos nos nove *loci* analisados foram registados (Tabela 5).

Para as 38 combinações (amostra x local de recolha) analisadas, a combinação de genótipos dos 9 *loci*, revelou um total de oito perfis genéticos distintos, dos quais cinco foram identificados como genótipos únicos: Verdelho, Sercial, Terrantez, Malvasia de S. Jorge e Caracol. Adicionalmente, foram observados três pares de genótipos que apresentaram variações associadas à cor do bago e à morfologia foliar: Malvasia Fina Boal/Malvasia Fina Roxa, Malvasia Cândida/Malvasia Cândida Roxa e Tinta Negra/Tinta Negra de Folha Branca (Tabela 5).

A casta Caracol ocupa uma área de 12 ha no encepamento regional da Madeira, sendo predominantemente cultivada no Porto Santo [84]. Diferentemente de outras castas, para as quais foi possível obter múltiplas amostras, o Caracol está representado neste estudo por uma única amostra, devido à localização (Porto Santo) e disponibilidade limitada de material biológico no momento da colheita. Ainda assim, a sua inclusão permitiu ampliar a caracterização genética e a compreensão da sua diversidade dentro do conjunto analisado contribuindo para a avaliação comparativa entre as castas. O Caracol exibiu um perfil genético idêntico para os 6 *SSRs*, reportado por Veloso *et al.* [5] e registado na Portaria [85] sob designação Caracol (PRT50914). Este perfil também é correspondente ao estudo de Rodrigues [20], que expandiu essa análise, incorporando o perfil de mais três *loci* *SSR* (*VVMD25*, *VVMD28* e *VVMD32*), tendo sido registados no VIVC (nº 17664) completando a informação dos 9 *SSRs*, sem qualquer divergência nos alelos observados. Esta correspondência reforça o valor destes *SSRs* na identificação genética e verificação da autenticidade, por comparação com os bancos de dados de referência.

Para as castas Malvasia Cândida e Malvasia Cândida Roxa, classificadas como castas distintas segundo [2, 15], devido à diferença da cor do bago, as quatro amostras apresentaram perfis genéticos idênticos em sete dos nove *loci* analisados. Atualmente a casta Malvasia Cândida presente no

encepamento regional da Madeira, ocupa uma área de 1,5 ha [84] maioritariamente localizado em Santana. Os perfis obtidos estão de acordo Veloso *et al.* [5], registado na Portaria [85] sob designação Malvasia Cândida (PRT50911) e Malvasia Cândida Roxa (PRT50810) para cinco *loci SSR*, consistentes com Rodrigues [20] e correspondentes com o registado no VIVC sob as designações Malvasia di Sardegna (nº 7266) e Malvasia di Sardegna Rosada (nº 22971) para sete *loci SSR*. No entanto, nos *loci VVMD32* e *VrZAG62*, observou-se a divergência de duas das amostras Malvasia Cândida e Malvasia Cândida Roxa, que mostraram homozigidade, enquanto apenas uma das amostras de Malvasia Cândida apresenta heterozigidade, estando apenas esta última em conformidade com os registos do VIVC. Esta discrepância pode ser justificada, segundo Jahnke *et al.* [86], por várias razões para a possível presença de alelos nulos (alelos recessivos para marcadores codominantes, sem qualquer efeito no fenótipo), pela falta de amplificação num *locus*: o *primer* não se liga corretamente, fragmentos mais longos não amplificam devido a imperfeições na reação de PCR, ou a quantidade de DNA na amostra é insuficiente, originando possíveis alelos nulos [86].

A casta Malvasia de São Jorge ocupa uma área de 26,9 ha no encepamento regional da Madeira [84]. O perfil genético obtido, está de acordo Veloso *et al.* [5] e a Portaria [85] sob designação Malvasia de São Jorge (PRT40604) para cinco dos seis *loci SSR*. O estudo de Rodrigues [20] incorporou mais três *loci SSR* (*VVMD25*, *VVMD28* e *VVMD32*), tendo sido registados no VIVC, completando a informação dos perfis para os 9 *SSRs*. O perfil obtido também é consistente com Rodrigues [20] e correspondente com o VIVC (nº 17689) em sete dos *loci* analisados. Observou-se uma divergência no *locus VVMD25*, onde o perfil exibiu heterozigidade, em contraste com a homozigidade registada no VIVC, o que pode ser atribuído à ocorrência de *stutter band* (artefactos na análise de fragmentos, que aparecem como picos secundários menores ou maiores ao redor do pico principal durante a corrida de fragmentos). No *locus VrZAG62*, verificou-se homozigidade divergente do VIVC, podendo ser explicado segundo Jahnke *et al.* [86], pela falta de amplificação num *locus*: o *primer* não se liga corretamente, fragmentos mais longos não amplificam devido a imperfeições na reação de PCR, ou a quantidade de DNA na amostra é insuficiente, originando possíveis alelos nulos.

As castas Malvasia Fina/Boal e Malvasia Fina Roxa apresentaram perfis genéticos idênticos, embora sejam classificadas como castas distintas devido à coloração dos bagos [2, 15]. Presentemente a casta Malvasia Fina Roxa apenas é cultivada em Portugal Continental, sendo que a Malvasia Fina/Boal ocupa uma área de 13,5 ha no encepamento regional da Madeira [84]. Os perfis genéticos obtidos destas castas estão de acordo Veloso *et al.* [5] e registado na Portaria [85], correspondente a Malvasia Fina (PRT52512), como sinónimo do nome regional Boal, designação esta apenas reconhecida para a utilização na rotulagem de DO “Madeira” e de Malvasia Fina Roxa (PRT52612).

Estes resultados são consistentes com Rodrigues [20] e correspondentes com os registados no VIVC para Malvasia Fina (nº 715) e Malvasia Fina Roxa (nº 15677), exceto nos *loci* *VVMD28* e *VVMD32* para todas estas amostras e no *locus* *VVMD27* para a Malvasia Fina Roxa, que exibiram padrões homozigóticos divergentes. Infere-se que, uma vez mais, esta discrepância pode ser explicada pela ocorrência de alelos nulos [86].

A casta Sercial está presente no encepamento regional da Madeira ocupando 27,1 ha, sendo também conhecida pelo regionalismo de Esgana Cão [84]. Esta casta exibiu perfis genéticos idênticos entre as amostras de várias localizações, correspondendo ao obtido por Veloso *et al.* [5] e registado na Portaria [85], sob designação Sercial (PRT40505) para cinco dos seis *loci* *SSR*. Os resultados são consistentes com Rodrigues [20] e correspondentes com o VIVC (nº 11497) para oito *loci* *SSR* analisados. No entanto, o *locus* *VrZAG62* apresentou homozigosidade, divergindo do padrão heterozigoto registado no VIVC, o que pode ser explicado pela possível ocorrência de alelos nulos [83, 86].

A casta Terrantez, nome apenas utilizado na RAM e só reconhecido para a utilização na rotulagem de DO “Madeira” apresenta uma ocupação de 6,7 ha no encepamento regional da Madeira [84]. As amostras revelaram perfis genéticos idênticos, independentemente da origem, registado na Portaria [85] com a designação Folgasão (PRT52709). Os perfis são consistentes com Rodrigues [20] e correspondentes com o VIVC sob o nome Folgasão (nº 4178) para oito *loci* *SSR* analisados. No entanto, no *locus* *VVMD32*, foi identificado um padrão homozigótico divergente do perfil heterozigótico da base de dados do VIVC, sugerindo, a ocorrência de alelos nulos ou problemas de amplificação, corroborado pelo valor positivo de $F(Null)$ de 0,0228 (alta probabilidade de alelos nulos) [82, 83, 86] (Tabela 6).

As castas Tinta Negra e Tinta Negra de Folha Branca mostraram perfis genéticos idênticos, distinguindo-se apenas pela cor das folhas após a vindima, não sendo classificadas como castas distintas. A Tinta Negra presente no encepamento regional da Madeira ocupa uma área de 207,9 ha, sendo também nomeada como Molar [84]. O perfil genético foi congruente com Veloso *et al.* [5] e registado na Portaria [85] sob a designação Tinta Negra (PRT51202), para cinco dos seis *loci* *SSR*. Os resultados são consistentes com Rodrigues [20] e correspondentes com o VIVC sob o nome Molar (nº 15678) para oito *loci* *SSR*, exceto no *locus* *VrZAG62*, que apresentou homozigosidade, indicando novamente a possibilidade de alelos nulos [86].

A casta Verdelho encontra-se predominantemente nas regiões dos Açores e da Madeira, ocupando nesta última, uma área de 57 ha no encepamento regional da Madeira [84]. Nas oito amostras da casta Verdelho o perfil genético obtido está de acordo com Veloso *et al.* [5] e registado na Portaria [85] sob a designação Verdelho (PRT50317) para quatro dos seis *loci* *SSR*, sendo que, dessas oito amostras,

cinco exibiram perfis genéticos uniformes em sete dos nove *loci* analisados, alinhando-se com o perfil de Rodrigues [20] e correspondente com o registado no VIVC (nº 22304). No entanto, observou-se uma discrepância no *locus* *VrZAG79*: enquanto duas amostras de duas localizações distintas apresentaram heteroziguidade, em conformidade com os registos do VIVC, as demais mostraram homoziguidade, divergindo do padrão heterozigoto da base de dados. Este desvio sugere a ocorrência de alelos nulos [86]. No local de amostragem ASJ (Arco de São Jorge), o *locus* *VVMD5* apresentou um padrão heterozigoto com uma distância alélica que não corresponde ao perfil do VIVC, o que pode indicar interferências no processo de colheita ou variações introduzidas no cultivo das castas, não tendo sido considerado na corrida de fragmentos como *stutter band* devido à sua expressão.

4.2.1 Índices de diversidade genética, por SSR

A diversidade genética dos 9 SSRs foi analisada considerando-se todo o universo amostral, contudo, para a análise estatística e interpretação dos resultados, os valores obtidos como possível ocorrência de alelos nulos não serão considerados. Esta decisão foi tomada para evitar distorções nos resultados, dado que alelos nulos podem levar à identificação incorreta de genótipos, comprometendo a precisão das conclusões sobre a diversidade genética e as relações entre as castas analisadas [86]. Assim, a diversidade genética foi avaliada com base no número de alelos por *locus* (N_a), heteroziguidade observada (H_o), heteroziguidade esperada (H_e), o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e a frequência estimada de alelos nulos ($F(Null)$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Índices de diversidade genética dos 9 SSRs nas amostras de *Vitis vinifera* L. analisadas. Número de amostras (n), Número de alelos (N_a), heteroziguidade observada (H_o), Heteroziguidade esperada (H_e), conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e frequência de alelos nulos ($F(Null)$).

<i>Loci</i>	<i>n</i>	<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>PIC</i>	<i>F(Null)</i>
<i>VVS2</i>	33	4	1,000	0,676	0,604	-0,2170
<i>VVMD5</i>	33	6	0,879	0,786	0,741	-0,0639
<i>VVMD7</i>	37	6	0,919	0,739	0,693	-0,1297
<i>VVMD25</i>	35	6	1,000	0,789	0,742	-0,1305
<i>VVMD27</i>	36	7	1,000	0,798	0,756	-0,1275
<i>VVMD28</i>	33	7	1,000	0,807	0,765	-0,1211
<i>VVMD32</i>	26	8	0,692	0,758	0,699	0,0228
<i>VrZAG62</i>	19	5	0,789	0,760	0,694	-0,0504
<i>VrZAG79</i>	32	7	1,000	0,796	0,754	-0,1329
Média		6,2	0,920	0,768	0,716	
Mínimo		4	0,692	0,676	0,604	
Máximo		8	1,000	0,807	0,765	

As amostras estudadas apresentaram um total de cinquenta e seis alelos nos 9 SSRs analisados, com uma média de 6,2 alelos por *locus*, sendo que o número de alelos (N_a) variou entre 4 alelos (*VVS2*), sugerindo menor grau de polimorfismo, e 8 alelos (*VVMD5*, *VVMD7*, *VVMD25*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32*, *VrZAG62* e *VrZAG79*), sendo estes últimos os mais polimórficos. A heterozigosidade observada (H_o) variou entre 0,692 (*VVMD32*) e 1,000 (*VVS2*, *VVMD25*, *VVMD27*, *VVMD28* e *VrZAG79*), com uma média de 0,920. Cinco *loci* apresentaram 100% de heterozigosidade, indicando que não foram observados homozigotos entre as amostras analisadas e refletindo uma alta variabilidade genética nestes *loci*. A heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,676 (*VVS2*) a 0,807 (*VVMD28*), consistente com o número de alelos detetados em cada *locus*, resultando numa média de 0,768. Os valores de PIC variaram de 0,604 (*VVS2*) a 0,765 (*VVMD28*), com uma média de 0,716. Oito *loci* apresentaram valores de PIC próximos ou superiores a 0,7, o que os permite destacar como altamente informativos, e como tal, de maior utilidade para discriminar entre diferentes genótipos e variedades de *V. vinifera* [88]. A maioria dos *loci* apresentaram valores negativos de $F(Null)$, variando de -0,2170 (*VVS2*) a -0,0504 (*VrZAG62*), exceto para o *locus* *VVMD32*, que apresentou valor positivo de 0,0228. Estes resultados sugerem a ocorrência de alguns alelos nulos ou a possibilidade de baixa amplificação desses alelos no *locus* *VVMD32*, no entanto, a baixa grandeza desses valores indica que a presença de alelos nulos não é um fator significativo [82, 83].

A variabilidade genética observada nos nove *loci* foi alta, com destaque para os *locus* *VVS2*, *VVMD25*, *VVMD27*, *VVMD28* e *VrZAG79*, que apresentaram 100% de heterozigosidade observada. A média de H_o (0,920) foi ligeiramente superior à média de H_e (0,768), o que sugere um leve excesso de heterozigotos na amostra analisada, podendo ser explicado pela consequência da seleção ao longo do processo de domesticação em favor do vigor híbrido, que confere características desejáveis das diferentes castas, procedentes de diferentes origens [89]. O valor médio elevado de PIC (0,716) confirma que os marcadores escolhidos são adequados para discriminação genética e podem ser utilizados de forma eficaz para estudos de diversidade genética e identificação [88, 90]. O *locus* com valor positivo de $F(Null)$, *VVMD32*, merece atenção, pois pode indicar a ocorrência de alelos nulos [86] ou problemas de amplificação. No geral, a ausência significativa de alelos nulos sugere que os marcadores *SSR* utilizados são robustos para a caracterização genética [89].

4.2.2 Análise filogenética

O fenograma (Figura 2) gerado a partir da análise dos 9 *loci* *SSRs*, revelou a formação de ramos filogenéticos distintos, representando diferentes níveis de similaridade genética entre as castas de *Vitis vinifera* aqui estudadas. Os agrupamentos foram definidos pelas distâncias genéticas

observadas e sustentados por altos valores de *bootstrap*, indicando a robustez estatística dos resultados (Figura 2).

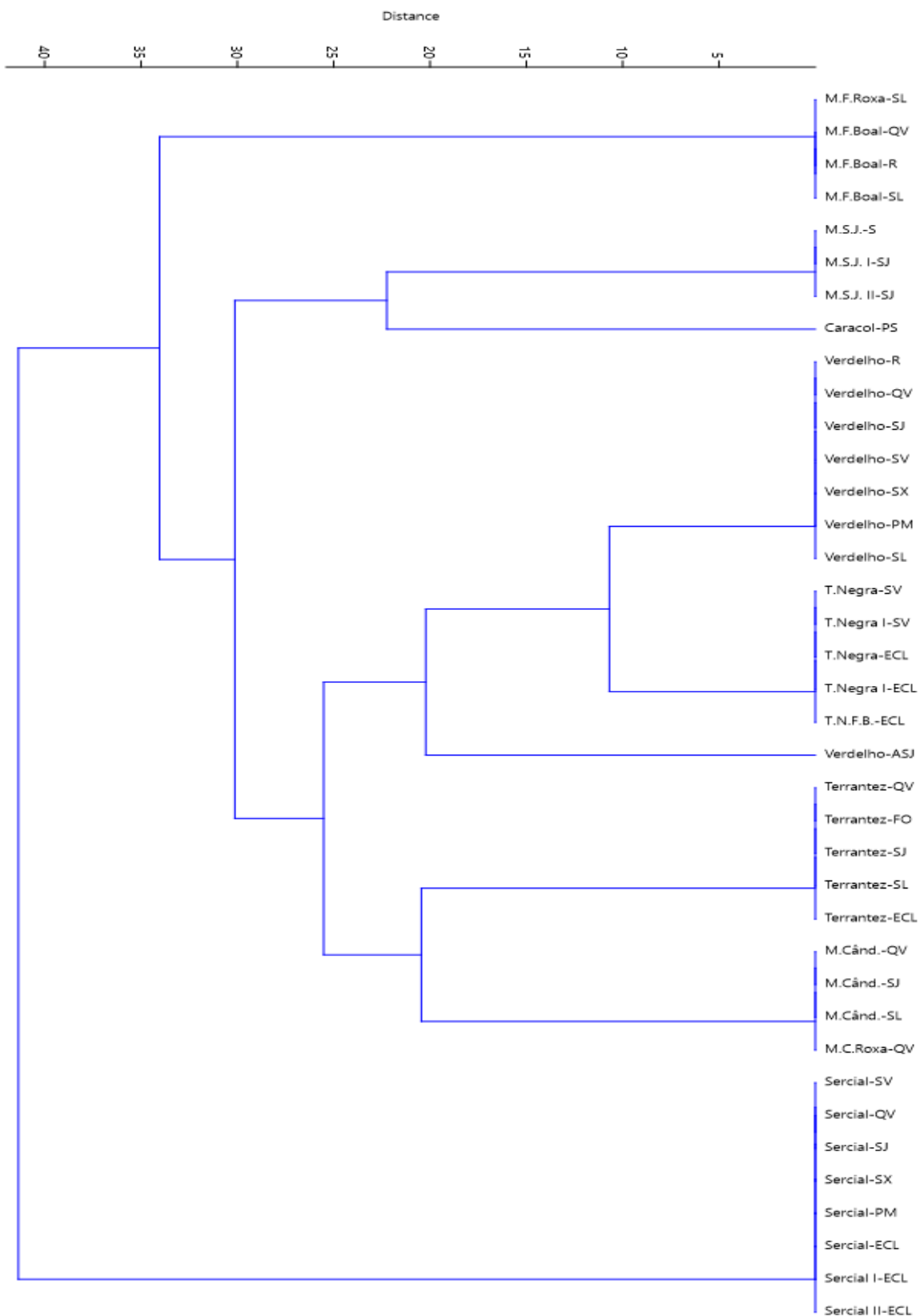


Figura 2 – Fenograma obtido a partir da matriz de distância genética, gerada com base nos dados alélicos para os 9 *SSRs*, utilizando o método UPGMA e distância euclidiana, avaliada pelo coeficiente de correlação cofenética ($r = 0,9656$), robustez de análise com 1.000 replicações de *bootstrap*.

De acordo com o fenograma, a casta Caracol surge num ramo filogenético isolado, mas mais próximo das castas Malvasia de São Jorge (M.S.J.) do que das restantes. A proximidade genética evidenciada entre estas castas sugere a possibilidade de a casta Caracol ser uma variante fenotípica, que tenha seguido um histórico evolutivo distinto, que pode também refletir adaptações específicas, derivada de um ancestral comum a M.S.J., por ser uma casta muito antiga, de origem provavelmente romana ou, segundo Conde Odart (1874), de origem grega [1], introduzida na Região Autónoma da Madeira no séc. XV por Infante D. Henrique [91].

No que diz respeito às diferentes castas de Malvasia, o fenograma apresenta diferentes relações evolutivas (Figura 2). As amostras identificadas como Malvasia Fina/Boal (M.F.Boal) e Malvasia Fina Roxa (M.F.Roxa) destacaram-se pela sua posição geneticamente mais distante das demais Malvasias. Por outro lado, as amostras M.S.J. formaram um clado separado das Malvasia Cândida (M.Când.) e Malvasia Cândida Roxa (M.C.Roxa), embora sendo que estas últimas integram o mesmo cluster. Apesar das diferenças genéticas entre estes dois grupos principais, a relativa proximidade no fenograma sugere que Malvasia de São Jorge, Malvasia Cândida e Malvasia Cândida Roxa compartilham uma história evolutiva mais recente, apresentando maior similaridade genética entre si do que com Malvasia Fina/Boal. Além disso, a posição da Malvasia Fina/Boal, está mais próxima de castas não pertencentes ao grupo das Malvasias, reforçando a sua distinção genética e sugerindo uma origem evolutiva distinta ou um isolamento genético prolongado.

As amostras das castas Sercial, Terrantez, Verdelho e Tinta Negra (T. Negra) foram posicionadas em clados distintos no fenograma, todos com suporte de *bootstrap* de 100%, confirmando a robustez dos agrupamentos e indicando alta similaridade genética dentro de cada casta, independentemente do local de colheita. Apesar de estarem em clados separados, as castas Tinta Negra e Verdelho (com exceção do Verdelho-ASJ) demonstraram maior proximidade genética entre si (72%) do que com as restantes, sugerindo uma relação evolutiva mais estreita. Em contraste, a casta Terrantez exibiu maior similaridade genética (65%) com Malvasia Cândida e Malvasia Cândida Roxa. Estes padrões destacam a complexidade da diversidade genética entre as castas analisadas, oferecendo informações importantes para compreender as suas relações filogenéticas e contribuindo para sua classificação e identificação.

A maioria das castas representam ramos filogenéticos independentes, com homogeneidade genética entre amostras de diferentes ou da mesma localização, sugerindo também algumas linhagens mais estreitamente relacionadas, e possivelmente derivadas de um ancestral comum a um tempo mais recente. Em contraste, outros ramos filogenéticos evidenciaram maior heterogeneidade genética, que podem refletir processos como cruzamentos, adaptações a diferentes regiões geográficas e padrões evolutivos complexos. Estes resultados reforçam a relevância de se implementarem estratégias

integradas de conservação da variabilidade genética, visando o uso sustentável e a preservação dos recursos genéticos de *V. vinifera*, face das mudanças ambientais e as necessidades da viticultura moderna [92].

4.3 SSR-HRM

A análise por HRM foi realizada com base nos resultados da análise preliminar, priorizando os *loci* *VVMD5*, *VVMD27* e *VrZAG79*, que demonstraram poder discriminatório, elevado conteúdo informativo de polimorfismo e amplificação robusta para eletroforese capilar, tendo sido subsequentemente validados por sequenciação. As castas Caracol, Malvasia Cândida, Verdelho e Sercial foram selecionadas com base na eficiência de amplificação por PCR, na diversidade dos perfis *SSRs*, considerando diferenças no tamanho dos alelos, e na disponibilidade de DNA genômico.

Foram realizadas múltiplas análises comparativas sem a definição de uma casta de referência fixa, avaliando-se individualmente cada casta em relação às demais para identificar variações nos perfis de fusão e a sua capacidade de discriminação varietal. A casta Sercial demonstrou maior eficácia na diferenciação genética, utilizada posteriormente como referência comparativa.

A amplificação por qPCR em tempo real para os *loci* *VVMD5*, *VVMD27* e *VrZAG79*, demonstrou um comportamento sigmoide típico, com Cts entre 25 e 30 ciclos, indicando a eficiência da amplificação nas amostras analisadas (Figura 3 e 4).

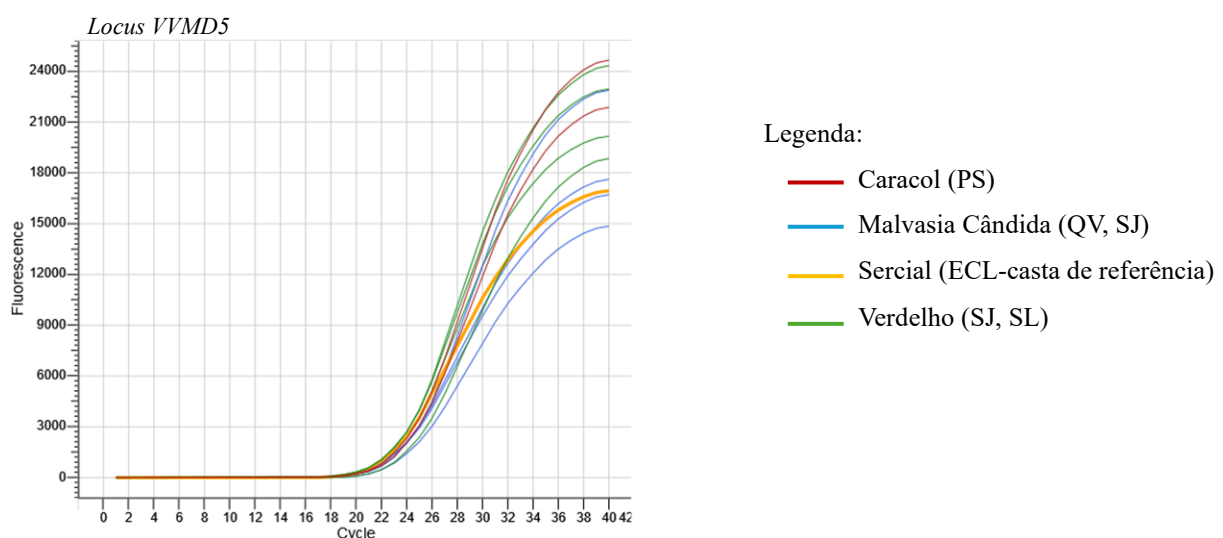


Figura 3 – Amplificação do DNA e eficiência da PCR para o *locus* *VVMD5*.

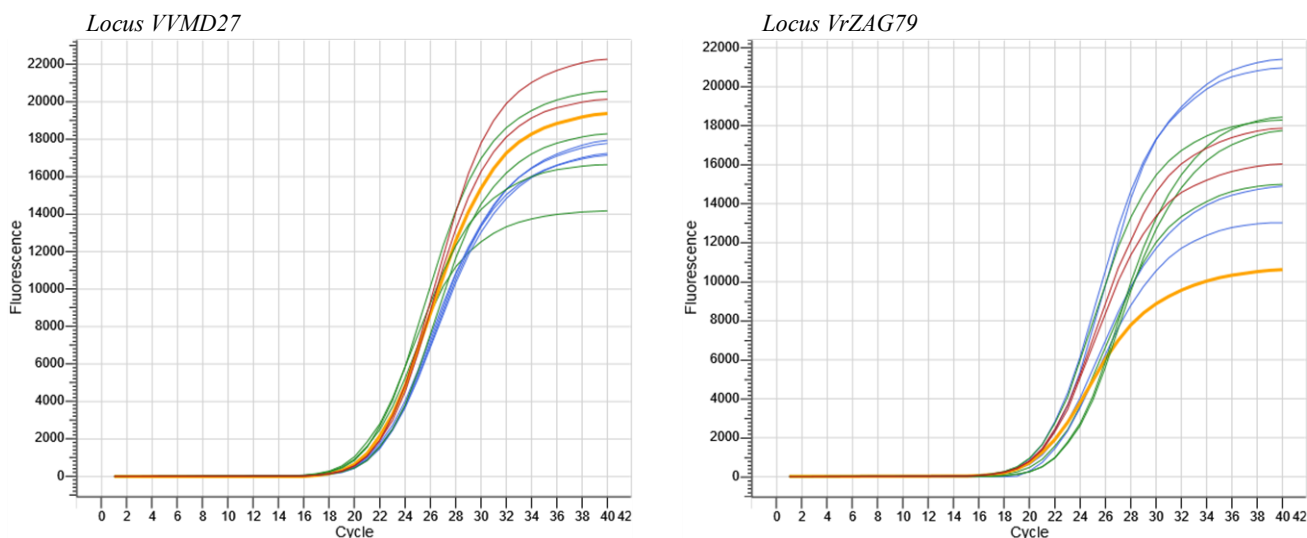


Figura 4 - Amplificação do DNA e eficiência da PCR para os *loci* *VVMD27* e *VrZAG79*.

4.3.1 *Locus VVMD5*

As curvas de fusão normalizada ilustram os perfis térmicos dos produtos de PCR dos diferentes marcadores, para as diferentes amostras, refletidos na variação de fluorescência à medida que a temperatura aumenta, e que podem evidenciar diferenças de estabilidade térmica entre os genótipos (Figura 5).

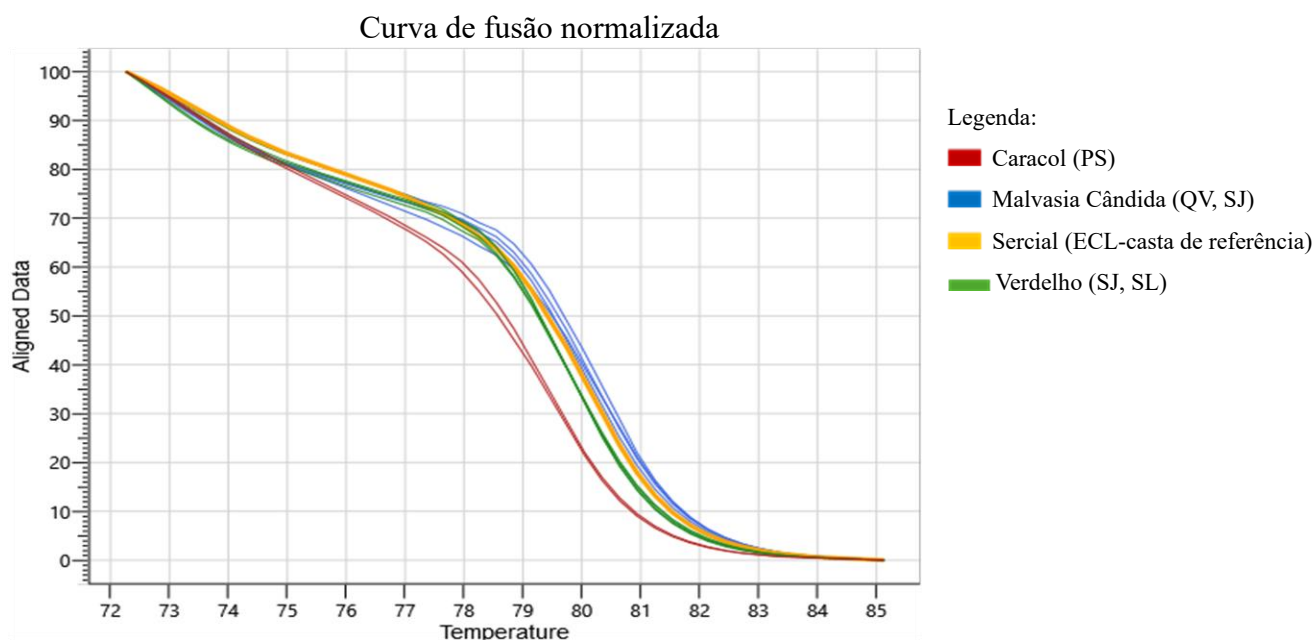


Figura 5 – Curva de fusão normalizada para *VVMD5*.

Para o *locus VVMD5*, a curva de fusão normalizada revelou que as diferentes castas exibiram perfis semelhantes, com uma sutil diferença para a casta Caracol, que demonstra maior fusão a uma temperatura mais baixa do que as restantes. A casta Caracol, com o ponto de fusão mais baixo, é aquela que a corrida de fragmentos indica como homozigótica para um fragmento com o maior tamanho (239 pb) das castas aqui comparadas, enquanto as castas Malvasia Cândida (225 pb), Verdelho (heterozigoto 221/231 pb), têm perfis de fusão semelhantes. Assim, verifica-se que não é possível associar a curva de fusão somente ao tamanho dos alelos *SSRs*, sendo conhecido que estabilidade térmica do DNA também depende da sua composição de bases no produto de PCR fora da região repetitiva, da presença de estruturas secundárias e de interações durante a fusão [48, 58], que podem diferir entre amostras.

A análise da curva de fusão normalizada para um determinado *locus* atua assim como, um controle de qualidade dos resultados do HRM, em que a fluorescência deve decrescer com o aumento da temperatura, assumindo um formato sigmoide com um decréscimo mais abrupto num intervalo de temperaturas que pode variar de acordo com o *locus*, e que permita verificar que a totalidade dos fragmentos desnaturaram aos 90 °C [74, 77]. Cumpridos estes critérios para a curva de fusão normalizada para o *locus VVMD5*, prosseguiu-se então para a análise da curva diferencial de *melting*, que tem por base estes resultados.

As variações nos padrões de dissociação do DNA, em comparação com uma amostra de referência, foram evidenciadas pelo gráfico de diferença de *melting* (Figura 6).

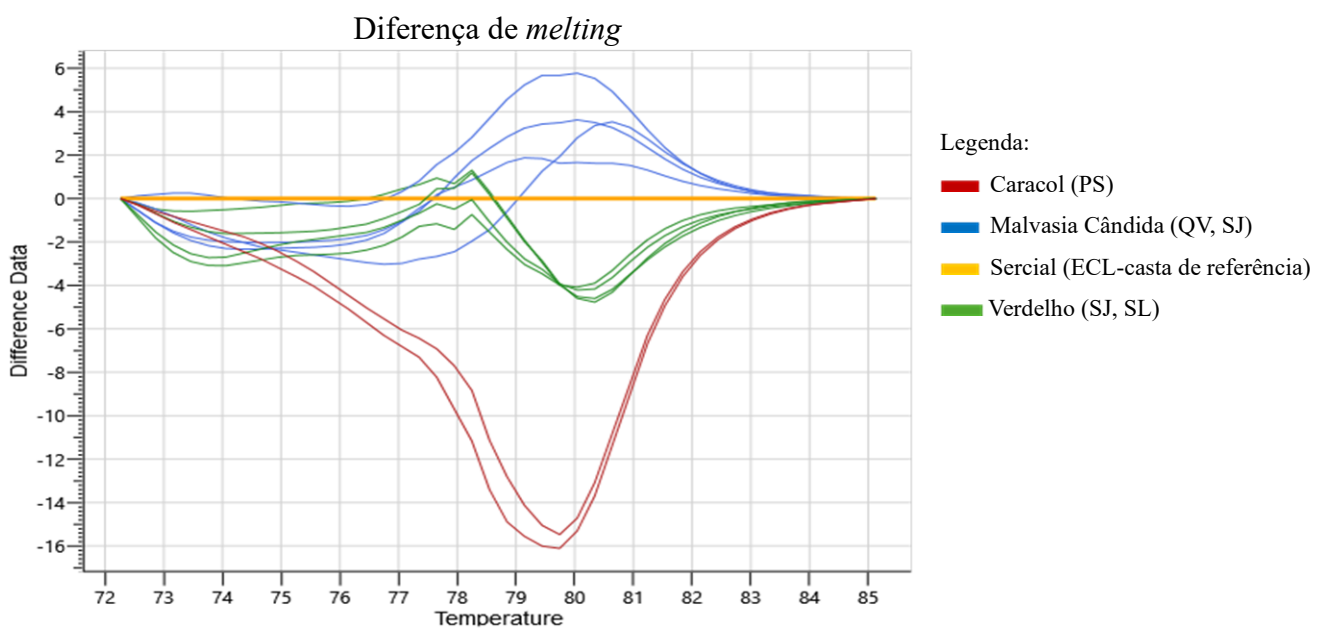


Figura 6 – Diferença de *melting* para *VVMD5*.

Esta análise dos resultados amplifica as variações entre os perfis de fusão em relação a uma amostra de referência, destacando a magnitude da divergência térmica entre os genótipos. As diferentes castas foram comparadas de forma iterativa, assumindo-se cada uma, sucessivamente, como referência. Entre elas, a casta Sercial destacou-se por proporcionar a melhor discriminação varietal. A escolha da casta de referência para este marcador influenciou diretamente a resolução do HRM na distinção de genótipos, uma vez que a referência com alelos termicamente mais distintos aumentou a sensibilidade da técnica, permitindo uma discriminação mais precisa [93].

A casta Caracol (239/239) apresentou um perfil com o maior desvio negativo, o que confirma a sua menor estabilidade térmica e, em sentido contrário, a Malvasia Cândida (225/225), que mostra um deslocamento positivo, refletindo maior estabilidade térmica. A casta Verdelho (221/231 pb) apresentou um deslocamento térmico bimodal subtil, com um pico positivo em torno dos 78 °C e um pico negativo em torno de 80 °C, compatível com heteroziguidade [72]. A ausência de um perfil bimodal bem definido pode ser explicada pela proximidade térmica e interação entre alelos durante a fusão de DNA, resultando numa curva de transição mais homogênea, sem separação distinta entre os dois alelos [94, 95], além de que, o HRM tem maior eficiência na detecção de heterozigotos quando a diferença de tamanho entre os alelos é superior a 10 pb [72, 95]. Ainda assim, para o marcador *VVMD5*, em particular, os perfis de temperatura de *melting* (T_m) entre as amostras parecem refletir as diferenças no número de repetições *SSRs*, que podem mudar o ponto de fusão e a estrutura do DNA, influenciando diretamente a estabilidade térmica dos produtos de PCR, apesar de não ser determinada exclusivamente pelo comprimento do alelo [96]. Em suma, a técnica SSR-HRM aplicada à análise do marcador *VVMD5* permitiu a diferenciação eficiente de genótipos e a discriminação de amostras representativas das castas Caracol, Malvasia Cândida e Verdelho, tendo o Sercial como referência [93].

4.3.2 Locus *VVMD27*

A curva de fusão normalizada para o marcador *VVMD27*, ilustra os perfis térmicos das diferentes amostras (Figura 7).

Os resultados obtidos para todas as amostras por análise de fragmentos foram identificadas como heterozigóticas. Na curva de fusão normalizada, a casta Caracol (178/193 pb na análise de fragmentos) apresentou um perfil com maior fusão a uma temperatura mais baixa do que as restantes, em contraste com a Malvasia Cândida (178/182 pb), sendo que o Verdelho (180/188 pb) apresentou perfis de fusão intermédios.

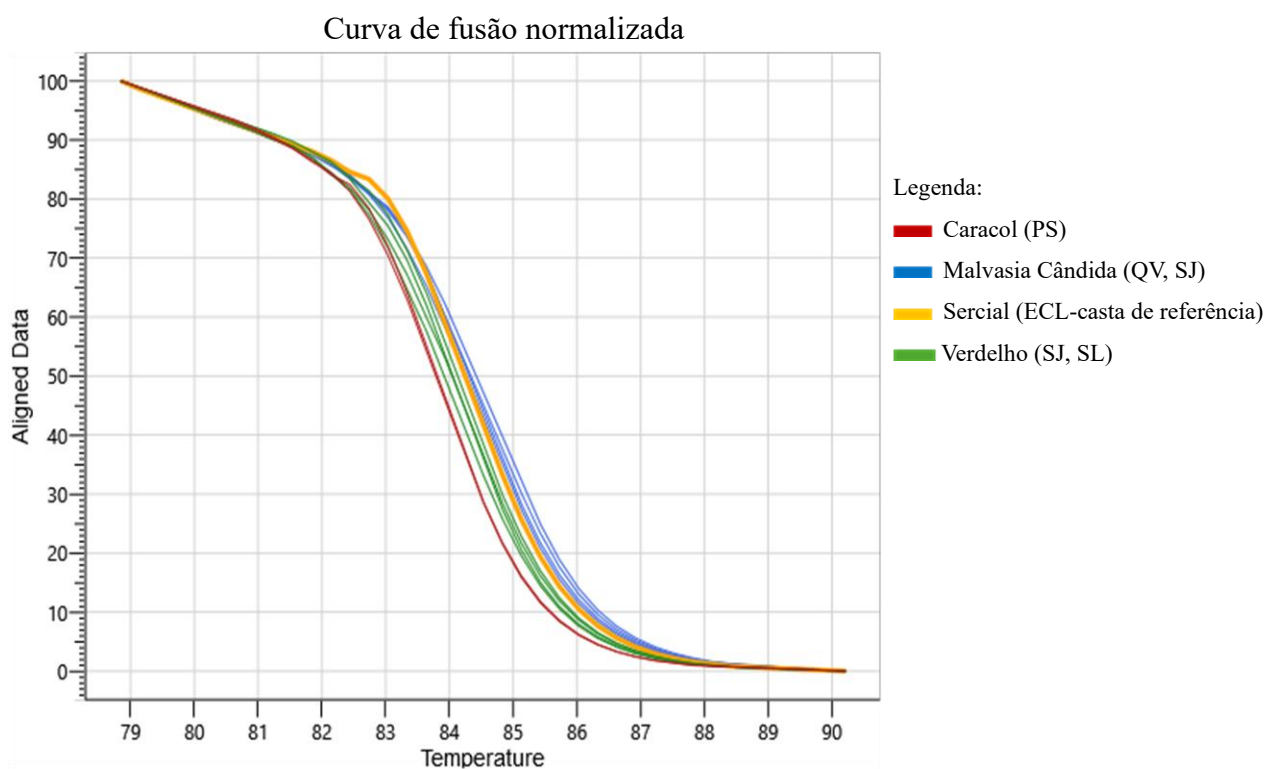


Figura 7 - Curva de fusão normalizada para *VVMD27*.

Como esperado, a curva de fusão normalizada apresentou um formato sigmoide característico em todas as amostras. Esta abordagem permitiu a correção de variações experimentais inerentes à reação, como diferenças na concentração de DNA, pequenas flutuações na temperatura do termociclador e variações na eficiência de amplificação. Ao alinhar os perfis de *melting*, a normalização reduz a influência desses fatores técnicos e melhora a comparabilidade entre amostras [72, 95, 97]. Desta forma, a curva de fusão normalizada foi utilizada como um controle de qualidade essencial, assegurando a consistência térmica das reações e permitindo uma avaliação mais precisa das variações nos perfis de *melting*.

As variações nos padrões de dissociação do DNA, em comparação com a amostra de referência, foram evidenciadas pelo gráfico de diferença de *melting* (Figura 8).

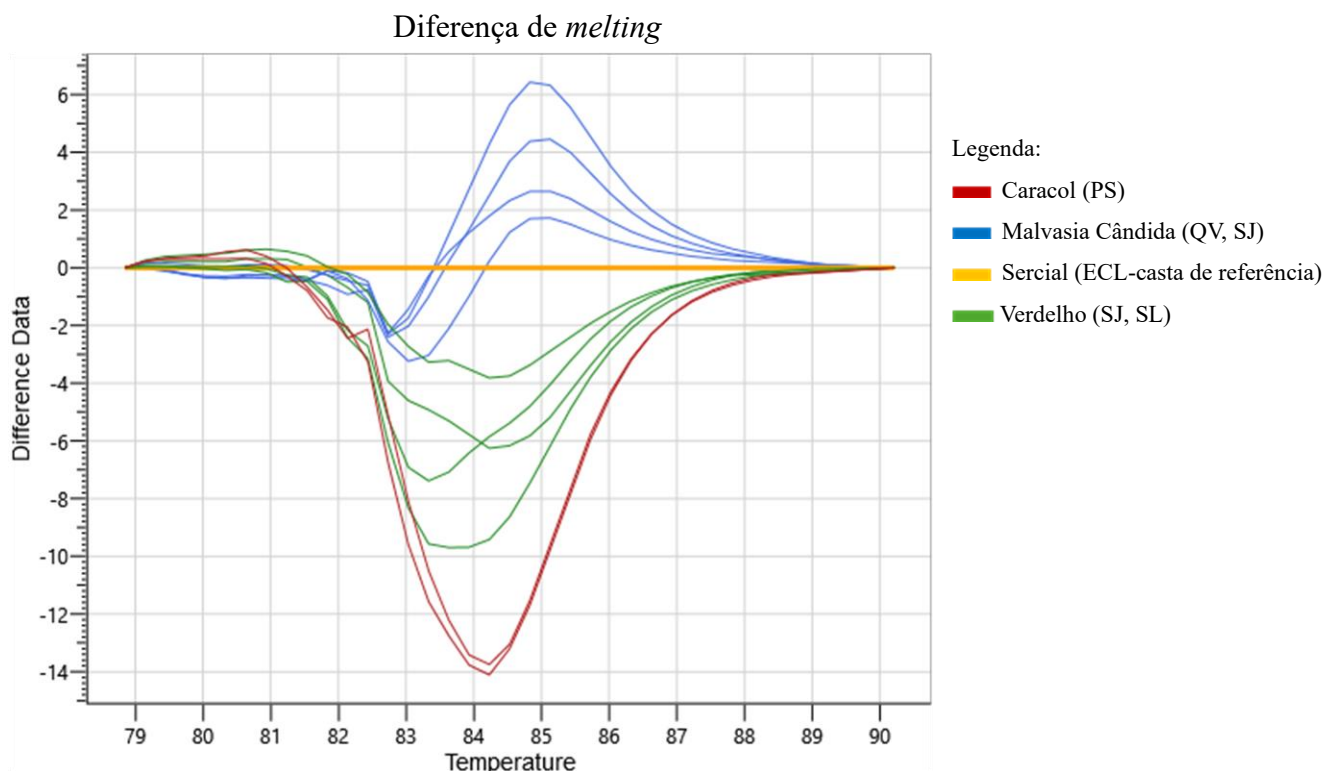


Figura 8 - Diferença de *melting* para *VVMD27*.

Para *VVMD27*, foram realizadas análises comparativas avaliando cada casta individualmente, como referência. A casta Sercial mostrou maior capacidade discriminatória e foi posteriormente adotada como casta de referência para este *locus*. Observaram-se 2 padrões distintos de *melting* para as 3 castas analisadas, comparadas à amostra de referência (Sercial), o que reflete variações na T_m e estabilidade térmica dos produtos de PCR. As castas Caracol (178/193) e Verdelho (180/188) apresentaram um perfil idêntico, com desvio negativo, o que confirma a sua menor estabilidade térmica relativamente à referência. Sendo heterozigotos, não apresentam um perfil bimodal como esperado, possivelmente devido a T_m muito próximas ou interações térmicas entre os alelos [72, 95]. A casta Malvasia Cândida (178/182 pb), apresentou um perfil térmico bimodal subtil, com um pico negativo em torno de 83 °C, e um pico positivo em torno dos 85 °C, compatível com heterozigotidade [72]. O seu perfil negativo e positivo distinto no gráfico de diferença sugere que os dois alelos apresentam transições térmicas em momentos distintos [72, 94, 95]. Para este *locus*, não é evidente um paralelismo entre o tamanho dos alelos e o perfil de T_m , nem há uma associação clara de genótipos heterozigóticos com um perfil bimodal, sugerindo que, entre as castas analisadas, haverá diferenças de sequência e/ou de estrutura secundária nas regiões vizinhas ao *SSR* [95].

Apesar destas limitações, a técnica SSR-HRM aplicada ao marcador *VVMD27* permitiu a discriminação da casta Malvasia Cândida relativamente às castas Caracol e Verdelho (Sercial, usado

como referência), com base em variações nos perfis de fusão em relação ao padrão de referência. Note-se que a escolha da casta de referência pode afetar a resolução do HRM, pois os alelos com maior divergência térmica aumentam a sensibilidade da técnica, aprimorando a discriminação [93].

4.3.3 Locus *VrZAG79*

As curvas de fusão normalizada obtidas por HRM para as diferentes castas no *locus VrZAG79*, indicaram variações na estabilidade térmica entre as castas, enquanto a normalização assegurou a eliminação de variações experimentais, garantindo um controle de qualidade (Figura 9). A curva de fusão normalizada apresentou um formato sigmoide característico em todas as amostras, corrigindo variações experimentais e minimizando a influência de fatores técnicos. Este processo assegurou uma maior uniformidade nos perfis térmicos, melhorando a reprodutibilidade dos resultados e a comparabilidade entre as amostras.

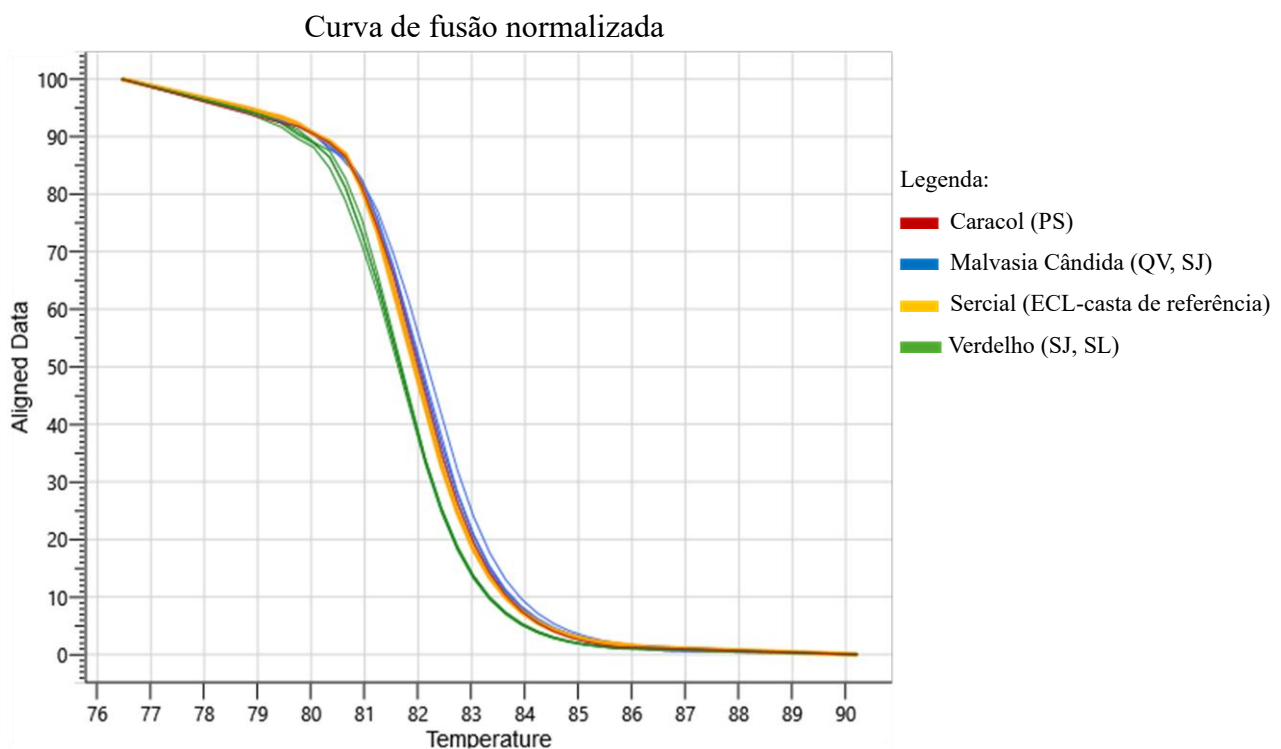


Figura 9 - Curva de fusão normalizada para *VrZAG79*.

A Malvasia Cândida, identificada como 242/246 pb na análise de fragmentos, apresenta-se como sendo a casta com maior estabilidade térmica entre as demais amostras, contrapondo com o Verdelho

(246/250 pb) que apresenta uma fusão mais precoce logo, menor estabilidade térmica, encontrando-se o Caracol (246/256 pb) numa posição intermédia.

As diferenças entre os perfis de fusão, em comparação com a amostra de referência, foram evidenciadas pelo gráfico de diferença de *melting* permitindo a identificação de variações nos padrões de dissociação do DNA (Figura 10).

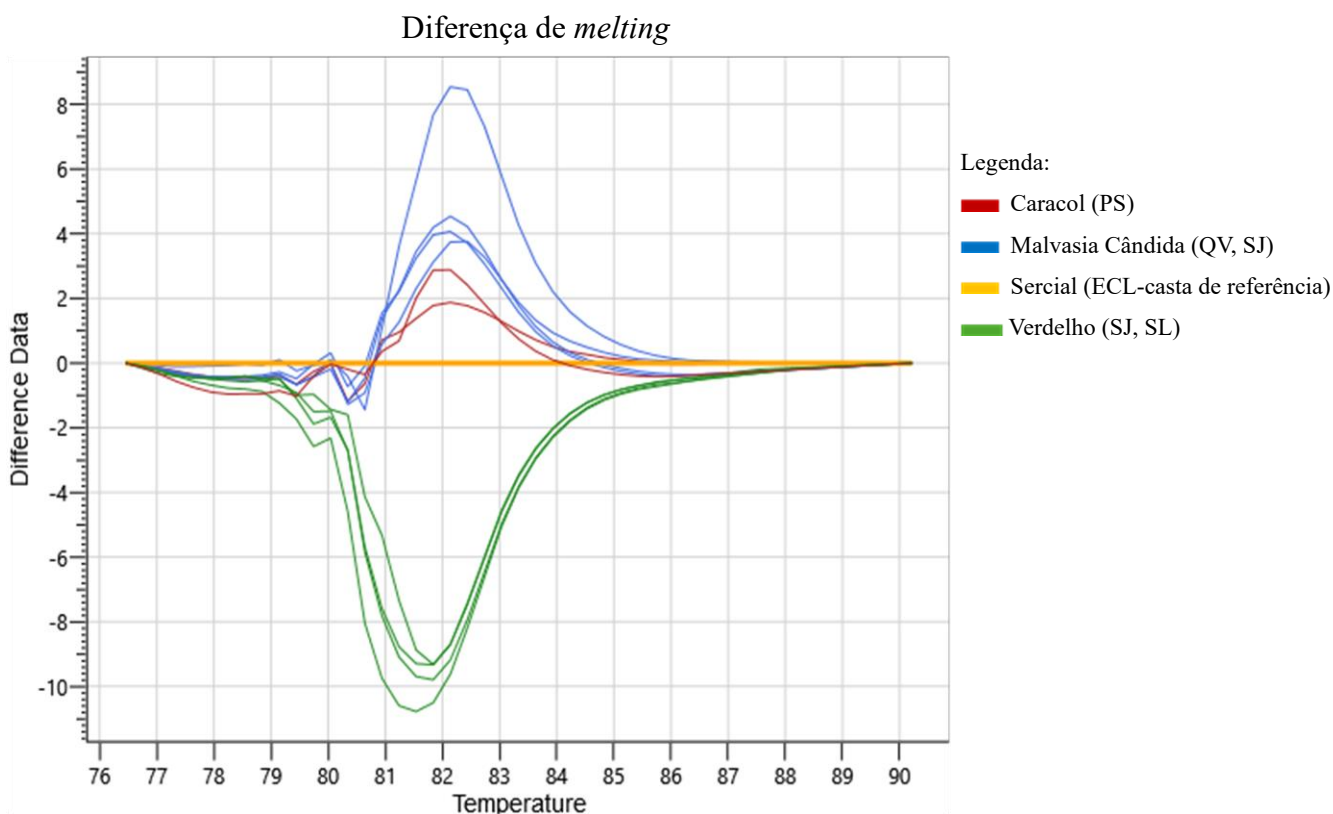


Figura 10 - Diferença de *melting* para *VrZAG79*.

No *locus VrZAG79*, foram realizadas múltiplas análises comparativas, destacando cada casta individualmente como referência, de modo a avaliar a sua capacidade de discriminação varietal. Apesar da diferenciação não ser absoluta, a casta que demonstrou maior eficácia na diferenciação comparativa foi a Sercial. O gráfico de diferença de *melting* para o marcador *VrZAG79* (Figura 10) destacou assim variações entre os perfis de fusão em relação à amostra de referência (Sercial), não permitindo, no entanto, uma distinção clara entre as castas Caracol e Malvasia Cândida. Ambas apresentaram um perfil de *melting* positivo, indicando uma maior estabilidade térmica relativamente à referência, possivelmente devido a interações alélicas que resultam em uma estrutura de dupla hélice mais estável. Foi observada uma tendência bimodal subtil em torno dos 81°C, sugerindo a presença de alelos com ligeiras diferenças na T_m , embora não suficientemente acentuadas para gerar perfis claramente distintos. Por outro lado, a casta Verdeelho exibiu um desvio negativo, refletindo uma

menor estabilidade térmica em comparação com a referência. O perfil de *melting* da casta Verdelho não apresentou características bimodais, podendo indicar que os alelos têm temperaturas de *melting* relativamente homogêneas, apresentam uma diferença entre alelos igual ou inferior a 10 pb e fragmentos maiores podem mascarar pequenas diferenças genéticas, especialmente em regiões repetitivas como *SSRs* [72, 95, 97].

Em suma, a aplicação da técnica SSR-HRM ao marcador *VrZAG79* permitiu a discriminação da casta Verdelho comparativamente às castas Caracol/Malvasia Cândida e Sercial, usado como referência. Para o *locus VrZAG79*, é essencial testar múltiplas castas para identificar aquela que apresenta o perfil térmico mais adequado como referência, de modo a maximizar a resolução do HRM e permitir a discriminação eficiente das demais castas [93].

Os resultados preliminares demonstram uma otimização da técnica de SSR-HRM bem-sucedida para os *loci VVMD5*, *VVMD27* e *VrZAG79* e o seu potencial na identificação de diferentes castas associadas ao Vinho Madeira. Os perfis de *melting* obtidos para o *locus VVMD5* permitiram distinguir as quatro castas analisadas, evidenciando a sua elevada capacidade discriminatória. O *VVMD27* diferenciou Malvasia Cândida de Verdelho e Caracol, embora não tenha gerado um perfil suficientemente distinto entre estas duas últimas castas. Relativamente ao *VrZAG79*, este marcador permite a distinção de Verdelho, Caracol/Malvasia Cândida e Sercial, mas não permite uma separação clara entre Caracol e Malvasia Cândida. Assim, *VVMD5* revela-se o *locus* com maior poder discriminatório entre as castas analisadas. No entanto, para maximizar a eficácia da identificação varietal, recomenda-se a utilização combinada de múltiplos *loci* e, idealmente, o aumento do número de *loci* analisados por esta técnica.

Recomenda-se ainda que os resultados preliminares aqui apresentados sejam interpretados com cautela, quer na identificação de castas quer na sugestão de alguma proporcionalidade do tamanho dos alelos *SSR* com a homozigotia ou heterozigotia em diferentes perfis de curvas de *melting*, uma vez que podem ser também influenciados pela presença de *SNPs* fora da região repetitiva ou estruturas secundárias no produto PCR. Estes resultados devem, no futuro, ser validados com um maior número de amostras para cada uma das castas analisadas neste estudo preliminar, como estendido à análise de outras castas.

5. Conclusões e Perspetivas futuras

A *Vitis vinifera* é uma das espécies de maior relevância económica na viticultura mundial, caracterizando-se pela sua ampla diversidade genética e adaptabilidade a diferentes condições agro-edafoclimáticas. A preservação dessa diversidade é fundamental para a manutenção da identidade varietal e para o aprimoramento de estratégias de conservação e certificação do material vegetal. No contexto da vitivinicultura da Madeira, a correta identificação das castas é essencial para garantir a rastreabilidade e autenticidade do Vinho Madeira com denominação DOP, um produto de elevada importância histórica e comercial, cuja qualidade e singularidade estão intrinsecamente associadas às variedades tradicionais cultivadas na Região Autónoma da Madeira.

A distinção entre castas pode ser desafiadora devido à semelhança morfológica de algumas variedades e à possibilidade de sinonímias e homonímias, tornando necessária a aplicação de métodos de caracterização molecular. De acordo com os resultados deste projeto, as técnicas moleculares baseadas em *SSRs* demonstraram-se ferramentas eficazes para a identificação e diferenciação de castas de *Vitis vinifera*. A análise dos 9 *loci SSRs* recomendados pelo VIVC possibilitou a obtenção de perfis genéticos distintos para as 11 castas analisadas, permitindo a sua identificação precisa e a inferência de relações filogenéticas entre estas, contribuindo para um melhor entendimento da diversidade genética e da sua história evolutiva. Adicionalmente, os perfis genéticos obtidos foram comparados com bases de dados nacionais e internacionais, contribuindo para a validação e integração das informações genéticas das castas tradicionais da RAM em plataformas, como o VIVC e o GrinGlobal.

Outro dos objetivos deste estudo foi o de explorar a aplicação da técnica *High Resolution Melting* associada aos *SSRs*, como um método alternativo à análise de fragmentos por eletroforese capilar, possibilitando uma abordagem mais rápida, de menor custo, mas também sensível e reproduzível para a autenticação varietal. Os resultados da curva de fusão normalizada nos *loci VVMD5*, *VVMD27* e *VrZAG79* revelaram perfis sigmóides, permitindo verificar que a totalidade dos fragmentos desnaturaram, atuando como um controlo de qualidade dos resultados do HRM. A análise das curvas de *melting* revelou que o *locus VVMD5* apresentou o maior poder discriminatório, permitindo distinguir as quatro castas analisadas. Os *loci VVMD27* e *VrZAG79* diferenciaram três perfis distintos. Estes resultados sugerem que a utilização combinada de múltiplos *loci SSRs* é essencial para maximizar a capacidade discriminatória da técnica, proporcionando uma abordagem mais robusta na autenticação varietal.

Apesar do sucesso na discriminação de castas, a técnica SSR-HRM nem sempre permite estabelecer um paralelismo direto com os perfis obtidos por eletroforese capilar, que distinguem

amostras homozigóticas e heterozigóticas com base no tamanho dos fragmentos amplificados. Esta diferença era expectável, uma vez que, além das variações no número de repetições da região repetitiva, podem existir polimorfismos de sequência em regiões fora da região repetitiva ou a formação de estruturas secundárias nos fragmentos amplificados por PCR, influenciando a estabilidade térmica e, conseqüentemente, o perfil de *melting*.

Desta forma, os resultados obtidos para os *loci SSRs* nas 11 castas analisadas destacam a relevância da caracterização molecular na viticultura, em conformidade com a Legislação Regional da Região Autónoma da Madeira pelas Portarias nº 395/2017 e 396/2017, de 9 de outubro, contribuindo para a preservação do património genético das castas tradicionais da RAM e assegurando a autenticidade dos vinhos produzidos. Paralelamente, os resultados do presente estudo sugerem a técnica HRM como uma potencial abordagem inovadora para a identificação e futura rastreabilidade deste material vegetal. Para consolidar sua aplicabilidade e robustez, estudos futuros devem expandir-se a um maior número de castas e aos 9 *loci SSRs* recomendados pelo VIVC, avaliando de forma criteriosa quais os *SSRs* e as castas de referência que maximizam a resolução da técnica na discriminação varietal. A ampliação do conjunto de dados permitirá uma maior sensibilidade na identificação de variações nos perfis de fusão, refinando a capacidade de distinção entre os genótipos. Adicionalmente, recomenda-se o desenvolvimento de uma base de dados com os perfis HRM validados, possibilitando e facilitando a identificação e a rastreabilidade das castas. Uma vez expandida e otimizada, a técnica SSR-HRM pode vir a estabelecer-se como uma ferramenta eficaz para viveiristas, produtores e entidades reguladoras, no controle da autenticidade das plantas utilizadas na produção de Vinho Madeira.

6. Referências

- [1] H. J. Böhm, J. M. M. Zapater, R. O. Rubio, e V. G. Miguel, *Atlas das Castas da Península Ibérica*. Dinalivro Lisboa, 2011.
- [2] J. Cunha, M. Teixeira Santos, L. Carneiro, P. Feveiro, e J. Eiras-Dias, «Portuguese traditional grapevine cultivars and wild vines (*Vitis vinifera* L.) share morphological and genetic traits», *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 56, pp. 975–989, nov. 2009.
- [3] «JORAM, ISerie, Número 28, 2015; Portaria n.º 38/2015; Portaria n.º 39/2015; Portaria n.º 40/2015». Acedido: 28 de novembro de 2024. [Online]. Disponível em: <https://joram.madeira.gov.pt/joram/1serie/Ano%20de%202015/ISerie-028-2015-02-13sup2.pdf>
- [4] F. Freitas, B., «A Região Demarcada da Madeira – Características e Património Vitícola. In: Seminário Vitivinicultura Atlântica – Construir o Futuro». Ilha do Pico 9–12 jun. 2011.
- [5] M. Veloso *et al.*, «Microsatellite database of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars used for wine production in Portugal», *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, vol. 25, pp. 53–61, jan. 2010.
- [6] J. Brazão, «A VITIVINICULTURA NA REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA. SUA EVOLUÇÃO E SITUAÇÃO ACTUAL», 1998.
- [7] G. Cipriani *et al.*, «The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin», *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, vol. 121, pp. 1569–85, nov. 2010.
- [8] A. Atak e K. Kahraman, «Ampelographic identification and comparison of some table grape (*Vitis vinifera* L.) clones», *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, vol. 42, abr. 2014.
- [9] N. J. Ouborg, Y. Piquot, e J. M. van Groenendael, «Population Genetics, Molecular Markers and the Study of Dispersal in Plants», *Journal of Ecology*, vol. 87, n.º 4, pp. 551–568, 1999.
- [10] P. This *et al.*, «Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars», *Theor Appl Genet*, vol. 109, n.º 7, pp. 1448–1458, nov. 2004.
- [11] G. Cipriani, M. T. Marrazzo, G. Di Gaspero, A. Pfeiffer, M. Morgante, e R. Testolin, «A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping», *BMC Plant Biology*, vol. 8, n.º 1, p. 127, dez. 2008.
- [12] J. Ibáñez, A. M. Vargas, M. Palancar, J. Borrego, e M. de Andrés, «Genetic Relationships among Table-Grape Varieties», *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 60, pp. 35–42, mar. 2009.
- [13] C. P. Meredith, «Grapevine Genetics: Probing the Past and Facing the Future», *Agriculturae Conspectus Scientificus*, vol. 66, n.º 1, pp. 21–25, mar. 2001.
- [14] I. Ganopoulos, A. Argiriou, e A. Tsafaris, «Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products», *Food Control*, vol. 22, n.º 3–4, pp. 532–541, mar. 2011.
- [15] S. Barrias, L. Pereira, S. Rocha, T. A. De Sousa, J. Ibáñez, e P. Martins-Lopes, «Identification of Portuguese traditional grapevines using molecular marker-based strategies», *Scientia Horticulturae*, vol. 311, p. 111826, mar. 2023.
- [16] S. Gomes, R. Breia, T. Carvalho, V. Carnide, e P. Martins-Lopes, «Microsatellite High-Resolution Melting (SSR-HRM) to Track Olive Genotypes: From Field to Olive Oil», *Journal of Food Science*, vol. 83, n.º 10, pp. 2415–2423, 2018.
- [17] S. E. Warnke, C. S. Thammina, K. Amundsen, P. Miljanic, e H. Hershman, «High-Resolution Melt Analysis of Simple Sequence Repeats for Bentgrass Species Differentiation», *itsrj*, vol. 13, n.º 1, p. 466, 2017.

- [18] A. Xanthopoulou *et al.*, «Microsatellite high-resolution melting (SSR-HRM) analysis for genotyping and molecular characterization of an *Olea europaea* germplasm collection», *Plant Genet. Res.*, vol. 12, n.º 3, pp. 273–277, dez. 2014.
- [19] V. di Rienzo *et al.*, «An enhanced analytical procedure to discover table grape DNA adulteration in industrial musts», *Food Control*, vol. 60, pp. 124–130, fev. 2016.
- [20] C. I. D. da S. Rodrigues, *Caracterização das variedades de Vitis vinifera L. tradicionalmente cultivadas na Região Autónoma da Madeira*. 2018.
- [21] J. Wen *et al.*, «A new phylogenetic tribal classification of the grape family (Vitaceae)», *Journal of Systematics and Evolution*, vol. 56, n.º 4, pp. 262–272, 2018.
- [22] J. Wen, «Vitaceae», em *Flowering Plants · Eudicots: Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae Alliance, Passifloraceae Alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae*, K. Kubitzki, Ed., Berlin, Heidelberg: Springer, 2007, pp. 467–479.
- [23] R. Bessis, «Evolution of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) imprinted by natural and human factors This review is one of a selection of papers presented at the symposium on *Vitis* at the XVII International Botanical Congress held in Vienna, Austria, in 2005.», *Can. J. Bot.*, vol. 85, n.º 8, pp. 679–690, ago. 2007.
- [24] K. Grainger e H. Tattersall, *Wine production: vine to bottle*. em Food industry briefing series. Oxford ; Ames, Iowa: Blackwell Pub, 2005.
- [25] R. S. Jackson, *Wine science: principles and applications*, 3. ed. em Food science and technology international series. Amsterdam, Heidelberg: Acad. Press, 2008.
- [26] P. This, T. Lacombe, e M. R. Thomas, «Historical origins and genetic diversity of wine grapes», *Trends in Genetics*, vol. 22, n.º 9, pp. 511–519, set. 2006.
- [27] P. McGovern, *Ancient wine: The search for the origins of viticulture*. 2003.
- [28] H. Togores, «Vinos tradicionales vs. vinos tecnológicos», *La Prensa del Rioja*, n.º 145, pp. 10–13, 2019.
- [29] J. Cunha, J. Cunha, M. M. Baleiras-Couto, P. Fevereiro, L. Carneiro, e J. Eiras-Dias, *Cunha et al. 2007*. 2007.
- [30] K. M. Sefc, F. Regner, E. Turetschek, J. Glössl, e H. Steinkellner, «Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species», *Genome*, vol. 42, n.º 3, pp. 367–373, jun. 1999.
- [31] M. S. Lopes, M. R. Dos Santos, J. E. E. Dias, D. Mendonça, e A. Da Câmara Machado, «Discrimination of Portuguese grapevines based on microsatellite markers», *Journal of Biotechnology*, vol. 127, n.º 1, pp. 34–44, dez. 2006.
- [32] G. Cipriani *et al.*, «The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin», *Theor Appl Genet*, vol. 121, n.º 8, pp. 1569–1585, nov. 2010.
- [33] G. Marsal *et al.*, «Molecular characterization of *Vitis vinifera* L. local cultivars from volcanic areas (Canary Islands and Madeira) using SSR markers», *OENO One*, vol. 53, n.º 4, out. 2019.
- [34] P. Moreno-Sanz, M. D. Loureiro, e B. Suárez, «Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain)», *Scientia Horticulturae*, vol. 129, n.º 3, pp. 433–440, jun. 2011.
- [35] R. Arroyo-García *et al.*, «Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms», *Mol Ecol*, vol. 15, n.º 12, pp. 3707–3714, out. 2006.
- [36] «World Statistics | OIV». Acedido: 25 de janeiro de 2025. [Online]. Disponível em: <https://www.oiv.int/what-we-do/global-report>
- [37] N. Magalhães, C. Godinho, e D. Gouveia, *Tratado de viticultura: a videira, a vinha e o terroir*. Lisboa: Esfera Poética, 2015.

- [38] M. Troggio *et al.*, «ASEV Honorary Research Lecture 2007: Beyond the Genome, Opportunities for a Modern Viticulture: A Research Overview», *Am J Enol Vitic.*, vol. 59, n.º 2, pp. 117–127, jun. 2008.
- [39] M. M. Baleiras-Couto e J. E. Eiras-Dias, «Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers», *Analytica Chimica Acta*, vol. 563, n.º 1, pp. 283–291, mar. 2006.
- [40] Machado, R., «Efeitos da desfolha precoce à floração da casta de “Folgasão” B (Terrantez) (*Vitis vinifera* L.) na Ilha da Madeira: componentes de rendimento e qualidade da uva. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 60 pp.»
- [41] A. Vieira, C. Lopes, e A. H. Cardoso, *O vinho da Madeira*, Edição especial. em Enciclopédia dos Vinhos de Portugal, no. 5. Lisboa: Chaves Ferreira, 1998.
- [42] I. Castro *et al.*, «Effectiveness of AFLPs and retrotransposon-based markers for the identification of Portuguese grapevine cultivars and clones», *Mol Biotechnol*, vol. 52, n.º 1, pp. 26–39, set. 2012.
- [43] S. Riaz, K. Garrison, G. Dangl, J.-M. Boursiquot, e C. Meredith, «Genetic Divergence and Chimerism within Ancient Asexually Propagated Winegrape Cultivars», *Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science*, vol. 127, jul. 2002.
- [44] F. Carimi, F. Mercati, R. De Michele, M. C. Fiore, P. Riccardi, e F. Sunseri, «Intra-varietal genetic diversity of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar ‘Nero d’Avola’ as revealed by microsatellite markers», *Genet Resour Crop Evol*, vol. 58, n.º 7, pp. 967–975, out. 2011.
- [45] J. Eiras-Dias, V. Paulos, S. Mestre, J. Martins, e I. Goulart, «O encepamento do arquipélago dos Açores», *Ciência e Técnica Vitivinícola*, vol. 21, pp. 99–112, dez. 2005.
- [46] J. E. Eiras-Dias e R. F. Rolando, «Catálogo das castas para vinho cultivadas em Portugal - Volume I | Request PDF».
- [47] L. Mondini, A. Noorani, e M. A. Pagnotta, «Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools», *Diversity*, vol. 1, n.º 1, pp. 19–35, ago. 2009.
- [48] K. M. Sefc, F. Lefort, M. S. Grando, K. D. Scott, H. Steinkellner, e M. R. Thomas, «Microsatellite Markers for Grapevine: A State of the Art», em *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*, K. A. Roubelakis-Angelakis, Ed., Dordrecht: Springer Netherlands, 2001, pp. 433–463.
- [49] M. T. Cervera, J. A. Cabezas, J. Sancha, F. Martinez de Toda, e J. Martínez-Zapater, «Application of AFLPS to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain)», *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 97, pp. 51–59, jul. 1998.
- [50] R. Arroyo-García e J. M. Martínez-Zapater, «Development and characterization of new microsatellite markers for grape», *VITIS - Journal of Grapevine Research*, vol. 43, n.º 4, Art. n.º 4, 2004.
- [51] J. Cunha, M. Teixeira Santos, J. Brazão, P. Feveireiro, e J. Eiras-Dias, «Portuguese *Vitis vinifera* L. Germplasm: Accessing Its Diversity and Strategies for Conservation», 2013, pp. 125–145.
- [52] M. A. Lanza, C. T. Guimaraes, e I. Schuster, «Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético.», 2000.
- [53] M. R. Thomas, P. Cain, e N. S. Scott, «DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness», *Plant Mol Biol*, vol. 25, n.º 6, pp. 939–949, set. 1994.
- [54] J. E. Bowers, E. B. Bandman, e C. P. Meredith, «DNA Fingerprint Characterization of Some Wine Grape Cultivars», *Am J Enol Vitic.*, vol. 44, n.º 3, pp. 266–274, jan. 1993.
- [55] M. R. Thomas e N. S. Scott, «Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs)», *Theor Appl Genet*, vol. 86, n.º 8, pp. 985–990, set. 1993.

- [56] T. Fossati, M. Labra, S. Castiglione, O. Failla, A. Scienza, e F. Sala, «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"», *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 102, n.º 2, pp. 200–205, fev. 2001.
- [57] J. M. Hancock, «Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms», *Microsatellites: Evolution and applications*, pp. 1–9, 1999.
- [58] J. E. Bowers, G. S. Dangl, e C. P. Meredith, «Development and Characterization of Additional Microsatellite DNA Markers for Grape», *Am J Enol Vitic.*, vol. 50, n.º 3, pp. 243–246, jan. 1999.
- [59] M. Delseny, M. Laroche, e P. Penon, «Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 116, n.º 1, pp. 113–120, out. 1983.
- [60] G. Tóth, Z. Gáspári, e J. Jurka, «Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis», *Genome Res.*, vol. 10, n.º 7, pp. 967–981, jul. 2000.
- [61] Oliveira, E.J., Padua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., and Vieira, M.L.C., «Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology, 2006. 29(2): p. 294-307.», *ResearchGate*, 2006.
- [62] R. K. Kalia, M. K. Rai, S. Kalia, R. Singh, e A. K. Dhawan, «Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants», *Euphytica*, vol. 177, n.º 3, pp. 309–334, fev. 2011.
- [63] S. Scalabrin *et al.*, «Physical mapping in highly heterozygous genomes: a physical contig map of the Pinot Noir grapevine cultivar», *BMC Genomics*, vol. 11, n.º 1, p. 204, mar. 2010.
- [64] S. Riaz, A. C. Tenscher, D. W. Ramming, e M. A. Walker, «Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding», *Theor Appl Genet*, vol. 122, n.º 6, pp. 1059–1073, abr. 2011.
- [65] L. Costantini, A. Monaco, J. F. Vouillamoz, M. Forlani, e M. S. Grando, «Genetic relationships among local *Vitis vinifera* cultivars from Campania (Italy)», *VITIS - Journal of Grapevine Research*, vol. 44, n.º 1, pp. 25–25, 2005.
- [66] J. María Ortiz *et al.*, «Molecular and morphological characterization of a Vitis gene bank for the establishment of a base collection», *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 51, n.º 4, pp. 403–409, jun. 2004.
- [67] M. S. Lopes, K. M. Sefc, E. Eiras Dias, H. Steinkellner, M. Laimer Câmara Machado, e A. Câmara Machado, «The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection», *Theor Appl Genet*, vol. 99, n.º 3, pp. 733–739, ago. 1999.
- [68] M. Rossetto, J. McNally, e R. J. Henry, «Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae», *Theor Appl Genet*, vol. 104, n.º 1, pp. 61–66, jan. 2002.
- [69] M. M. Veloso, «Microsatellite database of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars used for wine production in Portugal», 2010.
- [70] E. Maul e R. Töpfer, «*Vitis* International Variety Catalogue (V IVC): A cultivar database referenced by genetic profiles and morphology», *BIO Web of Conferences*, vol. 5, p. 01009, 2015.
- [71] G. H. Reed e C. T. Wittwer, «Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis», *Clin Chem*, vol. 50, n.º 10, pp. 1748–1754, out. 2004.
- [72] C. T. Wittwer, «High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations», *Human Mutation*, vol. 30, n.º 6, pp. 857–859, 2009.
- [73] R. H. A. M. Vossen, E. Aten, A. Roos, e J. T. den Dunnen, «High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening», *Human Mutation*, vol. 30, n.º 6, pp. 860–866, 2009.

- [74] J. F. Mackay, C. D. Wright, e R. G. Bonfiglioli, «A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars», *Plant Methods*, vol. 4, n.º 1, p. 8, mai. 2008.
- [75] E. A. Tindall, D. C. Petersen, P. Woodbridge, K. Schipany, e V. M. Hayes, «Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments», *Human Mutation*, vol. 30, n.º 6, pp. 876–883, 2009.
- [76] V. Di Rienzo *et al.*, «A reliable analytical procedure to discover table grape DNA adulteration in industrial wines and musts», *Acta Hort.*, n.º 1188, pp. 365–370, nov. 2017.
- [77] M. Awad, P. Mylona, e A. Polidoros, «Grapevine Phenological Quantitative Trait SSR Genotyping Using High-Throughput HRM-PCR Analysis», *PHYTON*, vol. 89, n.º 4, pp. 905–923, 2020.
- [78] M. Lodhi, G.-N. Ye, N. Weeden, e B. Reisch, «A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species», *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 12, pp. 6–13, jan. 1994.
- [79] OIV General Assembly, «Oiv Protocol for Identification of Varieties». [Online]. Disponível em: <https://www.oiv.int/public/medias/6886/oiv-viti-609-2019-en.pdf>
- [80] T. C. Lorenz, «Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies», *J Vis Exp*, n.º 63, p. 3998, mai. 2012.
- [81] M. Murray e W. Thompson, «Rapid isolation of higher weight DNA», *Nucleic acids research*, vol. 8, pp. 4321–5, nov. 1980.
- [82] S. Oddou-Muratorio, G. G. Vendramin, J. Buiteveld, e B. Fady, «Population estimators or progeny tests: what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci?», *Conservation Genetics*, vol. 10, n.º 5, Art. n.º 5, 2009.
- [83] J. Carlsson, «Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing», *Journal of Heredity*, vol. 99, n.º 6, pp. 616–623, nov. 2008.
- [84] IVBAM, «IVBAM, IP-RAM, Inventário do Potencial Vitícola 2022/2023». 2023 de 2022.
- [85] Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro, «Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território», *Diário da República n.º 226/2012, Série I de 2012-11-22, páginas 6712 - 6715*, 2012.
- [86] G. Jahnke, J. Smidla, T. Deák, R. Oláh, B. Á. Szöke, e D. Á. Nyitrainé Sárdy, «The SSR Null Allele Problem, and Its Consequences in Pedigree Reconstruction and Population Genetic Studies in Viticulture», *Horticulturae*, vol. 8, n.º 7, p. 658, jul. 2022.
- [87] G. Carrier *et al.*, «Transposable elements are a major cause of somatic polymorphism in *Vitis vinifera* L.», *PLoS One*, vol. 7, n.º 3, p. e32973, 2012.
- [88] E. Cretazzo, P. Moreno Sanz, S. Lorenzi, M. L. Benítez, L. Velasco, e F. Emanuelli, «Genetic Characterization by SSR Markers of a Comprehensive Wine Grape Collection Conserved at Rancho de la Merced (Andalusia, Spain)», *Plants (Basel)*, vol. 11, n.º 8, p. 1088, abr. 2022, doi: 10.3390/plants11081088.
- [89] J. Cunha, M. Teixeira Santos, P. Fevereiro, e J. Eiras-Dias, «A riqueza desconhecida das populações de vinha selvagem (*VITIS VINIFERA* L. SUBSP. *SYLVESTRIS*) do Alentejo», mai. 2010.
- [90] J. P. Martín, J. Borrego, F. Cabello, e J. M. Ortiz, «Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers», *Genome*, vol. 46, n.º 1, pp. 10–18, fev. 2003.
- [91] Gonçalves F., *Portugal País Vinícola.*, Editora Portuguesa de Livros Técnicos e Científicos, Lda. Lisboa. 269 pp. 1983.
- [92] M. K. Aradhya *et al.*, «Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L.», *Genet Res*, vol. 81, n.º 3, pp. 179–192, jun. 2003.

- [93] M. Słomka, M. Sobalska-Kwapis, M. Wachulec, G. Bartosz, e D. Strapagiel, «High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping-Limitations and Caveats in Practical Case Studies», *Int J Mol Sci*, vol. 18, n.º 11, p. 2316, nov. 2017.
- [94] J. L. Montgomery, L. N. Sanford, e C. T. Wittwer, «High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics», *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 10, n.º 2, pp. 219–240, mar. 2010.
- [95] G. H. Reed, J. O. Kent, e C. T. Wittwer, «High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics», *Pharmacogenomics*, vol. 8, n.º 6, pp. 597–608, jun. 2007.
- [96] M. R. Thomas e N. S. Scott, «Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs)», *Theoret. Appl. Genetics*, vol. 86, n.º 8, pp. 985–990, set. 1993.
- [97] M. Liew *et al.*, «Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons», *Clinical Chemistry*, vol. 50, n.º 7, pp. 1156–1164, jul. 2004.

7. Anexos

7.1 Extração de DNA

7.1.1 Preparação de soluções

Soluções:

Tampão de Extração (100 mL)	<ul style="list-style-type: none">• 20 nM, Na EDTA (pH 8,0)• 100 nM, Tris-HCl (pH 8,0)• 1,4 M, NaCl• 2%, CTAB• 2%, PVP• 0,2%, β-Mercaptoetanol• H₂O destilada esterilizada <p>- Adicionar na ordem descrita.</p> <p>- Após adição de todas as soluções, agitar o tubo invertendo gentilmente.</p>
Tampão TE (pH 8,0):	<ul style="list-style-type: none">• 10 nM, Tris-HCl (pH 8,0)• 1 nM, Na EDTA (pH 8,0)
Na EDTA 0,5 M (pH 8,0) (100 mL)	<ul style="list-style-type: none">• 18,612 g Na EDTA• 2 g NaOH <p>- Utilizar agitador magnético e aquecimento para dissolver.</p> <p>- Dissolver em H₂O destilada (cerca de 2/3 do volume final).</p> <p>- Ajustar o pH (8,0) com NaOH autoclavado.</p> <p>- Perfazer o volume com H₂O destilada.</p> <p>- Autoclavar.</p>
Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (100 mL)	<ul style="list-style-type: none">• 12,114 g Tris (Trizma) <p>- Dissolver em H₂O destilada (cerca de 2/3 do volume final).</p> <p>- Ajustar o pH (8,0) com HCl autoclavado</p> <p>- Perfazer o volume com H₂O destilada.</p> <p>- Autoclavar.</p>
NaCl 5 M (100 mL)	<ul style="list-style-type: none">• 29,22 g NaCl <p>- Utilizar agitador magnético e aquecimento para dissolver.</p> <p>- Dissolver em H₂O destilada (cerca de 2/3 do volume final).</p> <p>- Perfazer o volume com H₂O</p>

	- Autoclavar
CTAB 10% (100 mL)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 g CTAB - Dissolver em banho-maria 60 °C, com H ₂ O destilada <u>autoclavada</u> (cerca de 2/3 do volume final). - Perfazer o volume com H ₂ O destilada <u>autoclavada</u> - Guardar a 37 °C
PVP 10% (100 mL)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 g PVP - Utilizar agitador magnético e aquecer para dissolver (necessita de muito aquecimento), com H ₂ O destilada autoclavada (cerca de 2/3 do volume final). - Perfazer o volume com H ₂ O destilada autoclavada
Clorofórmio: Octanol 24:1 (v/v) (100 mL)	<ul style="list-style-type: none"> • 24 partes de clorofórmio (96 ml) • 1 parte de octanol (4 ml) - Trabalhar na hotte. - Guardar a solução em temperatura inferior a 23 °C, tapada da luz com folha de alumínio e na vertical.

7.1.2 Protocolos de extração

Protocolo A (ISOPlexis)

(Yeates, Gillings, Davison, Altavilla, & Veal, 1998) – Adaptado.

1. Autoclavar tubos de epp com areia (\pm 0.25 g por tubo).
2. Misturar 400 μ L de tampão de extração com 0,25 g de material vegetal (peso seco) e levar ao vortéx por 10 minutos (tubos ao contrário).
3. Adicionar 25 μ L de SDS (10%) e levar ao vortéx por 5 seg.
4. Incubar as amostras durante 1 h em banho-maria a 65° C.
5. Centrifugar por 10 min a 13 000 rpm.
6. Recolher o sobrenadante para um novo tubo.
7. Utilizar o pellet para re-extrair DNA seguindo as etapas 2 e 3, incubar a 65° C por 10 min e seguidamente centrifugar por 10 min a 13 000 rpm.
8. Juntar os sobrenadantes a 0,5 do volume de Polietileno glicol (30%) /cloreto de sódio (1,6 M) e incubar à temperatura ambiente por 2h.

9. Centrifugar por 20 min a 13 000 rpm, descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 140 μ L de TE. Deixar o pellet dissolver.
10. Adicionar 10 μ L de acetato de potássio (7,5 M) (concentração final de 0,5 M).
11. Transferir as amostras para o frigorífico (4° C) e deixar por 5 min.
12. Centrifugar por 30 min a 13 000 rpm, de modo a precipitar proteínas e polissacarídeos.
13. Passar o sobrenadante para um novo tubo.
14. Extrair a fase aquosa com 1 volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 - agitar sempre a solução). Misturar suavemente e centrifugar por 15 min a 5.000 rpm. Utilizar a hote.
15. Recolher o sobrenadante para um novo tubo.
16. Precipitar o DNA com 1,5 volume de etanol absoluto overnight a -20°C.
17. No outro dia, centrifugar por 30 min a 13 000 rpm, descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 25 μ L TE. Deixar dissolver durante algumas horas a 4°C, unir as amostras (replicados) em um único epp e armazenar a -20°C.

Protocolo B (Rodrigues [20])

(Lodhi *et al.* 1994) – Adaptado.

1. Num almofariz triturar 10 mg de folhas jovens com azoto líquido (-80°C).
2. Colocar o tecido triturado em tubos eppendorf de polipropileno de 15 mL. Colocar no gelo.
3. Realizar um spin, de forma a misturar todos os compostos e vai a incubar a 60 °C, em banho-maria, por 25 minutos. Deixar arrefecer à temperatura ambiente.
4. Adicionar 12 mL de clorofórmio: álcool isomílico e agitar os tubos (spin) até se formar uma emulsão.
5. Centrifugar a 6.000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente.
6. Transferir o sobrenadante para tubos eppendorf e adicionar 6 mL de clorofórmio:álcool isomílico. Realizar um spin.
7. Centrifugar a 6.000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente.
8. Transferir o sobrenadante para novos tubos eppendorf e adicionar 0,5 volumes de 5M NaCl à solução resultante dos passos anteriores e misturar.
9. Adicionar 2 volumes de etanol a 95% frio (-20 °C) e refrigerar (4 a 6 °C) por 15 a 20 minutos até começarem a aparecer as cadeias de DNA.
10. Centrifugar a 3.000 rpm durante 3 minutos, aumentar a velocidade para 5.000 rpm por mais 3 minutos.
11. Decantar o sobrenadante a lavar o pellet com etanol 76% frio (0 a 4 °C).

12. Remover o etanol do pellet sem secar o DNA deixando os tubos descobertos a 37 °C durante 20 a 30 minutos.
13. Dissolver em 200 a 300 µL de TE
14. Ressuspender com 1µL de RNase A por 100µL de solução de DNA e incubar a 37 °C por 15 minutos.
15. Guardar o DNA a – 70 °C, se por um período longo, ou a 20 °C, por um período curto.

Protocolo C (Lodhi *et al.* [78])

1. Collect unexpanded young leaves in liquid nitrogen or on ice and store at or below -70 °C until used. Grind 0.5 g of leaves using mortar and pestle in the presence of liquid nitrogen.
2. Add 5 mL of extraction buffer to the ground leaves and mix in the mortar
3. Pour the slurry into clean 15-mL polypropylene centrifuge tubes.
4. Add 50 mg polyvinylpyrrolidone (PVP), (Sigma, P6755) and invert the tubes several times to mix thoroughly with the leaf slurry; the final concentration of PVP is 100 mg/g leaf
5. Incubate at 60°C for 25 minutes and cool to room temperature.
6. Add 6 mL of chloroform-octanol and mix gently by inverting the tubes 20 to 25 times to form an emulsion.
7. Spin at 6.000 rpm for 15 minutes in a tabletop centrifuge at room temperature.
8. Transfer the top aqueous phase to a new 15-mL centrifuge tube with a wide-bore pipette tip. A second chloroform-octanol extraction may be performed if the aqueous phase is cloudy due to the presence of PVP.
9. Add 0,5 volume of 5M NaCl to the aqueous solution recovered from the previous step and mix well.
10. Add two volumes of cold (-20 °C 95% ethanol and refrigerate (4 to 6 °C for 15-20 minutes or until DNA strands begin to appear. The solution can be left for one hour or more if necessary.
11. Spin at 3.000 rpm for three minutes and then increase speed to 5.000 rpm for an additional three minutes at room temperature.
12. Pour off supernatant and wash pellet with cold (0 to 4 °C 76% ethanol. Completely remove ethanol without drying the DNA pellet by leaving the tubes uncovered at 37 °C for 20 to 30 minutes.
13. Dissolve in 200 to 300 µL TE.
14. Treat with 1 µL RNase A per 100 µL DNA solution and incubate at 37 °C for 15 minutes.
15. Quantify DNA in a spectrophotometer at A260.
16. Keep DNA at -70 °C for long-term or -20 °C for short-term storage.

Protocolo E

(Lodhi *et al.* 1994) – Adaptado

1. Num almofariz triturar 0,5 g de folhas jovens com azoto líquido (-80 °C).
2. Colocar o tecido triturado em tubos de polipropileno de 15 mL.
3. Adicionar 5 mL de tampão de extração e misturar no vórtex até obter uma emulsão.
4. Incubar a 60 °C, em banho-maria, por 25 minutos agitando ocasionalmente (5 em 5 min) os tubos para manter o extrato ressuspendido (usar peso sobre os tubos para não boiar). Deixar arrefecer à temperatura ambiente.
5. Adicionar 6 mL de clorofórmio: octanol (24:1) e agitar, invertendo os tubos gentilmente 20 a 25 vezes até se formar uma emulsão.
6. Centrifugar a 6.000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente (23 °C).
7. Transferir o sobrenadante (usando a pipeta) para novos tubos, adicionar 6 mL de clorofórmio: octanol (24:1), agitando gentilmente 20 a 25 vezes até se formar uma emulsão.
8. Centrifugar a 6.000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente.
9. Transferir o sobrenadante para novos tubos, adicionar 0,5 volumes de 5M NaCl à solução resultante dos passos anteriores e misturar bem sem ajuda do vórtex durante 30 segundos.
10. Adicionar 2 volumes de etanol a 96% frio (-20 °C) e agitar gentilmente, refrigerando (4 a 6 °C) por 1 hora (período de almoço, deixar no frigorífico do piso 2).
11. Centrifugar a 3.000 rpm durante 4 minutos, aumentar a velocidade para 5.000 rpm por mais 4 minutos.
12. Descartar o sobrenadante (não é necessário pipetar, só entornar os tubos gentilmente) e adicionar 500 µL de etanol 76% (não usar 70%) frio (0 a 4 °C) ao precipitado.
13. Centrifugar por 30 minutos a 7.000 rpm.
14. Remover o etanol do precipitado descartando a fase líquida e depois inverter os tubos sobre papel absorvente (piso 2). Tapar e levar para o piso 0.
15. Na estufa (piso 0), deixar os tubos descobertos a 37 °C, sem secar o DNA durante 30 minutos.
16. Dissolver em 50 µL de TE e agitar com pouca intensidade no vórtex, deixando à temperatura ambiente durante 30 min
17. Ressuspender com 0,5 µL de RNase A em 50 µL (razão de 1 µL por 100 µL de solução de DNA) e incubar a 37 °C por 15 minutos
18. Realizar limpeza da amostra com kit de purificação de DNA
19. Guardar o DNA a -70 °C, se por um período longo, ou a -20 °C, por um período curto.

7.1.3 Eletroforese em gel de agarose

Preparação do gel de agarose a 1,5 %:

1. Com uma proveta graduada de 100 mL, meça 100 mL de tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato pH 8, 1 mM EDTA)
2. Pese 1,5 g de agarose (Molecular grade)
3. Junte a agarose e o TAE 1X num erlenmeyer de 200 mL
4. Leve a solução à ebulição no micro-ondas, agitando ocasionalmente, até dissolver a agarose
5. Deixe arrefecer até ± 55 °C e agite levemente.
6. Verta o gel no suporte devidamente preparado, com as borrachas e o pente, e deixe solidificar completamente (+- 20 min)
7. Cuidadosamente, retire o pente do gel solidificado e coloque o gel na tina de eletroforese imerso em TAE 1X. Observação: O DNA tem carga negativa, pelo que a eletroforese corre do pólo negativo para o pólo positivo

Verificação dos produtos de PCR em gel de agarose:

1. Utilizando uma micropipeta, carregue numa placa de PCR, 4 μ L de GelRed com o número de amostras a utilizar.
2. Adicione 5 μ L de amostra do produto de PCR fazendo ressuspensão.
3. Carregue o gel de agarose com o preparado anterior e coloque cada amostra em cada poço.

7.1.4 Revelação dos géis para os 9 loci

