



**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE INTRAVARIETAL
NA VARIEDADE ANTIGA DE VIDEIRA ‘GOUVEIO’
POR ANÁLISE DE CARACTERÍSTICAS
DE QUALIDADE DO MOSTO, RENDIMENTO
E DE CARACTERIZAÇÃO CITOGENÓMICA**

João Miguel Vieira Tavares

**Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica**

Orientadores: Professora Doutora Elsa Maria Félix Gonçalves

Professor Doutor Pedro Manuel Vieira Talhinhos

Júri:

Presidente: Doutor Carlos Manuel Antunes Lopes, Professor associado com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Ana Cristina Riepenhausen Delaunay Caperta, Professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Elsa Maria Félix Gonçalves, Professora auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora.

2024

Agradecimentos

Quero agradecer especialmente aos meus professores orientadores, Elsa Gonçalves e Pedro Talhinhos, pela sua disponibilidade e prontidão, toda a ajuda concedida, o gosto contagiante que nutrem pelas suas áreas de interesse, o seu carinho e simpatia, e acima de tudo, louvar as excelentes pessoas que são. Sem eles nada disto seria possível. Queria salientar o incrível esforço que ambos investem da sua pessoa em prol da educação, demonstrando uma elevada profissionalidade e dedicação no decurso de todas as suas aulas e de todo o seu trabalho.

Agradecer a toda a equipa de genética quantitativa e melhoramento de plantas do Instituto Superior de Agronomia, pelo trabalho, entajuda e simpatia ao longo do trabalho de campo realizado e durante a escrita da dissertação. Nomeadamente, ao Professor Antero Martins, Teresa Pinto, David Faísca, Sónia Surgy, João Coelho e Susana Pina. Toda a ajuda deste grupo de pessoas contribuiu de forma plena para o trabalho aqui apresentado.

Agradecer mais uma vez ao David Faísca e à Joana Soares, técnica de laboratório do setor da enologia, por todo o apoio, conhecimento transmitido e pela inclusão e bom ambiente prestado ao longo de todo o trabalho de laboratório.

Por último, e não menos importante, gostaria de agradecer ao Instituto Superior de Agronomia por ter sido como uma casa ao longo de todo o meu percurso académico e ter sido responsável por grande parte do conhecimento que hoje trago comigo.

Uma última nota para a PORVID e para todo o seu trabalho louvável na conservação e seleção de inúmeros génotipos de videira de variedades autóctones e divulgação do mesmo com os estudantes e com aqueles poderão contribuir positivamente para este projeto. Certamente que o trabalho aqui realizado, assim como noutras instituições que se regem pelos mesmos princípios, assegurarão o futuro do setor vitivinícola em Portugal.

Resumo

Em Portugal, a videira tem sofrido diversos fenómenos de erosão genética, pelo que a conservação e estudo da sua variabilidade genética tomam elevada relevância. A variabilidade intravarietal em videira constitui uma fonte de diversidade genética importante para a seleção. A variedade 'Gouveio' acumulou ao longo dos anos uma elevada variabilidade intravarietal em características quantitativas quando comparada com outras variedades de videira.

A existência de variabilidade intravarietal tem sido alvo de diversos estudos, para os quais a eficiência do delineamento experimental tem-se mostrado imprescindível para a sua correta avaliação. Por outro lado, a relação entre o tamanho do genoma e a existência de variabilidade intravarietal não se encontra amplamente estudada. A variabilidade citogenómica, potencialmente causada por transposões e elementos repetitivos do DNA, poderá refletir-se na variabilidade genética intravarietal.

Avaliou-se a variabilidade genética intravarietal na casta 'Gouveio' relativamente ao rendimento, peso do bago e características de qualidade do mosto, as quais mostraram, para um nível de significância de 0,05, a existência de variabilidade intravarietal significativa. Foi também avaliada a variabilidade citogenómica, através de citometria de fluxo, não tendo sido encontrada variabilidade intravarietal significativa para qualquer nível de significância usual. O tamanho médio do genoma desta casta foi de 1,29 pg/2C. Os resultados apontam para uma possível hipótese de considerar que as diferenças genéticas existentes entre os clones deverão ser a mutações pontuais em certos genes e não a transposões, sequências repetitivas do DNA e outros fatores que afetam o tamanho do genoma.

Através da realização de um estudo metodológico para avaliar a influência do número de repetições do delineamento experimental na quantificação da variabilidade genética intravarietal e na eficiência da seleção, conclui-se que para a avaliação do rendimento, peso do bago e acidez total pelo menos quatro repetições deverão ser usadas e para o teor de sólidos solúveis, no mínimo, três repetições.

Palavras-chave: Variabilidade intravarietal, delineamento experimental, características quantitativas, tamanho do genoma, citometria de fluxo.

Abstract

In Portugal, the grapevine has significant economic interest. However, it has undergone genetic erosion, making the conservation and study of its genetic variability highly relevant. Intravarietal variability in grapevine constitutes an important source of genetic diversity for breeding and selection programmes. Over the years, the ancient variety 'Gouveio' has accumulated a high level of intravarietal variability in quantitative traits when compared to other grapevine varieties in Portugal.

The existence of intravarietal variability has been the subject of various studies, for which the presence of criterious experimental designs has proven essential to provide a reliable assessment of quantitative traits. On the other hand, the correlation between genome size and the existence of intravarietal variability has not been widely studied. The existence of this cytogenomic variability, potentially caused by transposons and repetitive DNA elements, could be reflected on intravarietal genetic variability.

In this context, intravarietal genetic variability was analyzed in 'Gouveio' regarding quantitative traits such as yield, berry weight, and must quality characteristics, which showed significant intravarietal genetic variability ($p\text{-value} < 0.001$). Cytogenomic variability was also evaluated through flow cytometry, resulting on an average genome size of this variety at 1.29 pg/2C, with no significant intravarietal variability found ($p\text{-value} > 0.05$). These results may suggest the hypothesis that the genetic differences between the different clones are due to point mutations in certain genes and not to transposons, repetitive DNA sequences, or other factors that affect genome size.

Carrying out a methodological study on the experimental design to evaluate the influence of the number of repetitions in quantifying intravarietal genetic variability and selection efficiency, it is concluded that for the evaluation of yield, berry weight and total acidity at least four repetitions must be used and for the soluble solids content, at least, three repetitions.

Keywords: intravarietal variability, experimental designs, quantitative traits, genome size, flow cytometry.

Índice

1.	Introdução.....	8
1.1	Variabilidade intervarietal e intravarietal em <i>Vitis vinifera</i>	11
1.2.	Delineamento experimental – importância, características e modelos existentes	15
1.3.	Citometria de fluxo como ferramenta para avaliar a variabilidade citogenómica	16
1.4.	Objetivos do trabalho	24
2.	Materiais e Métodos.....	25
2.1.	Localização, configuração do ensaio e climatologia da região.....	25
2.2.	Material Vegetal.....	27
2.2.1.	Colheita de amostras.....	27
2.2.2.	Conservação das amostras de folhas e de bagos.....	29
2.3.	Métodos	30
2.3.1.	Análise citogenómica e quantificação do DNA nuclear.....	30
2.3.2.	Avaliação do rendimento da casta ‘Gouveio’.....	33
2.3.3.	Avaliação do peso do bago e de características de qualidade do mosto (pH, teor de sólidos solúveis e acidez total).....	34
2.3.4.	Análise estatística dos dados de características quantitativas e citogenómicas	36
3.	Resultados e Discussão.....	40
3.1.	Avaliação da variabilidade intravarietal de características quantitativas.....	40
3.2.	Estudo metodológico sobre o efeito do número de repetições do ensaio na avaliação de características quantitativas	42
3.3.	Avaliação da variabilidade intravarietal através da análise de características citogenómicas	46
4.	Conclusão.....	52
	Referências.....	54
	Anexo	63

Índice de quadros

Quadro 1 - Tampões mais utilizados para preparação de suspensões de núcleos	19
Quadro 2 - Lista de alguns padrões de origem vegetal utilizados atualmente em citometria de fluxo e respetivo método de calibração e padrão primário utilizado	23
Quadro 3 - Listagem dos clones analisados no ensaio de seleção da casta 'Gouveio'	28
Quadro 4 – Lista de todas as combinações possíveis de repetições resolúveis para ensaios simulados com quatro, três e duas repetições a partir da situação original com cinco repetições.....	38
Quadro 5 - Resultados do ajustamento do modelo linear misto aos dados das características quantitativas avaliadas na variedade 'Gouveio'	41
Quadro 6 - Estudo metodológico relativo ao número de repetições do ensaio.....	43
Quadro 7 – Resultados da citometria de fluxo referentes à amostra do clone GV0605 e do padrão utilizado	46
Quadro 8 – Resultados do ajustamento do modelo linear misto aos dados do tamanho do genoma na variedade 'Gouveio'	50

Índice de figuras

Figura 1 - Ensaio de seleção da casta 'Gouveio', em Pegões, segundo o delineamento experimental linha coluna resolúvel (RCD).....	25
Figura 2 – Precipitação total, média mensal das temperaturas mínima, média e máxima registadas de agosto de 2022 a agosto de 2023 na estação meteorológica situada na PORVID, Pegões.	26
Figura 3 - Cartografia do solo no ensaio de seleção da casta 'Gouveio', segundo a classificação dos solos de Portugal.	27
Figura 4 - Recolha de amostras; a - Colheita de folhas jovens da casta 'Gouveio' em estado de crescimento vegetativo, nos blocos completos 3, 4 e 5; b - Colheita de bagos da casta 'Gouveio' em todos os blocos completos do ensaio.....	29
Figura 5 - Preparação das suspensões de núcleos de <i>V. vinifera</i> e <i>S. lycopersicum</i> para posterior leitura no citómetro de fluxo.....	31
Figura 6 – Estratégia de gating utilizada na determinação do tamanho do genoma em amostras de <i>Vitis vinifera</i> em citometria de fluxo.	32
Figura 7 - Pesagem de cachos, de cada unidade experimental, para determinação do rendimento dos diferentes clones da casta 'Gouveio'	34
Figura 8 - Medição do pH (a) e do teor de sólidos solúveis (grau brix) (b), a partir do mosto de cada clone em cada bloco completo, através de um potenciómetro e de um refratómetro digital, respetivamente.....	35
Figura 9 - Titulação ácido-base das amostras previamente preparadas em gobelés de 50 mL, com NaOH 0,1 M, (a) e (b).	36
Figura 10 – Variações percentuais dos indicadores RB e RMSE associados às estimativas de heritabilidade em sentido lato (H^2) para o rendimento, peso do bago, pH, teor de sólidos solúveis e acidez total.	44
Figura 11 - Variações percentuais dos indicadores RB e RMSE associados às estimativas do coeficiente de variação genotípico (CV_G) para o rendimento, peso do bago, pH, teor de sólidos solúveis e acidez total.	44
Figura 12 - Análise citogenómica realizada a partir de citometria de fluxo. Histogramas da intensidade de fluorescência relativa (FL1) [(a), (c) e (e)] e gráficos de pontos da difusão lateral da luz (SSC) versus FL1 [(b), (d) e (f)], obtidos através do isolamento simultâneo de núcleos da amostra em estudo, <i>Vitis vinifera</i> 'Gouveio', e <i>Solanum lycopersicum</i> 'Stupické' (standard, 2C = 1,96pg), corados com iodeto de propídio..	48
Figura 13 – Média e respetivo desvio padrão do tamanho do genoma observado nos diferentes clones da casta 'Gouveio' nos blocos completos 3, 4 e 5.....	49

1. Introdução

A videira, *Vitis vinifera*, é uma das culturas hortofrutícolas economicamente mais importantes a nível nacional. Desde o início dos anos 2000, Portugal tem sofrido ligeiros acréscimos e decréscimos na sua produção vinícola, tendo na última campanha, 2023, registado um valor de produção total de 6,85 milhões de hectolitros de vinho, colocando Portugal em 10º lugar no *ranking* mundial dos países com maior produção de vinho (IVV, 2023).

Vitis vinifera pertence à família *Vitaceae* que contém cerca de 60 espécies selvagens de *Vitis* hibridizáveis entre si. Estas estão distribuídas por zonas subtropicais, mediterrânicas e continentais da Ásia, América do Norte e Europa, onde o clima temperado é predominante (Terral et al., 2010). A maior parte das videiras que são utilizadas para se obter uva de mesa, passas, sumo e predominantemente vinho, são classificadas como *Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera* que deriva do seu parente selvagem *V. vinifera* subsp. *sylvestris*.

A videira selvagem, *V. vinifera* subsp. *sylvestris*, terá sido originária do centro de diversidade genética do Mediterrâneo e Médio-Oriente. Atualmente, a sua distribuição encontra-se altamente fragmentada devido à pressão antropogénica e aos agentes patogénicos provenientes da América do Norte no séc. XIX, estando distribuída desde a Europa Ocidental até à zona mais a Sul do Cáucaso e na bacia mediterrânica (Arnold et al., 1998).

O cultivo e domesticação desta espécie terá ocorrido entre 7000 e 4000 anos A.C. na área geográfica entre o Mar Negro e o Irão, próximo ao monte Ararate, no Cáucaso. Posteriormente, ainda que esta espécie tenha sido dispersa pela mão do Homem e multiplicada vegetativamente, foi acumulando progressivamente diversidade genética, dando origem a centros de domesticação secundária em torno da bacia mediterrânea. A sua dispersão não é consensual entre os investigadores. Segundo Grassi & Lorenzis (2021), a primeira rota de dispersão ocorreu do monte Ararate para a Mesopotâmia, Egito e Grécia, na idade do bronze. Uma rota alternativa a esta sugere que a videira tenha chegado à Grécia através da Anatólia. A segunda rota de dispersão terá ocorrido da Grécia para o sul de Itália (Sicília), França (Marselha) e Espanha, sob influência dos Gregos, Etruscos e Fenícios. A terceira rota terá partido de França para o norte da Europa através dos rios Ródano, Reno e Danúbio, sob influência do império Romano. Todos estes processos secundários de domesticação conduziram a populações altamente heterogéneas.

Outras espécies do género *Vitis* são também importantes no mundo vitivinícola. Após a grande praga de filoxera do séc. XIX, proveniente dos EUA, e que resultou na destruição de inúmeras vinhas em França e por toda a Europa, foi proposta a enxertia em porta-enxertos de videiras americanas, como *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. berlandieri*. Desde então, o uso de porta-enxertos

resistentes foi amplamente utilizado até aos dias de hoje como forma de combate biológico não só à filoxera, mas também a outros patogénios como nemátodes, e como resposta a vários tipos de stresse abiótico como a seca, salinidade, calcário excessivo e problemas de nutrição mineral (Ollat et al., 2016).

Vitis vinifera conta com um elevado número de variedades autóctones em Portugal, cerca de 250 (IVV, 2016), que expressam características intrínsecas únicas específicas no *terroir* onde são cultivadas. Estas variedades apresentam uma elevada variabilidade genética entre si, sendo esta visível pela diversidade das características químicas, morfológicas e no ciclo vegetativo e reprodutivo expresso em cada variedade. Os parâmetros ampelográficos podem não ser rigorosos o suficiente para serem utilizados como identificadores de castas, pelo que, quando necessário, são utilizados métodos de biologia molecular (marcadores moleculares) para sua identificação. Estes têm demonstrado apetência para a descoberta de novas variedades, quando o perfil do genótipo não corresponde com nenhum perfil presente na base de dados (Augusto et al., 2021; Gonçalves et al., 2023).

A casta 'Gouveio' é uma casta autóctone portuguesa profícua na região do Douro e Trás-os-Montes, encontrando-se disseminada por todo o território nacional, inclusivé no Alentejo. Trata-se de uma casta medianamente generosa nos rendimentos, com uma época de maturação média/temporã, de fácil condução, sensível ao oídio e às chuvas tardias, com boa resiliência a diversos tipos de solo e clima e de fácil adaptação aos porta-enxertos habituais, produzindo assim cachos médios e compactos que produzem uvas pequenas de cor verde-amarelada (IVV, 2016). É também denominada por 'Godello' na região da Galiza, onde é amplamente cultivada, e erroneamente denominada por 'Verdelho', por isso muitas vezes confundida com a casta 'Verdelho' cultivada nos Açores e na Madeira.

O 'Gouveio' poderá integrar vinhos monovarietais sendo mais comum a sua integração em lotes com castas como o 'Alvarinho', 'Arinto', 'Viosinho', 'Antão Vaz', entre outras. A casta 'Gouveio' caracteriza-se por ter um excelente equilíbrio entre acidez e açúcar, permitindo assim uma boa evolução em garrafa; uma boa graduação alcoólica; e uma boa estrutura, com aromas frutados e intensos (IVV, 2016).

Através do estudo da variabilidade genética das espécies, é possível traçar uma linha cronológica da sua evolução e notar o modo de como a conservação tem um papel preponderante na fixação de certos genótipos para a estabilidade da espécie.

Nos principais países vitivinícolas a videira tem sofrido ao longo dos anos um fenómeno de erosão genética no decurso do seu processo evolutivo, em parte, derivado da preferência para a utilização de variedades de videira amplamente conhecidas, não promovendo castas autóctones de cada região, levando assim a um afunilamento que conduz a perda de

diversidade intervarietal e de identidade em muitas regiões vitícolas. Ademais, a elevada variabilidade intravarietal tem sido comprometida através de certas práticas, nomeadamente, a generalização da seleção com base genética estreita, focada no clone; enxertos prontos derivados de parcelas homogêneas, ao invés de enxertia de campo com garfos de diversas origens; e leis de certificação que tendem a favorecer a utilização de material homogêneo (Gonçalves & Martins, 2022a).

Todas as medidas anunciadas acima prejudicam a diversidade e conduzem ao afunilamento genético desta espécie. Deste modo, deve existir uma preocupação acrescida, por parte do selecionador, de selecionar clones de menor sensibilidade à interação genótipo x ambiente (o que implica a existência de ensaios em vários ambientes), de menor suscetibilidade a diversos fatores bióticos e abióticos e de descrever convenientemente as características do material selecionado. Ainda assim, subsiste sempre o risco de um certo clone possuir um comportamento insatisfatório em certos ambientes. De maneira a contornar este problema, devem ser adotadas estratégias, como por exemplo, a utilização de pelo menos sete clones distintos de cada casta e a utilização de material policlonal (mistura equilibrada de 7-20 clones) com um comportamento acentuadamente mais estável (Martins & Gonçalves, 2015).

A preservação da diversidade e variabilidade genética de *V. vinifera* é de extrema importância e relevância para o setor da vinha e do vinho. Quanto maior for a diversidade intravarietal, maiores são os ganhos obtidos a partir de seleção e maior é a capacidade de uma dada variedade responder favoravelmente aos desafios presentes e futuros da viticultura (Gonçalves & Martins, 2022a).

Os programas de seleção da videira requerem o entendimento de processos de genética quantitativa para estudo das características quantitativas que são determinadas por vários genes de efeitos aditivos sem dominância interalélica (Falconer, 1960) e que correspondem às características de maior interesse económico no melhoramento vegetal. Estas, ao contrário das características qualitativas, são altamente influenciadas pelo ambiente. De forma simplificada, o valor fenotípico (P):

$$P = G + E$$

onde “G” corresponde ao valor genotípico e “E” aos desvios ambientais.

Das mais variadas características quantitativas importantes para se realizar seleção em *V. vinifera*, o rendimento e o peso do bago, assim como características de qualidade do mosto (pH, teor de sólidos solúveis e acidez total) representam uma fatia importante de características a serem avaliadas de maneira a se obter uma boa produtividade na vinha e uma boa qualidade do vinho produzido, respetivamente.

O pH e a acidez total resultam de medições dos vários ácidos existentes (ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, entre outros), assim como das suas concentrações presentes em solução. Deste modo, cada valor de pH e acidez total obtido pode resultar de diferentes combinações de ácidos que poderão originar os mesmos valores para estas duas características (Boulton et al., 1999).

O equilíbrio entre o pH e a acidez total representa um aspeto importante na produção de vinho e na sua estabilidade. Em determinadas situações, durante o processo de vinificação, as condições de desenvolvimento e maturação do mosto, assim como a presença microbiana, podem levar a desequilíbrios na acidez dos vinhos, sendo necessário por vezes a adição de corretivos de modo a garantir os valores desejados (Boulton et al., 1999).

Ainda que, ao longo de todo o processo de produção vinícola os valores de pH e de acidez total sejam alterados, é de fomentar a importância da análise destes valores no mosto como ponto de partida no processo de produção.

O grau brix indica o teor de sólidos solúveis (TSS), isto é, a quantidade de açúcares, maioritariamente sacarose, que está presente nos bagos das uvas. Este valor é lido usualmente antes da vindima, cujos valores deverão estar entre 19 e 25 graus brix, e durante o processo de vinificação, de modo a controlar o trabalho das leveduras no processo de fermentação. Assim, o grau brix determinará diretamente o potencial alcoólico e consequentemente o equilíbrio e o “perfil sensorial” do vinho produzido.

1.1 Variabilidade intervarietal e intravarietal em *Vitis vinifera*

A diversidade genética existente nas diferentes variedades de *V. vinifera* possui um elevado interesse pelo carácter histórico e distinto que atribui ao setor vitivinícola. A esta variabilidade encontrada entre variedades chamamos diversidade intervarietal, a qual tem sido alvo de inúmeros estudos e programas de caracterização, identificação e preservação em alguns institutos, nomeadamente no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, o qual possui uma coleção ampelográfica onde se encontram preservadas inúmeras castas portuguesas e estrangeiras devidamente caracterizadas enologicamente e ampelograficamente, através de descritores internacionais elaborados pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) e por microssatélites (Velooso et al., 2010).

Para além da diversidade intervarietal, existe outro tipo de diversidade, não menos importante, que existe dentro de cada variedade, a diversidade intravarietal. As diferenças genéticas responsáveis por este tipo de variabilidade aumentaram e divergiram devido a mutações no

genoma das células somáticas (variação somaclonal), que ocorrem aleatoriamente ao longo do seu ciclo de vida, alterando a informação genética de certos *loci* e, assim, podendo interferir benéficamente, ou não, com a transcrição de certos genes de interesse (Lorenzis et al., 2017).

No decurso do processo evolutivo, o tamanho do genoma nos eucariotas tem sofrido variações no seu tamanho, não apenas devido a mutações somáticas. Estas variações devem-se também à quantidade de transposições e de elementos repetitivos do DNA, como *satellite* DNA e sequências repetitivas no DNA, apresentando um aumento do número de cópias em genomas de maior dimensão (Kidwell, 2002).

Segundo Wong et al. (2000), os mecanismos de mobilidade e inserção de transposições e elementos repetitivos apresentam diferentes padrões em animais e plantas. Nos animais, estes elementos são integrados nos intrões do DNA, ao contrário das plantas cujos elementos são integrados em regiões intergênicas e intragênicas.

Nas plantas, o tamanho do genoma, expresso em DNA nuclear, é extremamente variável, resultado também da presença de transposições e elementos repetitivos, variando entre 0,13 pg/2C DNA, para *Genlisea tuberosa*, e 328,12 pg/2C DNA para *Tmesipteris oblancoolata*, o maior genoma de entre todos os eucariotas (Fernández et al., 2024). Em genomas de pequena dimensão os transposições são responsáveis por uma variação de 3%, chegando a atingir os 85% em genomas de maior dimensão (Lee & Kim, 2014). Em *Arabidopsis thaliana*, estes polimorfismos acima descritos são responsáveis por 50% da variabilidade no seu genoma (Wang, 2011).

Os retrotransposições LTR, *long term repeat*, são o grupo de transposições mais abundantes nas plantas, sendo aqueles que mais contribuem para a variação dos valores de 1C DNA. Estes transposições podem estar localizados em regiões intergênicas ou inseridos num gene específico, influenciando assim a sua expressão (Galindo-González et al., 2017). De modo a evitar a amplificação descontrolada dos retrotransposições LTR, existem sistemas de controlo da atividade dos retrotransposições que contrabalançam a amplificação destes elementos e o consecutivo aumento do genoma, através de mecanismos de eliminação, com a recombinação entre LTRs e NHEJs, outro tipo de retrotransposições (Lee & Kim, 2014).

Todos estes fatores, transposições, sequências repetitivas e *satellite* DNA, poderão contribuir para a variabilidade existente em *V. vinifera*.

A partir da técnica de citometria de fluxo, têm sido desenvolvidos diversos estudos que visam um melhor entendimento da variação do tamanho do genoma (2C DNA) em diversas variedades de *V. vinifera* (González et al., 2022). Quanto à existência ou não de variabilidade

genética intravarietal em *V. vinifera*, detetada através de citometria de fluxo, a ausência de estudos comprova a necessidade de um maior foco nesta vertente.

A família *Vitaceae* conta com cerca de 1036 espécies (POWO, 2024) distribuídas por cinco tribos (*Ampelopsideae*, *Cisseae*, *Cayratieae*, *Parthenocisseae* e *Viteae*) reconhecidas por Wen et al., (2018) com base em análises filogenéticas e filogenómicas provenientes de material sequenciado. *Vitaceae* possui um tamanho de genoma de 1,61 pg/2C DNA, valor médio medido de uma amostra representativa de ca. 80 espécies (Chu et al., 2018; Lodhi & Reisch, 1995; Bai et al., 2012; Veselý et al., 2013). O genoma de menor dimensão desta família pertence a *Vitis vulpina* (tribo *Viteae*), com 0,62 pg/2C DNA, e o de maior dimensão a *Cyphostemma humile* (tribo *Cayratieae*), com 6,5 pg/2C DNA (Chu et al., 2018).

A partir da reconstrução do tamanho do genoma de um ancestral comum da família *Vitaceae* foi revelado que este possuía um tamanho relativamente pequeno (2C DNA = 1,70 pg) (Chu et al., 2018). A evolução do genoma ao longo dos anos nas espécies desta família tem sido caracterizada por uma redução do seu tamanho, verificada em 4 das 5 tribos acima descritas, *Ampelopsideae* (2C DNA = 1,14 pg), *Cisseae* (2C DNA = 1,30 pg), *Parthenocisseae* (2C DNA = 1,08 pg), *Viteae* (2C DNA = 1,20 pg). Em contraste, o clade *Cayratieae* foi o único que apresentou uma aparente acumulação de DNA (2C DNA = 2,92 pg). Estas alterações do tamanho do genoma poderão ser justificadas pela mobilidade de transposões e rearranjos cromossómicos. Recentemente, a poliploidização tem-se verificado como um fator que contribui para um aumento do tamanho do genoma, especialmente em algumas espécies do género *Cissus* (tribo *Cisseae*), como *C. tuberosa*, *C. discolor*, *C. rotundifolia* e *C. javana* (Chu et al., 2018).

Os primeiros estudos de variabilidade em *V. vinifera*, através de citometria de fluxo, foram desenvolvidos por Lodhi & Reisch (1995), onde apresentaram o primeiro estudo do tamanho do genoma na família *Vitaceae*. Estes autores analisaram várias espécies de *Vitis*, diversas variedades de *V. vinifera* e *V. labrusca* e até outros géneros da família *Vitaceae*. Entre as espécies do género *Vitis* analisadas, obtiveram-se valores de 2C DNA compreendidos entre 0,85 pg, para *V. doaniana*, e 1,12 pg, para *V. rupestris* e *V. aestivalis* var. *lincecumii*. Foram analisadas quatro variedades de *V. vinifera* e entre elas obtidos valores entre 0,86 e 1,00 pg/2C. Embora as diferenças detetadas entre as diversas variedades tenham sido de 14%, não foram encontradas diferenças significativas no estudo da variabilidade intervarietal. Ainda assim, este estudo teve um papel importante para o conhecimento do tamanho genoma das espécies do género *Vitis*.

Num estudo posterior, onde foi estimado o tamanho do genoma em nove variedades de *V. vinifera* (Leal et al., 2006), foram obtidos valores entre 1,17 e 1,26 pg/2C. Estas diferenças

detetadas entre variedades (3-6%), variabilidade intervarietal, não obtiveram resultados estatisticamente significativos ($p\text{-value} > 0,05$), corroborando os resultados de Lodhi & Reisch (1995). A discrepância entre os valores observados nos dois estudos não se deve apenas às diferentes variedades analisadas, mas também aos diferentes padrões utilizados em citometria de fluxo, que poderão interferir na exatidão da leitura dos resultados observados.

Um estudo mais recente onde foi avaliada a variação do tamanho do genoma em 36 acessos de 21 variedades de *V. vinifera* (seis delas variedades autóctones) das Ilhas Baleares (González et al., 2022), mostrou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre estas (1,090 - 1,277 pg/2C). Os resultados que comprovam a existência de variabilidade intervarietal neste estudo poderão ser explicados pelo facto de o padrão utilizado possuir maior similaridade com a videira, pela elevada quantidade de indivíduos da amostragem e pelas diferentes variedades avaliadas, comparativamente aos estudos anteriores.

Estes estudos de variabilidade corroboraram a ideia de que *V. vinifera* possui um tamanho de genoma bastante estável, mas carecem de uma análise pormenorizada a um elevado número de indivíduos de modo que a amostragem seja o mais representativa possível.

A variedade antiga de videira 'Gouveio', comparativamente com 59 variedades portuguesas analisadas, mostrou ter sido uma das variedades que mais acumulou variabilidade intravarietal (Gonçalves & Martins, 2022b), neste caso concreto no rendimento.

As variedades antigas de videira são populações altamente heterogêneas relativamente a características de elevado interesse agronómico - características quantitativas. Nestas, é possível ser encontrado um elevado nível de variabilidade entre clones, alguns com potencial genético até dez vezes superior para a produtividade e até duas vezes superior para o teor de sólidos solúveis (Martins & Gonçalves, 2015). Esta variação é extremamente vantajosa uma vez que é devido a esta diversidade que é garantida a estabilidade genética da variedade ao longo do tempo em diferentes ambientes (Gonçalves & Martins, 2022a) e é possível a realização de seleção policlonal (OIV, 2019) com elevados ganhos genéticos para as características agronómicas e enológicas de interesse. Se a opção for fazer seleção clonal, embora seja tentador selecionar um clone com elevados ganhos genéticos para a produtividade e/ou para outras características de interesse, este poderá revelar uma elevada sensibilidade à interação genótipo x ambiente (G x E). Deste modo, quando é feita a seleção clonal, é importante o estudo da interação G x E de maneira a quantificar a parte genotípica que está a ser expressa num dado ambiente. Este estudo requer a plantação de vários ensaios em ambientes que sejam representativos das regiões de cultura da variedade e uma posterior recolha de dados durante, pelo menos, três a cinco anos, de todos os clones presentes nesses ensaios.

As técnicas mais utilizadas para o estudo da interação G x E geralmente incluem análises de variância com interação, análises do coeficiente de variação (CV) de diferentes características em diferentes ambientes, análises de regressão usando índices ambientais, métodos não paramétricos baseados no *ranking* genotípico em diferentes ambientes, métodos baseados em modelos mistos e análise em componentes principais (Martins & Gonçalves, 2015). Usando estes métodos, é possível selecionar clones com elevados ganhos genéticos para as características agronômicas e enológicas de interesse e que simultaneamente apresentem uma maior estabilidade ambiental.

A Associação Portuguesa para a Diversidade da Videira (PORVID), conjuntamente com os seus associados, tem focado o seu trabalho na conservação e valorização da variabilidade genética intravarietal de castas autóctones. Aqui, tem sido aplicada uma metodologia de conservação e seleção da videira inovadora e desenvolvida em Portugal (Martins & Gonçalves, 2015). Esta, ao contrário dos métodos de seleção convencionais, explora uma amostra representativa da variabilidade intravarietal da casta, separa a diversidade determinada geneticamente, prevê o ganho genético de seleção e avalia a interação G x E, conseguindo assim obter dois tipos de material selecionado, policlonal e clonal (Martins, & Gonçalves, 2015).

1.2. Delineamento experimental – importância, características e modelos existentes

Um ponto crucial para uma seleção eficiente é a redução e quantificação dos desvios ambientais, de maneira a se conseguir prever o melhor valor genotípico possível dos clones em estudo de uma determinada casta. Para que isto seja possível, os ensaios de campo têm de ser estabelecidos de acordo com um delineamento experimental eficiente, fundamental para se obter uma avaliação de confiança das características quantitativas, e a análise dos dados deverá compreender o ajustamento de modelos mistos, definidos de acordo com o delineamento experimental adotado (Martins & Gonçalves, 2015).

No estabelecimento de qualquer ensaio, os princípios básicos do delineamento experimental deverão ser cumpridos: repetição, casualização e controlo de variação espacial ou outras fontes de variação que poderão influenciar as condições da avaliação de características nesse ensaio (Fisher, 1935). As repetições permitem obter uma estimativa da variância dos erros aleatórios, aumentando a sua precisão com o número de repetições. A casualização é essencial para validar a estimativa da variância dos erros aleatórios, assegurando que todas as unidades experimentais são igualmente “boas” para receber qualquer genótipo, minimizando assim erros sistemáticos ou viés induzido pelo experimentador. A forma como se

controlam as diferentes fontes de variação (espacial e outras) entre unidades experimentais determina o tipo de casualização e, conseqüentemente, o tipo de delineamento experimental adotado (Gonçalves & Martins, 2022a).

Para controlo dessas fontes de variação, o delineamento experimental mais simples, desenvolvido por Fisher (1935), foram delineamentos em blocos completos casualizados (RCBD). Posteriormente, Yates (1936) descreveu delineamentos em blocos incompletos, em que o controlo da heterogeneidade é conseguido a partir de pequenos conjuntos homogêneos (blocos incompletos) de unidades experimentais dentro de cada bloco completo. A partir daí, inúmeras variantes deste modelo apareceram, como é o caso de delineamentos alfa, por Patterson & Williams (1976), e de delineamentos linha-coluna resolúveis (RCD), por Williams & John (1989). Estes últimos, são sobretudo usados quando se suspeita da existência de variação espacial em duas direções no campo, sendo as linhas e colunas (blocos incompletos) utilizadas conjuntamente para introduzir dois fatores de controlo da heterogeneidade espacial (Gonçalves et al., 2010).

Assim, o delineamento experimental RCD é o delineamento mais utilizado em ensaios de seleção da videira. Diversos estudos (Gonçalves et al., 2022) mostram que este delineamento demonstrou ser o que melhor controla a variabilidade espacial em ensaios de campo de grandes dimensões, obtendo-se uma estimativa da variância genotípica mais precisa. Este delineamento mostrou também a obtenção de valores de heritabilidade em sentido lato (H^2) mais elevados na avaliação de características quantitativas, indicando assim a sua aptidão para uma melhor quantificação da variabilidade intravarietal e para uma maior eficiência da seleção policlonal.

1.3. Citometria de fluxo como ferramenta para avaliar a variabilidade citogenómica

A citometria de fluxo é uma tecnologia que analisa células ou partículas em suspensão, numa solução tampão, à medida que estas passam por um ou vários lasers de luz. Cada partícula é analisada pela dispersão da luz e por um ou mais parâmetros de fluorescência. A dispersão da luz é independente da fluorescência e é medida em duas direções diferentes: difusão frontal da luz (forward scatter, FSC), proporcional ao tamanho relativo da célula; e difusão lateral da luz (side scatter, SSC), a 90°, que indica a complexidade interna ou a granularidade da célula (McKinnon, 2018).

As amostras poderão ser preparadas para a medição da fluorescência através de alguns processos como a transferência e expressão de proteínas fluorescentes (e.g. *green fluorescent protein*, GFP); coloração com corantes fluorescentes (e.g. iodeto de propídio, o

qual foi utilizado nesta experiência, que se liga aos ácidos nucleicos como o DNA) ou por imunocoloração com anticorpos fluorescentes conjugados (e.g. fluoresceína isotiocianato) (McKinnon, 2018).

Através desta tecnologia é possível a medição de grandes populações de células num período de tempo muito curto, o que levou ao seu uso em larga escala em diversas áreas como imunologia, virologia, biologia molecular e monitorização do desenvolvimento de carcinomas e de doenças infecciosas (Doležel & Bartoš, 2005; McKinnon, 2018).

Ao aplicarmos esta metodologia em células vegetais existe uma dificuldade acrescida devido ao maior grau de complexidade da estrutura das mesmas. Heller, (1973) aplicou esta metodologia pela primeira vez em células vegetais, utilizando alguns tratamentos enzimáticos e brometo de etídio para corar o DNA. Contudo, era um procedimento moroso e de difícil leitura. Apenas dez anos depois, a citometria de fluxo começou a ser mais amplamente aplicada às plantas através do isolamento de protoplastos em vez de células. O uso de enzimas hidrolíticas (celulases e pectinases) para remoção da parede celular levou a que a deteção destes protoplastos fosse de melhor qualidade e com um fluxo não perturbado, devido à estrutura esférica e regular dos mesmos (Doležel & Bartoš, 2005).

No início dos anos 80, Puite e Ten Broeke demonstraram que o DNA nuclear podia ser corado em protoplastos vegetais, mas que a distribuição do ciclo celular não conseguia ser interpretada nos histogramas de fluorescência, possivelmente devido ao efeito da fluorescência do citoplasma, da baixa permeabilidade da membrana plasmática e da posição descentrada do núcleo (Galbraith & Shields, 1982; Puite & Ten Broeke, 1983; Galbraith, 1990).

Deste modo, a melhor abordagem seria isolar os núcleos intactos dos protoplastos (lise celular) através de um detergente ou meio hipotónico, levando assim a histogramas com boa leitura em DNA nuclear. Assim, Galbraith et al. (1983) sugeriram um método prático e rápido de preparação de suspensões de núcleos que consistia em fracionar uma pequena quantidade de tecido vegetal fresco num tampão adequado.

A capacidade de estimar o DNA nuclear de uma vasta gama de espécies vegetais de forma rápida, simultânea e precisa constituiu uma ferramenta importante para impulsionar o avanço no melhoramento de plantas. Através destes avanços na citometria de fluxo, foi possível a determinação de diferentes níveis de ploidias, permitindo por exemplo a deteção de genótipos desejáveis (e.g. aneuploidias em culturas importantes como os cereais); mapear genomas de plantas; a deteção e caracterização de genótipos *true-to-typeness* em programas de melhoramento; a utilização de citometria de fluxo em estudos citogenéticos, como por exemplo na distinção de sexos em espécies dioicas e alogâmicas onde a escolha de genótipos de um determinado sexo são favorecidos (e.g. espécies do género *Asparagus*), apresentando

benefícios do ponto de vista agronómico; entre outros (Ochatt, 2008). Deste modo, é possível afirmar que o trabalho de Galbraith veio revolucionar a forma como a citometria de fluxo pode estar de mãos dadas com a biologia vegetal e que este, marcou o início da citometria de fluxo nas plantas (Doležel & Bartoš, 2005).

A escolha do tampão para o isolamento de núcleos é um aspeto de elevada importância de maneira a se obter a estimativa mais precisa e fiável do conteúdo em DNA nuclear. Um aspeto importante quando se seleciona um tampão é o efeito dos metabolitos secundários na coloração, independentemente do fluorocromo utilizado (Loureiro et al., 2021). Certos metabolitos secundários, como é o caso dos fenóis, podem comportar-se como inibidores de coloração, oferecendo uma barreira à ligação do fluorocromo, resultando numa redução da fluorescência, e, noutros casos, metabolitos secundários poder-se-ão ligar ao núcleo e assim atrair detritos celulares fluorescentes criando um halo de partículas pouco fluorescentes em torno do núcleo, resultando um ligeiro aumento da intensidade da fluorescência (Greilhuber et al., 2007).

Foram descritos mais de 30 tampões diferentes, sendo o tampão de Galbraith, $MgSO_4$, LB01, tampão de Otto, $Tris.MgCl_2$ e o WPB (*Woody Plant Buffer*), presentes no **Quadro 1**, aqueles que mostraram melhores resultados, contando assim com estes na maioria de publicações (Loureiro et al., 2021).

Quadro 1 - Tampões mais utilizados para preparação de suspensões de núcleos

Tampão	Composição *	Referências
Tampão de Galbraith	45 mM MgCl ₂ , 30 mM citrato de sódio, 20 mM MOPS, 0.1 % (m/v) Triton X-100, pH 7,0	Galbraith et al. (1983)
MgSO₄	10 mM MgSO ₄ .7H ₂ O, 50 mM KCl, 5 mM HEPES, 3 mM DTT, 10 % (m/v) Triton X-100, pH 8,0	Arumuganathan & Earle (1991)
LB01	15 mM Tris, 2 mM Na ₂ EDTA, 0.5 mM espermina, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 15 mM β-mercaptoetanol, 0.1 % (v/v) Triton X-100, pH 7,5	Doležel et al. (1989)
Tampão de Otto	100 mM ácido cítrico, 0.5 % (v/v) Tween 20, 400 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0	Otto (1990)
Tris-MgCl₂	200 mM Tris-HCl, 4 mM MgCl ₂ .6H ₂ O, 0.5 % (v/v) Triton X-100, pH 7,5	Pfosser et al. (1995)
GPB	0.5 mM espermina.4HCl, 30 mM citrato de sódio, 20 mM MOPS, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.5 % (v/v) Triton X-100, pH 7,0	Loureiro et al. (2007)
WPB	0.2 M Tris-HCl, 4 mM MgCl ₂ .6H ₂ O, 2 mM EDTA Na ₂ .2H ₂ O, 86 mM NaCl, 10 mM metabissulfito de sódio, 1 % PVP-10, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 7,5	Loureiro et al. (2007)

Nota: *As concentrações finais dos diferentes componentes estão presentes no quadro. As quantidades de cada reagente bem como outras especificidades para preparação destes tampões encontram-se descritas nos artigos originais. MOPS = ácido 4-morfolinopropano 1-sulfônico; HEPES = ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-iletanossulfônico; DTT = ditioneitol; Tris = tris-(hidroximetil)-aminometano; EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético.

Todos estes tampões para isolamento de núcleos têm na sua composição: Substâncias orgânicas tampão, como MOPS, Tris, HEPES, entre outras, que controlam a variação de pH da solução, normalmente entre sete e oito, e preservam a integridade do núcleo; Detergentes não iônicos, como Tween-20, Triton X-100, que quebram a membrana plasmática, sem alteração da atividade biológica, e isolam o núcleo, diminuindo a tendência para o núcleo e os detritos celulares se agregarem; Estabilizadores da cromatina, como MgCl₂ e MgSO₄; Agentes quelantes, como por exemplo o EDTA e o citrato de sódio, que se ligam aos catiões

bivalentes servindo de cofatores às enzimas nucleases, bloqueando a atividade das DNases; e sais inorgânicos como KCl, NaCl, que providenciam alguma carga iônica (Loureiro et al., 2021).

Alguns tampões são enriquecidos com mercaptoetanol, metabissulfito, ácido ascórbico ou ditioneitol que funcionam como redutores. Poderá também ser adicionada polivinilpirrolidona, PVP-10 ou PVP-40. A ligação destes compostos com antioxidantes permite que os fenóis se mantenham num estado reduzido, isto é, sejam removidos das proteínas e do DNA antes destes serem oxidados, levando assim uma melhoria na qualidade dos histogramas em espécies com alto teor em fenóis (Barathan et al., 1994; Yokoya et al., 2000).

Loureiro et al. (2007), de maneira a formular um tampão generalizado que obtivesse resultados de boa qualidade, conduziram diversos estudos de modo a desenvolver novas fórmulas de tampões de isolamento de núcleos com base nas concentrações dos compostos que faziam parte dos tampões já existentes. Deste modo, desenvolveu o *General Purpose Buffer* (GPB) e o *Woody Plant Buffer* (WPB), dos quais resultaram histogramas de elevada qualidade, comparativamente a histogramas cuja preparação de núcleos foi efetuada com os diversos tampões anteriormente citados.

O tampão GPB mostrou ser aquele que, quando comparado com o WPB em espécies não problemáticas, resultou em histogramas cujo conteúdo em DNA nuclear estaria com uma resolução tão boa ou superior. No entanto, em espécies lenhosas, o tampão GPB mostrou-se ineficaz. As espécies lenhosas são consideradas recalcitrantes para a citometria de fluxo, uma vez que os seus tecidos contêm compostos citosólicos (taninos, fenóis) que interferem com a fluorescência na coloração do DNA nuclear, como referido anteriormente. Desta forma, a adição de PVP-10 foi de extrema importância para a formulação do tampão que melhor se adequa a estes casos, o WPB.

Posteriormente ao fracionamento das amostras com o tampão e sua homogeneização, o núcleo das células tem de ser corado com um fluorocromo, que se deve ligar especificamente ao DNA. Estes, podem ser divididos em dois grupos: aqueles que se intercalam na cadeia de dupla do DNA, como Iodeto de Propídio (PI) e Brometo de Etídio (EtBr); e aqueles que se ligam a bases específicas do DNA, como o DAPI (especificidade A-T) e mitramicina (especificidade G-C), por exemplo (Loureiro, 2007).

Após a escolha do fluorocromo mais adequado é necessária a utilização de um citómetro de fluxo que emita no comprimento de onda adequado ao fluorocromo pretendido. Cada fluorocromo é excitado a um certo comprimento de onda específico, emitindo assim uma dada coloração na sua leitura pelo aparelho (ex. PI, excitado a 530nm com coloração azul-esverdeada e emite a 605nm com coloração vermelha).

De maneira a obter uma quantificação absoluta do DNA e devido ao facto de esta ser realizada através de comparação com uma amostra de genoma conhecido, é importante a utilização de fluorocromos que se intercalam na cadeia dupla de DNA (PI ou EtBr). Assim, a fluorescência proveniente dos fluorocromos não será afetada pela composição em bases do DNA (Doležel et al., 1992).

Até aos anos 2000, foram utilizados diferentes padrões em citometria de fluxo, por diversos autores, de maneira a dar continuidade a estudos de variação do tamanho do genoma em certas espécies vegetais. Padrões estes, como leucócitos humanos (Lysák et al., 2000), glóbulos vermelhos de galinha (CRBC) (Galbraith et al., 1983), glóbulos vermelhos de truta-arco-íris (RTRBC) (Turpeinen et al., 1999) e também algumas espécies vegetais como petúnia (Marie & Brown, 1993), *Medicago sativa* (Martel et al., 1997) e aveia (Morgan et al., 1995).

No início do séc.XXI, a utilização de CRBC em *V. vinifera*, assim como outros padrões de origem animal, foram postos em causa devido a variações no conteúdo em DNA nuclear ($2C = 2,49 - 3,01\text{pg}$, Johnston et al., 1999) que poderiam induzir discrepâncias nos valores reais lidos para *V. vinifera*. Para além disso, diferenças no tamanho nuclear e na quantidade de heterocromatina, entre a amostra e o padrão, influenciam as propriedades da dispersão de luz e conseqüentemente a sua medição pelo citómetro.

Segundo Doležel & Bartoš (2005), de maneira a minimizar o erro associado, a referência standard deve possuir um tamanho de genoma parecido, mas não igual à espécie analisada, de modo a não existir sobreposição de picos no histograma de fluorescência, um genoma geneticamente estável, amplamente conhecido e estudado e com uma organização da cromatina semelhante à espécie em estudo.

De maneira a cumprir estes requisitos, Doležel et al. (1992, 1998) e Johnston et al. (1999) apresentaram uma série de espécies vegetais de diversos tamanhos genómicos, 1,11 a 34,76 pg de DNA e 1,08 a 32,97 pg de DNA, respetivamente, que poderiam ser usadas como padrão em análises de citometria de fluxo.

Embora a utilização de padrões de origem animal não seja consensual entre diversos autores, Bennett et al. (2003) mostrou a vantagem da utilização de *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, cujo genoma se conhecia com elevada precisão, para calibração de *Arabidopsis thaliana*. A comparação destas duas espécies através de citometria de fluxo mostrou que o tamanho do genoma de *A. thaliana* estaria subestimado pelo *Arabidopsis Genome Initiative* (2000) (Bennett et al., 2003).

Neste sentido, *A. thaliana* foi utilizada para estabelecer uma série de standards “de ouro” para plantas. De acordo com Doležel & Greilhuber (2010), estas referências standard têm de ser

calibradas para medições em citometria de fluxo. Este procedimento inicial é fundamental para calibração dos diferentes padrões, especialmente pelo facto do genoma de diferentes espécies de plantas apresentar elevadas variações no seu tamanho (Bennett & Leitch, 2005).

Anos mais tarde, foram estabelecidos diversos padrões calibrados com diferentes standards primários (**Quadro 2**), que poderiam ser usados por investigadores de todo o mundo de modo a existir uma coerência em torno dos resultados obtidos em estudos de citometria de fluxo.

Para a obtenção destes novos padrões, os investigadores tiveram de ser rigorosos relativamente à precisão das medições, o coeficiente de variação obtido dos picos nos histogramas foi inferior a 3%, com pelo menos 1000 núcleos por pico, sem sobreposição e sem picos muito distantes. Tiveram de ser efetuadas repetições em diferentes dias de modo a validar os resultados (Temsch et al., 2022).

Quadro 2 - Lista de alguns padrões de origem vegetal utilizados atualmente em citometria de fluxo e respetivo método de calibração e padrão primário utilizado

Espécies	Variedade/ cultivar/clone	2C DNA (pg)	Método de calibração	Standard primário (organismo e tamanho do genoma)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ecótipo da Colômbia	0,321 ^a	FCM, standard único	<i>Caenorhabditis elegans</i> Bristol N2, 100Mbp/1C ^b
<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	'Nipponbare'	0,795 ^c	(genoma totalmente sequenciado)	-
<i>Solanum lycopersicum</i>	'Stupické polní rané'	1,96 ^d	FCM, "cascata"	Leucócitos humanos, 7 pg/2C ^f
		1,735 ^e	FCM, standard único	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> 'Nipponbare', 388,82 Mbp/1C ^c
<i>Glycine max</i>	'Polanka'	2,50 ^h	FCM, standard único	Leucócitos humanos, 7 pg/2C ^f
		2,077 ⁱ	FCM, "cascata"	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> 'Nipponbare', 388,82 Mbp/1C ^c
<i>Zea mays</i>	'CE-777'	5,433 ^j	FCM, standard único	Leucócitos humanos, 7 pg/2C ^f
<i>Pisum sativum</i>	'Ctirad' 'Kleine Rheinländerin'	9,09 ^k	FCM, standard único	Leucócitos humanos, 7 pg/2C ^f
		8,018 ^e	FCM, "cascata"	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> 'Nipponbare', 388,82 Mbp/1C ^c
		8,84 ^l	Microdensitometria de Feulgen, standard único	<i>Allium cepa</i> 'Stuttgarter Riesen', 16,75 pg/1C ^m
<i>Secale cereale</i>	'Daňkovské'	16,19 ^k	FCM, "cascata"	Leucócitos humanos, 7 pg/2C ^f
<i>Vicia faba</i>	'Inovec'	26,90 ^d	FCM, "cascata"	Leucócitos humanos, 7 pg/2C ^f
		23,796 ^e	FCM, "cascata"	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> 'Nipponbare', 388,82 Mbp/1C ^c
<i>Allium cepa</i>	'Alice' -	34,89 ^k	FCM, "cascata"	Leucócitos humanos, 7 pg/2C ^f
		30,745 ⁿ	FCM, "cascata"	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> 'Nipponbare', 388,82 Mbp/1C ^c
		33,55 ^o	Medição calorimétrica de um número de células conhecido	
<i>Haemanthus albillos</i>	Clone comercial	59,143 ^e	FCM, "cascata"	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> 'Nipponbare', 388,82 Mbp/1C ^c

Nota: Para cada padrão, estão representados os standards primários que foram utilizados na calibração destes, assim como o respetivo método de calibração. Especificações suplementares de outros padrões utilizados, assim como detalhes metodológicos que não estão presentes no Quadro 2 podem ser encontrados em Temsch et al. (2022) e nos respetivos artigos originais. Métodos de calibração – FCM: *Flow cytometry method*; standard único: apenas um standard é utilizado na calibração dos novos padrões; "cascata": calibração em modo "cascata", são utilizados uma série de standards onde são comparados os C-values destas espécies com o C-value do novo padrão. Este cálculo começa com a calibração do novo padrão com o organismo de genoma conhecido representado na coluna "standard primário", e por aí em diante. **Referências:** **a** - Bennett et al. (2003); **b** - *C. elegans* Sequencing Consortium (1998); **c** - International Rice Genome Sequencing Project (2015); **d** - Doležel et al. (1992); **e** - Veselý et al. (2012); **f** - Tiersch et al. (1989); **h** - Doležel et al. (1994); **i** - Veleba et al. (2017); **j** - Lysak & Doležel (1998); **k** - Doležel et al. (1998); **l** - Greilhuber & Ebert (1994); **m** - Bennett & Smith (1976); **n** - Šmarda et al. (2014); **o** - Van't Hof (1965).

1.4. Objetivos do trabalho

Neste trabalho, pretende-se avaliar a variabilidade genética intravarietal na variedade de videira 'Gouveio', relativamente a várias características quantitativas de interesse económico (rendimento, peso do bago e características da qualidade do mosto, como o pH, teor de sólidos solúveis e acidez total) e determinar, pela primeira vez, a variabilidade citogenómica (tamanho do genoma) nesta casta.

A quantificação da variabilidade genética intravarietal para as características quantitativas avaliadas é possível através da aplicação de metodologias de genética quantitativa. Na avaliação deste tipo de características o delineamento experimental do ensaio é um ponto chave, sendo não só importante o tipo de casualização adotado, como também o número de repetições do ensaio. Estes ensaios contêm amostras representativas da variabilidade intravarietal e são estabelecidos para fins de seleção policlonal, portanto, com mais de uma centena de clones em comparação e que, para serem viáveis, é necessário estabelecer um balanço entre o que é teoricamente mais correto (por exemplo, quanto maior o número de repetições mais exatas e precisas serão as estimativas dos parâmetros genéticos de interesse e mais eficiente será a seleção) e a exequibilidade do trabalho de campo e laboratorial. Torna-se, assim, importante obter informação sobre qual o número mínimo de repetições que poderá ser usado para avaliar as características quantitativas de interesse de modo a otimizar tanto quanto possível os recursos disponíveis.

Por outro lado, pretende-se também aferir se a citometria de fluxo constitui um bom método para avaliar a variabilidade intravarietal em *V. vinifera*, uma vez que, noutros estudos realizados em *Olea europaea* 'Galega Vulgar', foi possível comprovar a existência de variabilidade intravarietal tendo por base este método (Pereira, 2019).

Em suma, este trabalho tem por objetivo testar algumas metodologias de quantificação da variabilidade intravarietal em variedades autóctones de videira contribuindo, assim, para complementar os estudos que têm sido conduzidos nesta área.

2. Materiais e Métodos

2.1. Localização, configuração do ensaio e climatologia da região

A avaliação da variabilidade intravarietal foi realizada no ensaio de seleção da casta ‘Gouveio’ (**Figura 1a**), instalado no Pólo de Conservação da Diversidade da Videira da Associação Portuguesa para a Diversidade da Videira (PORVID), em Pegões mas já no concelho de Palmela, distrito de Setúbal ($38^{\circ}38'50''N$ $8^{\circ}38'34''W$, 70m de altitude), segundo o mapa do ensaio (**Figura 1b**). As linhas do ensaio possuem orientação nordeste – sudoeste.



Figura 1 - Ensaio de seleção da casta ‘Gouveio’, em Pegões, segundo o delineamento experimental linha-coluna resolúvel (RCD); **a** - Ensaio de seleção da casta ‘Gouveio’, correspondente ao bloco completo 5, em estado de crescimento vegetativo, aquando da colheita de folhas para análise citogenómica; **b** - Mapa do ensaio de seleção da casta ‘Gouveio’ com as cinco repetições resolúveis (blocos completos).

Este ensaio foi instalado com uma amostra representativa da variabilidade da casta, com 150 clones, segundo um delineamento experimental linha-coluna resolúvel (RCD), com cinco repetições resolúveis (blocos completos), cada uma com 14 linhas e 11 colunas, e com três plantas por unidade experimental.

A climatologia da região caracteriza-se por um clima típico Mediterrâneo, com verões quentes e secos e invernos moderados. Os valores médios mensais das temperaturas mínima, média e máxima, assim como de precipitação, verificados nos meses antecedentes à colheita de dados, em 2022 e 2023, encontram-se na **Figura 2**.

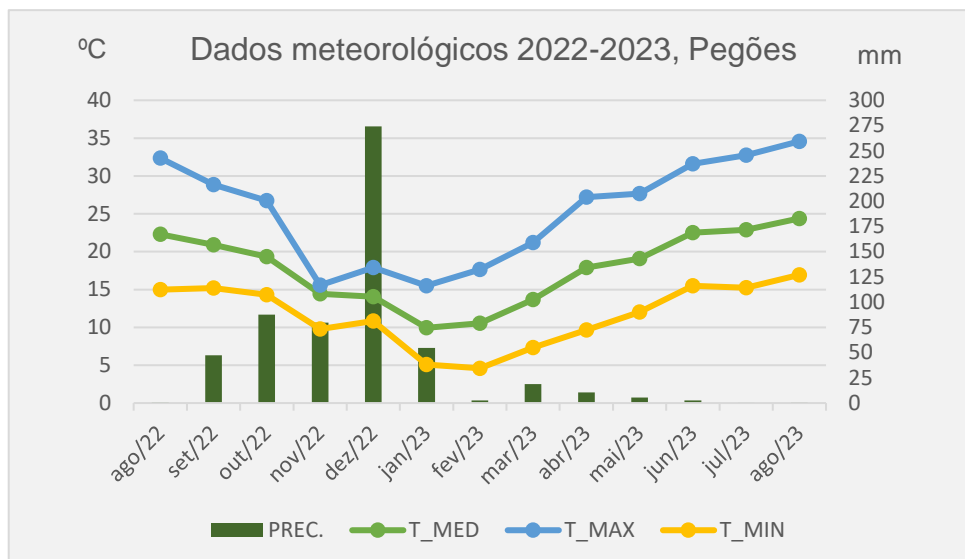


Figura 2 – Precipitação total, média mensal das temperaturas mínima, média e máxima registadas de agosto de 2022 a agosto de 2023 na estação meteorológica situada na PORVID, Pegões.

O ensaio de seleção da casta ‘Gouveio’ foi instalado numa zona onde estão referenciados, na carta de solos de Portugal, dois tipos de solo diferentes (**Figura 3**), segundo a classificação dos solos de Portugal. Ambos representam solos podzolizados, solos evoluídos de perfil ABC com horizonte B espódico. Este horizonte apresenta elevada permeabilidade, onde tomam lugar processos de lixiviação de sais e também de catiões não ácidos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+), bem como processos de eluviação e iluviação de matéria orgânica e “óxidos” de ferro e alumínio (Madeira & Ricardo, 2012). Estes solos são maioritariamente arenosos, ricos em argila, com cerca de 1 m de profundidade (Santos et al., 2007).

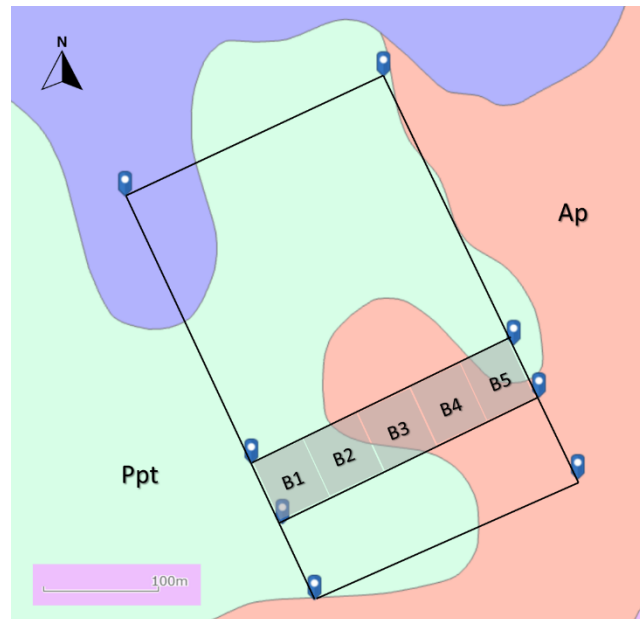


Figura 3- Cartografia do solo no ensaio de seleção da casta ‘Gouveio’, segundo a classificação dos solos de Portugal (CSP). Ppt – Solos podzolizados (podzóis), não hidromórficos, com surraipa, com horizonte E incipiente, de ou sobre arenitos; Ap – Solos podzolizados (podzóis), não hidromórficos, sem surraipa, normais, de areias ou arenitos (Cardoso, 1974). Figura retirada do Sistema Nacional de Informação do Solo (SNIS) através da plataforma WebGIS.

2.2. Material Vegetal

2.2.1. Colheita de amostras

Para a caracterização citogenómica, foi colhida uma folha jovem de cada unidade experimental (conjunto de três videiras) em três repetições resolúveis no campo (blocos completos 3, 4 e 5). Os clones existentes no ensaio encontram-se listados no **Quadro 3**. A colheita de amostras nos blocos 5, 4 e 3 foi realizada nos dias 14 de junho, 30 de junho e 11 de julho de 2023, respetivamente, e a folha de cada unidade experimental colocada num saco previamente identificado (**Figura 4a**). Como padrão para a análise citogenómica foram utilizadas folhas frescas de *Solanum lycopersicum* ‘Stupické’. As sementes foram fornecidas pelo Instituto de Botânica Experimental, Olomouc, República Checa, semeadas no Instituto Superior de Agronomia e as respetivas folhas colhidas aquando da sua utilização para análise citogenómica.

Quadro 3 - Listagem dos clones analisados no ensaio de seleção da casta 'Gouveio'

Clones da variedade 'Gouveio'						
GV0154	GV0102	GV0041	GV0095	GV0093	GV13030-15	GV0092
GV0531	GV0592	GV0115	GV5137-3	GV5140-24	GV0602	GV0013
GV0011	GV0146	GV0581	GV0106	GV13030-16	GV0105	GV0071
GV0016	GV0061	GV0604	GV5137-5	GV13030-20	GV0622	GV0142
GV0554	GV0151	GV5137-2	GV0081	GV0104	GV0135	GV0086
GV5139-2	GV0565	GV5144-14	GV0546	GV0032	GV5140-13	GV0084
GV0156	GV0114	GV5142-2	GV0125	GV0121	GV0065	GV0534
GV0051	GV0033	GV0074	GV0626	GV0525	GV0045	GV0543
GV5137-13	GV0063	GV0571	GV0593	GV13030-14	GV0036	GV0055
GV0034	GV0591	GV0075	GV0111	GV0563	GV0564	GV5140-11
GV0131	GV0103	GV13030-13	GV0605	GV0062	GV0132	GV0022
GV0096	GV0586	GV0116	GV0043	GV0094	GV0561	GV5139-5
GV0545	GV0572	GV13030-19	GV0123	GV0053	GV0541	GV0015
GV0556	GV5140-10	GV0124	GV0621	GV0524	GV0633	GV0012
GV0552	GV5139-1	GV0026	GV0574	GV5137-11	GV0144	GV0542
GV0153	GV0042	GV0555	GV0583	GV0073	GV0553	GV0152
GV0024	GV5146-13	GV0141	GV0133	GV0122	GV0632	GV0533
GV0091	GV0535	GV0044	GV0023	GV0585	GV0113	GV0526
GV0624	GV5137-1	GV0521	GV0595	GV0082	GV0536	GV0544
GV0143	GV0056	GV0126	GV0083	GV0562	GV5141-3	GV0623
GV5139-6	GV0522	GV0025	GV0014	GV0052	GV0134	GV0021
GV0606	GV5140-15					

Nota: o clone GV0144 corresponde a um clone de 'Gouveio' Roxo.

A colheita de amostras de bagos para posterior avaliação do peso do bago e de características de qualidade do mosto ocorreu no dia 25 de agosto de 2023 em todos os clones e repetições resolúveis do ensaio da casta 'Gouveio'. Foram colhidos aleatoriamente 60 bagos por unidade experimental, cerca de 20 bagos por videira (**Figura 4b**). Estas amostras tentaram representar o melhor possível a totalidade da unidade experimental, por esse motivo, foram colhidos bagos de diferentes zonas dos cachos e de cachos com diferentes orientações (Norte e Sul).



Figura 4 - Recolha de amostras; **a** - Colheita de folhas jovens da casta 'Gouveio' em estado de crescimento vegetativo, nos blocos completos 3, 4 e 5; **b** - Colheita de bagos da casta 'Gouveio' em todos os blocos completos do ensaio.

2.2.2. Conservação das amostras de folhas e de bagos

Após colhidas, as amostras foliares foram humedecidas de modo a manter o estado de turgescência das células vegetais, envoltas em papel absorvente e recolocadas no saco respetivo. Estas amostras foram conservadas no frigorífico a 5°C no mesmo dia da recolha. A análise citogenómica destas amostras decorreu num período de 15 dias após a sua recolha no campo. Todos os resultados obtidos são referentes a esse período.

As amostras de bagos foram conservadas no campo, aquando da sua colheita, em arcas refrigeradoras com acumuladores térmicos e no mesmo dia colocadas numa arca congeladora a -20°C. Estas foram analisadas em laboratório uma semana após a sua recolha.

2.3. Métodos

2.3.1. Análise citogenômica e quantificação do DNA nuclear

Foram analisadas folhas jovens de todos os clones nos blocos completos 3, 4 e 5, presentes no ensaio de seleção da casta 'Gouveio', através da técnica de citometria de fluxo, de modo a ser avaliado o conteúdo nuclear de DNA.

Deste modo, foram analisados exemplares de *Vitis vinifera* ($2C = 1,19 \pm 0,02$ pg, Loureiro et al., 2007) conjuntamente com um padrão de genoma conhecido e de tamanho semelhante à amostra em estudo, *Solanum lycopersicum* 'Stupické' ($2C = 1,96$ pg, Doležel et al., 1992), de maneira a ser comparada a fluorescência (FL1) das duas espécies e posteriormente ser calculado o tamanho do genoma dos vários clones da casta.

A preparação das suspensões de núcleos a analisar foi realizada de acordo com Loureiro et al. (2007). Folhas jovens de cada clone de 'Gouveio' foram fracionadas juntamente com o padrão de genoma conhecido (**Figura 5a**), com o auxílio de uma lâmina de barbear, numa caixa de Petri contendo 1 mL de tampão *Woody Plant Buffer* (WPB).

Este tampão é composto por 0.2 M de Tris-HCl, 4 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1% (v/v) Triton X-100, 2 mM de $EDTA Na_2 \cdot 2H_2O$, 86 mM de NaCl, 10 mM de $Na_2S_2O_5$ (metabissulfito de sódio), 1% PVP-10 (Loureiro et al., 2007). Posteriormente à adição de todos os componentes à água, o pH do tampão foi ajustado para 7,5 através das partículas de hidróxido de sódio. O tampão foi depois armazenado e conservado a 4°C.

A suspensão de núcleos obtida foi depois filtrada para um tubo de ensaio de 5 mL usando um filtro de 30 μm (**Figura 5b**), de modo a remover os detritos celulares, e corado o DNA da mesma com uma solução de iodeto de propídio 25 $\mu g/mL$ (**Figura 5c**).

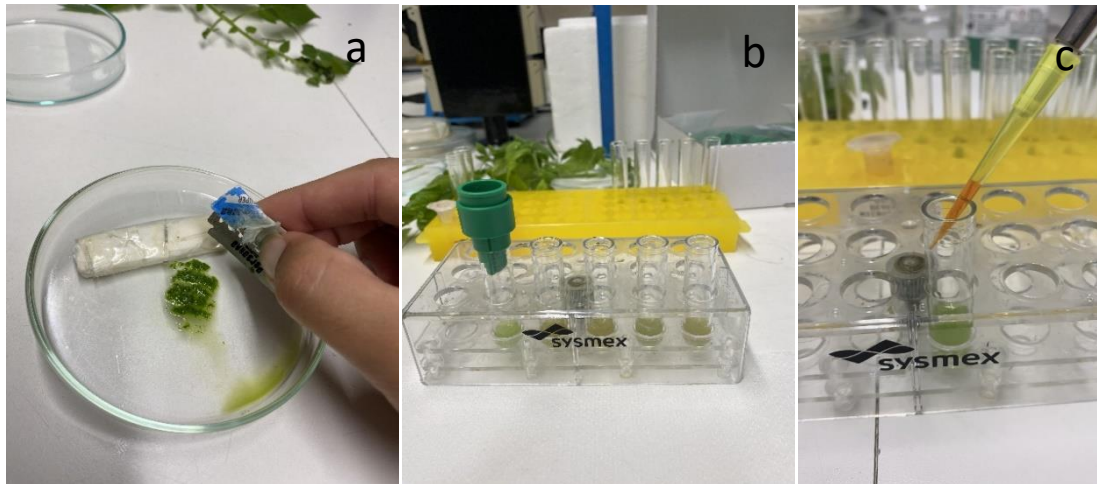


Figura 5 - Preparação das suspensões de núcleos de *V. vinifera* e *S. lycopersicum* para posterior leitura no citômetro de fluxo; **a** - Fracionamento de folhas jovens de *V. vinifera* e do padrão *S. lycopersicum* com 1 mL de tampão WPB, com o auxílio de uma lâmina de barbear; **b** - Filtragem da suspensão obtida através de um filtro de 30 µm; **c** - Adição de iodeto de propídio 25 µg/mL nos tubos de ensaio, de maneira a corar o DNA nuclear.

Após a preparação das suspensões de núcleos corados, estas foram analisadas no citômetro de fluxo CyFlow Space (Sysmex-Partec GmbH), com cinco leituras para cada amostra, e a aquisição dos dados numéricos e dos gráficos de fluorescência foi realizada através do *software* FloMax v2.4d (Sysmex, Gorlitz, Germany) (Guilengue et al., 2020).

Assim, através da fluorescência e da quantidade de luz emitida por núcleo, foi possível a obtenção de gráficos de fluorescência (FL1 x SSC, **Figura 6A**) dos quais, a partir da informação destes, foi possível a formulação de um histograma da contagem do número de núcleos pela intensidade da fluorescência emitida por estes (**Figura 6B**), representando assim alguns picos que corresponderão às fases G_0/G_1 e G_2 do ciclo celular das amostras colocadas na suspensão.

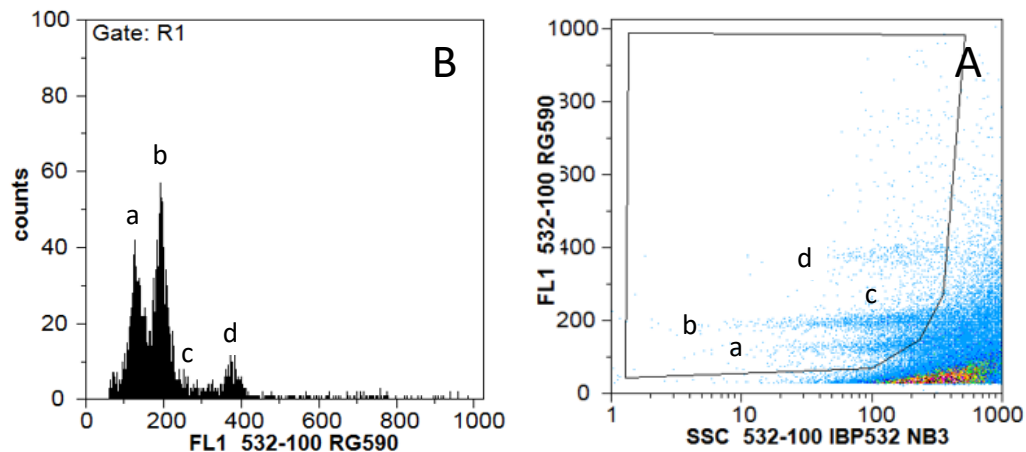


Figura 6 – Estratégia de *gating* utilizada na determinação do tamanho do genoma em amostras de *Vitis vinifera* em citometria de fluxo. **B** - Histograma da intensidade de fluorescência relativa obtido através de análise simultânea de núcleos isolados de *V. vinifera* L. variedade 'Gouveio' e *Solanum lycopersicum* 'Stupické'. **a** - Núcleos de *V. vinifera* em fase G_0/G_1 ; **b** – Núcleos de *S. lycopersicum* em fase G_0/G_1 ; **c** – Núcleos de *V. vinifera* em fase G_2 ; **d** – Núcleos de *S. lycopersicum* em fase G_2 . **A** – Gráfico de pontos da difusão lateral da luz (SSC) versus intensidade de fluorescência (FL1) com o *gating* utilizado para excluir tanto quanto possível os núcleos lesados e detritos celulares.

De maneira a ser obtido um histograma de melhor qualidade, dado o elevado ruído em torno dos valores de fluorescência das amostras analisadas, foi adotada uma estratégia de *gating* através da utilização de um polígono que circunscreve os dados de ambas as espécies a valores de difusão lateral da luz mais baixos (**Figura 6A**).

O ruído presente nos gráficos de fluorescência corresponde a núcleos lesados, detritos celulares e presença de metabolitos secundários. Este último, poderá ser explicado pelo facto de a videira ser considerada uma espécie recalcitrante para a citometria de fluxo. As plantas lenhosas possuem um elevado teor de fenóis e outros metabolitos secundários, interferindo desta forma na leitura pelo citómetro.

As medições da intensidade de fluorescência relativa em núcleos corados são realizadas em escala linear e idealmente, são analisados cerca de 5.000-20.000 núcleos por amostra (Galbraith et al., 2001).

A quantidade em DNA nuclear de cada amostra foi calculada com base nos valores das médias dos picos G₁ da amostra *V. vinifera* e do padrão *S. lycopersicum* 'Stupické', a partir dos histogramas da intensidade de fluorescência, segundo a fórmula de Doležel & Bartoš (2005):

$$\text{Conteúdo de DNA nuclear (2C) da amostra (V. vinifera)} = \frac{\text{Média do pico G1 da amostra (V. vinifera)}}{\text{Média do pico G1 do padrão (S. lycopersicum 'Stupické')}} \times \text{Conteúdo de DNA nuclear (2C) do padrão (S. lycopersicum 'Stupické')}$$

O resultado desta equação é dado em pg de DNA. Assumindo uma razão de 1:1 de pares de bases AT : GC e ignorando a presença de nucleótidos modificados na molécula de DNA, 1 pg de DNA corresponde a 0,978 x 10⁹ pb (1 pg = 978 Mbp). Deste modo, os erros deverão ser <1% (Doležel et al., 2003).

De maneira a se obter uma melhor interpretação dos resultados, foi calculado o valor do coeficiente de variação (CV, %) do tamanho do genoma para cada amostra, resultado da leitura realizada pelo citômetro de todos os pontos do pico G₁ tanto de *V. vinifera* como de *S. lycopersicum*, nos histogramas da intensidade de fluorescência.

2.3.2. Avaliação do rendimento da casta 'Gouveio'

Foram vindimados todos os cachos das plantas da unidade experimental em todos os clones nos blocos completos (B1, B2, B3, B4 e B5) do ensaio da casta 'Gouveio' e medido o seu peso com auxílio de uma balança suspensa mecânica (Salter 235, 25kg x 100g) (**Figura 7**). O valor do rendimento (kg/planta) foi obtido através da subtração do peso do balde ao peso total e da sua posterior divisão pelo número de videiras de cada unidade experimental, geralmente três.

Estes dados foram obtidos no dia 28 de agosto de 2023.



Figura 7 - Pesagem de cachos, de cada unidade experimental, para determinação do rendimento dos diferentes clones da casta 'Gouveio'.

2.3.3. Avaliação do peso do bago e de características de qualidade do mosto (pH, teor de sólidos solúveis e acidez total)

Após a colheita e congelamento das amostras de bagos dos diversos clones da casta 'Gouveio', os bagos foram descongelados de um dia para o outro, numa rede com separatórias, onde a água pudesse ser escoada, colocando-os junto ao saco respetivo de cada clone.

No dia seguinte, foram contados o número de bagos de cada amostra e recolocados dentro do saco correspondente, apontando na folha de registos. Posteriormente foi pesada cada amostra numa balança digital (Gram Precision CM-6, 6 kg x 0,2 g) e registado esse valor (o peso dos sacos, cerca de 2 g, foi subtraído ao peso total de cada amostra).

Os bagos foram esmagados dentro de cada saco, com o auxílio do BagMixer (Interscience). O conteúdo líquido destes foi vertido para tubos falcon de 50 mL através de um filtro e de um funil. O número do clone, bloco completo e posição no campo (referenciação coluna/linha) foram revistos, amostra a amostra, antes da passagem do mosto para os tubos de falcon de modo a detetar algum erro numérico que possa ter ocorrido.

Foi medido o pH de cada amostra, através de um potenciómetro (Thermo scientific™ Orion Star A211) previamente calibrado (**Figura 8a**), e registado o seu valor na folha de registos.

Posteriormente procedeu-se à avaliação do teor de sólidos solúveis (grau brix), através de um refratômetro digital (Atago PAL-1). Com a ajuda de uma pipeta de Pasteur foi colocado um pouco do mosto na zona de leitura (**Figura 8b**) e registado o seu valor.

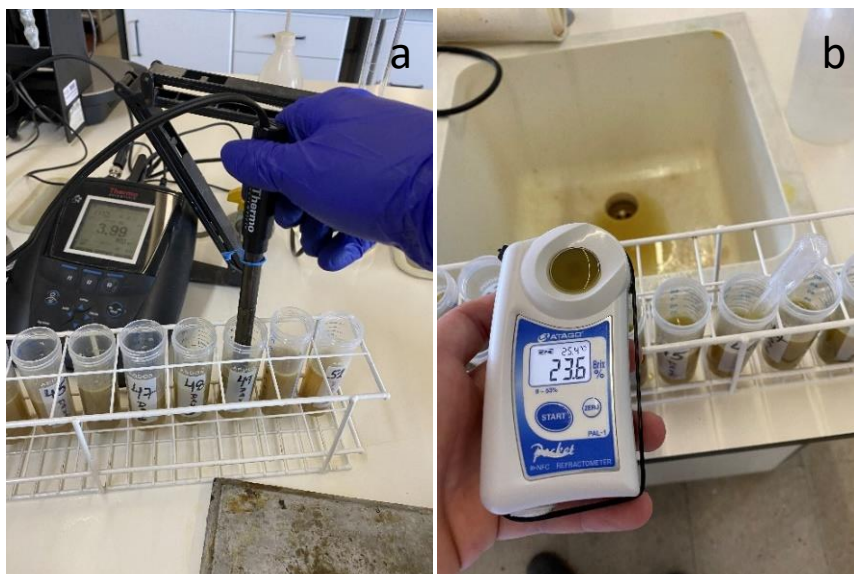


Figura 8 - Medição do pH (**a**) e do teor de sólidos solúveis (grau brix) (**b**), a partir do mosto de cada clone em cada bloco completo, através de um potenciômetro e de um refratômetro digital, respetivamente.

Para a medição da acidez total, foi utilizado o método proposto pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2021). Para preparação das amostras, foi colocado num gobelé de 50 mL 25 mL de água bidestilada, 1 mL de azul de bromotimol e 5 mL de mosto do clone respetivo.

Titularam-se as amostras previamente preparadas utilizando uma bureta de 50 mL ($\pm 0,050$ mL) com hidróxido de sódio (NaOH 0,1M) e um agitador magnético (Biosan MSH-300), com o auxílio do potenciômetro, previamente calibrado (**Figura 9a e 9b**).

Foi sendo adicionado sucessivamente NaOH à amostra até o pH atingir a neutralidade, cerca de 7 (6,95 - 7,15), que corresponde ao ponto de equivalência, também demonstrado com a alteração de cor da amostra de amarelo-alaranjado (**Figura 9 c II**) para azul-esverdeado (**Figura 9 c I**). Ao longo de todo este processo a solução foi sendo continuamente homogeneizada até o titulado reagir totalmente com o titulante.

No final de cada amostra ser titulada foi registado o valor volúmico de NaOH inicial e final na folha de registos. O valor correspondente à acidez total, expressa em gramas de ácido tartárico por litro, resulta da diferença entre o volume final e inicial de hidróxido de sódio despendido multiplicado pela concentração da amostra que, por sua vez, é multiplicado por 0,075 (OIV, 2021).

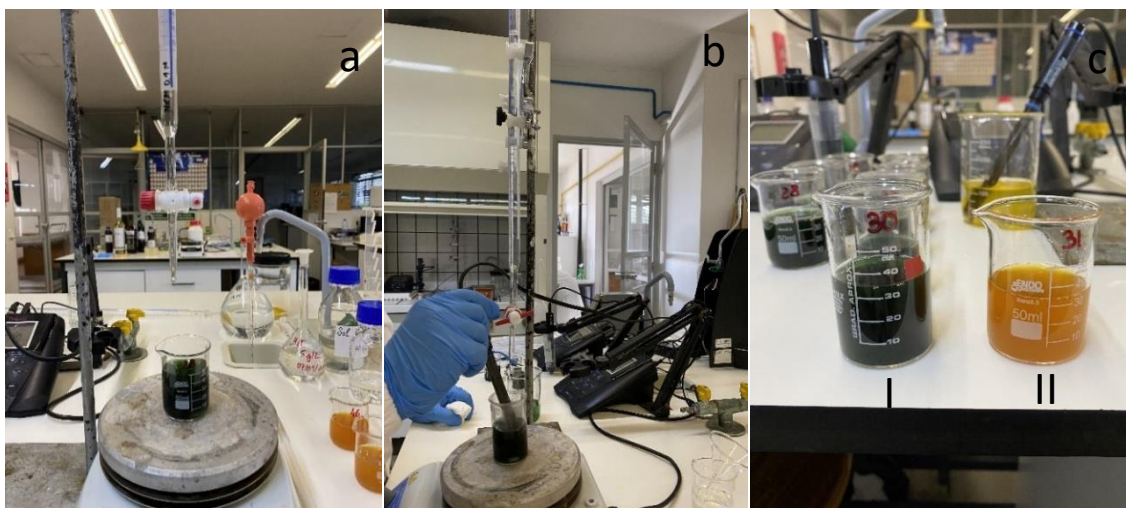


Figura 9 - Titulação ácido-base das amostras previamente preparadas em gobelés de 50 mL, com NaOH 0,1 M, (a) e (b); Solução azul-esverdeada, após a titulação, com o ponto de equivalência atingido (c I); Solução amarela-alaranjada, antes da titulação (c II).

2.3.4. Análise estatística dos dados de características quantitativas e citogenómicas

Para cada uma das características avaliadas (rendimento, peso do bago, pH, teor de sólidos solúveis e acidez total do mosto e características citogenómicas) foi ajustado o seguinte modelo linear misto univariado, definido de acordo com o delineamento experimental adotado:

$$\gamma_{ijlm} = \mu + u_{g_i} + u_{r_j} + u_{col(r)_{jl}} + u_{(r)row_{jm}} + e_{ijlm}$$

para $i = 1, \dots, 150$; $j = 1, \dots, 5$; $l = 1, \dots, 11$; e $m = 1, \dots, 14$.

Neste modelo, γ_{ijlm} corresponde à variável resposta que diz respeito ao valor fenotípico de uma dada característica do clone i localizado na coluna l e na linha m da repetição resolúvel j , μ é a média populacional para essa característica; u_{g_i} o efeito genotípico do clone i , u_{r_j} o efeito da repetição resolúvel j , $u_{col(r)_{jl}}$ o efeito da coluna l na repetição resolúvel j , $u_{(r)row_{jm}}$ o efeito da linha m na repetição resolúvel j e e_{ijlm} o erro aleatório correspondente à observação γ_{ijlm} .

Os efeitos u_{g_i} , u_{r_j} , $u_{col(r)_{jl}}$ e $u_{(r)row_{jm}}$ e o erro aleatório e_{ijlm} admitiram-se variáveis aleatórias independentes e identicamente distribuídas, com distribuição Normal de valor médio zero e variâncias σ_g^2 , σ_r^2 , $\sigma_{col(r)}^2$, $\sigma_{row(r)}^2$ e σ_e^2 , respetivamente. Todas as variáveis aleatórias admitiram-se como mutuamente independentes. Para os dados das características citogenómicas os efeitos da repetição resolúvel admitiram-se como fixos (apenas três repetições foram avaliadas e traduzem, neste caso, os efeitos dos diferentes dias de amostragem).

Para todas as características avaliadas o modelo linear misto acima descrito foi ajustado no *package* ASReml-R (Butler et al., 2023) do *software* Rstudio (R version 4.3.2).

As componentes de variância foram estimadas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) e a partir dessas estimativas foi possível obter os melhores preditores lineares empíricos não enviesados (EBLUPs) dos efeitos genotípicos (Searle et al., 1992) para uma dada característica, assim como a estimativa da variância do erro de predição (PEV) desses EBLUPs. Para todas as características a componente de variância genotípica associada foi testada ($H_0: \sigma_g^2 = 0$ vs $H_1: \sigma_g^2 > 0$) através de um teste de razão de verossimilhanças restritas. (REMLRT).

Assim, para todas as características avaliadas, foi possível o cálculo de uma medida generalizada da heritabilidade em sentido lato (H^2) (Gonçalves et al., 2020) que, classicamente, corresponde à proporção da variância fenotípica que é explicada por causas genéticas:

$$H^2 = 1 - \frac{\overline{PEV}}{\hat{\sigma}_g^2}$$

onde \overline{PEV} representa a média das estimativas das variâncias dos erros de predição dos efeitos genotípicos e $\hat{\sigma}_g^2$ a estimativa da variância genotípica.

Foi calculado o Coeficiente de Variação Genotípico (CV_G) de modo a comparar a variabilidade genética intravarietal entre características:

$$CV_G(\%) = \frac{\hat{\sigma}_g}{Média\ Geral} \times 100$$

onde $\hat{\sigma}_g$ é a estimativa do desvio padrão genotípico da característica avaliada e Média Geral é a média dessa respetiva característica.

Foi realizado um estudo metodológico de modo a compreender o efeito do número de repetições do ensaio de 'Gouveio' na qualidade das estimativas dos parâmetros de genética quantitativa. Deste modo, o delineamento experimental linha-coluna resolúvel com cinco

repetições (RCD5) foi comparado com o delineamento experimental com apenas quatro repetições (RCD4), três repetições (RCD3) e duas repetições (RCD2). Para tal, usaram-se os dados de todas as possíveis combinações das cinco repetições do ensaio original para se simular ensaios com quatro repetições (C_4^5), três repetições (C_3^5) e duas repetições (C_2^5). As combinações possíveis de repetições para os diferentes ensaios simulados encontram-se no **Quadro 4**. No total, foram simulados cinco ensaios com quatro repetições, dez com três repetições e dez com duas repetições.

Quadro 4 – Lista de todas as combinações possíveis de repetições resolúveis para ensaios simulados com quatro, três e duas repetições a partir da situação original com cinco repetições

C_4^5	[,1]	[,2]	[,3]	[,4]	[,5]	[,6]	[,7]	[,8]	[,9]	[,10]
[1,]	1	1	1	1	2	-	-	-	-	-
[2,]	2	2	2	3	3	-	-	-	-	-
[3,]	3	3	4	4	4	-	-	-	-	-
[4,]	4	5	5	5	5	-	-	-	-	-
C_3^5	[,1]	[,2]	[,3]	[,4]	[,5]	[,6]	[,7]	[,8]	[,9]	[,10]
[1,]	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3
[2,]	2	2	2	3	3	4	3	3	4	4
[3,]	3	4	5	4	5	5	4	5	5	5
C_2^5	[,1]	[,2]	[,3]	[,4]	[,5]	[,6]	[,7]	[,8]	[,9]	[,10]
[1,]	1	1	1	1	2	2	2	3	3	4
[2,]	2	3	4	5	3	4	5	4	5	5

De maneira a ser avaliada a exatidão e a precisão associadas às estimativas do CV_G e da H^2 , foram calculados dois indicadores: o viés relativo (RB) e o erro quadrático médio relativo ($RMSE$) para os delineamentos RCD4, RCD3 e RCD2, usando como referência o delineamento original, RCD5. Esses indicadores foram calculados de acordo com seguintes expressões:

$$RB (\%) = \frac{Viés(\hat{\theta})}{\theta} \times 100$$

$$RMSE (\%) = \frac{MSE (\hat{\theta})}{\theta^2} \times 100$$

onde:

θ é o valor da heritabilidade em sentido lato, ou do coeficiente de variação genotípico, obtido com o delineamento original RCD5;

$\bar{\theta}$ é a média dos valores obtidos para a heritabilidade em sentido lato, ou para o coeficiente de variação genotípico, para todos os ensaios simulados de acordo com o novo delineamento estabelecido (RCD4, RCD3 ou RCD2);

$Var (\hat{\theta})$ é a variância dos valores obtidos para a heritabilidade em sentido lato, ou para o coeficiente de variação genotípico, para todos os ensaios simulados de acordo com o novo delineamento estabelecido (RCD4, RCD3 ou RCD2);

$$Viés (\hat{\theta}) = \bar{\theta} - \theta ;$$

$$MSE (\hat{\theta}) = [Viés (\hat{\theta})]^2 + Var (\hat{\theta}).$$

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação da variabilidade intravarietal de características quantitativas

Para todas as características avaliadas, as estimativas das componentes de variância associadas aos fatores de efeitos aleatórios e de parâmetros de genética quantitativa encontram-se presentes no **Quadro 5**. Foi encontrada variabilidade genética significativa para todas as características avaliadas, isto é, rendimento, peso do bago, teor de sólidos solúveis, acidez total e pH (Rejeição de $H_0: \sigma_g^2 = 0$, p-value < 0,001). Através das estimativas obtidas para as componentes de variância associadas aos efeitos do delineamento experimental, pode ver-se que a proporção da componente de variância associada às colunas nas repetições resolúveis, face à variabilidade total explicada pelos fatores associados ao delineamento experimental, foi a maior nas características rendimento, teor de sólidos solúveis e acidez. Este resultado revela a importância desse fator do delineamento no controlo de variabilidade presente no ensaio de campo devido a variabilidade espacial, variabilidade associada a técnicas culturais e outras fontes de variação sistemáticas, quando são avaliadas essas características. A importância da inclusão dos efeitos associados às colunas nas repetições resolúveis na análise do rendimento foi também já observada em ensaios de outras variedades de videira (Gonçalves et al., 2022).

Os valores obtidos do coeficiente de variação genotípico, apresentados no **Quadro 5**, permitem-nos comparar a variabilidade genética entre diferentes características quantitativas. Diante as características avaliadas, de acordo com este indicador, a variabilidade genética intravarietal foi maior no rendimento, seguido de peso do bago, teor de sólidos solúveis, acidez total e pH, respetivamente. Estudos anteriores (Martins & Gonçalves, 2015) corroboraram o facto de o rendimento ser a característica com maior variabilidade dentro de todas as características quantitativas avaliadas.

Quadro 5 - Resultados do ajustamento do modelo linear misto aos dados das características quantitativas avaliadas na variedade ‘Gouveio’: estimativas das componentes de variância genotípica ($\hat{\sigma}_g^2$), das repetições resolúveis ($\hat{\sigma}_r^2$), das colunas nas repetições resolúveis ($\hat{\sigma}_{col(r)}^2$), das linhas nas repetições resolúveis ($\hat{\sigma}_{row(r)}^2$), dos erros aleatórios e respetivos erros padrão (SE), teste de razão de verosimilhanças restritas (REMLRT) à variância genotípica (σ_g^2) e respetivo p-value, heritabilidade em sentido lato (H^2) e coeficiente de variação genotípico (CV_G)

Características quantitativas	$\hat{\sigma}_g^2$ (SE)	$\hat{\sigma}_r^2$ (SE)	$\hat{\sigma}_{col(r)}^2$ (SE)	$\hat{\sigma}_{row(r)}^2$ (SE)	$\hat{\sigma}_e^2$ (SE)	REMLRT (p-value)	H^2	CV_G (%)
Rendimento (kg/planta)	0,634 (0,094)	0,045 (0,053)	0,220 (0,058)	0,051 (0,025)	0,781 (0,050)	175,655 (<0,001)	0,783	19,415
Peso do bago (g/bago)	0,014 (0,002)	0,001 (0,001)	0,001 (0,001)	0,001 (0,001)	0,019 (0,001)	172,777 (<0,001)	0,776	7,040
Teor de sólidos solúveis (grau brix)	1,897 (0,244)	0,074 (0,093)	0,430 (0,102)	0,167 (0,048)	0,892 (0,058)	424,861 (<0,001)	0,900	5,755
Acidez Total (g/L de ácido tartárico)	0,072 (0,018)	0,005 (0,009)	0,045 (0,015)	0,030 (0,012)	0,346 (0,022)	28,971 (<0,001)	0,476	5,015
pH	0,005 (0,001)	0,001 (0,001)	0,001 (0,000)	0,001 (0,000)	0,004 (0,000)	275,210 (<0,001)	0,852	1,777

A heritabilidade em sentido lato representa a proporção da variância fenotípica que é explicada por causas genéticas, variando entre zero e um. Quanto mais elevado for este valor, menor será o efeito dos desvios ambientais e maior será a eficiência de seleção. O teor de sólidos solúveis foi a característica quantitativa que apresentou maior heritabilidade, querendo isto dizer que 90% da variabilidade fenotípica (ao nível da média do genótipo) é devido a causas genéticas, seguindo-se o pH, o rendimento, o peso do bago e por fim a acidez total.

Os valores elevados de heritabilidade em sentido lato, expostos no **Quadro 5**, evidenciam que poderá ser realizada uma seleção eficiente para estas características quantitativas, no entanto, em menor grau para a acidez total (característica para a qual o valor da heritabilidade foi moderado). Dependendo do ensaio de campo e do ano, os valores de heritabilidade para o rendimento no delineamento RCD variam entre 0,501 e 0,812 para diversas variedades de *V. vinifera* (Gonçalves et al., 2022). No ano de 2020 e 2021, na variedade ‘Gouveio’, foi obtido no mesmo ensaio desta variedade um valor de heritabilidade de 0,757 e 0,773 respetivamente (Gonçalves et al., 2022), muito próximo ao valor obtido em 2023.

Numa perspectiva de seleção, um coeficiente de variabilidade genotípico elevado juntamente com valores elevados de heritabilidade em sentido lato, possibilitam um leque alargado de *performances* específicas a serem selecionadas em programas de seleção.

Como já referido, de todas as características quantitativas avaliadas, a acidez total foi a que apresentou valores de heritabilidade mais baixos, significando menores ganhos de seleção para esta característica. Estes valores poderão ser explicados pela metodologia utilizada, nomeadamente, pela baixa precisão de leitura da bureta durante a titulação; pelo volume de titulante adicionado (gota-a-gota) não ser o mais preciso, demonstrando assim a chegada ao ponto de equivalência com pouco rigor; e a solução de NaOH não ter sido feita no mesmo dia da realização da titulação, uma vez que, sendo uma base forte, pode “perder título”, diminuindo assim a concentração efetiva de NaOH na solução titulante.

3.2. Estudo metodológico sobre o efeito do número de repetições do ensaio na avaliação de características quantitativas

Os resultados relativos ao estudo efetuado para avaliar o efeito do número de repetições na exatidão e precisão associadas às estimativas dos parâmetros genéticos de interesse, nomeadamente, coeficiente de variação genotípico e heritabilidade em sentido lato, são apresentados no **Quadro 6** e nas **Figuras 10 e 11**. Nestes, encontram-se ainda os valores médios de H^2 e CV_G obtidos para todas as possíveis combinações de quatro, três e duas repetições (RCD4, RCD3 e RCD2, respetivamente).

Os valores de viés relativo (RB) e erro quadrático médio relativo ($RMSE$) avaliam a exatidão e precisão, respetivamente, das estimativas obtidas para os parâmetros genéticos avaliados nas diferentes características estudadas.

De acordo com as **Figuras 10 e 11**, as gamas de variação obtidas para o viés relativo e erro quadrático médio relativo associado às estimativas do coeficiente de variação genotípico são substancialmente inferiores às verificadas para as estimativas da heritabilidade em sentido lato.

Em geral, a partir da análise destes resultados, é possível inferir que com a diminuição do número de repetições são verificadas elevadas quebras nos valores de H^2 , principalmente a partir de três repetições, o que terá reflexos diretos na eficiência de seleção. Em contraste, menores quebras foram verificadas nos valores de CV_G , ou seja, na quantificação da variabilidade intravarietal.

Quadro 6 - Estudo metodológico relativo ao número de repetições do ensaio: valores médios para o coeficiente de variação genotípico (CV_G) e heritabilidade em sentido lato (H^2) obtidos para todas as possíveis combinações de quatro, três e duas repetições (RCD4, RCD3 e RCD2, respetivamente), viés relativo (RB) e erro quadrático médio relativo ($RMSE$) associados às estimativas de H^2 e CV_G para as diversas características quantitativas avaliadas (RCD5 refere-se ao delineamento experimental original com cinco repetições)

Rendimento 2023 (RCD5: CV_G (%) = 19,415, H^2 = 0,783)						
	CV_G (%)			H^2		
	RCD4	RCD3	RCD2	RCD4	RCD3	RCD2
Valor médio	19,395	19,360	19,276	0,741	0,681	0,585
RB (%)	-0,103	-0,286	-0,719	-5,263	-12,979	-25,296
RMSE (%)	0,064	0,195	0,774	0,296	1,778	7,018
Peso do bago 2023 (RCD5: CV_G (%) = 7,040, H^2 = 0,776)						
	CV_G (%)			H^2		
	RCD4	RCD3	RCD2	RCD4	RCD3	RCD2
Valor médio	7,053	7,067	7,090	0,736	0,678	0,588
RB (%)	0,191	0,395	0,721	-5,150	-12,612	-24,229
RMSE (%)	0,032	0,100	0,443	0,273	1,644	6,235
pH 2023 (RCD5: CV_G (%) = 1,777, H^2 = 0,852)						
	CV_G (%)			H^2		
	RCD4	RCD3	RCD2	RCD4	RCD3	RCD2
Valor médio	1,778	1,779	1,783	0,821	0,773	0,694
RB (%)	0,022	0,108	0,330	-3,653	-9,211	-18,518
RMSE (%)	0,010	0,047	0,201	0,140	0,886	3,667
Teor de sólidos solúveis 2023 (RCD5: CV_G (%) = 5,755, H^2 = 0,900)						
	CV_G (%)			H^2		
	RCD4	RCD3	RCD2	RCD4	RCD3	RCD2
Valor médio	5,762	5,776	5,797	0,878	0,844	0,784
RB (%)	0,131	0,374	0,741	-2,444	-6,248	-12,956
RMSE (%)	0,040	0,108	0,303	0,070	0,430	1,869
Acidez Total 2023 (RCD5: CV_G (%) = 5,015, H^2 = 0,476)						
	CV_G (%)			H^2		
	RCD4	RCD3	RCD2	RCD4	RCD3	RCD2
Valor médio	5,006	4,981	4,874	0,418	0,344	0,245
RB (%)	-0,180	-0,692	-2,816	-12,248	-27,736	-48,496
RMSE (%)	0,475	1,272	3,837	1,925	8,848	26,743

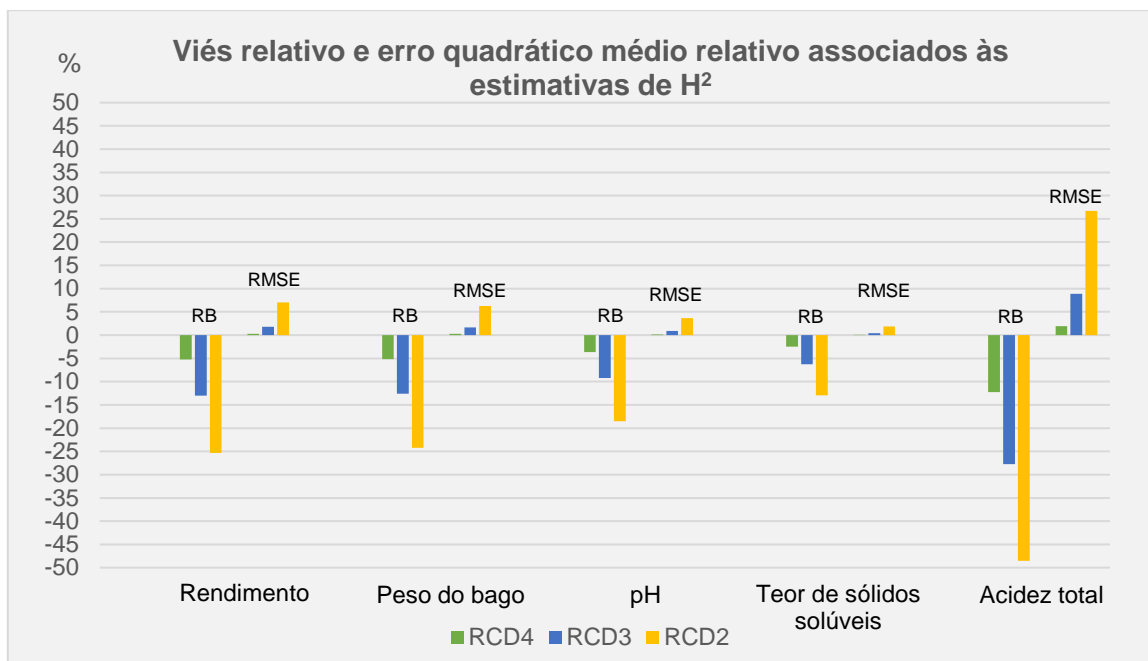


Figura 10 – Variações percentuais dos indicadores RB e RMSE associados às estimativas de heritabilidade em sentido lato (H^2) para o rendimento, peso do bago, pH, teor de sólidos solúveis e acidez total.

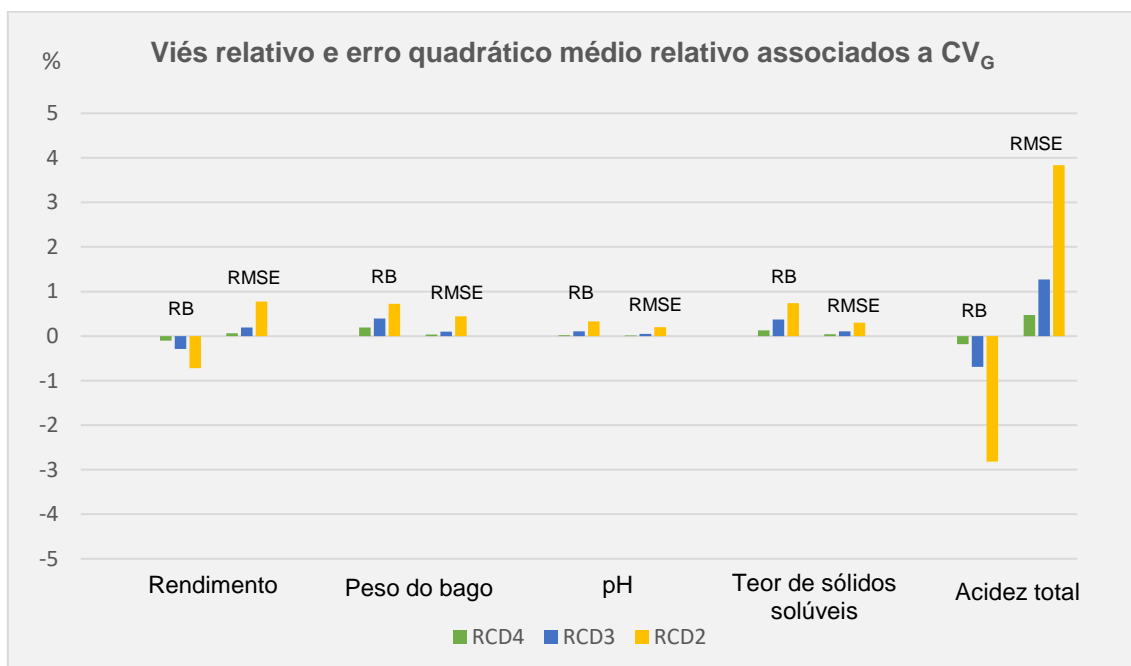


Figura 11 - Variações percentuais dos indicadores RB e RMSE associados às estimativas do coeficiente de variação genotípico (CV_G) para o rendimento, peso do bago, pH, teor de sólidos solúveis e acidez total.

A importância do número de repetições para uma maior eficiência de seleção é comprovada com os resultados obtidos para as diferentes características quantitativas avaliadas. É particularmente visível a sua importância na acidez total, rendimento e no peso do bago, onde a heritabilidade em sentido lato registou quebras consideráveis, principalmente, aquando da utilização de duas repetições. Deste modo, para a realização de seleção, a utilização de, pelo menos, quatro repetições do ensaio torna-se essencial para a obtenção de ganhos genéticos de seleção mais elevados. Estes resultados confirmam a importância do número de repetições no delineamento experimental adotado, sendo essencial que para características sujeitas à influência de maiores desvios ambientais, como por exemplo, rendimento e acidez total, o número de repetições usado para a colheita de dados não seja reduzido face ao delineamento original (isto é, cinco repetições).

Pelo contrário, para o estudo da variabilidade intravarietal, a importância do número de repetições não toma tamanha relevância. Para as estimativas da quantificação da variabilidade intravarietal, obtiveram-se valores do viés relativo e do erro quadrático médio inferiores a 1% face ao delineamento com cinco repetições, para todas as situações estudadas. Posto isto, a utilização de menos de cinco repetições na quantificação da variabilidade intravarietal não constitui um entrave para o estudo dessa variabilidade intravarietal.

Os resultados obtidos com este estudo de simulação estão de acordo com resultados anteriores obtidos para outras variedades relativamente ao rendimento: para a quantificação da variabilidade intravarietal duas repetições são suficientes, mas para a condução de uma seleção eficiente o número de repetições é muito importante, havendo perdas nessa eficiência com a redução do número de repetições, não sendo desejável que este número seja inferior a quatro (Gonçalves & Martins, 2019, 2022b). Relativamente às outras características avaliadas, verificou-se uma diminuição considerável para a precisão associada à quantificação da variabilidade intravarietal da acidez total. Em termos de seleção, para todas as características observou-se igualmente um decréscimo da sua eficiência apenas com duas repetições, sendo esse decréscimo mais acentuado na acidez total e peso bago, precisamente as características cuja avaliação está mais sujeitas à influência de desvios ambientais. Para a avaliação do teor de sólidos solúveis o uso de apenas três repetições não compromete a precisão da seleção. Estes resultados são muito relevantes para um melhor planeamento do processo experimental relativo aos ensaios que contêm amostras representativas da variabilidade intravarietal e que são estabelecidos para fins de seleção policlonal. Trata-se de ensaios com um grande número de genótipos, com mais de uma centena de clones em comparação e que, para serem viáveis, é necessário estabelecer um balanço entre o que é teoricamente mais correto (neste caso, quanto maior o número de

repetições mais exatas e precisas serão as estimativas dos parâmetros genéticos de interesse e mais eficiente será a seleção) e a exequibilidade do trabalho de campo e laboratorial. Este último ponto torna-se mais crítico quando se avaliam características de qualidade mosto que implicam a colheita de amostras de bagos de todos os clones do ensaio em várias repetições seguida da sua análise laboratorial (centenas de amostras terão sempre de ser colhidas). Um estabelecimento de um mínimo para o número de repetições para este tipo de característica é um resultado prático muito relevante. Neste trabalho, conclui-se que, no mínimo, três repetições são necessárias para a avaliação dessas características.

3.3. Avaliação da variabilidade intravarietal através da análise de características citogenômicas

Os valores de fluorescência representados nos histogramas correspondem à média dos picos delineados manualmente através de uma ferramenta no *software* FloMax, sendo que cada pico representa os núcleos corados de cada espécie, *V. vinifera* 'Gouveio' e *Solanum lycopersicum* 'Stupické' em diferentes fases do ciclo celular G₀/G₁ e G₂. Na **Figura 12** estão expostos três histogramas de fluorescência derivados da análise citogenômica de três clones diferentes.

O conteúdo em DNA nuclear foi calculado através da fórmula apresentada anteriormente no ponto 2.3.1., a partir da média dos picos G₁ da amostra e do padrão. Os resultados das cinco leituras realizadas para um clone específico encontram-se presentes no **Quadro 7**.

Quadro 7 – Resultados da citometria de fluxo referentes à amostra do clone GV0605 e do padrão utilizado

Genótipo	Bloco	Linha	Coluna	Leitura	Conteúdo nuclear da amostra (pg)	Conteúdo nuclear da amostra (Mbp)	C.V. amostra (%)	C.V. padrão (%)
GV0605	B3	120	42	1	1,283	1252,666	4,260	3,410
				2	1,495	1458,710	3,810	2,710
				3	1,358	1325,420	4,750	3,790
				4	1,287	1256,176	5,720	2,070
				5	1,419	1384,681	4,990	4,320

Os resultados da média das medições obtidas para o tamanho do genoma, dos 150 clones analisados encontram-se expostos na **Figura 13**. A média das medições para o tamanho do genoma de todos os clones de *V. vinifera* analisados foi 1,29±0,09 pg/2C DNA (1258,97 Mbp),

muito próximo do valor medido por Loureiro et al. (2007), $1,19 \pm 0,02$ pg/2C DNA. Estes resultados apresentaram um coeficiente de variação de 7,1%, variando desde 1,015 pg (clone GV0114, B3) até 1,511 pg (clone GV0075, B4).

Os valores, na íntegra, das medições para o tamanho do genoma dos diversos clones distribuídos pelos 3 blocos completos (representando 450 amostras), assim como o respetivo coeficiente de variação indicando a qualidade da suspensão de núcleos obtida, estão presentes no **Anexo 1**. Estes dois valores, 2C DNA e CV correspondem à média das cinco leituras realizadas para cada amostra.

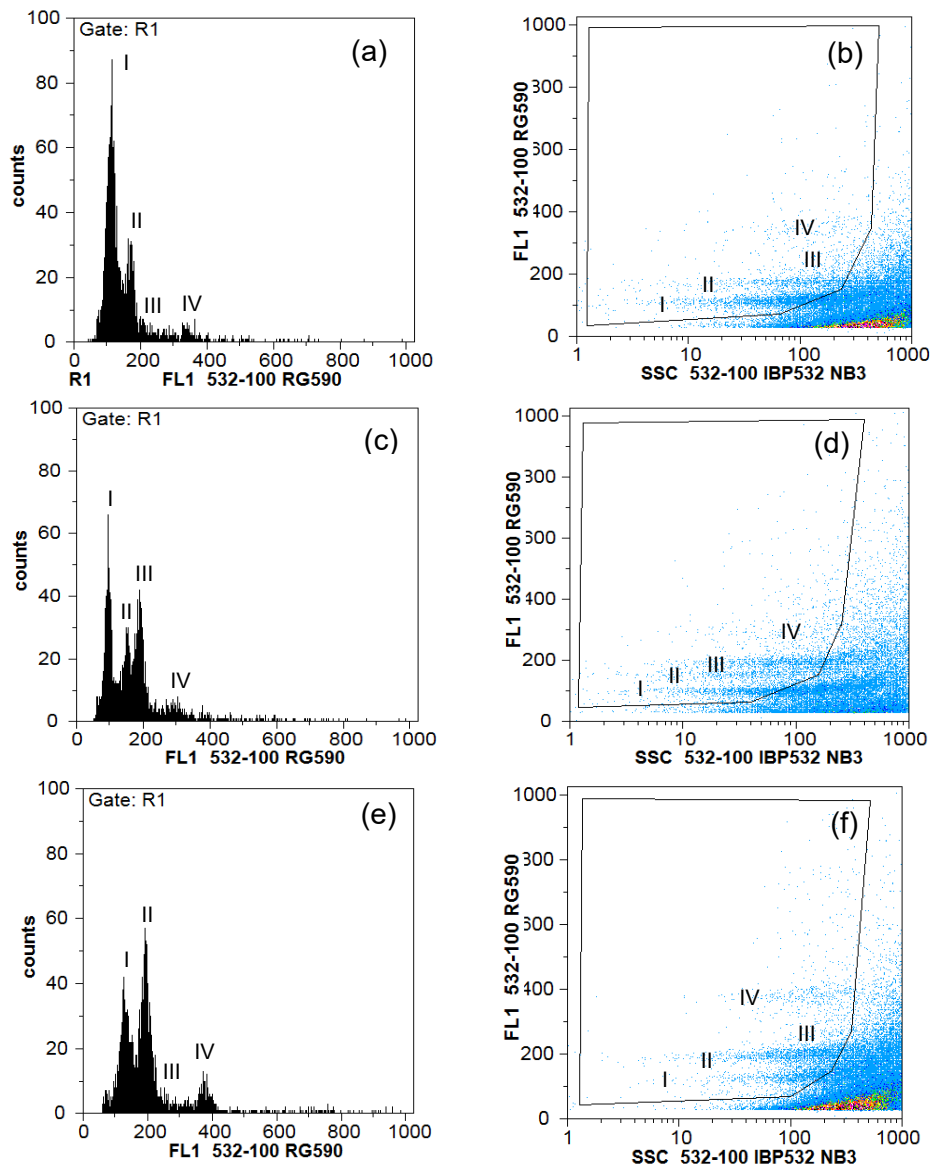


Figura 12 - Análise citogenômica realizada a partir de citometria de fluxo. Histogramas da intensidade de fluorescência relativa (FL1) [(a), (c) e (e)] e gráficos de pontos da difusão lateral da luz (SSC) versus FL1 [(b), (d) e (f)], obtidos através do isolamento simultâneo de núcleos da amostra em estudo, *Vitis vinifera* 'Gouveio', e *Solanum lycopersicum* 'Stupické' (standard, $2C = 1,96pg$), corados com iodeto de propídio. Os gráficos (a) e (b) correspondem ao clone GV0535 do bloco 5; (c) e (d) correspondem ao clone GV0126 do bloco 5; (e) e (f) correspondem ao clone GV5137-13 do bloco 5. I - Núcleos de *V. vinifera* em fase G_0/G_1 ; II - Núcleos de *S. lycopersicum* em fase G_0/G_1 ; III - Núcleos de *V. vinifera* em fase G_2 ; IV - Núcleos de *S. lycopersicum* em fase G_2 .



Figura 13 – Média amostral e respetivo desvio padrão do tamanho do genoma observado nos diferentes clones da casta 'Gouveio' nos blocos completos 3, 4 e 5.

O coeficiente de variação dos picos de DNA quantifica uma precisão de medições individuais, mas não diz nada sobre a estimativa do conteúdo de DNA (Doležel & Bartoš, 2005). Este indicador, correspondente à média dos coeficientes de variação para todas as amostras, tomou o valor de 4,8%. Os valores deste indicador, para serem considerados aceitáveis, devem estar geralmente abaixo dos 3% e abaixo dos 5% para espécies “complicadas” (Doležel & Bartoš, 2005), como foi o caso de *V. vinifera*.

Os resultados obtidos com o ajustamento do modelo linear misto descrito no ponto 2.3.4. (**Quadro 8**), mostraram a não existência de variabilidade intravarietal significativa ($p\text{-value} > 0,05$). Verificou-se, portanto, que a variação encontrada nas diversas medições para o tamanho do genoma entre os 150 clones da casta ‘Gouveio’ não foi significativa para qualquer nível de significância usual. Tal é comprovado pelo teste à componente de variância genotípica e pelo valor obtido para uma medida generalizada da heritabilidade em sentido lato (**Quadro 8**). O baixo valor calculado da estatística de teste REMLRT para a variância genotípica (REMLRT = 0,136 e a conseqüente não rejeição da hipótese nula para qualquer nível de significância usual), bem como o valor de zero para a heritabilidade em sentido lato, corroboram o facto da variabilidade encontrada para o tamanho do genoma não provir de diferenças entre clones, demonstrando assim a inviabilidade da utilização deste método para a quantificação da variabilidade intravarietal em *V. vinifera*. Essa variabilidade nas diversas medições do tamanho do genoma dos clones da casta ‘Gouveio’ deve-se essencialmente a desvios “ambientais” (isto é, variabilidade não explicada pelo modelo) e a causas controladas pelos fatores associados ao delineamento experimental.

Quadro 8 – Resultados do ajustamento do modelo linear misto aos dados do tamanho do genoma na variedade ‘Gouveio’: estimativas das componentes de variância genotípica ($\hat{\sigma}_g^2$), das colunas nas repetições resolúveis ($\hat{\sigma}_{col(r)}^2$), das linhas nas repetições resolúveis ($\hat{\sigma}_{row(r)}^2$), dos erros aleatórios e respetivos erros padrão (SE), teste de razão de verosimilhanças restritas (REMLRT) à variância genotípica (σ_g^2) e respetivo p-value, heritabilidade em sentido lato (H^2) e coeficiente de variação genotípico (CV_G)

	$\hat{\sigma}_g^2$ (SE)	$\hat{\sigma}_{col(r)}^2$ (SE)	$\hat{\sigma}_{row(r)}^2$ (SE)	$\hat{\sigma}_e^2$ (SE)	REMLRT (p-value)	H^2	CV_G (%)
Tamanho do genoma	0,0001 (0,0003)	0,0003 (0,0002)	0,0001 (0,0001)	0,0067 (0,0006)	0,1346 (>0,05)	0,0461	0,8697

Os desvios “ambientais” encontrados dever-se-ão essencialmente a erros aleatórios intrínsecos à metodologia utilizada que influenciaram a medição do genoma por parte do

citómetro. Erros estes como o fracionamento do material vegetal ter sido realizado manualmente (diferentes intensidades de fracionamento com durações desiguais entre amostras) gerando variações na quantidade de núcleos fracionados; o erro do próprio aparelho de medição (citómetro de fluxo), que apresentou leituras díspares para a mesma amostra (**Quadro 7**) e a existência de variabilidade na delimitação dos picos do histograma no *software* FloMax.

Neste modelo, a repetição resolúvel foi considerada como um fator de efeitos fixos. O teste aos efeitos deste fator revelou a existência de efeitos significativos do fator repetição resolúvel sobre o tamanho do genoma ($p\text{-value} < 0,001$). A existência de efeitos significativos das repetições resolúveis (blocos completos) existentes no campo indica-nos que as avaliações efetuadas em três fases, uma vez que cada um dos três blocos completos foi colhido num dia específico, influenciaram as medições do tamanho do genoma. A diferença temporal entre a colheita do primeiro bloco a ser analisado e último foi cerca de um mês (amostras do B5, B4 e B3 colhidas no dia 14 de junho, 30 de junho e 11 de julho, respetivamente), o que poderá ter levado à colheita de amostras foliares em diferentes estágios de desenvolvimento, interferindo assim com a fluorescência medida pelo citómetro. Folhas mais velhas apresentarão mais metabolitos secundários que afetam a coloração dos núcleos, como referido no ponto 1.3., levando conseqüentemente a uma diminuição ou até aumento da fluorescência nos histogramas.

4. Conclusão

O estudo da variabilidade genética intravarietal em variedades antigas de *V. vinifera* constitui um passo importante para um melhor conhecimento da variedade, para que posteriormente sejam levados a cabo programas de seleção policlonal e clonal. Aqui, o delineamento experimental torna-se crucial para fornecer uma avaliação de confiança das características quantitativas.

No ensaio de seleção da variedade 'Gouveio', foi encontrada variabilidade genética intravarietal significativa ($p\text{-value} < 0,001$) para todas as características quantitativas avaliadas: rendimento, peso do bago, pH, teor de sólidos solúveis e acidez total. O rendimento demonstrou ser a característica com maior variabilidade intravarietal, apresentando um coeficiente de variação genotípico superior a todas as outras características. Os valores de heritabilidade em sentido lato, que têm relação direta com a eficiência de seleção, apresentaram valores elevados, excetuando a acidez total que apresentou um valor moderado. Para a obtenção de melhores resultados na acidez total serão recomendáveis alterações na metodologia utilizada, nomeadamente na titulação e preparação de compostos.

Através da técnica de citometria de fluxo, não foi encontrada variabilidade intravarietal significativa ($p\text{-value} > 0,05$), inviabilizando deste modo a sua comparação com a variabilidade intravarietal encontrada para as características quantitativas avaliadas. A média amostral do tamanho do genoma resultante das medições dos diversos clones da variedade 'Gouveio' foi $1,29 \pm 0,09$ pg/2C DNA, apresentando um coeficiente de variação de 7,1% (1,015 pg - 1,511 pg) para valores de 2C DNA. A variabilidade encontrada em torno dos valores medidos para o tamanho do genoma nos diversos clones de 'Gouveio' dever-se-á apenas a erros aleatórios que influenciaram essas medições e a efeitos associados ao delineamento experimental, não sendo possível suportar a ideia que esta variabilidade poderia provir de sequências repetitivas do DNA e transposões através do método de análise utilizado.

O reduzido tamanho do genoma da videira, quando comparado com o tamanho do genoma de outras plantas, poderá dificultar a possibilidade de ser encontrada variabilidade citogenómica.

Através da existência de variabilidade genética entre os clones analisados da casta 'Gouveio' para as diversas características quantitativas avaliadas e da ausência de variabilidade intravarietal observada para o tamanho do genoma, poderá ser emitida a hipótese de que as diferenças genéticas existentes nos diversos clones dever-se-ão a mutações pontuais em certos genes e não a transposões, sequências repetitivas do DNA e outros fatores que afetam o tamanho do genoma.

Os estudos apresentados neste trabalho foram efetuados num ensaio estabelecido de acordo com um delineamento experimental linha-coluna resolúvel, por ser o tipo de delineamento que melhor controla a variabilidade espacial e outras fontes de variação sistemática em ensaios de grande dimensão. Porém, aliado ao tipo de casualização adotado, é importante avaliar a importância do número de repetições para a obtenção de resultados mais fidedignos. O estudo metodológico realizado sobre o efeito do número de repetições na exatidão e precisão das estimativas dos parâmetros de genética quantitativa, comprovou a importância da utilização de um maior número de repetições do ensaio para uma maior eficiência na seleção, especialmente nas características rendimento, peso do bago e acidez. Para a avaliação destas últimas características pelo menos quatro repetições deverão ser utilizadas.

Referências

- Arnold, C., Gillet, F., & Gobat, J. M. (2015). Situation de la vigne sauvage *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* en Europe. *Vitis-Journal of Grapevine Research*, 37(4): 159-170. <https://doi.org/10.5073/vitis.1998.37.159-170>
- Arumuganathan, K., & Earle, E. (1991). Estimation of Nuclear DNA Content of Plants by Flow Cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3): 229-233. <https://doi.org/10.1007/BF02672073>
- Augusto, D., Ibáñez, J., Pinto-Sintra, A. L., Falco, V., Leal, F., Martínez-Zapater, J. M., Oliveira, A. A., & Castro, I. (2021). Grapevine diversity and genetic relationships in northeast Portugal old vineyards. *Plants*, 10(12), 2755. <https://doi.org/10.3390/plants10122755>
- Bai, C., Alverson, W. S., Follansbee, A., & Waller, D. M. (2012). New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. *Annals of Botany*, 110(8): 1623-1629. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs222>
- Bennet, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J., & Johnston, J. S. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (~ 100 Mb) and *Drosophila* (~ 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~ 157 Mb and thus ~ 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~ 125 Mb. *Annals of Botany*, 91(5): 547-557. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg057>
- Bennett, M. D., & Leitch, I. J. (2005). Plant genome size research: a field in focus. *Annals of Botany*, 95(1): 1-6. <https://doi.org/10.1093/aob/mci001>
- Bennett, M. D., & Smith, J. B. (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 274(933): 227-274. <https://doi.org/10.1098/rstb.1976.0044>
- Bharathan, G., Lambert, G., & Galbraith, D. W. (1994). Nuclear DNA content of monocotyledons and related taxa. *American Journal of Botany*, 81(3): 381-386. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1994.tb15457.x>
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1999). Juice and wine acidity. In *Principles and Practices of Winemaking*. Springer, 15: 521-538. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6255-6_15
- Butler, D., Cullis, B., Gilmour, A., Gogel, B., & Thompson, R. (2023). ASReml-R Reference Manual Version 4.2. VSN International Ltd., Hemel Hempstead, HP2 4TP, UK.

- Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282(5396): 2012-2018. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>
- Cardoso, J. C. (1974). A classificação dos solos de Portugal (nova versão). *Boletim de Solos do SROA*, 17: 14-46.
- Chu, Z. F., Wen, J., Yang, Y. P., Nie, Z. L., & Meng, Y. (2018). Genome size variation and evolution in the grape family Vitaceae. *Journal of Systematics and Evolution*, 56(4): 273-282. <https://doi.org/10.1111/jse.12310>
- Doležel, J., & Greilhuber, J. (2010). Nuclear genome size: are we getting closer?. *Cytometry Part A*, 77(7): 635-642. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20915>
- Doležel, J., & Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99-110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H., & Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry – part A*, 51: 127–128. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.10013>
- Doležel, J., Binarová, P., & Lucretti, S. (1989). Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31(2): 113-120. <https://doi.org/10.1007/BF02907241>
- Doležel, J., Doleželová, M., & Novák, F. J. (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, 36(3): 351-357. <https://doi.org/10.1007/BF02920930>
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L., & Obermayers, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82: 17-26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a010312>
- Doležel, J., Sgorbati, S., & Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(4): 625-631. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x>
- Falconer, D. S. (1960). *Introduction to quantitative genetics*. Oliver and Boyd. 1: 1-371.
- Fernández, P., Amice, R., Bruy, D., Christenhusz, M. J., Leitch, I. J., Leitch, A. L., Pokorny, L., Hidalgo, O., & Pellicer, J. (2024). A 160 Gbp fern genome shatters size record for eukaryotes. *iScience*. 27(6): 109889 <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109889>
- Fisher, R. A. (1935). *The design of experiments*. Oliver and Boyd, UK.

- Franks, T., Botta, R., Thomas, M.R., & Franks, J. (2002). Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 192–199. <https://doi.org/10.1007/s001220100683>
- Galbraith, D. W. (1990). Flow cytometric analysis of plant genomes. Academic Press. *Methods in cell biology*, 33(48): 549-562. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60553-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60553-1)
- Galbraith, D. W., & Shields, B. A. (1982). The effects of inhibitors of cell wall synthesis on tobacco protoplast development. *Physiologia Plantarum*, 55(1): 25-30. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb00279.x>
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., & Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601): 1049-1051. <https://doi.org/10.1126/science.220.4601.1049>
- Galbraith, D. W., Lambert, G., Macas, J., & Doležel, J. (2001). Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Current Protocols in Cytometry*, 2: 7.6.1-7.6.22. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0706s02>
- Galindo-González, L., Mhiri, C., Deyholos, M. K., & Grandbastien, M. A. (2017). LTR-retrotransposons in plants: engines of evolution. *Gene*, 626: 14-25. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.04.051>
- Gonçalves, E., & Martins, A. (2019). Methods for conservation of intra-varietal genetic variability in ancient grapevine varieties. In *BIO Web of Conferences*. EDP Sciences, 15: 01029. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191501029>
- Gonçalves, E., & Martins, A. (2022a). Efficient Assessment and large-scale conservation of intra-varietal diversity of ancient grapevine varieties: case study Portugal. *Plants*, 11(15): 1917. <https://doi.org/10.3390/plants11151917>
- Gonçalves, E., & Martins, A. (2022b). Optimizing conservation and evaluation of intravarietal grapevine diversity. *Improving Sustainable Viticulture and Winemaking Practices*, 3: 45-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85150-3.00020-7>
- Gonçalves, E., Carrasquinho, I., & Martins, A. (2020). Measure to evaluate the sensitivity to genotype-by-environment interaction in grapevine clones. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 26(3), 259-270. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12432>
- Gonçalves, E., Carrasquinho, I., & Martins, A. (2022). Fully and partially replicated experimental designs for evaluating intravarietal variability in grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2022: 5293298. <https://doi.org/10.1155/2022/5293298>

Gonçalves, E., Faisca-Silva, D., Rocheta, M., Pinto, T., Carvalho, L., Pereira, L., Barrias, S., Rocha, S., Lopes, A., Guimarães, J., Mota, T., Costa, P., Manso, J., Arnaldo, L., Cardoso, M., Graça, A., Almeida, C., Vaz, L., Pedroso, V., Brazão, J., Carlos, F., Cavaco, A., Chambel, A., Mendes, L., Godinho, M., Cachão, M., Mata, F., Fino, C., Costa, J., Fernandes J., Porfírio, J., Cunha, J., Matos, J., Simões, F., Martins-Lopes, P., Viegas, W., & Martins, A. (2023). Large-scale screening of unknown varieties in a grapevine intra-varietal variability collection. *BIO Web of Conferences* 68: 01015. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20236801015>

Gonçalves, E., St.Aubyn, A., & Martins, A. (2010). Experimental designs for evaluation of genetic variability and selection of ancient grapevine varieties: a simulation study. *Heredity*, 104: 552-562. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.153>

González, R., Vallès, J., & Garnatje, T. (2022). Genome size variation assessment in *Vitis vinifera* L. landraces in Ibiza and Formentera (Balearic Islands). *Plants* 11(14): 1892. <https://doi.org/10.3390/plants11141892>

Grassi, F., & Lorenzis, G. D. (2021). Back to the origins: background and perspectives of grapevine domestication. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9): 4518. <https://doi.org/10.3390/ijms22094518>

Greilhuber, J., & Ebert, I. (1994). Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome*, 37(4): 646-655. <https://doi.org/10.1139/g94-092>

Greilhuber, J., Temsch, E. M., & Loureiro, J. C. (2007). Nuclear DNA content measurement. Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley-VCH, 1: 67-101. <https://doi.org/10.1002/9783527610921.ch4>

Guilengue, N., Alves, S., Talhinhos, P., & Neves-Martins, J. (2020). Genetic and genomic diversity in a tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) germplasm collection and adaptability to Mediterranean climate conditions. *Agronomy*, 10(1): 21. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010021>

Heller, F. O. (1973). DNS-Bestimmung an keimwurzeln von vicia faba L. mit hilfe der impulsctytophotometrie 1. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 86(5-9): 437-441. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1973.tb02427.x>

International Rice Genome Sequencing Project, & Sasaki, T. (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436(7052): 793-800. <https://doi.org/10.1038/nature03895>

IVV. (2016). Castas portuguesas têm futuro promissor. Instituto da Vinha e do Vinho. <https://www.ivv.gov.pt/np4/5872.html> (24/09/2024).

- IVV. (2016). Descritivo de castas. Instituto da Vinha e do Vinho. <https://www.ivv.gov.pt/np4/111/370.html> (02/02/2024).
- IVV. (2023). Evolução da produção mundial de vinho. Instituto da Vinha e do Vinho. <https://www.ivv.gov.pt/np4/36/> (15/04/2024).
- IVV. (2023). Evolução da produção nacional de vinho por região vitivinícola. Instituto da Vinha e do Vinho. <https://www.ivv.gov.pt/np4/36/> (15/04/2024).
- Johnston, J. S., Bennett, M. D., Rayburn, A. L., Galbraith, D. W., & Price, H. J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86(5): 609–613. <https://doi.org/10.2307/2656569>
- Kidwell, M. G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, 115: 49-63. <https://doi.org/10.1023/A:1016072014259>
- Leal, F., Loureiro, J., Rodriguez, E., Pais, M., Santos, C., & Pinto-Carnide, O. (2006). Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Reports*, 25(9): 978-985. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0162-1>
- Lee, S. I., & Kim, N. S. (2014). Transposable elements and genome size variations in plants. *Genomics & informatics*, 12(3): 87. <https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.3.87>
- Lodhi, M. A., & Reisch, B. I. (1995). Nuclear DNA content of *Vitis* species, cultivars, and other genera of the Vitaceae. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(1): 11–16. <https://doi.org/10.1007/BF00220990>
- Lorenzis, G., Squadrito, M., Rossini, M., Lorenzo, G., Brancadoro, L., & Scienza, A. (2017). Study of intra-varietal diversity in biotypes of Aglianico and Muscat of Alexandria (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23: 132–142. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12247>
- Loureiro, J. (2007). Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. Tese de Doutoramento em Biologia. Universidade de Aveiro.
- Loureiro, J., Kron, P., Tensch, E., Koutecký, P., Lopes, S., Castro, M., & Castro, S. (2021). Isolation of plant nuclei for estimation of nuclear DNA content: Overview and best practices. *Cytometry – part A*, 99: 318-327. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24331>
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C. (2007). Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Annals of Botany*, 100(4): 875-888. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm152>

- Lysak, M. A., & Dolezel, J. (1998). Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia*, 51(2): 123-132. <https://doi.org/10.1080/00087114.1998.10589127>
- Lysák, M. A., Rostková, A., Dixon, J. M., Rossi, G., & Doležel, J. (2000). Limited genome size variation in *Sesleria albicans*. *Annals of Botany*, 86(2): 399-403. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1200>
- Madeira, M. A. V., & Ricardo, R. P. (2012). Fatores e processos de evolução dos solos. Texto de apoio à UC de Formação e Conservação do Solo, Instituto Superior de Agronomia.
- Marie, D., & Brown, S. C. (1993). A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78(1-2): 41-51. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(93\)90113-S](https://doi.org/10.1016/0248-4900(93)90113-S)
- Martel, E., De Nay, D., Siljak-Yakoviev, S., Brown, S., & Sarr, A. (1997). Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. *Journal of Heredity*, 88(2): 139-143. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023072>
- Martins, A., & Gonçalves, E. (2015). Grapevine breeding programmes in Portugal. In A. G. Reynolds (Ed.), *Grapevine breeding programs for the wine industry: traditional and molecular techniques* 8: 159-182. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-075-0.00008-9>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: an overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Morgan, E. R., Burge, G. K., Seelye, J. F., Grant, J. E., & Hopping, M. E. (1995). Interspecific hybridisation between *Limonium perigrinum* Bergius and *Limonium purpuratum* L. *Euphytica*, 83(3): 215-224. <https://doi.org/10.1007/BF01678133>
- Ochatt, S. J. (2008). Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry - part A*, 73(7): 581-598. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20562>
- OIV. (2019). Resolution OIV-VITI 564B-2019. Process for the recovery and conservation of the intravarietal diversity and the polyclonal selection of the vine in grape varieties with wide genetic variability. *International Organisation of Vine and Wine*, 1-17.
- OIV. (2021). Total acidity. *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. *International Organisation of Vine and Wine*, 1: 433-435.
- Ollat, N., Bordnave L., Tandonnet, J.P., Boursiquot J.M., & Marguerit, E. (2016) Grapevine rootstocks: origins and perspectives. *Acta Horticulturae*, 1136: 11-22. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1136.2>

Otto, F. (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In *Methods in Cell Biology*. Academic Press, 33: 105-110. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60516-6)

Paschou, P., Drineas, P., Yannaki, E., Razou, A., Kanaki, K., Tsetsos, F., Padmanabhuni, S. S., Michalodimitrakis, M., Renda, M. C., Pavlovic, S., Anagnostopoulos, A., Stamatoyannopoulos, J. A., Kidd, K. K., & Stamatoyannopoulos, G. (2014). Maritime route of colonization of Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111(25): 9211-9216. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320811111>

Patterson, H. D., & Williams, E. (1976). A new class of resolvable incomplete block designs. *Biometrika*, 63(1): 83-92. <https://doi.org/10.1093/biomet/63.1.83>

Pereira, M. R. (2019) Diversidade genómica e genética intra-varietal em oliveira 'Galega Vulgar'. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia.

Pfossier, M., Amon, A., Lelley, T., & Heberle-Bors, E. (1995). Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry – part A*, 21(4): 387–393. <https://doi.org/10.1002/cyto.990210412>

Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. (2024). Vitaceae family. <https://powo.science.kew.org/> (02/10/2024).

Puite, K. J., & Ten Broeke, W. R. R. (1983). DNA staining of fixed and non-fixed plant protoplasts for flow cytometry with Hoechst 33342. *Plant Science Letters*, 32(1): 79-88. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(83\)90101-3](https://doi.org/10.1016/0304-4211(83)90101-3)

Santos, T., Lopes, C., Rodrigues, M., Souza, C., Ricardo-da-Silva, J., Maroco, J., Pereira, J., & Chaves, M. (2007). Effects of deficit irrigation strategies on cluster microclimate for improving fruit composition of Moscatel field-grown grapevines. *Scientia Horticulturae*, 112: 321-330. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.006>

Searle, S. R., Casella, G., & McCulloch, C. E. (1992). *C. variance components*. John Wiley: Hoboken, NJ, USA.

Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Leitch, I. J., Mucina, L., Pacini, E., Tichý, L., Grulich, V., & Rotreklová, O. (2014). Ecological and evolutionary significance of genomic GC content diversity in monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111(39): E4096-E4102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321152111>

- Temsch, E. M., Koutecký, P., Urfus, T., Šmarda, P., & Doležel, J. (2022). Reference standards for flow cytometric estimation of absolute nuclear DNA content in plants. *Cytometry - part A*, 101(9): 710-724. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24495>
- Terral, J., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance, J., Jung, C., Fabre, L., Tardy, C., Compan, M., Bacilieri, R., Lacombe, T., & This, P. (2010). Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105: 443-455. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp298>
- Tiersch, T. R., Chandler, R. W., Wachtel, S. S., & Elias, S. (1989). Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytometry – part A*, 10(6), 706-710. <https://doi.org/10.1002/cyto.990100606>
- Turpeinen, T., Kulmala, J., & Nevo, E. (1999). Genome size variation in *Hordeum spontaneum* populations. *Genome*, 42(6): 1094-1099. <https://doi.org/10.1139/g99-066>
- Van't Hof, J. (1965). Relationships between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the root meristem cells of several plants. *Experimental Cell Research*, 39(1):48-58. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90006-6)
- Veleba, A., Šmarda, P., Zedek, F., Horová, L., Šmerda, J., & Bureš, P. (2017). Evolution of genome size and genomic GC content in carnivorous holokinetics (Droseraceae). *Annals of Botany*, 119(3): 409-416. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw229>
- Veloso, M. M., Almandanim, M. C., Baleiras-Couto, M., Pereira, H. S., Carneiro, L. C., Feveireiro, P., & Eiras-Dias, J. (2010). Microsatellite database of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars used for wine production in Portugal. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 25 (2): 53-61.
- Veselý, P., Bureš, P., & Šmarda, P. (2013). Nutrient reserves may allow for genome size increase: evidence from comparison of geophytes and their sister non-geophytic relatives. *Annals of Botany*, 112(6): 1193-1200. <https://doi.org/10.1093/aob/mct185>
- Veselý, P., Bureš, P., Šmarda, P., & Pavlíček, T. (2012). Genome size and DNA base composition of geophytes: the mirror of phenology and ecology? *Annals of Botany*, 109(1): 65-75. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr267>
- Wang, W., Kerstetter, R. A., & Michael, T. P. (2011). Evolution of genome size in Duckweeds (Lemnaceae). *Journal of Botany*, 2011: 570319. <https://doi.org/10.1155/2011/570319>

- Welham, S. J., & Thompson, R. (1997). Likelihood ratio tests for fixed model terms using residual maximum likelihood. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 59(3): 701-714. <https://doi.org/10.1111/1467-9868.00092>
- Wen, J., Lu, L. M., Nie, Z. L., Liu, X. Q., Zhang, N., Ickert-Bond, S., Gerrath, J., Manchester, S. R., Boggan, J., & Chen, Z. D. (2018). A new phylogenetic tribal classification of the grape family (Vitaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 56(4): 262-272. <https://doi.org/10.1111/jse.12427>
- Williams, E. R., & John, J. (1989). Construction of row and column designs with contiguous replicates. *Journal of the Royal Statistical Society*, 38(1): 149-154. <https://doi.org/10.2307/2347689>
- Wong, G. K., Passey, D. A., Huang, Y., Yang, Z., & Yu, J. (2000). Is "junk" DNA mostly intron DNA?. *Genome Research*, 10(11): 1672–1678. <https://doi.org/10.1101/gr.148900>
- Yates, F. (1936). A new method of arranging variety trials involving a large number of varieties. *The Journal of Agricultural Science*, 26(3): 424-455. <https://doi.org/10.1017/S0021859600022760>
- Yokoya, K., Roberts, A. V., Mottley, J., Lewis, R., & Brandham, P. E. (2000). Nuclear DNA amounts in roses. *Annals of Botany*, 85(4): 557-561. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1102>

Anexo

Anexo 1 – Média das cinco leituras e respetivo valor do coeficiente de variação do pico G_0/G_1 (%), para cada amostra, do tamanho do genoma de *V. vinifera*, em pg, dos clones do ensaio de seleção da casta 'Gouveio' nos três blocos completos analisados (B3, B4 e B5).

	B3		B4		B5	
	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)
GV0011	1,343	5,31	1,241	6,08	1,337	4,68
GV0012	1,413	3,32	1,375	3,92	1,302	6,87
GV0013	1,205	4,16	1,167	4,88	1,376	5,64
GV0014	1,192	5,16	1,499	3,73	1,362	4,45
GV0015	1,240	5,69	1,431	4,10	1,312	6,04
GV0016	1,084	3,62	1,332	5,39	1,269	5,59
GV0021	1,348	3,42	1,219	4,94	1,449	5,05
GV0022	1,121	4,30	1,237	6,02	1,412	4,75
GV0023	1,302	3,40	1,331	4,76	1,281	6,57
GV0024	1,199	3,13	1,414	3,55	1,386	5,11
GV0025	1,187	4,37	1,312	3,89	1,282	5,30
GV0026	1,255	4,01	1,308	5,15	1,342	5,51
GV0032	1,462	4,03	1,227	4,69	1,326	4,99
GV0033	1,216	3,98	1,135	4,57	1,293	5,25
GV0034	1,360	3,74	1,344	3,71	1,328	4,97
GV0036	1,194	3,16	1,344	4,76	1,421	3,69
GV0041	1,187	4,02	1,320	4,18	1,365	5,77
GV0042	1,345	3,99	1,160	1,53	1,455	5,49
GV0043	1,257	2,23	1,406	4,28	1,209	5,48
GV0044	1,123	4,40	1,140	5,44	1,314	5,44
GV0045	1,208	4,08	1,351	5,86	1,307	6,10
GV0051	1,204	4,26	1,383	4,98	1,333	6,04
GV0052	1,107	6,55	1,272	4,79	1,389	5,73
GV0053	1,239	3,81	1,181	4,71	1,207	6,44
GV0055	1,230	4,93	1,286	5,12	1,378	5,91
GV0056	1,150	4,44	1,202	4,69	1,282	6,28
GV0061	1,378	4,29	1,432	3,92	1,391	3,91
GV0062	1,291	3,63	1,374	4,86	1,278	4,33
GV0063	1,181	5,05	1,265	4,45	1,323	5,17
GV0065	1,305	4,30	1,240	4,76	1,478	4,23
GV0071	1,065	5,52	1,285	4,24	1,248	5,72
GV0073	1,246	3,02	1,323	3,90	1,340	5,84
GV0074	1,255	3,62	1,200	5,59	1,254	5,70

Anexo 1 - Continuação I

	B3		B4		B5	
	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)
GV0075	1,195	4,06	1,511	3,44	1,282	6,63
GV0081	1,109	5,30	1,449	4,00	1,394	6,33
GV0082	1,356	4,60	1,216	6,60	1,358	5,42
GV0083	1,130	3,69	1,432	4,63	1,240	5,44
GV0084	1,257	5,75	1,273	5,35	1,224	6,41
GV0086	1,236	4,58	1,398	4,27	1,322	5,50
GV0091	1,269	5,16	1,396	4,70	1,288	5,65
GV0092	1,423	3,34	1,219	4,41	1,371	5,26
GV0093	1,255	3,40	1,136	4,73	1,295	5,61
GV0094	1,146	6,24	1,304	5,00	1,321	6,06
GV0095	1,295	4,85	1,110	5,79	1,194	6,32
GV0096	1,457	5,26	1,282	4,11	1,335	5,55
GV0102	1,248	3,83	1,192	5,93	1,327	3,01
GV0103	1,386	3,78	1,185	6,21	1,327	5,74
GV0104	1,221	4,47	1,228	4,44	1,476	4,15
GV0105	1,189	3,68	1,218	4,77	1,321	5,14
GV0106	1,193	3,36	1,299	5,45	1,462	4,40
GV0111	1,156	3,99	1,175	4,24	1,370	4,90
GV0113	1,253	5,49	1,390	4,41	1,447	4,77
GV0114	1,015	2,30	1,198	6,40	1,300	5,38
GV0115	1,199	6,07	1,321	4,85	1,292	4,47
GV0116	1,357	3,59	1,348	4,45	1,358	5,30
GV0121	1,198	2,66	1,224	4,18	NA	NA
GV0122	1,437	3,30	1,390	3,16	1,314	4,65
GV0123	1,379	5,07	1,270	5,34	1,318	4,26
GV0124	1,212	5,22	1,246	6,42	1,411	7,13
GV0125	1,223	4,21	1,399	4,46	1,388	6,12
GV0126	1,167	5,66	1,257	5,78	1,246	4,78
GV0131	1,206	3,91	1,178	5,65	NA	NA
GV0132	1,309	3,09	1,453	4,61	1,362	6,23
GV0133	1,245	4,94	1,211	5,21	1,390	4,91
GV0134	1,178	4,44	1,417	5,38	1,382	5,28
GV0135	1,314	4,08	1,336	4,26	NA	NA
GV0141	1,354	4,30	1,262	4,35	1,372	5,11
GV0142	1,257	5,05	1,258	5,25	1,265	5,30
GV0143	1,299	4,36	1,207	2,91	1,267	3,82
GV0144	1,209	5,63	1,231	5,96	1,327	5,20
GV0146	1,289	5,26	1,269	5,39	1,409	5,24

Anexo 1 – Continuação II

	B3		B4		B5	
	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)
GV0151	1,063	6,08	1,218	5,37	1,291	5,42
GV0152	1,212	4,85	1,466	4,38	1,292	5,68
GV0153	1,299	3,45	1,337	3,55	1,452	3,89
GV0154	1,109	4,47	1,135	5,25	1,411	5,44
GV0156	1,178	5,18	1,246	4,66	1,256	5,17
GV0521	1,392	3,80	1,204	4,14	1,364	5,82
GV0522	1,480	3,52	1,203	4,80	1,363	5,34
GV0524	1,303	4,86	1,227	2,96	1,353	6,17
GV0525	1,250	4,23	1,092	5,72	1,302	5,93
GV0526	1,192	4,39	1,406	3,90	1,280	5,87
GV0531	1,251	3,54	1,364	3,66	1,329	6,00
GV0533	1,264	3,88	1,192	5,77	1,378	4,42
GV0534	1,138	4,63	1,318	5,43	1,279	5,13
GV0535	1,352	5,51	1,235	6,55	1,262	6,07
GV0536	1,233	2,50	1,145	5,39	1,211	4,70
GV0541	1,062	4,63	1,189	3,71	1,351	4,45
GV0542	1,298	5,40	1,192	2,65	1,302	6,94
GV0543	1,130	3,89	1,334	5,56	1,274	5,46
GV0544	1,210	4,39	1,361	4,18	1,326	4,86
GV0545	1,194	5,35	1,259	4,22	1,375	5,14
GV0546	1,230	4,91	1,189	4,99	1,303	5,67
GV0552	1,273	4,53	1,385	4,57	1,180	6,74
GV0553	1,392	4,28	1,383	5,30	1,292	4,61
GV0554	1,343	4,65	1,272	5,48	1,379	5,50
GV0555	1,363	5,07	1,311	5,98	1,273	4,53
GV0556	1,310	4,47	1,127	6,58	1,465	5,10
GV0561	1,307	4,75	1,313	5,47	1,295	4,98
GV0562	1,368	3,47	1,247	4,70	1,414	4,45
GV0563	1,240	4,24	1,230	4,59	1,410	5,02
GV0564	1,344	3,18	1,232	4,11	1,311	5,09
GV0565	1,221	4,69	1,286	4,72	1,342	4,56
GV0571	1,347	3,80	1,494	4,13	1,319	5,75
GV0572	1,187	4,20	1,359	3,75	1,399	4,59
GV0574	1,128	4,06	1,347	6,05	1,266	5,71
GV0581	1,120	4,03	1,219	5,23	1,287	6,28
GV0583	1,230	4,51	1,321	4,85	1,288	4,46
GV0585	1,329	3,75	1,299	5,62	1,374	5,65
GV0586	1,347	3,86	1,368	6,56	1,351	4,98
GV0591	1,214	5,07	1,314	3,53	1,298	4,69
GV0592	1,097	2,66	1,381	4,33	1,208	6,07
GV0593	1,143	3,70	1,282	5,49	1,335	6,15

Anexo 1 – Continuação III

	B3		B4		B5	
	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)	Tamanho do genoma (pg)	C.V. (%)
GV0595	1,221	4,00	1,300	3,83	1,342	5,74
GV0602	1,228	5,11	1,281	4,91	1,299	6,14
GV0604	1,227	4,78	1,289	7,38	1,434	4,82
GV0605	1,368	4,71	1,240	6,37	1,280	5,47
GV0606	1,163	5,72	1,143	6,28	1,334	4,13
GV0621	1,169	5,59	1,432	4,24	1,349	5,85
GV0622	1,141	6,24	1,181	4,42	1,284	5,05
GV0623	1,361	4,68	1,237	3,41	1,392	4,54
GV0624	1,188	5,09	1,258	5,88	1,413	5,32
GV0626	1,309	3,66	1,297	3,55	1,293	6,30
GV0632	1,293	5,08	1,171	5,85	1,398	3,51
GV0633	1,207	4,60	1,338	4,06	1,319	5,73
GV13030-13	1,139	6,38	1,456	4,27	1,265	5,32
GV13030-14	1,196	3,75	1,420	4,18	1,211	5,55
GV13030-15	1,237	3,64	1,239	5,56	1,376	5,04
GV13030-16	1,166	5,64	1,186	4,72	1,321	5,08
GV13030-19	1,380	3,94	1,226	6,17	1,305	5,99
GV13030-20	1,084	5,80	1,352	3,36	1,350	6,74
GV5137-1	1,333	2,57	1,495	4,13	1,420	5,72
GV5137-11	1,468	4,39	1,397	4,48	1,270	4,95
GV5137-13	1,302	4,36	1,249	4,25	1,296	4,97
GV5137-2	1,297	5,48	1,225	5,00	1,415	5,93
GV5137-3	1,244	5,21	1,229	5,23	1,355	5,12
GV5137-5	1,332	4,55	1,424	3,52	1,325	5,91
GV5139-1	1,391	4,07	1,236	6,82	1,264	6,51
GV5139-2	1,371	NA	1,417	4,79	1,427	5,51
GV5139-5	1,296	3,45	1,282	4,73	1,349	5,12
GV5139-6	NA	NA	1,329	4,11	1,347	6,48
GV5140-10	1,335	4,25	1,291	5,11	1,416	4,99
GV5140-11	1,263	4,68	1,369	5,80	1,372	6,04
GV5140-13	1,125	5,49	1,387	5,51	1,327	5,78
GV5140-15	1,319	4,23	NA	NA	NA	NA
GV5140-18	1,206	3,78	NA	NA	1,448	5,10
GV5140-24	1,060	4,97	1,308	3,89	1,335	5,32
GV5141-3	1,182	4,06	1,268	3,56	1,375	5,77
GV5142-2	1,235	3,40	1,169	5,57	NA	NA
GV5144-14	1,322	3,47	1,125	5,12	1,294	6,03
GV5146-13	1,277	3,04	1,297	5,84	1,385	5,23