

MSC

2.º
CICLO

FCUP
ISA
2018

U. PORTO

Caracterização das variedades de *Vitis vinifera*L.
tradicionalmente cultivadas na Região Autónoma da madeira

Catarina Isabel Rodrigues

FC

U. PORTO
FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

INSTITUTO
SUPERIOR D
AGRONOMIA
*Hinc
Patriam
Sustinet*
Universidade de Lisboa

Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I.P.
iniav

Caracterização das variedades de *Vitis vinifera* L. tradicionalmente cultivadas na Região Autónoma da Madeira

Catarina Isabel Duarte da Silva Rodrigues

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Viticultura e Enologia

2018

U. PORTO
FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

M

S

C

M

S

C

M

S

C



Caracterização das variedades de *Vitis vinifera* L. tradicionalmente cultivadas na Região Autónoma da Madeira

Catarina Isabel Duarte da Silva Rodrigues

Mestrado em Viticultura e Enologia

Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território

2018

Orientadores

Doutor Jorge Bernardo Lacerda de Queiroz, Professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

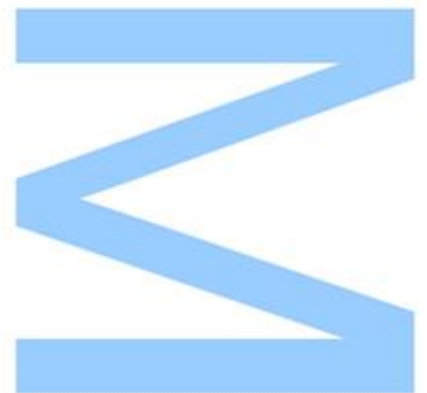
Doutor Jorge Manuel Martins Cunha, Investigador auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



O presente trabalho foi realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) – Dois Portos, no departamento de Viticultura, secção de Ampelografia.

Aos meus Pais

“O futuro anuncia o regresso ao passado com a afirmação das castas tradicionais”

Vieira *et al.* (1998)

Agradecimentos

Começo por exprimir os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de algum modo contribuíram, direta ou indiretamente, para a sua concretização.

Ao Doutor Jorge Queiroz, professor na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela disponibilidade que demonstrou ao ter aceitado ser orientador de estágio, bem como, pela simpatia, ajuda e disponibilidade que demonstrou no decorrer deste trabalho, para além do seu contributo na minha formação académica.

Ao Doutor Jorge Cunha, meu orientador no INIAV – Pólo de Dois Portos, por toda a sua ajuda, disponibilidade, empenho e dinamismo incansável que o caracteriza, bem como, pelos conhecimentos transmitidos, amizade, compreensão e paciência demonstradas ao longo da realização deste trabalho.

Ao Doutor Eiras-Dias e ao Sr.^o Engenheiro João Brazão, pela simpatia, ajuda, informação disponibilizada, esclarecimento de dúvidas e disponibilidade demonstrada durante a elaboração da tese de mestrado.

À Senhora Amélia Soares, técnica de laboratório, pela ajuda na realização das análises físico-químicas.

A todos os colaboradores do INIAV – Pólo de Dois Portos, pelo ambiente de trabalho acolhedor, pela amabilidade e ajuda sempre demonstradas.

À Sr.^a Engenheira Carlota Ferreira, da Direção de Serviços de Vitivinicultura do Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, pela informação facultada.

Aos colegas de curso de Pós-Graduação e de Mestrado em Viticultura e Enologia, pelo excelente convívio e troca de experiências.

Aos meus amigos Helena Gabriel, Cristiano Francisco e Nuno Fernandes pela amizade, apoio, ajuda, conselhos e vivências partilhadas. Em especial à Helena e ao Cristiano, que me acolheram e receberam em sua casa. Ao Nuno Fernandes pelos seus preciosos ensinamentos. À Diana Leão Costa pelo companheirismo e aventuras

partilhadas e à Ana Morgadinho, amiga de longa data, que apesar de longe está sempre presente, pela preciosa ajuda na finalização deste trabalho.

Um agradecimento especial e afetuoso aos meus pais, a quem dedico este trabalho, pela ajuda e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e, também, por me incentivarem na realização do mestrado.

A todos o meu Obrigada.

Resumo

A cultura da vinha em Portugal tem uma longa tradição, assim como uma grande diversidade de variedades de videira. Esta diversidade deve-se principalmente à longa história de cultivo da videira, que gerou novas plantas através da germinação de grainhas (cruzamento sexuado) e à propagação vegetativa, que permitiu a conservação e a evolução das variedades ao longo dos séculos. Da disseminação da referida diversidade por todo o país resultou um grande número de sinónimos, homónimos e erros de identidade das variedades. A caracterização ampelográfica através da morfologia e ampelometria, complementada com a análise genética molecular, baseada no polimorfismo de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) através de SSR (Simple Sequence Repeats), tornaram-se as técnicas de eleição para identificação e distinção de variedades.

Neste trabalho, o principal objetivo foi caracterizar as variedades tradicionais da RAM (Região Autónoma da Madeira). Assim, foram selecionados 41 acessos de *Vitis vinifera* L. na CAN (Coleção Ampelográfica Nacional), com a finalidade de clarificar sinonímias, homonímias ou identificar erros de identidade nas variedades cultivadas no Arquipélago da Madeira e entre variedades cultivadas apenas em Portugal Continental. Para a caracterização ampelográfica foram utilizados os descritores da OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), tendo sido caracterizadas morfologicamente 10 variedades, enquanto para a caracterização molecular foram utilizados os perfis de nove SSR (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79, VVS2), conforme recomendado pela base de dados do VVC (*Vitis* International Variety Catalogue). A análise global dos resultados para a descrição morfológica permitiu validar algumas características morfológicas em quatro variedades distintas. A caracterização molecular através do método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), permitiu observar a diversidade genética entre as variedades estudadas, tendo sido identificadas 15 sinonímias e um total de 26 genótipos únicos, dos quais quatro pares de genótipos apresentam variação somática ao nível da cor do bago.

Palavras-Chave: SSR, *Vitis vinifera* L., sinonímias, homonímias, OIV, UPGMA.

Abstract

The culture of the vineyard in Portugal has a long tradition, as well as a great diversity of vine varieties. This diversity is mainly due to the long history of grapevine cultivation, which has generated new plants through seed germination (sexual intercourse) and vegetative propagation, which has allowed the conservation and evolution of the varieties over the centuries. The dissemination of this diversity throughout the country resulted in a large number of synonyms, homonyms and errors of identity of the varieties. Thus, the Ampelographic characterization through morphology and ampelometry complemented with molecular genetic analysis, based on the polymorphism of DNA (Deoxyribonucleic acid) through microsatellites (SSR – Simple Sequence Repeats) became the technique of choice for identification and distinction of varieties.

In this work the main objective was to characterize the traditional varieties of the Autonomous Region of Madeira. Thus, 41 accessions of *Vitis vinifera* L. were selected in CAN (National Ampelographic Collection), with the purpose of clarifying synonymies, homonymies or identifying identity errors in the varieties cultivated in the Madeira Archipelago and among varieties cultivated only in Continental Portugal. For the ampelographic characterization, the descriptors of the OIV (International Organization of Vigne et du Vin) were used, and 10 varieties were characterized morphologically, while for the molecular characterization the profiles of nine SSR profiles (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79, VVS2) were used, as recommended by VVC (*Vitis* International Variety Catalog) database. The global analysis of the results for the morphological description allowed to validate some morphological characteristics in four different varieties. The molecular characterization through UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) allowed to observe the genetic diversity between the studied varieties, with 15 synonyms and a total of 26 unique genotypes identified, of which four pairs of genotypes present somatic variation at the color of the berry.

Keywords: SSR, *Vitis vinifera* L., synonyms, homonyms, OIV, UPGMA.

Índice

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ANEXOS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Ampelografia Clássica, Morfologia e Ampelometria	5
2.2 Marcadores Bioquímicos - Isoenzimas.....	6
2.3 Marcadores Moleculares	7
2.3.1 Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)	10
2.3.2 Polimorfismo do ADN Amplificado ao Acaso (RAPD)	11
2.3.3 Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).....	12
2.3.4 Sequências Simples Repetidas (SSR).....	13
2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	14
2.5 Sequenciador de Fluorescência Automático	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Material Vegetal	18

3.2 Extração de ADN	19
3.3 Quantificação de ADN.....	20
3.4 Análise por Microssatélites.....	20
3.4.1 Reação de PCR para Amplificação de Fragmentos de Microssatélites... 21	
3.4.2 Deteção dos Fragmentos em Sequenciador Automático	23
3.4.3 análise de Dados.....	23
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Identidade, Sinonímias e Homonímias das Variedades Tradicionalmente Cultivadas na Região Autónoma da Madeira.....	25
4.2 Análise das Variedades Tradicionalmente Cultivadas na Madeira	39
4.2.1 Análise da Diversidade Genética das Variedades	39
4.2.2 Caracterização Morfológica das Variedades do Arquipélago da Madeira	40
5.CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS.....	65

Lista de Figuras

FIGURA 1 - PCR, Reação em Cadeia da Polimerase (adaptado de Garibyan & Avashia, 2013)	15
FIGURA 3 - Termociclador T Gradient (Whatman – Biometra, Gottingen; Germany) e análise dos resultados do PCR.....	16
FIGURA 4 - Sequenciador automático CEQTM 8000 Genetic Analysis System.....	17
FIGURA 5 - Exemplo de gel de agarose (1,2%) após eletroforese dos produtos PCR da mix I das variedades em estudo	23
FIGURA 6 - Fenograma dos 41 acessos utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) obtido a partir da matriz de distância genética gerada com base nos dados alélicos dos nove <i>loci</i> de SSR.....	28

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Marcadores utilizados na caracterização genética de plantas (Adaptado de FAO/IAEA, 2002; Mueller & Wolfenbarger, 1999; Cabral, 2008).	9
TABELA 2 - Nome, origem e código de referência na CAN das variedades analisadas	19
TABELA 3 - Microssatélites, LG, sequência de <i>primers</i> e referências dos SSR estudados	21
TABELA 4 - Misturas de reagentes utilizados (MIX I e MIX II) para obtenção dos produtos PCR.	22
TABELA 5 - Fases de PCR no termociclador (desnaturação, emparelhamento e extensão).....	22
TABELA 6 – Tamanho dos alelos para os nove loci de microssatélites de 41 acessos de <i>Vitis vinifera</i> L. para identificação de sinónimos e/ou homónimos.....	26
TABELA 7 - <i>Locus</i> , sequências repetitivas, intervalo de tamanhos, número de amostras (n), número de alelos (Na), heterozigocidade observada (Ho), heterozigocidade esperada (He) para os nove microssatélites nucleares analisados.....	40

Lista de Anexos

ANEXO I - Extração de ADN	66
ANEXO II - Quantificação de ADN.....	68
ANEXO III - Descrição morfológica dos 10 acessos segundo os descritores da OIV	69

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

ARN – Ácido Ribonucleico

CAN - Coleção Ampelográfica Nacional

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DO – Denominação de Origem

IG – Indicação Geográfica

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

JORAM - Jornal Oficial da Região Autónoma da Madeira

MAMAOT - Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território

OIV – Organisation Internationale de la Vigne et du Vin

PCR – Polymerase Chain Reaction

RAM – Região Autónoma da Madeira

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

RDM – Região Demarcada da Madeira

RFLP - Restriction Fragment length Polymorphism

SIGSVV - Sistema Integrado de Gestão do Sector Vitivinícola

SSR - Simple Sequence Repeats (Microsatélites)

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

UPOV – Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétaux

VVC – *Vitis* International Variety Catalogue

1. Introdução

Portugal é atualmente considerado o país da bacia mediterrânica com maior densidade de variedades autóctones de *Vitis vinifera* L. (Castro *et al.*, 2013). A cultura da vinha, no nosso país é uma das atividades de grande importância económica e social, encontrando-se distribuída entre 37º a 42º de latitude Norte e de 7º a 9,5º de longitude Oeste, abrangendo toda a área do continente e algumas ilhas dos arquipélagos da Madeira e dos Açores, estando bem adaptada às condições edafo-climáticas prevaletentes nessas áreas (Clímaco, 1997).

Aquando do povoamento da ilha da Madeira, descoberta em 1418 por navegadores portugueses, o Infante D. Henrique ordenou a introdução de videiras vindas do reino e, mais tarde, de outras áreas da bacia do Mediterrâneo (Vieira *et al.*, 1998), tendo sido a vinha e a cana-de-açúcar as principais culturas introduzidas no arquipélago desde o início da colonização (Carvalho & Correia, 1983).

A Região Demarcada da Madeira (RDM), compreendida pelas ilhas da Madeira e Porto Santo é caracterizada pela multiplicidade de microclimas, altitude e exposição das parcelas associadas ao solo de origem em rochas vulcânicas, principalmente basaltos, traquites, tufos e escórias (Vieira *et al.*, 1998), com pH ácido a muito ácido (Freitas, 2011).

A cultura da vinha começou por ser instalada nas zonas baixas e secas da parte sul da ilha da Madeira (França, 1981; Brazão, 1998), tendo um maior impulso no arquipélago quando a indústria do açúcar começou a decair, sobretudo depois do ano 1640 com o estabelecimento dos ingleses na ilha, gozando de privilégios especiais em relação ao comércio de vinhos e tornando-se os principais dinamizadores da cultura (Vieira *et al.*, 1998).

Desde muito cedo, o Arquipélago da Madeira ficou conhecido pela qualidade dos vinhos com elevada acidez, proporcionando-lhes longevidade (Freitas, 2011) e pela produtividade das vinhas, em particular, os vinhos produzidos a partir da casta Malvasia Cândida, havendo também uma expressão significativa das castas Verdelho, Sercial, Boal, Terrantez e Tinta da Madeira. No período após a devastação da vinha pelo oídio e pela filoxera, verificou-se uma profunda alteração do encepamento da

região. Os híbridos e variedades de videiras americanas apresentavam-se resistentes à filoxera e às doenças criptogâmicas mais importantes e produziam abundantemente, o que levou os agricultores a cultivá-las em detrimento das variedades tradicionais (Brazão, 1998).

Até ao início da década de 1980, a cultura da vinha praticava-se em todos os concelhos da região do arquipélago, sendo os concelhos de Câmara de Lobos, São Vicente, Santana, Porto Moniz e Calheta os mais significativos na produção vitícola (SIGSVV, consultado em 07/02/2018).

Presentemente a Região Autónoma da Madeira (RAM) abrange uma área vitícola de aproximadamente 500ha (Machado, 2017) e as castas mais difundidas são: Tinta Negra, Verdelho, Complexa, Sercial, Malvasia Fina e Caracol. As variedades Deliciosa, Rio Grande e Mário Feld constam nas Portarias n.ºs 395/2017 e 396/2017, de 9 de outubro, mas a sua área atual de cultura não se encontra definida no SIGSVV (Sistema Integrado de Gestão do Setor Vitivinícola), o que pressupõe a sua extinção a curto prazo, bem como da variedade Verdelho Tinto referenciada na Portaria n.º 39/2015, de 13 de fevereiro (SIGSVV, consultado em 07/02/2018). Na variedade Malvasia Babosa mencionada por Garcia Ramos, em 1879 (Menezes, 1896), e regulamentada no Decreto Regular Regional n.º 20/85/M, de 21 outubro, a situação é ainda mais crítica, uma vez que não é referida na atual portaria de castas de uvas aptas à produção de vinho com DO “Madeira” (Portaria n.º 39/2015, de 13 de fevereiro), nem nas portarias de castas de uvas aptas à produção de vinho com DO “Madeirense” e IG “Terras Madeirenses” (Portarias n.ºs 395/2017 e 396/2017, de 9 de outubro).

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar as variedades tradicionalmente cultivadas na Região Autónoma da Madeira e clarificar algumas sinonímias/homonímias existentes entre variedades de Portugal Continental, previamente identificadas quer através do ADN, utilizando marcadores moleculares, quer através da morfologia, utilizando descritores morfológicos.

2. Revisão Bibliográfica

Na segunda metade do século XIX, os vinhedos europeus foram devastados pelo míldio (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl & de Toni) e pela filoxera (*Dactylosphaera vitifoliae* Fitch), causando uma redução dramática na diversidade genética da videira (Cipriani *et al.*, 2010). A viticultura europeia foi salva da extinção pela introdução de várias espécies indígenas americanas, que foram utilizadas como porta-enxertos e para a criação de híbridos interespecíficos resistentes a doenças (This *et al.*, 2006).

No século XX, com o desenvolvimento global da vinha e da indústria do vinho, restringiram-se ainda mais as variedades cultivadas. Estas passaram a ser em menor número, devido principalmente à ampla disseminação de um pequeno número de castas francesas mais adaptadas à procura do mercado vitivinícola, em detrimento das variedades tradicionalmente cultivadas. Muitas destas variedades tradicionais foram abandonadas, com sérios riscos de virem a desaparecer, e só recentemente renasceu o interesse por muitas delas, as quais foram reintroduzidas em “homenagem” ao património cultural e às tradições locais (Cipriani *et al.*, 2010).

Para preservar os recursos genéticos da vinha, têm sido realizados numerosos estudos um pouco por todo o mundo vitícola, visando o levantamento, a localização, a caracterização e a manutenção de variedades tradicionalmente cultivadas em cada região (Moreno-Sanz *et al.*, 2011). Muitos marcadores morfológicos e moleculares foram utilizados para a caracterização do germoplasma de *Vitis vinifera* L.. Entre eles, a caracterização ampelográfica de acordo com características morfológicas (Galet, 1979; Cervera *et al.*, 1998) tem sido útil na identificação de variedades de videira e facilitou o esclarecimento de denominações ou o estabelecimento de relações fenológicas. A caracterização morfológica é um processo demorado, baseada em caracteres que podem ser facilmente influenciados pelo meio ambiente e pela subjetividade do ampelógrafo (Levadoux, 1956; Cervera *et al.*, 1998).

Evidências históricas têm sido frequentemente utilizadas para inferir a origem e as relações das videiras cultivadas. No entanto, as conclusões sobre esses motivos são frequentemente questionadas: sinónimos e filogenia precisam de verificação e identificação, e os erros precisam de ser corrigidos. Neste contexto, existe um

interesse crescente em compreender a origem e a diversidade genética do germoplasma da videira proveniente de diferentes áreas geográficas, bem como em resolver a complexidade das relações entre esse germoplasma e as variedades internacionais mais conhecidas (Grassi *et al.*, 2003).

Deste modo, surgiram novas ferramentas moleculares para caracterizar a biodiversidade entre os genomas das plantas (Karp *et al.*, 1998; Fossati *et al.*, 2001), tornando mais direto e eficaz o estudo da identidade e origem da videira (Grassi *et al.*, 2003). Os microssatélites (Repetições de Sequência Simples, SSR) são considerados os marcadores moleculares mais eficientes na identificação de variedades de videira, sendo abundante e uniformemente distribuídos ao longo do genoma e herdados de modo codominante. Além disso, os SSR são altamente reprodutíveis e têm requisitos de rastreio simples, sendo particularmente vantajosos para estudos de populações e mapeamentos genéticos (Rossetto *et al.*, 2002). Os microssatélites são amplamente utilizados na pesquisa genética da videira para identificação de variedades, análise de parentesco, mapeamento do genoma, caracterização genética de germoplasma e de esclarecimento de sinónimos e homónimos. Contudo, o estudo com recurso a microssatélites é um processo dispendioso e demorado, que envolve a construção e rastreio de bibliotecas genómicas e o desenho e otimização de *primers* para realização de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Arroyo-Garcia & Martinez-Zapater, 2004).

A diversidade de videiras existentes atualmente foi moldada pela história e evolução da humanidade. Existem milhares de variedades, das quais apenas uma pequena parte é comercialmente utilizada. Felizmente, a maior parte da diversidade genética da videira encontra-se ainda preservada em colecções de germoplasma existentes por todo o mundo vitivinícola (This *et al.*, 2006), permitindo estudar e caracterizar amplamente o património genético da espécie, seja por métodos morfológicos ou moleculares.

2.1 Ampelografia Clássica, Morfologia e Ampelometria

Ampelografia (do grego, o estudo “grafia” da videira “ampelos”) é o termo que designa o ramo da Ampelologia que tem por objetivo caracterizar, classificar e identificar as variedades de videira (Eiras-Dias, 1994).

A identificação de variedades de videira foi, durante muito tempo, tradicionalmente realizada através da ampelografia clássica, baseando-se na análise e comparação de características morfológicas de folhas, extremidade dos ramos jovens, pâmpanos e frutos (Galet, 1991; Boursiquot & This, 1996; IPGRI, UPOV, OIV, 1997; Galet, 2000; This *et al.*, 2004). Esta metodologia foi a primeira a ser utilizada na caracterização e descrição das variedades. No entanto, apesar do seu grande contributo para a viticultura, a ampelografia clássica apresenta desvantagens inerentes ao facto de basear a classificação em características fenotípicas da videira.

Durante o crescimento da videira, a expressão do genótipo em fenótipo é influenciada por fatores ambientais (Monteiro, 1999; Soldado, 2005), como o clima, agentes patogénicos, características do solo ou estado nutricional das plantas (Castro *et al.*, 2012). Além disso, as plantas juvenis até aos quatro ou cinco anos são difíceis de identificar, visto que não apresentam os traços morfológicos típicos de plantas adultas (Vignani *et al.*, 1996; Franks *et al.*, 2002; Riaz *et al.*, 2002; This *et al.*, 2004).

Associada à descrição morfológica está ainda a ampelometria e os métodos filométricos. Estes métodos consistem em medições feitas na folha adulta da videira. Em complemento à filometria, é ainda possível recorrer à carpometria, uma vez que os quocientes diâmetro/comprimento dos bagos e largura/comprimento das grainhas têm grande valor na distinção entre variedades (Eiras-Dias, 1994).

Em Portugal, os primeiros trabalhos ampelográficos apresentavam um nível bastante empírico, nomeadamente no que diz respeito às características relacionadas com a cultura e vinificação das variedades. Nos anos de 1940, é publicada uma descrição ampelográfica de 44 variedades brancas e 48 variedades tintas, por Carvalho e Vasconcellos, Luís Santa Bárbara e Alfredo Baptista, onde são referenciados os principais caracteres de cada variedade e onde são feitas medições angulares nas folhas adultas (Eiras-Dias, 1984).

No decorrer dos anos de 1950, foi criado por Acúrcio Rodrigues um método filométrico de caracterização ampelográfica premiado pela OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), uma vez que a descrição da morfologia externa não era considerada suficiente para uma perfeita caracterização das diferentes variedades. Naquele trabalho, recorreu-se às descrições biométricas das folhas e dos frutos, suscetíveis de interpretação estatística e independentes do observador, como complemento das descrições das características botânicas, culturais e económicas (Eiras-Dias, 1984).

Em 1983, foi publicado pela OIV o *Code des caractères descriptifs des variétés et espèces de Vitis*, com a finalidade de uniformizar os caracteres utilizados nas descrições morfológicas em todos os países vitícolas. Na segunda metade da década de 1980, surgiu em Portugal o Projeto Nacional de Ampelografia e Sinonímia das Variedades de Videira, em que foram realizadas 271 descrições morfológicas baseadas na lista mínima para a descrição de variedades (Eiras-Dias, 1994).

Atualmente, a utilização dos métodos morfológicos e ampelométricos permite caracterizar e classificar de modo bastante preciso a generalidade das variedades de videira. Estes métodos de aplicação generalizada podem ser complementados com recurso a técnicas de biologia molecular na identificação dos materiais que são mais onerosos e exigem laboratórios especializados (Eiras-Dias, 2005).

2.2 Marcadores Bioquímicos - Isoenzimas

As múltiplas formas moleculares de uma enzima são denominadas isoenzimas. São marcadores constituídos por subunidades, e estas originam enzimas com a mesma atividade catalítica (Abdullah, 2001). O método mais adaptado à deteção destas subunidades é a eletroforese, uma vez que permite separar compostos em função da carga elétrica, da sua estrutura e da massa molar, fatores alteráveis quando ocorrem as mutações que originam o polimorfismo enzimático (Eiras-Dias, 1994).

Os suportes eletroforéticos que permitem uma melhor separação e visualização das bandas isoenzimáticas são o gel de amido e o gel de poliacrilamida. Sendo um gel sintético, a poliacrilamida, permite a obtenção controlada de graus variáveis de entrecruzamento das ligações no polímero com o conseqüente controlo da dimensão

dos poros. Como é transparente, permite a utilização de menor quantidade de proteína comparativamente ao amido, que é opaco, e tem a desvantagem de ser neurotóxico. As isoenzimas, para serem úteis na caracterização de variedades, devem ser estáveis e apresentar diversidade intervarietal detetável, que por sua vez, deve ser mínima e os resultados laboratoriais reprodutíveis (Eiras-Dias, 1994).

A análise isoenzimática não fornece polimorfismo suficiente para uma caracterização detalhada de genótipos de baixa variabilidade e na estimativa da diversidade genética, assim como na identificação de variedades, uma vez que a expressão das enzimas depende da fase de desenvolvimento da planta e requer que todas as plantas estejam no mesmo nível de desenvolvimento (Sefc *et al.*, 2001). Outras desvantagens deste método são a sua difícil execução, baixa reprodutibilidade de resultados e baixo nível de polimorfismo (Eiras-Dias, 1994). Por este motivo, somente sistemas enzimáticos que não apresentam variações sob diferentes condições podem ser considerados marcadores enzimáticos, o que limita o número de marcadores disponíveis e, conseqüentemente, restringe o grau de polimorfismo, afetando diretamente a diferenciação conseguida com análise isoenzimática (Parfit & Arulsekhar, 1989; Walter *et al.*, 1989; Sefc *et al.*, 2001).

2.3 Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são sequências de ADN associadas a regiões polimórficas do genoma. Estas podem ser identificadas por ensaios laboratoriais de uma forma direta, através da sequência de nucleótidos, ou indireta no caso das isoenzimas (marcadores bioquímicos) que precederam os marcadores de ADN (FAO, IAEA, 2002; Sefc *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de marcadores moleculares veio dar um impulso em diferentes áreas da genética e do melhoramento de plantas. Permitem um “*fingerprint*” para cada variedade e têm sido amplamente aplicados na pesquisa e identificação genética de variedades, análise parental, proteção varietal, mapeamento genómico, caracterização de germoplasma, deteção de diferentes clones e averiguação de sinonímias e homonímias (Arroyo-Garcia & Martinez-Zapater, 2004). Apresentam elevados níveis de polimorfismo entre as variedades de videira (Cervera *et al.*, 1998) e têm sido

utilizados com êxito numa ampla gama de aplicações, como a avaliação da diversidade genética, mapeamento de ligação, identificação de variedades e estudos de *pedigree* (Cunha *et al.*, 2013).

Apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos, por fornecerem um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo do genoma e por não serem influenciados por fatores ambientais e estado fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa dos genótipos numa fase inicial de desenvolvimento da planta (Lanza *et al.*, 2000). São uma metodologia útil para completar a ampelografia clássica, identificar sinónimos e estabelecer relações genéticas entre variedades de videira (Bowers *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 2006), sendo um requisito essencial para a indústria vitivinícola na elaboração de vinhas monovarietais (Thomas *et al.*, 1994).

Os marcadores moleculares podem dividir-se em dois grandes grupos: os baseados no polimorfismo do ADN e os baseados no polimorfismo de outras biomoléculas (enzimas), sendo o primeiro mais relevante. Os marcadores, consoante o método utilizado, dividem-se em marcadores detetados pela reação de PCR (RAPD, AFLP, SSR) ou por outras técnicas (RFLP) (Faria, 2005).

As técnicas moleculares mais utilizadas no estudo da diversidade genética da videira são: a análise do polimorfismo no comprimento dos fragmentos provenientes da restrição da cadeia de ADN (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP), a análise do polimorfismo de sequências casualizadas amplificadas de ADN (Random Amplified Polymorphic ADN – RAPD), a análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP) e a análise de sequências simples repetidas (Simple Sequence Repeats - SSR) (Ouborg *et al.*, 1999).

Os marcadores podem ser classificados como codominantes, em que os padrões de bandas de homozigótos podem ser distinguidos dos padrões de heterozigótos (aloenzimas, microssatélites e a maioria dos RFLP) e permitem uma fácil estimativa das frequências dos alelos nas populações, ou dominantes, onde os padrões de bandas de heterozigotos são idênticos aos padrões de um dos homozigotos e, portanto, homozigotos e heterozigotos não podem ser distinguidos (RAPD, AFLP); por outro lado, permitem a estimativa do genótipo, mas não das frequências dos alelos. As impressões digitais dos minissatélites são codominantes, mas, devido ao grande

número de bandas que normalmente resultam dessa técnica, muitas vezes é muito difícil calcular as frequências dos alelos. A quantidade de fluxo de genes é muitas vezes inferida da quantificação da quantidade de diferenciação entre populações (Wright, 1978; Ouborg *et al.*, 1999).

Os marcadores moleculares são usados para identificar e marcar os genes desejados (Mohan *et al.*, 1997).

Estes marcadores diferem do tipo e quantidade de variabilidade que expressam, na sua adequação para cada questão particular e na facilidade e custos de seu desenvolvimento e aplicação (Tabela 1). A estimativa do fluxo de genes com marcadores genéticos envolve essencialmente a avaliação da distribuição dos alelos no espaço (Oubourg *et al.*, 1999).

Tabela 1 - Marcadores utilizados na caracterização genética de plantas (Adaptado de FAO/IAEA, 2002; Mueller & Wolfenbarger, 1999; Cabral, 2008).

Marcador	Vantagens	Desvantagens
Isoenzimas	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica relativamente pouco dispendiosa - Análises relativamente rápidas - Codominante - Não é necessário conhecimento da sequência - Elevada reprodutibilidade - Facilidade de utilização e desenvolvimento 	<ul style="list-style-type: none"> - Diferentes protocolos para cada <i>locus</i> - Muito trabalhoso - Por vezes, difícil de interpretar - Quantidade de informação reduzida
RFLP	<ul style="list-style-type: none"> - Número ilimitado de <i>loci</i> - Codominante - Diversos sistemas de deteção - Robusto - Não é necessário conhecimento da sequência - Elevada reprodutibilidade - Elevada resolução de diferenças genéticas 	<ul style="list-style-type: none"> - Muito trabalhoso - Dispendioso - Necessidade de quantidades elevadas de ADN - É frequente baixo grau de polimorfismo - Método moroso - Dificuldade de utilização e desenvolvimento - Quantidade de informação reduzida
RAPD	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidez na obtenção dos resultados - Não é necessária informação acerca da sequência - Necessidade de quantidades reduzidas de ADN - Bom polimorfismo - Pode ser automatizado - Elevada quantidade de informação - Facilidade de utilização e desenvolvimento 	<ul style="list-style-type: none"> - Método muito sensível a alterações laboratoriais - Baixa reprodutibilidade intra e interlaboratorial - Deteção frequente de múltiplos <i>loci</i> - Dominante

(Cont.)

Marcador	Vantagens	Desvantagens
AFLP	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de quantidades reduzidas de ADN - Não é necessária informação acerca da sequência - Pode ser automatizado - Elevada quantidade de informação 	<ul style="list-style-type: none"> - Dominante - Técnica patenteada - Tecnicamente difícil
AFLP	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada reprodutibilidade - Elevada resolução de diferenças genéticas 	
SSR	<ul style="list-style-type: none"> - Método Rápido - Altamente polimórfico - Robusto - Pode ser automatizado - Necessidade de quantidades reduzidas de ADN - Codominante - Multialélico - Possibilidade de <i>multiplexing</i> - Elevada quantidade de informação - Elevada reprodutibilidade - Elevada resolução de diferenças genéticas 	<ul style="list-style-type: none"> - Método dispendioso - Específico para cada espécie, na maioria dos casos - Pontuais dificuldades de interpretação

2.3.1 Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)

Entre os vários marcadores moleculares desenvolvidos, os RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism), foram os primeiros a serem aplicados na identificação de ADN específico em variedades e porta-enxertos (Bourquin *et al.*, 1992, 1995; Bowers *et al.*, 1993; Thomas & Scott, 1993; Guerra & Meredith, 1995; Eiras-Dias, 2005).

A técnica dos RFLP baseia-se na digestão do ADN genómico com enzimas de restrição. Os fragmentos gerados de ADN são separados em gel de agarose e transferidos para membranas de nylon ou nitrocelulose, onde são hibridizados com sondas de ADN, detetando sequências genómicas homólogas a elas. As sondas são sequências de ADN marcadas com nucleotídeos radioativos ou quimioluminescentes.

Após cada hibridização, as membranas contendo os fragmentos de ADN fixados são expostas a um filme de raios X e submetidas ao processo de revelação (Lanza *et al.*, 2000).

O polimorfismo detetado pelos marcadores RFLP é muito confiável, pois envolve o reconhecimento por enzimas de restrição específicas e a hibridação com uma sonda específica. Os marcadores RFLP facilitam a seleção de progénies com genótipos desejáveis em um curto período de tempo, são codominantes e podem identificar um *locus* único (Mohan *et al.*, 1997).

Com resultados promissores, estes marcadores apresentavam algumas dificuldades na avaliação dos resultados, pois são excessivamente dispendiosos em tempo e em recursos financeiros, requerem que o ADN seja puro e pouco fragmentado (Sefc *et al.*, 2001).

2.3.2 Polimorfismo do ADN Amplificado ao Acaso (RAPD)

Os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) são uma variação da técnica de PCR que utiliza um único *primer* de dez nucleotídeos e com sequência arbitrária. Para que um fragmento de ADN seja amplificado, duas regiões complementares ao *primer* devem estar separadas até 2 000 pb e em orientações opostas. Posteriormente, são amplificados fragmentos de ADN, distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da sequência do ADN. A deteção dos produtos de amplificação é feita em gel de agarose tratado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. As bases moleculares do polimorfismo de RAPD são mutações de ponto, ou deleções no sítio de pareamento do *primer*, ou inserções entre os sítios de pareamento, deixando-os a uma distância tal que impossibilita a sua amplificação (Lanza *et al.*, 2000).

Os RAPD são uma técnica de fácil execução de baixo custo e aplicável a qualquer tipo de organismo. No entanto, apresentam problemas inerentes à reprodutibilidade dos padrões de amplificação, além do baixo conteúdo de informação genética por *loco*, uma vez que, são marcadores dominantes. Este tipo de marcador possibilita a deteção de apenas um alelo por *locos*, sendo que a presença de uma banda no gel identifica indivíduos homocigotos dominantes (AA) e heterocigotos (Aa), não permitindo a distinção entre eles. O homocigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda (Lanza *et al.*, 2000).

2.3.3 Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

Os marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) foram usados e recomendados para a caracterização da videira, uma vez que permitem a análise simultânea de um grande número de *loci* num único ensaio, e proporcionam padrões estáveis e reproduzíveis da amplificação de banda (Fossati *et al.*, 2001).

O método AFLP é uma classe recente de marcadores, que alia a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à praticidade da amplificação do PCR, apresentando-se como uma ferramenta poderosa na caracterização de genomas e no mapeamento genético (Vos *et al.*, 1995). A técnica baseia-se na digestão simultânea do ADN genómico com duas enzimas de restrição, sendo *EcoRI* e *MseI* as mais usadas. Adaptadores específicos, com terminais complementares às extremidades coesivas dos sítios de restrição, são ligados aos fragmentos de ADN digeridos. São utilizados dois adaptadores específicos, sendo um para cada sítio de restrição. Os fragmentos digeridos e com os adaptadores ligados a eles são submetidos a uma reação de PCR com *primers* pré-seletivos, cuja sequência é complementar à dos adaptadores, acrescidos de um nucleótido arbitrário na sua extremidade 3'. A amplificação pré-seletiva é realizada com o objetivo de aumentar a proporção dos fragmentos de interesse, com os sítios de restrição de *EcoRI* e *MseI*, e de fazer uma seleção inicial desses fragmentos (Lanza *et al.*, 2000).

Os marcadores AFLP têm como vantagens, o grande poder de deteção de variabilidade genética, uma vez que a técnica explora polimorfismos de restrição e de amplificação, alia a vantagem de explorar regiões genómicas arbitrárias sem a necessidade do conhecimento prévio das sequências do ADN, com a elevada especificidade da técnica de PCR. Uma das limitações do AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por *loco* que, à semelhança do RAPD, também são marcadores essencialmente dominantes. Como o AFLP é realizado em várias etapas, incluindo a digestão do ADN com enzimas de restrição, é uma técnica trabalhosa, que necessita de ADN genómico de alta qualidade e de um maior número de reagentes, tornando-a também mais cara. Outro fato que contribui para aumentar a complexidade do AFLP é que a resolução dos polimorfismos precisa de ser realizada em géis de sequenciamento, utilizando radioatividade ou fluorescência, e nem todos os

laboratórios estão capacitados para trabalhar com tais metodologias (Lanza *et al.*, 2000).

2.3.4 Sequências Simples Repetidas (SSR)

Os Microssatélites (SSR - Simple Sequence Repeats) são sequências de nucleótidos constituídas pela repetição ininterrupta de um único padrão de nucleótidos, com um máximo de 6 pb (e.g. (GA)_n (GATA)_n, etc.) (Hancock, 1999; Cabral, 2008). São sequências simples de ADN, repetidas de forma contínua, encontradas em maior ou menor grau nos genomas de todos os organismos e organelos conhecidos (Chambers & MacAvoy, 2000; Cabral, 2008), distribuídos aleatoriamente pelos genomas eucarióticos, sujeito à herança Mendeliana codominante (OIV, 2009; Castro *et al.*, 2011). Devido ao seu polimorfismo, reprodutibilidade e natureza codominante, tornaram-se os marcadores de escolha para a compilação, padronização e troca de informação sobre os recursos genéticos da videira (Emanuelli *et al.*, 2013).

São marcadores altamente reprodutíveis, nos quais um único par de iniciadores de PCR que une as sequências repetidas produz padrões polimórficos entre os alelos, dependendo do número de unidades repetidas (Goulão & Oliveira, 2001). Os *loci* de microssatélites são abundantes, distribuídos uniformemente no genoma, seletivamente neutros, altamente reprodutíveis, exibem uma herança codominante mendeliana e apresentam uma grande diversidade alélica. A sua reprodutibilidade permite a troca de dados entre laboratórios em todo o mundo (Bowers *et al.*, 1996; Sefc *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2000; Rossetto *et al.*, 2002; Fatahi *et al.*, 2003). A confiabilidade da técnica SSR permite comparar os resultados obtidos por diferentes grupos e auxilia na assimilação dos dados numa base de dados comum (Lopes *et al.*, 1999). Estas propriedades tornam os SSR particularmente vantajosos para aplicações, tais como estudos de populações e mapeamento, sendo considerados um dos marcadores moleculares mais eficientes (Rossetto *et al.*, 2002).

Devido à sua codominância e alto conteúdo de informação são considerados marcadores extremamente eficientes e uteis na caracterização da diversidade genética, identificação de variedades, esclarecimento de sinónimos e homónimos,

análise de parentesco, mapeamento do genoma e caracterização do germoplasma (Arroyo-Garcia & Martinez-Zapater, 2004).

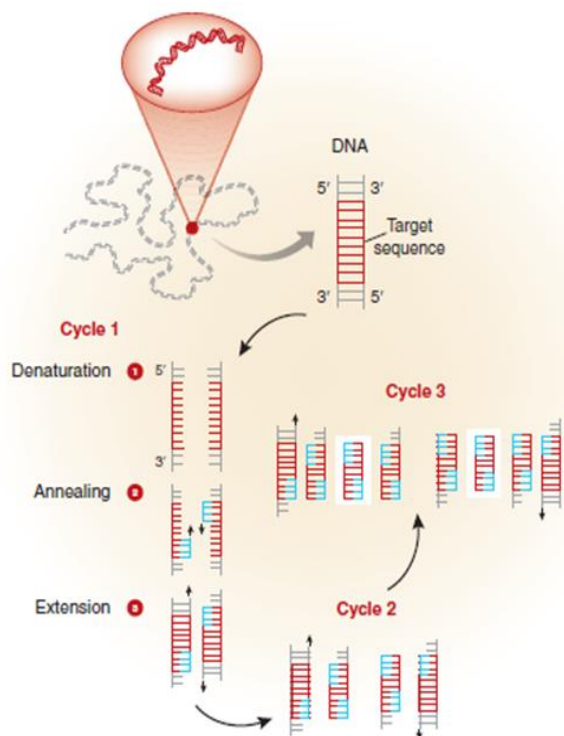
Na videira, os SSR foram introduzidos no processo de identificação de variedades e são explorados para reconstrução de pedigree e mapeamento genético (Sefc *et al.*, 2001; Andorrà, 2015). Os marcadores genéticos têm a vantagem de que o ADN de uma determinada planta é idêntico em todas as células de qualquer tecido em qualquer fase de desenvolvimento e não é influenciado pelas condições ambientais ou sanitárias das plantas. O ADN pode ser obtido a partir de qualquer tipo de tecido vegetal disponível (madeira, folhas e outras partes da planta, com exceção da grainha) e as análises podem ser realizadas em qualquer época do ano. Devido à tecnologia PCR, podem ser analisadas pequenas quantidades de ADN, o que facilita a utilidade do método e a quantidade de tecido vegetal utilizado da videira, como o mosto e o vinho (Sefc *et al.*, 2009). Contudo, é um processo dispendioso e demorado que envolve a construção e rastreio de bibliotecas genómicas e o desenho e otimização de *primers* para a realização de PCR (Arroyo-Garcia & Martinez-Zapater, 2004).

Atualmente, um conjunto de seis microssatélites foi incluído na lista de descritores para castas e espécies de *Vitis*, estabelecida pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) e um conjunto de outros três microssatélites foi estabelecido pelo GRAPEGEN_06 (Management & Conservation of Grapevine Genetic Resources) (<https://www1.montpellier.inra.fr/grapegen06/accueil.php>), que tem permitido caracterizar a diversidade de *Vitis* registada na base de dados VIVC.

2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste na síntese enzimática *in vitro* de um segmento de ADN, delimitado por um par de *primers* de sequências específicas de nucleotídeos de cadeia simples (Lanza *et al.*, 2000). Os nucleotídeos incluem as quatro bases, adenina, timina, citosina e guanina (A, T, C, G), que se encontram no ADN (Garibyan & Avashia, 2013). Os *primers*, são sequências curtas de ADN, que pareiam com o ADN-molde e servem de iniciadores para a síntese *in vitro* de uma nova cadeia de ADN. As reações desenrolam-se em vários ciclos alternados de

temperatura, cerca de 25 a 45, sendo cada um deles constituído por três etapas, como descrito na figura 1:



❶) Desnaturalização da cadeia dupla de ADN; ❷) Emparelhamento (“annealing”) dos *primers* com as sequências complementares específicas que flanqueiam o sítio alvo; ❸) Extensão, uma nova cadeia de ADN é sintetizada a partir das extremidades 3'-OH livres dos *primers* por meio da enzima ADN Taq polimerase. Como cada ciclo é repetido várias vezes, a amplificação do ADN-alvo ocorre em progressão geométrica, requerendo uma quantidade muito pequena de ADN-molde (Lanza *et al.*, 2000).

Figura 1 - PCR, Reação em Cadeia da Polimerase (adaptado de Garibyan & Avashia, 2013)

A PCR é uma técnica simples, rápida e que não necessita de grandes quantidades de ADN. A amplificação pode ser feita em ADN não puro, desde que não tenha inibidores da ADN Taq polimerase (Chawla, 2000; Diniz, 2006). É, contudo, muito sensível a algumas condições, assim como o número de ciclos, a duração e a temperatura a que ocorrem, o que pode inviabilizar a obtenção de resultados reprodutíveis (Diniz, 2006).

Existem dois métodos de visualização dos produtos de PCR: a) coloração do produto de ADN amplificado com um corante químico, tal como brometo de etídio, que intercala entre as duas cadeias do duplex; b) rotular os *primers* ou nucleotídeos de PCR com corantes fluorescentes antes da amplificação por PCR. O método mais utilizado para visualizar o produto de PCR é a eletroforese em gel de agarose, que separa produtos de ADN com base em tamanho e carga. Permite também determinar a presença e tamanho do produto de PCR (Garibyan & Avashia, 2013).

Como esta técnica envolve vários ciclos de amplificação, foi desenvolvido um equipamento que permite programar de forma contínua e automatizada, os vários

ciclos de aquecimento e arrefecimento, designado de termociclador (Figura 2) (Sá-Correia *et al.*, 2003).



Figura 2 - Termociclador T Gradient (Whatman – Biometra, Gottingen; Germany) e análise dos resultados do PCR por eletroforese em gel de agarose.

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da técnica PCR, utilizando o ADN, possibilitaram o desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo (RAPD, AFLP, SSR) (Lanza *et al.*, 2000). Desta forma, foi possível realizar a caracterização genética de bancos e coleções de germoplasma anteriormente impossíveis. Uma vez que, os marcadores baseados em PCR são altamente polimórficos e simples de processar, eles resultam na geração de quantidades relativamente grandes de dados por unidade de tempo (Powell *et al.*, 1996; Hokanson *et al.*, 1998).

Para a utilização desses marcadores em grande escala na caracterização de germoplasma e reprodução, é importante que os resultados obtidos possam ser trocados entre laboratórios, o que, por sua vez, requer a necessidade de serem utilizados materiais padronizados para produzir resultados reprodutíveis, de modo a que a identidade certa e a comparação dos dados sejam possíveis (Jones *et al.*, 1997).

2.5 Sequenciador de Fluorescência Automático

O sequenciador automático CEQ™ 8000 Genetic Analysis System™ (Figura 3) é um sistema de eletroforese por capilaridade que permite determinar a sequência de bases das amostras de ADN e os tamanhos dos fragmentos de ADN amplificados.

A eletroforese por capilaridade ocorre quando um campo elétrico é aplicado a uma solução eletrolítica, através de um gel de poliacrilamida, inserida num sistema de capilares, o que se deve à migração de iões. Uma vez que, o ADN tem carga negativa, os fragmentos de ADN ao serem atingidos pelo campo elétrico movem-se para o pólo positivo. Os fragmentos de ADN marcados são detetados pela sua fluorescência e separados de acordo com o seu tamanho à medida que ocorre a migração (Beckman Coulter, 2002; Marques, 2006).



Figura 3 - Sequenciador automático CEQ™ 8000 Genetic Analysis System

3. Material e Métodos

Neste capítulo encontram-se caracterizados os acessos, a metodologia e os equipamentos utilizados ao longo deste trabalho.

Para realização deste estudo utilizaram-se marcadores moleculares do tipo SSR, sendo utilizados os *primers* VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79 e VVS2.

Os produtos de amplificação foram separados em sequenciador automático, e os resultados comparados com os perfis de SSR existentes na base de dados do INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária) – Pólo de Dois Portos e do VVC (*Vitis* Internacional Variety Catalogue).

3.1 Material Vegetal

Foram selecionados para análise molecular 41 acessos de *Vitis vinifera* L., da Coleção Ampelográfica Nacional (CAN), localizada em Dois Portos (Quinta da Almoíña), propriedade do INIAV. Estes acessos incluem todas as variedades tradicionalmente cultivadas na Região Autónoma da Madeira e alguns acessos que possuem o mesmo nome de entrada e que são considerados variedades distintas (homonímias). Também algumas sinonímias previamente identificadas foram incluídas para verificação quer da metodologia utilizada quer na validação da análise dos dados.

Assim, para cada um dos 41 acessos foram colhidas folhas jovens de uma única planta (3ª) do acesso em causa, tendo sido identificadas e armazenadas a - 80°C até serem utilizadas. Na tabela 2, estão apresentados os nomes dos acessos, a sua referência na CAN e o local de colheita inicial, designado por origem.

Tabela 2 - Nome, origem e código de referência na CAN das variedades analisadas

Nome do Acesso	Ref. ^a CAN	Origem	Nome do Acesso	Ref. ^a CAN	Origem
Tinta Antiga do Curral	11012	Madeira	Verdejo Blanco	51510	Jerez
Triunfo	11522	Madeira	Verdelho Roxo	51513	Açores
Listrão Roxo	11706	Madeira	Carão de Moça	51612	Madeira
Sercial	40505	Madeira	Verdelho Tinto	51806	Vinhos Verdes
Malvasia Babosa	40603	Madeira	Malvasia de Sitges	51813	Jerez
Malvasia de S. Jorge	40604	Madeira	Verdelho (Dão)	52110	Beiras
Rio Grande	40809	Lisboa	Gouveio (Douro)	52112	Douro e Porto
Tinta Antiga de Gaula	41604	Madeira	Terrantez (Dão)	52210	Beiras
Mario Feld	41606	Madeira	Terrantez	52211	Madeira
Tinta do Porto Santo	41701	Madeira	Esgana Cão	52414	Douro e Porto
Deliciosa	11614	Lisboa	Esganoso Castelo Paiva	52415	Vinhos Verdes
Complexa	50201	Lisboa	Malvasia Fina	52512	Douro e Porto
Verdelho	50317	Açores	Malvasia Fina Roxa	52612	Beiras
Boal (Madeira)	50609	Madeira	Molar	52703	Lisboa
Malvasia Cândida Roxa	50810	Madeira	Folgasão Roxo	52708	Beiras
Malvasia di Lipari	50910	Sicília	Folgasão	52709	Douro e Porto
Malvasia Cândida	50911	Madeira	Bastardo	52804	Madeira
Caracol	50914	Madeira	Palomino Fino	53011	Jerez
Esganoso	50915	Vinhos Verdes	Malvasia Rei	53013	Douro e Porto
Listrão	51110	Madeira	Pinot Noir	53706	Borgonha
Tinta Negra	51202	Madeira			

Foram selecionados para caracterização morfológica os acessos, Tinta Antiga do Curral, Triunfo, Deliciosa, Boal, Malvasia Cândida Roxa, Listrão, Verdejo Blanco, Carão de Moça, Esganoso Castelo Paiva e Bastardo, que ainda não se encontram descritos segundo a lista de descritores para as variedades de videira *Vitis* (OIV, 2009). Esta descrição compreende 46 descritores, incluindo morfológicos e biológicos, que fazem parte da lista mínima da OIV para a descrição de variedades de videira (Anexo III).

3.2 Extração de ADN

As folhas jovens foram maceradas com azoto líquido num almofariz, previamente refrigerado, até se obter um pó fino. Este procedimento permite uma maior exposição das células aos reagentes de extração de ADN.

A extração de ADN, foi feita segundo o método descrito por Lodhi *et al.* (1994), com ligeiras alterações, consoante referido no Anexo I.

3.3 Quantificação de ADN

Após a extração de ADN foi necessário quantificar e avaliar a pureza do mesmo. Para tal, recorreu-se à utilização de um espectrofotómetro UV de espectro completo, o Thermo Scientific™ NanoDrop 2000, utilizando um volume de 1 µL por cada amostra.

A proporção das absorvâncias a 260 nm e 280 nm (260/280) é utilizada para avaliar a pureza do ADN e ARN (ácido ribonucleico), sendo que o valor de referência em que o ADN é considerado “puro” corresponde a uma proporção de aproximadamente 1,8. Esta proporção é utilizada como medida secundária de pureza do ácido nucleico. A proporção das absorvâncias a 260 nm e 230 nm (260/230) é também utilizada para verificar a presença de contaminantes na amostra. Os valores ideais estão geralmente compreendidos entre 2,0 e 2,2. Se a proporção for sensivelmente inferior ao esperado, pode indicar a presença de contaminantes que absorvem a 230 nm (Protocolo no Anexo II).

3.4 Análise por Microsatélites

A análise de ADN foi realizada através da amplificação de nove *loci* de microsatélites (SSR), utilizando um par de iniciadores (*primers forward* e *reverse*) específico para cada *locus* (Tabela 3).

Tabela 3 - Microsatélites, LG, sequência de *primers* e referências dos SSR estudados

Nome SSR	Linkage Group	Forward primer	Reverse primer	Obtentor
VVMD5 ⊗	16	[D4] CTA GAG CTA CGC CAA TCC AA	TAT ACC AAA AAT CAT ATT CCT AAA	Bowers <i>et al.</i> , 1999
VVMD7 ⊗	7	[D3] AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT	CGA ACC TTC ACA CGC TTG AT	Bowers <i>et al.</i> , 1999
VVMD25 ◇	11	[D2] TTC CGT TAA AGC AAA AGA AAA AGG	TTG GAT TTG AAA TTT ATT GAG GGG	Bowers <i>et al.</i> , 1999
VVMD27 ◇	5	[D2] AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT	ACG GGT ATA GAG CAA ACG GTG T	Bowers <i>et al.</i> , 1999
VVMD28 ◇	3	[D4] AAC AAT TCA ATG AAA AGA GAG AGA GAG A	TCA TCA ATT TCG TAT CTC TAT TTG CTG	Bowers <i>et al.</i> , 1999
VVMD32 ◇	4	[D3] TAT GAT TTT TTA GGG GGG TGA GG	GGA AAG ATG GGA TGA CTC GC	Bowers <i>et al.</i> , 1999
VrZAG62 ◇	3	[D3] GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACG C	CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C	Sefc <i>et al.</i> , 1999
VrZAG79 ⊗	18	[D2] AGA TTG TGG AGG AGG GAA CAA ACC G	TGC CCC CAT TTT CAA ACT CCC TTC C	Sefc <i>et al.</i> , 1999
VVS2 ⊗	11	[D4] CAG CCC GTA AAT GTA TCC ATC	AAA TTC AAA ATT CTA ATT CAA CTG G	Thomas e Scott, 1993

◇ - MIX I – Mistura de *primers* utilizados na reacção de PCR

⊗ - MIX II – Mistura de *primers* utilizados na reacção de PCR

Os *primers* referidos foram previamente preparados e conservados a - 20°C segundo as instruções do fornecedor, tendo-se realizado a sua ressuspensão em água ultrapura esterilizada de forma a obter uma concentração final de 25 pmol/μl.

3.4.1 Reacção de PCR para Amplificação de Fragmentos de Microsatélites

As reacções de amplificação foram efetuadas de acordo com os dados apresentados na tabela 4, para um volume total de 10 μl de mistura de reacção de acordo com o *locus* amplificado. Para cada reacção utilizaram-se 2 μL da solução inicial (10 ng/μL) de cada um dos acessos.

Tabela 4 - Misturas de reagentes utilizados (MIX I e MIX II) para obtenção dos produtos PCR.

Reagentes	Unidades
Água ultrapura esterelizada	2,5 µL
PCR Master Mix Quiagen	5,0 µL
Mix I/II	0,5 µL
ADN 10ng	2,0 µL
Total	10,0 µL

As amplificações foram efetuadas num termociclador T Gradient (Whatman – Biometra, Gottingen; Germany) e os SSR foram agrupados em duas MIX conforme referido previamente, tendo sido realizadas segundo as condições referidas na tabela 5.

Tabela 5 - Fases de PCR no termociclador (desnaturação, emparelhamento e extensão)

Multiplex I e II		
Fases PCR	Duração	Temperatura
Desnaturação Inicial	15 min	94°C
Desnaturação	30 s	94°C
Emparelhamento	90 s	57°C
Extensão	60 s	72°C
Extensão final	30 min	72°C

2 x 39 ciclos

Após o término de cada programa Multiplex, a temperatura desce para os 4°C.

Posteriormente, os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (120V, 45 min). Cada poço individual do gel, foi carregado com 3 µl de volume final, sendo 2 µl de produto PCR e 1 µl de loading dye 6x (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). Para cada uma das corridas foram colocados nos poços das extremidades 3 µl de marcador “1 kb Plus DNA Ladder” (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), para quantificação e fragmentos entre 25 – 20 000 bp. Os resultados foram verificados através da presença ou ausência de bandas. As amostras que revelaram a presença de bandas de tamanho aproximado ao esperado foram posteriormente carregadas no sequenciador automático.

Após a realização de eletroforese, procedeu-se à revelação do gel com brometo de etídio e posterior visualização num transiluminador UV. Fotografou-se o gel e ajustou-se a imagem no programa Kodac 1D Limited edition v. 3.5.4. (Figura 4).

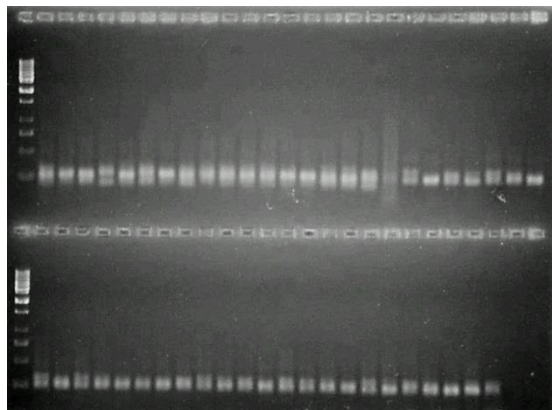


Figura 4 - Exemplo de gel de agarose (1,2%) após eletroforese dos produtos PCR da mix I das variedades em estudo

3.4.2 Detecção dos Fragmentos em Sequenciador Automático

Para deteção de fragmentos previamente observados no gel de agarose foi utilizado o sequenciador automático CEQ™ 8000 Genetic Analysis System v.8. Beckman Coulter.

Após a inserção dos capilares (*capilar array usage record*), da seringa de gel, do reservatório com água ultrapura esterilizada, da placa de tampão e da placa com os produtos de PCR de acordo com o anexo II, foi iniciada a leitura de cada uma das amostras.

Após colocação dos componentes mencionados foi selecionado o programa FRAG-3 do sequenciador automático (CEQ™ 8000 Genetic Analysis System v.8. Beckman Coulter), para o qual foi possível obter as leituras correspondentes para cada um dos nove *loci* utilizados.

3.4.3 Análise de Dados

Para determinar identidades, sinónimos, homónimos e erros de classificação, os perfis de microssatélites (SSR) obtidos para cada um dos acessos estudados foram comparados através do programa GenAlex v6.501. Foi também utilizado para calcular

o número de alelos por *locus* (N_a), a heterozigocidade observada (H_o), a heterozigocidade esperada (H_e) ou diversidade genética para cada um dos nove *loci* de microssatélites.

O programa MEGA 7.0.26 (<http://www.megasoftware.net>) foi utilizado para construção da árvore filogenética baseada no UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando a matriz de distâncias genéticas obtida através do algoritmo de combinação simples (Tamura *et al.*, 2011).

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos e a sua análise estatística.

4.1 Identidade, Sinonímias e Homonímias das Variedades Tradicionalmente Cultivadas na Região Autónoma da Madeira

Para os 41 acessos de variedades de videira em estudo foi possível obter um perfil genético utilizando nove microssatélites (Tabela 6). A análise dos perfis obtidos para cada um dos acessos permitiu identificar 26 genótipos únicos, dos quais estão incluídos quatro pares de genótipos com variação somática (mutação) ao nível da cor do bago (Verdelho B/Verdelho R; Folgasão B/Folgasão R; Malvasia Fina B/Malvasia Fina R; Malvasia Cândida B/Malvasia Cândida R). Os restantes 15 acessos são considerados sinónimos. Utilizando a matriz de distâncias genéticas obtidas através do algoritmo de combinação simples foi possível construir a árvore filogenética, para os 41 acessos, baseada no UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) utilizando o *software* MEGA 7.0.26 (Tamura *et al.*, 2011) e visualizar corretamente a correspondência entre os sinónimos identificados (Figura 5).

Tabela 6 – Tamanho dos alelos para os nove *loci* de microssatélites de 41 acessos de *Vitis vinifera* L. para identificação de sinónimos e/ou homónimos

Nome do Acesso	Referência CAN	VVMD27		VVMD25		VVMD28		VrZAG62		VVMD32		VVMD5		VVMD7		VrZAG79		VVS2	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Tinta Antiga do Curral	11012	181	189	239	249	235	249	187	193	255	271	224	236	237	255	244	260	133	151
Tinta do Porto Santo	41701	181	189	239	249	235	249	187	193	255	271	224	236	237	255	244	260	133	151
Tinta Antiga de Gaula	41604	181	189	239	249	235	249	187	193	255	271	224	236	237	255	244	260	133	151
Tinta Negra T ★	51202	181	189	239	249	235	249	187	193	255	271	224	236	237	255	244	260	133	151
Molar	52703	181	189	239	249	235	249	187	193	255	271	224	236	237	255	244	260	133	151
Triunfo ★	11522	179	199	241	241	247	247	193	203	271	271	234	244	247	249	241	243	131	147
Sercial B ★	40505	181	185	239	263	235	259	187	193	239	239	224	236	237	251	246	258	133	151
Esganoso Castelo Paiva	52415	181	185	239	263	235	259	187	193	239	239	224	236	237	251	246	258	133	151
Esgana Cão	52414	181	185	239	263	235	259	187	193	239	239	224	236	237	251	246	258	133	151
Esganoso	50915	181	181	249	249	233	243	187	193	239	251	224	234	237	237	238	246	133	151
Malvasia Babosa B ★	40603	179	181	241	255	235	257	187	201	251	255	224	238	245	251	242	246	143	145
Rio Grande ★	40809	181	183	255	263	229	235	187	187	239	271	236	238	237	241	246	246	143	151
Deliciosa ★	11614	181	185	241	255	259	259	187	187	253	271	224	236	237	251	242	256	143	145
Complexa ★	50201	185	194	241	248	237	261	185	187	251	271	224	236	237	247	238	256	145	149
Verdelho B ★	50317	181	189	241	249	235	247	193	195	255	271	220	230	237	255	246	250	133	151
Verdejo Blanco	51510	183	189	249	249	235	259	185	193	239	251	224	236	237	257	250	250	151	157
Verdelho Roxo	51513	181	189	241	249	235	247	193	195	255	271	220	230	237	255	246	250	133	151
Verdelho (Dão)	52110	185	189	249	249	235	259	186	188	251	271	224	236	237	241	250	250	151	157
Gouveio (Douro)	52112	185	189	249	249	235	259	186	188	251	271	224	236	237	241	250	250	151	157
Verdelho Tinto ★	51806	181	189	249	255	235	243	187	199	245	251	226	234	237	247	250	258	133	143
Malvasia Fina B	52512	179	194	241	255	235	237	187	187	251	255	224	238	237	255	246	250	143	145
Boal (Madeira) ★	50609	179	194	241	255	235	237	187	187	251	255	224	238	237	255	246	250	143	145
Malvasia Fina Roxa	52612	179	194	241	255	235	237	187	187	251	255	224	238	237	255	246	250	143	145

(Cont.)

Nome da variedade	Referência CAN	VVMD27		VVMD25		VVMD28		VrZAG62		VVMD32		VVMD5		VVMD7		VrZAG79		VVS2	
		Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
Malvasia Cândida B ★	50911	179	183	241	255	237	259	187	201	251	271	224	224	241	247	242	246	143	145
Malvasia de Sitges B	51813	179	183	241	255	237	259	187	201	251	271	224	224	241	247	242	246	143	145
Malvasia di Lipari B	50910	179	183	241	255	237	259	187	201	251	271	224	224	241	247	242	246	143	145
Malvasia Cândida Roxa R	50810	179	183	241	255	237	259	187	201	251	271	224	224	241	247	242	246	143	145
Malvasia de S. Jorge B ★	40604	181	194	239	239	227	247	187	195	255	259	220	224	237	237	246	250	133	145
Caracol B ★	50914	179	194	239	241	237	245	187	195	249	257	238	238	237	245	246	256	133	145
Folgasão B ★	52709	185	189	241	249	237	259	193	203	239	271	230	238	241	245	244	250	133	151
Terrantez B	52211	185	189	241	249	237	259	193	203	239	271	230	238	241	245	244	250	133	151
Carão de Moça B	51612	185	189	241	249	237	259	193	203	239	271	230	238	241	245	244	250	133	151
Folgasão Roxo	52708	185	189	241	249	237	259	193	203	239	271	230	238	241	245	244	250	133	151
Terrantez (Dão)	52210	185	189	241	255	237	255	193	195	251	271	224	236	245	261	250	250	143	157
Bastardo ★	52804	175	189	249	255	235	249	187	187	239	255	236	236	237	255	244	246	143	151
Palomino Fino	53011	185	194	241	241	237	249	187	193	255	257	226	238	237	247	250	256	133	145
Malvasia Rei	53013	185	194	241	241	237	249	187	193	255	257	226	238	237	247	250	256	133	145
Listrão B ★	51110	185	194	241	241	237	249	187	193	255	257	226	238	237	247	250	256	133	145
Listrão Roxo R ★	11706	185	189	239	241	235	245	193	195	255	257	226	238	237	247	242	250	133	135
Pinot Noir	53706	185	189	239	249	219	237	187	193	239	271	226	236	237	241	238	244	137	151
Mario Feld ★	41606	185	189	239	249	219	237	187	193	239	271	226	236	237	241	238	244	137	151

★ - Variedades tradicionalmente cultivadas na Região Autónoma da Madeira (genótipos únicos).

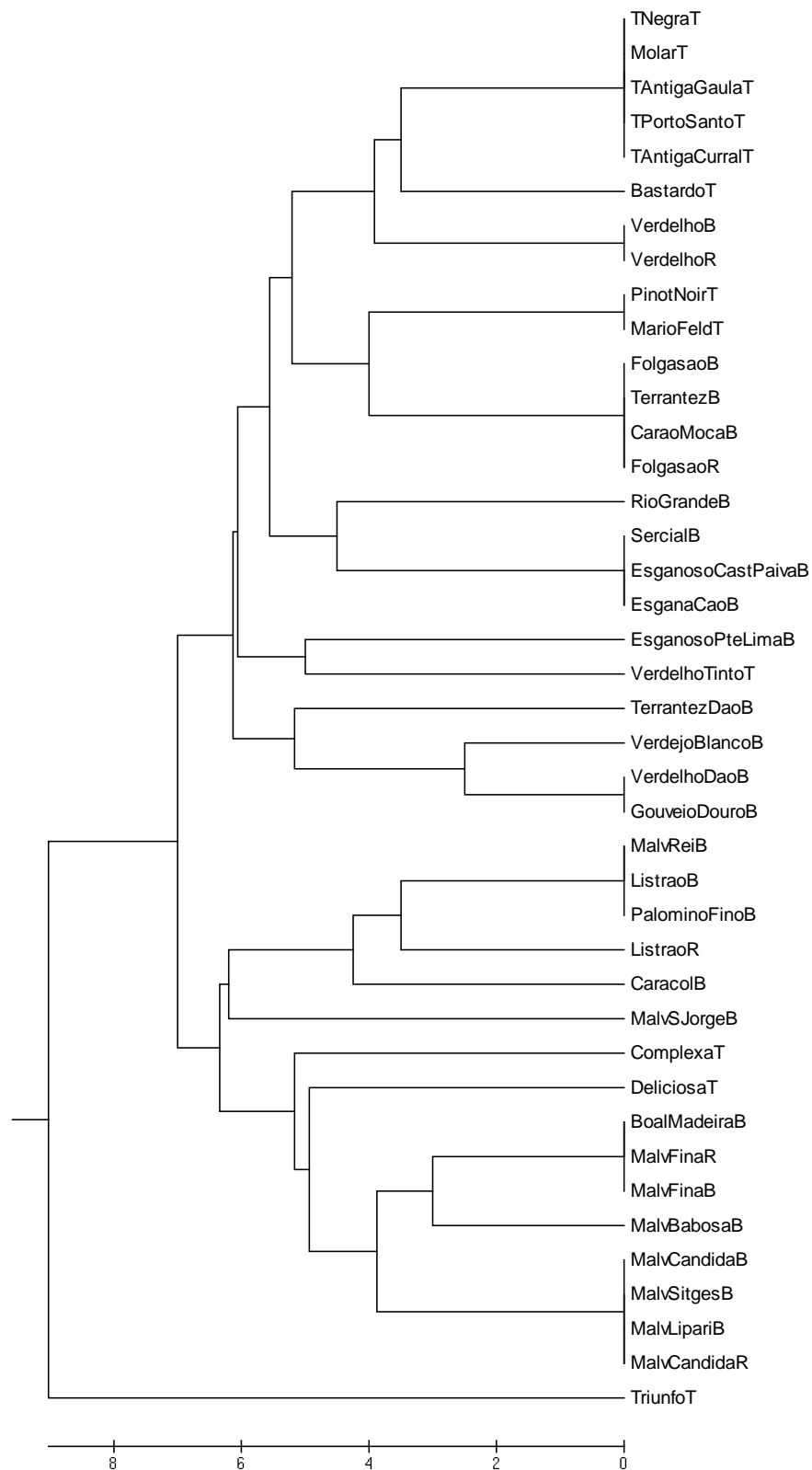


Figura 5 - Fenograma dos 41 acessos utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) obtido a partir da matriz de distância genética gerada com base nos dados alélicos dos nove *loci* de SSR.

Para cada um dos acessos foram utilizadas abreviaturas do nome correspondente na Tabela 6.

Da análise do fenograma, podemos verificar que:

- Os acessos Tinta Negra T (51202), Molar T (52703), Tinta Antiga de Gaula T (41604), Tinta do Porto Santo T (41701) e Tinta Antiga do Curral T (11012) apresentam um perfil genético igual para os nove microssatélites, logo são considerados sinónimos. O perfil genético destes acessos é igual ao obtido por Veloso *et al.* (2010) para a variedade **Tinta Negra** (PRT51202) referida na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) que define as variedades aptas à produção de vinho em Portugal e identificado na base de dados do VVC como Molar (n.º 15678). Atualmente esta é a variedade dominante no encepamento da Região Autónoma da Madeira com uma área de 241,072 ha (SIGSVV, consultado em 07/02/2018).

- Os acessos Verdelho B (50317) e Verdelho Roxo R (51513) apresentam um perfil genético igual para os nove microssatélites contudo, são considerados duas variedades diferentes, uma vez que diferem na cor do bago, resultante de mutações ocorridas ao longo dos tempos. O perfil genético dos acessos anteriormente referidos corresponde aos obtidos por Veloso *et al.* (2010) para as variedades **Verdelho** (PRT50317) e **Verdelho Roxo** (PRT51513) referidas na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) e identificadas na base de dados do VVC como Verdelho Branco (n.º 22304) e Verdelho Roxo (n.º 17736). Atualmente, a variedade Verdelho encontra-se predominantemente nas regiões dos Açores e da Madeira, ocupando nesta última uma área de 55,672ha (SIGSVV, consultado em 07/02/2018). Esta variedade encontra-se atualmente em ampla expansão no continente, à semelhança do que aconteceu no passado. Segundo dados históricos, Ruy Fernandes, em 1531, citou pela primeira vez esta variedade como cultivada nas vizinhanças de Lamego (Menezes, 1896). Embora Böhm (2007) tenha referido a sua origem provável na ilha mediterrânica de Creta (Cândia), esta citação parece ser pouco fundamentada, uma vez que no passado, a diversidade de variedades com designação Verdelho foram referenciadas por vários autores em diferentes épocas, como por exemplo: Verdelho Branco (Ruy Fernandes, 1531); Verdelho da Índia (Lacerda Lobo, 1790); Verdelho da Madeira (Visconde Villa Maior, 1867); Verdelho Doce (Villa Maior, 1866); Verdelho Estimado (Villa Maior, 1875); Verdelho Feijão (Villa Maior, 1866); Verdelho Pardo (Lacerda Lobo, 1790); Verdelho Peludo (Lacerda Lobo,

1790); Verdelho Preto ou Tinto (Ruy Fernandes, 1531); Verdelho Roxo (Lacerda Lobo, 1790); Verdelho Valente (Gyrão, 1822). Normalmente, os centros de origem estão associados à diversidade identificada numa determinada região (Valvilov, 1926), o que poderá ser o caso mais provável para a origem da variedade Verdelho. Esta variedade é igual à Verdelho cultivada nos Açores (Lopes *et al.*, 1999) e na Austrália, para onde foi levada da ilha da Madeira, por volta de 1824 (Krake *et al.*, 1999; Eiras-Dias *et al.*, 2006). É diferente da Verdecchio italiana (MVC, consultado em Fevereiro de 2018) e da Verdejo espanhola, como representado na figura 5 (Verdejo Blanco B). Relativamente a esta última variedade, é morfologicamente muito semelhante, mas os perfis de microssatélites provam que são duas variedades distintas (Tabela 6).

Também se verificou que os acessos Verdelho (Dão) B (52110) e Gouveio (Douro) B (52112) apresentam um perfil genético igual para os nove microssatélites sendo considerados sinónimos. O perfil genético destes acessos é igual ao obtido por Veloso *et al.* (2010) para a variedade **Gouveio** (PRT52112) referida na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) e identificada na base de dados do MVC como Gouveio (n.º 12953). Averiguou-se que as variedades Verdelho (PRT50317), Verdelho Roxo (PRT51513), Verdelho Tinto (PRT51806) e Verdejo (PRT60028) vulgarmente designadas por Verdelho, são homónimas da variedade Gouveio (PRT52112).

Relativamente ao acesso Verdelho Tinto (51806), que corresponde à mesma variedade referida na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) é diferente genotipicamente de todas as outras variedades referenciadas anteriormente (Tabela 6 e Figura 5).

Em conclusão verificou-se que, as variedades **Verdelho** (PRT50317), **Verdelho Roxo** (PRT51513), **Gouveio** (PRT52112), **Verdejo** (PRT60028) e **Verdelho Tinto** (PRT51806) são completamente distintas conforme representado na Tabela 6 e Figura 5, referido em Eiras-Dias *et al.* (2006) e na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012).

- Os acessos Mário Feld (41606) e Pinot Noir (53706) apresentam um perfil genético igual para os nove microssatélites, sendo considerados sinónimos. O perfil genético dos acessos referidos anteriormente corresponde ao obtido por Veloso *et al.* (2010)

para a variedade **Pinot Noir** (PRT53706) na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) e identificado na base de dados do VVC como Pinot Noir (n.º 9279).

Esta variedade referida na Portaria n.º 86/99, de 12 de maio, como Mário Feld é possivelmente uma das castas mais cultivadas no mundo, constando na lista de castas referidas nas Portarias n.ºs 395/2017 e 396/2017, de 09 de outubro, que regulamentam a produção de vinho com a DO “Madeirense” e com IG “Terras Madeirenses”, respetivamente (JORAM, 2017). No entanto, atualmente, esta variedade não se encontra em cultura na Região Autónoma da Madeira (SIGSVV, consultado em 07/02/2018).

- Os acessos Folgasão B (52709), Terrantez B (52211) e Carão de Moça B (51612), são considerados sinónimos, uma vez que apresentam um perfil genético igual para os nove microssatélites. Também o acesso Folgasão Roxo (52708), apresenta um perfil genético idêntico ao do Folgasão B para os nove microssatélites; contudo, são consideradas duas variedades diferentes, uma vez que diferem na cor do bago resultante de mutações ocorridas ao longo dos tempos. O perfil genético destes acessos é igual ao obtido por Veloso *et al.* (2010), para as variedades **Folgasão** (PRT52709) e **Folgasão Roxo** (PRT52708) referidas na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) e identificadas na base de dados do VVC como Folgasão (n.º 4178) e Folgasão Roxo (n.º 4176). Presentemente, a variedade Folgasão ocupa no encepamento regional da Madeira uma área de 2,304 ha (SIGSVV, consultado em 07/02/2018). A variedade Folgasão Roxo é somente cultivada em Portugal Continental.

A variedade Folgasão (PRT52709) é também conhecida na Região Autónoma da Madeira por Terrantez, no entanto, esta designação é apenas reconhecida para utilização na rotulagem da DOP “Madeira”, e é diferente da variedade Terrantez (PRT52210) tradicionalmente cultivada na região do Dão.

- Os acessos Sercial B (40505), Esgana Cão (52414) e Esganoso Castelo Paiva (52415) apresentam um perfil genético igual para os nove microssatélites, sendo considerados sinónimos. O perfil genético dos acessos anteriormente referidos

corresponde ao obtido por Veloso *et al.* (2010) para a variedade **Sercial** (PRT40505) referida na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) e identificada na base de dados do VVC como Sercial (n.º 11497). A variedade Sercial está presente no encepamento regional da Madeira com uma área de 20,958 ha (SIGSVV, consultado em 07/02/2018). Foi mencionada por Alarte em 1711 (Böhm, 2007), e Odart, em 1873, referenciou-a como cultivada em Portugal Continental e Arquipélago da Madeira (Menezes, 1896).

O acesso Esganoso Castelo Paiva (52415) corresponde à variedade Sercial (PRT40505) e é diferente do acesso Esganoso de Lima (homonímia) que corresponde à variedade Esganoso (PRT50915) referida na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) e identificado por Veloso *et al.* (2010). A variedade Esganoso é apenas cultivada em Portugal Continental.

- Os acessos Listrão B (51110), Malvasia Rei B (53013) e Palomino Fino B (53011) são considerados sinónimos, uma vez que apresentam um perfil genético igual para os nove microssatélites. O perfil genético identificado anteriormente corresponde ao genótipo obtido por Veloso *et al.* (2010), para a variedade **Malvasia Rei** (PRT53013) referida na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) e identificada na base de dados do VVC como Palomino Fino (n.º 8888). Atualmente, a variedade Malvasia Rei (PRT53013) ocupa uma área de 3,757ha na Região Autónoma da Madeira (SIGSVV, consultado em 07/02/2018), sendo praticamente cultivada na ilha de Porto Santo, onde é vulgarmente designada por Listrão. Esta variedade foi citada pela primeira vez na bibliografia portuguesa como Listrão por Grande em 1849 e em 1878 por Visconde de Villa Maior, alegando que “a mesma se encontrava instalada na coleção ampelográfica do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra e que os bacelos eram provenientes da Madeira”, sinalizando desta forma a primeira referência da variedade em Portugal. Também Garcia Ramos, em 1879, refere que, “Na ilha da Madeira é das castas que entram na categoria das que têm as folhas menos profundamente lobadas e dentadas; bagos globosos e verdoengos amarellados” (Menezes, 1896).

- Os acessos Malvasia Fina B (52512) e Boal da Madeira B (50609) apresentam um perfil genético igual para os nove microssatélites, sendo considerados sinónimos. Também a variedade Malvasia Fina Roxa (52612), apresenta um perfil genético idêntico à Malvasia Fina B para os nove microssatélites, contudo são consideradas duas variedades distintas, uma vez que diferem na cor do bago resultante de mutações ocorridas. De acordo com Veloso *et al.* (2010), o perfil genético identificado anteriormente corresponde aos genótipos das variedades **Malvasia Fina** (PRT52512) e **Malvasia Fina Roxa** (PRT52612) referidas na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012), e identificadas na base de dados do VVC como Malvasia Fina (n.º 715) e Malvasia Fina Roxa (n.º 15677). Presentemente, a variedade Malvasia Fina ocupa no encepamento regional da Madeira uma área de 13,943 ha (SIGSVV, consultado em 07/02/2018). A Malvasia Fina Roxa apenas é cultivada em Portugal Continental.

Na variedade Malvasia Fina (PRT52512), a designação Boal é apenas reconhecida para utilização na rotulagem da DOP “Madeira”.

A designação “Malvasia” foi mencionada na bibliografia pela primeira vez por Herrera (1515) e Fernandes (1532). Casta muito antiga, de origem provavelmente romana ou, segundo Conde Odart (1874), de origem grega (Böhm, 2007). Esta variedade predominava um pouco por todas as regiões vitivinícolas do país e na Região Autónoma da Madeira. Oriunda de Napoli di Malvasia, perto de Sparta e Creta, foi introduzida no arquipélago da Madeira no século XV por Infante D. Henrique (Gonçalves, 1983). Num estudo exaustivo de castas em Portugal, em 1896, foram referenciadas 19 diferentes Malvasias (Malvasia Babosa, Malvasia de Cheiro, Malvasia da Ribeira, Malvasia de Lisboa, Malvasia de Parreira, Malvasia de Passa, Malvasia de Santarém, Malvasia de Vinha, Malvasia do Bairro, Malvasia do Douro, Malvasia Esfarrapada, Malvasia Fina, Malvasia Grossa, Malvasia Parda, Malvasia Penaguiota, Malvasia Preta, Malvasia Roxa, Malvasia Serôdia, Malvasia Vermelha) (Menezes, 1896).

Após o severo estrangulamento da diversidade de variedades de videira causado pelas doenças provenientes da América do Norte, o oídio (*Uncinula necator* Schweinf. Burrill) em 1851 e do míldio (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl & de Toni) em 1880, assim como, da praga da filoxera (*Dactylosphaera vitifoliae* Fitch) em 1863 (Cunha *et al.*, 2013), constatou-se a redução do número de variedades. Atualmente e

com base na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro existem 15 variedades de Malvasia.

- Os acessos Malvasia Cândida B (50911), Malvasia de Sitges B (51813) e Malvasia di Lipari B (50910) apresentam um perfil igual para os nove microssatélites, logo são considerados sinónimos. Também a variedade Malvasia Cândida Roxa (50810), apresenta um perfil genético idêntico à Malvasia Cândida B para os nove microssatélites, no entanto, a cor do bago é diferente, sendo consideradas duas variedades distintas, resultado de mutações ocorridas. O perfil genético dos acessos identificados anteriormente corresponde aos obtidos por Veloso *et al.* (2010), para as variedades **Malvasia Cândida** (PRT50911) e **Malvasia Cândida Roxa** (PRT50810) referidas na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012), e identificadas na base de dados do VVC como Malvasia di Sardegna (n.º 7266) e Malvasia di Sardegna Rosada (n.º 22971), respetivamente. Atualmente a variedade Malvasia Cândida presente no encepamento regional da Madeira ocupa uma área de 2,426 ha (SIGSVV, consultado em 07/02/2018).

- Para o acesso Bastardo T (52804), Veloso *et al.* (2010), identificaram como sinónimos os acessos Graciosa (50304) e Bastardo-Roxo Rs (41708), utilizando apenas seis microssatélites (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79, VVS2). A variedade **Bastardo** (PRT52803) referida na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) é identificada na base de dados do VVC como Trousseau Noir (n.º 12668). Cultivada maioritariamente em Portugal Continental, existem atualmente 1,340 ha na Região Autónoma da Madeira (SIGSVV, consultado em 07/02/2018). Quanto à sua origem histórica, Ruy Fernandes (1532) menciona a variedade pela primeira vez, seguindo-se de Alarte em 1712. Teixeira de Macedo, em 1853, refere que, na ilha de São Miguel, a variedade Bastardo é pouco produtiva, temporã e sensível à podridão (Menezes, 1896).

- O acesso **Rio Grande** (40809) apresenta um perfil genético igual ao obtido por Veloso *et al.* (2010) para os seis microssatélites (VVMD 5, VVMD7, VVMD27,

VrZAG62, VrZAG79, VVS2) e corresponde ao genótipo com a mesma designação quer na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012), quer no VVC com o n.º 10102. Este estudo permitiu acrescentar ao perfil genético da variedade Rio Grande, os alelos identificados para os microssatélites VVMD25 (255-263), VVMD28 (229-235), VVMD32 (239-271).

Esta variedade resulta de um cruzamento entre Diagalves e Fernão Pires (VVC, <http://www.vivc.de/index.php?r=passport%2Fview&id=10102>, consultado em 20/02/2018). Presentemente esta variedade não se encontra em cultura na ilha da Madeira (SIGSVV, consultado em 07/02/2018).

- O acesso **Caracol B** (50914) corresponde ao genótipo com a mesma designação quer na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012), quer no VVC com o n.º 17664. O perfil genético do acesso anteriormente referido corresponde ao obtido por Veloso *et al.* (2010) para os seis microssatélites (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79, VVS2). Com este estudo acrescentou-se ao perfil genético da variedade Caracol os microssatélites VVMD25 (239-239), VVMD28 (237-245), VVMD32 (249-257). Os resultados obtidos neste trabalho, por SSR, mostraram ser idênticos aos obtidos por Rodríguez-Torres (2017) e aos referidos na *Vitis* Canárias (<http://vitiscanarias.com/publico/muestra.aspx?id=30>, consultado em 20/02/2018) para a variedade Cedrés, cultivada nas ilhas Canárias (Espanha). Esta sinonímia também é referida por Cunha *et al.* (2016), quando analisam os perfis de SNP destas duas variedades. Presentemente, a variedade Caracol ocupa uma área de 10,388 ha no encepamento regional da Madeira (SIGSVV, consultado em 07/02/2018).

- O acesso **Malvasia de São Jorge B** (40604) corresponde ao genótipo com a mesma designação na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) e com a designação no VVC de Malvasia Branca de São Jorge com o n.º 17689. O perfil genético deste acesso é igual ao obtido por Veloso *et al.* (2010) para os seis microssatélites (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79, VVS2). Foi possível com este estudo acrescentar ao perfil genético da variedade Malvasia de São Jorge B os microssatélites VVMD25 (239-239), VVMD28 (227-247), VVMD32 (255-259).

- O acesso **Complexa** (50201) apresenta um perfil genético igual ao obtido por Veloso *et al.* (2010), para os seis microssatélites (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79, VVS2) e corresponde ao genótipo com a mesma designação quer na Portaria n.º 380/2012, de 22 de Novembro (MAMAOT, 2012) quer no VVC com o n.º 2794. Com este trabalho foi possível ampliar o perfil genético da variedade Complexa com os microssatélites VVMD25 (241-248), VVMD28 (237-261), VVMD32 (251-271). Esta variedade foi obtida por Ferreira de Almeida na década 50 do século XX e resulta de um cruzamento entre Castelão e Alicante Bouschet, que deu origem a um genótipo F1, que por sua vez, cruzado com Alicante Bouschet originou um genótipo F2; este cruzado com Moscatel de Hamburgo, deu origem à variedade Complexa (VVC, <http://www.vivc.de/index.php?r=passport%2Fview&id=2794>, consultado em 20/02/2018). Atualmente, a variedade Complexa ocupa uma área de 25,237 ha no encepamento regional da Madeira (SIGSVV, consultados em 07/02/2018).

- O acesso **Deliciosa** (41707) corresponde ao genótipo com a mesma designação quer na Portaria n.º 380/2012, de 22 de Novembro (MAMAOT, 2012), quer no VVC com o n.º 3507. O perfil genético obtido por Veloso *et al.* (2010), é comum para os 6 microssatélites correspondentes (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79, VVS2). Com este trabalho foi possível acrescentar à sua descrição os alelos identificados para cada um dos microssatélites VVMD25 (241-255), VVMD28 (259-259), VVMD32 (251-271). Esta variedade não apresenta sinónimos e foi obtida por Ferreira de Almeida na década 50 do século XX.

Resulta de um cruzamento entre Diagalves e Sultanina (VVC, <http://www.vivc.de/index.php?r=passport%2Fview&id=3507>, consultado em 20/02/2018). Presentemente esta variedade não se encontra em cultura na Região Autónoma da Madeira (SIGSVV, consultado em 07/02/2018), encontrando-se conservada apenas na CAN (PRT051).

- O acesso Malvasia Babosa (40603) corresponde ao genótipo Babosa B (Veloso *et al.*, 2010), com a designação de **Malvasia Babosa** (PRT40603), quer na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012), quer no VVC com o n.º 14139. O perfil genético obtido por Veloso *et al.* (2010), é comum para os seis microssatélites

correspondentes (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79, VVS2), acrescentando-se com este trabalho à sua descrição os alelos identificados para cada um dos microssatélites VVMD25 (241-255), VVMD28 (235-257), VVMD32 (251-255).

A Malvasia Babosa é uma variedade distinta das Malvasias referidas anteriormente e resulta de um cruzamento de Malvasia di Sardegna com Mourisco Branco (Hében, uma das variedades ibéricas mais importantes (Zinelabidine *et al.*, 2015). Atualmente, na base de dados internacional, existem dois sinónimos registados e não se conhecem novas plantações (SIGSVV, consultado em 07/02/2018), encontrando-se presentemente conservada na CAN (PRT051). Em 1879, Garcia Ramos referencia a Malvasia Babosa como uma variedade presente na Região Autónoma da Madeira (Menezes, 1896). Desconhecendo-se o seu obtentor, é plausível afirmar que esta variedade terá tido origem em data desconhecida, algures na Península Ibérica, e encontrado um único refugio no Arquipélago da Madeira, constando, até 2015, na lista de castas aprovadas para produção do Vinho da Madeira. Presentemente esta variedade não faz parte das listas de variedades aprovadas para a produção de vinhos na RAM, colocando em risco a sua extinção.

- O acesso **Triunfo T** (11522) foi recentemente introduzido na CAN, uma vez que o genótipo identificado por Veloso *et al.* (2010), foi erroneamente eliminado, o que provocou a perda desse genótipo (único acesso existente na CAN). O perfil genético obtido para o acesso recentemente introduzido não coincide com o identificado por Veloso *et al.* (2010) e referido na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012), com a mesma designação, pelo que, se considera mal identificado. Desta forma, foi necessário comparar os dados obtidos com os dados do VVC, tendo-se verificado a sua correspondência com a variedade Couderc Noir (n.º 3206). Inesperadamente, esta variedade nunca foi associada à região da Madeira e nem consta na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012) não tendo sido possível identificar/colher e instalar para fins de preservação na CAN a variedade Triunfo. Será necessário em futuras ações de prospeção recolher o genótipo desejado, uma vez que segundo o SIGSVV (consultado em 07/02/2018), esta variedade ainda se encontra em cultura com uma área de 0,111 ha (SIGSVV, consultado em 07/02/2018).

- O acesso **Listrão Roxo R** (41605) corresponde ao genótipo com a mesma designação quer na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro (MAMAOT, 2012), quer no VVC com o nr. 17248. O perfil genético obtido por Veloso *et al.* (2010), é comum para os seis microssatélites (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79, VVS2), acrescentando-se com este trabalho à sua descrição os alelos identificados para cada um dos microssatélites VVMD25 (239-241), VVMD28 (235-245), VVMD32 (255-257). A variedade Listrão Roxo R não é um mutante do acesso Listrão B, anteriormente referido como correspondendo à variedade Malvasia Rei, consideram-se duas variedades distintas. Da comparação dos dados da Listrão Roxo R com os dados do VVC (<http://www.vivc.de/index.php?r=passport%2Fview&id=17248>, consultado em 20/02/2018) e do *Vitis* Canárias (<http://vitiscanarias.com/publico/muestra.aspx?id=40>, consultado em 20/02/2018), quer por SSR, quer por SNP, verificamos que o perfil genético obtido corresponde ao da variedade Listán Prieto (<http://vitiscanarias.com/publico/muestra.aspx?id=40> & Cunha *et al.*, 2016). Apesar da variedade Listán Prieto referida na base de dados do *Vitis* Canárias (<http://vitiscanarias.com/publico/muestra.aspx?id=40>, consultado em 20/02/2018), com a cor do bago azul negro, e a variedade Listrão Roxo da CAN apresentarem o mesmo perfil genético, são consideradas variedades distintas, uma vez que a cor do bago é diferente.

Para os 13 acessos (Bastardo T, Rio Grande B, Esganoso Ponte Lima B, Verdelho Tinto T, Terrantez Dão B, Verdejo Blanco B, Listrão R, Caracol B, Malvasia São Jorge B, Complexa T, Deliciosa T, Malvasia Babosa B e Triunfo T) onde não foram encontrados sinónimos, verificou-se que cada acesso é considerado um genótipo diferente (genótipos únicos), tendo-se comprovado que estão associados à DO «Madeirense» e IG «Terras Madeirenses» apenas os seguintes acessos, cujas variedades possuem o mesmo nome: Bastardo T, Rio Grande B, Listrão R, Caracol B, Malvasia de São Jorge B, Complexa T, Deliciosa T e Triunfo T. Os acessos: Bastardo T, Listrão R e Malvasia de São Jorge B estão também associados à DO «Madeira», bem como o acesso Verdelho Tinto T.

4.2 Análise das Variedades Tradicionalmente Cultivadas na Madeira

Neste capítulo será analisada a diversidade genética de quatro variedades em estudo, bem como, a sua caracterização morfológica.

4.2.1 Análise da Diversidade Genética das Variedades

Em função dos dados obtidos, foram selecionados os 18 genótipos únicos tradicionalmente cultivados na Região Autónoma da Madeira (identificados com "★" na Tabela 6). A análise da diversidade genética permitiu identificar 56 alelos para os nove *loci* nucleares e o alelo mais frequente foi o VrZAG62 - 187, com uma frequência de 0,5 (Tabela 6).

Da análise da tabela 7, verificou-se que o número de alelos por *locus* varia entre 12 para o VVMD28 e seis para o VVMD25. A heterozigocidade esperada (H_e) variou entre 0,681 no *locus* VrZAG62 e 0,853 no *locus* VVMD28, com um valor médio de 0,796. Para a heterozigocidade observada (H_o), foi possível verificar que esta é sempre superior à heterozigocidade esperada, como resultado da ausência de alelos nulos em todos os *loci* estudados e devido à multiplicação assexuada das diferentes variedades, procedentes de diferentes origens. Também Cunha *et al.* (2010) verificou que a heterozigocidade observada foi superior à heterozigocidade esperada quando comparou diferentes variedades multiplicadas de forma assexuada com plantas de *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* multiplicadas de forma sexuada dentro de uma determinada população.

Tabela 7 - Locus, sequências repetitivas, intervalo de tamanhos, número de amostras (n), número de alelos (Na), heterozigocidade observada (Ho), heterozigocidade esperada (He) para os nove microssatélites nucleares analisados.

Locus	Sequência nucleótida	Tamanho dos fragmentos	n	Na	Ho	He
VVMD27	(CT)n	171-219	18	8,000	1,000	0,832
VVMD25	(CT)n	243-275	18	6,000	0,833	0,762
VVMD28	(CT)n	221-279	18	12,000	0,889	0,853
VrZAG62	(AG)9	174-220	18	7,000	0,778	0,681
VVMD32	(CT)n	239-273	18	9,000	0,889	0,816
VVMD5	(CT)3AT(CT)11ATAG(AT)3	222-268	18	8,000	0,833	0,816
VVMD7	(CT)14,5	231-265	18	7,000	0,944	0,759
VrZAG79	(GA)19	235/236-261/262	18	10,000	0,944	0,840
VVS2	(GA)19	123/124-161/162	18	9,000	1,000	0,809
Média				8,444	0,901	0,796
Mínimo				6,000	0,778	0,681
Máximo				12,000	1,000	0,853

4.2.2 Caracterização Morfológica das Variedades do Arquipélago da Madeira

Relativamente aos acessos analisados neste trabalho, foram apenas descritos a nível morfológico 10 acessos: Bastardo (52804); Boal (50609); Carão de Moça (51612); Deliciosa (11614); Esganoso Castelo Paiva (52415); Listrão (51110); Malvasia Cândida Roxa (50810); Tinta Antiga do Curral (11012); Triunfo (11522); Verdejo Blanco (51510), conforme apresentado no anexo III. Estes acessos incluem variedades previamente descritas e variedades que poderiam estar associadas a identidades desconhecidas. A sua descrição morfológica e o perfil genético único obtido constitui as normas mínimas para registo da identidade de uma variedade (Decreto-Lei n.º 194/2006, de 27 de setembro), de forma a integrar o Catálogo Nacional de Variedades de Videira da DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária) e a servir de descrição padrão, para que essas variedades possam ser admitidas à certificação. Assim, dos 41 acessos estudados, verificou-se que 26 são considerados genótipos únicos, ou seja, genótipos não redundantes. Deste conjunto de acessos, apenas 18 são considerados genótipos tradicionalmente cultivados na Região Autónoma da Madeira, segundo a Portaria n.º 39/2015, de 13 de fevereiro, onde está referenciada a variedade Verdelho Tinto e as Portarias n.ºs 395/2017 e 396/2017, de 09 de outubro, para as restantes variedades, à exceção da Malvasia Babosa, conforme referido no ponto 4.1. Da conjugação das variedades referidas nos

respetivos decretos, Catálogo Nacional de Variedades de Videira (DGAV, 2017), Catálogos das Castas para Vinho Cultivadas em Portugal (Eiras-Dias *et al.*, 2011 e 2013) e dos resultados obtidos neste estudo foram apenas consideradas as descrições dos acessos: Tinta Antiga do Curral (nome principal: Tinta Negra), Deliciosa e Malvasia Cândida Roxa. Sendo as variedades correspondentes a estes acessos tradicionalmente cultivadas na Região Autónoma da Madeira, pelo que, se considera que a descrição morfológica realizada poderá ser utilizada para fins de registo de identidade e catalogação das mesmas. O acesso Triunfo, conforme já referido no ponto 4.1 corresponde à variedade Couderc Noir.

Tinta Negra



Tradicionalmente cultivada na Região Autónoma da Madeira com as designações de: Tinta Antiga do Curral, Tinta Antiga de Gaula, Tinta de Porto Santo e Tinta Negra Mole.

Abrolhamento	Época de rebentação	Precoce
Pâmpano Jovem	Abertura da extremidade	Completamente aberta
	Intensidade de pigmentação antociânica na extremidade	Ausente ou muito baixa
	Densidade dos pêlos prostrados na extremidade	Média
	Vigor do pâmpano	Elevado
Pâmpano	Porte (antes de ser tutorado)	Semi-ereto
	Cor da face dorsal dos entrenós	Verde e Vermelha
	Cor da face ventral dos entrenós	Verde
	Número de gavinhas consecutivas	2 ou menos
Folha Jovem	Cor da página superior da folha (4ª folha)	Verde
	Densidade de pelos prostrados entre as nervuras da página inferior (4ª folha)	Média
Folha adulta	Forma do limbo	Orbicular
	Número de lóbulos	Cinco
	Distribuição da pigmentação antociânica das nervuras principais da página superior	Nula
	Enrugamento do limbo	Ausente ou muito baixo
	Perfil da folha em seção transversal	Em forma de V
	Bolhosidade da página superior	Média
	Forma dos dentes	Mistura de retilínea com convexa
	Grau de abertura do seio peciolar	Aberto
	Forma da base do seio peciolar	Em U
	Dentes no seio peciolar	Ausente
	Base do seio peciolar delimitado pela nervura	Não delimitado

(Cont.)

Folha Adulta (Cont.)	Dentes nos seios laterais superiores	Ausente
	Densidade de pêlos prostrados entre as nervuras principais na página inferior	Média
Folha adulta	Densidade de pêlos eretos entre as nervuras principais na página inferior	Ausente ou muito baixa
	Profundidade dos seios laterais superiores	Superficial
Cacho	Comprimento (pedúnculo excluído)	Médio
	Compacidade	Compacto
	Comprimento do pedúnculo	Médio
	Forma	Cónico
	Número de asas	1 - 2 asas
	Peso	Baixo
Bago	Forma	Elíptica curta
	Coloração da película	Azul negro
	Intensidade de pigmentação antociânica da polpa	Ausente ou muito baixa
	Consistência da polpa	Mole
	Sabores particulares	Ausente
	Formação das grainhas	Bem formadas
	Peso	Muito baixo
Mosto	Teor alcoólico provável	Muito elevado
	Acidez total	Baixa

Deliciosa



Tradicionalmente cultivada na Região Autónoma da Madeira

Abrolhamento	Época de rebentação	Tardia
Pâmpano Jovem	Abertura da extremidade	Completamente aberta
	Intensidade de pigmentação antociânica na extremidade	Ausente ou muito baixa
	Densidade dos pêlos prostrados na extremidade	Média/elevada
	Vigor do pâmpano	Baixo
Pâmpano	Porte (antes de ser tutorado)	Semi-retombante
	Cor da face dorsal dos entrenós	Verde e vermelha
	Cor da face ventral dos entrenós	Verde
	Número de gavinhas consecutivas	Duas ou menos
Folha Jovem	Cor da página superior da folha (4ª folha)	Bronze
	Densidade de pelos prostrados entre as nervuras da página inferior (4ª folha)	Elevada
Folha adulta	Forma do limbo	Cuneiforme
	Número de lóbulos	Cinco
	Distribuição da pigmentação antociânica das nervuras principais da página superior	Nula
	Enrugamento do limbo	Ausente ou muito baixo
	Perfil da folha em seção transversal	Plano
	Bolhosidade da página superior	Ausente ou muito baixa
	Forma dos dentes	Ambos os lados retilíneos
	Grau de abertura do seio peciolar	Muito aberto
	Forma da base do seio peciolar	Em V
	Dentes no seio peciolar	Ausente
	Base do seio peciolar delimitado pela nervura	Não delimitado
	Dentes nos seios laterais superiores	Ausente
	Densidade de pêlos prostrados entre as nervuras principais na página inferior	Média

(Cont.)

Folha adulta (Cont.)	Densidade de pêlos eretos entre as nervuras principais na página inferior	Média
	Profundidade dos seios laterais superiores	Média
Cacho	Comprimento (pedúnculo excluído)	Curto
	Compacidade	Solto
	Comprimento do pedúnculo	Curto
	Forma	Em funil
	Número de asas	Três - quatro asas
	Peso	Médio
Bago	Forma	Esférica
	Coloração da película	Violeta vermelho escuro
	Intensidade de pigmentação antociânica da polpa	Ausente ou muito baixa
	Consistência da polpa	Ligeiramente firme
	Sabores particulares	Ausente
	Formação das grainhas	Rudimentar/Bem formadas
	Peso	Baixo
Mosto	Teor alcoólico provável	Elevado
	Acidez total	Baixa

Malvasia Cândida Roxa



Tradicionalmente cultivada na Região Autónoma da Madeira

Abrolhamento	Época de rebentação	Tardia
Pâmpano Jovem	Abertura da extremidade	Completamente aberta
	Intensidade de pigmentação antociânica na extremidade	Média/Elevada
	Densidade dos pêlos prostrados na extremidade	Ausente ou muito baixa
	Vigor do pâmpano	Muito baixo
Pâmpano	Porte (antes de ser tutorado)	Semi-ereto/Horizontal
	Cor da face dorsal dos entrenós	Verde e Vermelha
	Cor da face ventral dos entrenós	Verde
	Número de gavinhas consecutivas	Duas ou menos
Folha Jovem	Cor da página superior da folha (4ª folha)	Bronze
	Densidade de pelos prostrados entre as nervuras da página inferior (4ª folha)	Ausente ou muito baixa
Folha adulta	Forma do limbo	Cuneiforme
	Número de lóbulos	Cinco
	Distribuição da pigmentação antociânica das nervuras principais da página superior	Nula
	Enrugamento do limbo	Ausente ou muito baixo
	Perfil da folha em seção transversal	Involuto
	Bolhosidade da página superior	Média
	Forma dos dentes	Mistura de retilínea com convexa
	Grau de abertura do seio peciolar	Muito aberto
	Forma da base do seio peciolar	Em chaveta
	Dentes no seio peciolar	Ausente
	Base do seio peciolar delimitado pela nervura	Não delimitado
	Dentes nos seios laterais superiores	Ausente
	Densidade de pêlos prostrados entre as nervuras principais na página inferior	Ausente ou muito baixa

(Cont.)

Folha adulta (Cont.)	Densidade de pêlos eretos entre as nervuras principais na página inferior	Ausente ou muito baixa
	Profundidade dos seios laterais superiores	Média
Cacho	Comprimento (pedúnculo excluído)	Médio
	Compacidade	Solto
	Comprimento do pedúnculo	Médio
	Forma	Cilíndrico
	Número de asas	Ausente
	Peso	Muito Baixo
Bago	Forma	Elíptica curta
	Coloração da película	Rosa
	Intensidade de pigmentação antociânica da polpa	Ausente ou muito baixa
	Consistência da polpa	Ligeiramente firme
	Sabores particulares	Ausente
	Formação das grânhas	Bem formadas
	Peso	Muito baixo
Mosto	Teor alcoólico provável	Muito elevado
	Acidez total	Baixa

Couderc Noir



Varietade recolhida recentemente na Região Autónoma da Madeira, desconhecendo-se a data da sua introdução e o seu historial na região.

Abrolhamento	Época de rebentação	Médio
Pâmpano Jovem	Abertura da extremidade	Completamente aberta
	Intensidade de pigmentação antociânica na extremidade	Média
	Densidade dos pêlos prostrados na extremidade	Ausente ou muito baixa
	Vigor do pâmpano	Baixo
Pâmpano	Porte (antes de ser tutorado)	Semi-ereto/Horizontal
	Cor da face dorsal dos entrenós	Verde
	Cor da face ventral dos entrenós	Verde
	Número de gavinhas consecutivas	Duas ou menos
Folha Jovem	Cor da página superior da folha (4ª folha)	Bronze
	Densidade de pelos prostrados entre as nervuras da página inferior (4ª folha)	Ausente ou muito baixa
Folha adulta	Forma do limbo	Orbicular
	Número de lóbulos	Três
	Distribuição da pigmentação antociânica das nervuras principais da página superior	Nula
	Enrugamento do limbo	Ausente ou muito baixo
	Perfil da folha em seção transversal	Em forma de V
	Bolhosidade da página superior	Média
	Forma dos dentes	Mistura de retilínea com convexa
	Grau de abertura do seio peciolar	Fechado
	Forma da base do seio peciolar	Em V
	Dentes no seio peciolar	Ausente
	Base do seio peciolar delimitado pela nervura	Não delimitado

(Cont.)

Folha adulta (Cont.)	Dentes nos seios laterais superiores	Ausente
	Densidade de pêlos prostrados entre as nervuras principais na página inferior	Baixa
	Densidade de pêlos eretos entre as nervuras principais na página inferior	Baixa
	Profundidade dos seios laterais superiores	Ausente ou muito superficial
Cacho	Comprimento (pedúnculo excluído)	Curto
	Compacidade	Médio
	Comprimento do pedúnculo	Muito curto
	Forma	Cilíndrico
	Número de asas	Uma - duas asas
	Peso	Baixo
Bago	Forma	Esférica
	Coloração da película	Azul negro
	Intensidade de pigmentação antociânica da polpa	Baixa
	Consistência da polpa	Ligeiramente firme
	Sabores particulares	Herbáceo
	Formação das grânhas	Bem formadas
	Peso	Baixo
Mosto	Teor alcoólico provável	Elevado
	Acidez total	Elevada

5. Conclusão

No início deste trabalho, foi proposto realizar uma caracterização e classificação das variedades de videira tradicionalmente cultivadas na Região Autónoma da Madeira, tomando por base a caracterização molecular, baseada em SSR e a descrição morfológica, baseada nos descritores da OIV. O estudo realizado permitiu identificar no conjunto dos 41 acessos analisados que apenas 26 genótipos são considerados não redundantes, dos quais apenas 18 estão associados à tipicidade dos vinhos com DO “Madeira”, DO “Madeirense” e IG “Terras Madeirenses”. Para a maioria dos genótipos identificados, já se conheciam as correspondentes sinónimas, assim como algumas das suas homónimas com variedades do continente cultivadas em Portugal Continental. Para os acessos Tinta Antiga do Curral, Deliciosa e Malvasia Cândida Roxa foi realizada a descrição morfológica, por estas ainda não se encontrarem devidamente caracterizadas no Catálogo das Castas para vinho cultivadas em Portugal.

Para os genótipos Rio Grande B, Sercial B, Verdelho Tinto, Terrantez (Dão) B, Caracol, Complexa, Deliciosa, Malvasia Babosa, Triunfo, Listrão Roxo R, Esganoso de Ponte de Lima e Malvasia de São Jorge B, a caracterização molecular foi complementada para os SSR VVMD25, VVMD28, VVMD32, de forma a cumprir os requisitos de identidade genética segundo o VVC, maior e mais completa base de dados de *Vitis*.

A preservação da diversidade das variedades tradicionais da Região Demarcada da Madeira está ameaçada devido ao número reduzido de variedades utilizadas. A conceção de uma base de dados de diversidade genética contribuirá para a monitorização futura da perda de diversidade. Será igualmente utilizada para a identificação de características úteis em programas de melhoramento.

Para além disso, este estudo suporta uma base científica de extrema utilidade para o setor viveirista, que, nos últimos anos e, em casos muito pontuais têm comercializado na região plantas de variedades não previstas nas legislações que regulamentam a cultura da vinha e a produção de vinho na Região Autónoma da Madeira.

Este conhecimento sustenta cientificamente a atual legislação regional da Região Autónoma da Madeira que regulamenta a identidade das castas inscritas na Portaria n.º 39/2015, de 13 de fevereiro, e nas Portarias n.ºs 395/2017 e 396/2017, de 9 de outubro, suportando a sua identidade, quer no Catálogo Nacional de Variedades, quer na Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro, que estabelece as castas aptas para a produção de vinho em Portugal.

Referências Bibliográficas

- Abdullah, B. (2001). The use of isozymes as Biochemical Markers in Rice Research. *Buletin Agrobio*, 4(2), 39-44.
- Andorrà, Gemma (2015). "Caracterización e Identificación de 449 Accesiones de *Vitis Vinifera* L. Procedentes de Colecciones Ampelográficas."
- Arroyo-Garcia, R., & Martinez-Zapater, J. (2004). Development and characterization of new microsatellite markers for grape. *Vitis*, 43(4), 175-178.
- Beckman, C. (2002). *CQT™ 8000 Genetic analysis System: ADN sequence, Customer Training Guide*. Beckman Coulter. Fullerton, Canadá.
- Böhm, J. (2007). *Portugal Vitícola. O Grande Livro das Castas*. 2ª edição. Chaves Ferreira Publicações. 230 pp.
- Bourquin, J., Tournier, P., Otten, L., & Walter, B. (1992). Identification of sixteen grapevine rootstocks by RFLP and RFLP analysis of nuclear DNA extracted from the wood, *Vitis*, 31, 157-162.
- Boursiquot, J., & This, P. (1996). Les nouvelles techniques utilisées en ampélographie: informatique et marquage. In: La viticulture à l'aube du III^{ème} Millénaire. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, hors série, pp. 13-23.
- Bowers, J., Bandman, E., & Meredith, C. (1993). DNA Fingerprinting Characterization of Some Wine Grape Cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44:266-274.
- Bowers, J., Dangl, G., Vignani, R., & Meredith, C. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39, 628-633.

- Brazão, J. (1998). A Vitivinicultura na Região Autónoma da Madeira. Sua Evolução e Situação Actual. In: *II Jornadas Técnicas Vitivinícolas de Canárias*. Tenerife, Espanha. pp. 152-168.
- Cabral, E. (2008). *Caracterização molecular de variedades de noqueira (Juglans regia L.) portuguesas. Estudo comparativo com cultivares internacionais. Autenticidade de nozes comerciais e produtos derivados*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto. 130 pp.
- Carvalho, B., & Correia, L. (1983). *Vinhos do Nosso País*. 3ª edição. Junta Nacional do Vinho. Lisboa. 141 pp.
- Castro, I., Martín, J., Ortiz, J., & Pinto-Carnide, O. (2011). Varietal discrimination and genetic relationships of *Vitis vinifera* L. cultivars from two major Controlled Appellation (DOC) regions in Portugal. *Scientia Horticulturae*, 127(4), 507-514.
- Castro, I., D'Onofrio, C., Martín, J., Ortiz, J., De Lorenzis, G., Ferreira, V., & Pinto-Carnide, O. (2012). Effectiveness of AFLPs and retrotransposon-based markers for the identification of Portuguese grapevine cultivars and clones. *Molecular Biotechnology*, 52(1), 26-39.
- Castro, I., Pinto-Carnide, O., Ortiz, J., & Martín, J. (2013). Chloroplast genome diversity in Portuguese grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Molecular Biotechnology*, 54(2), 528-540.
- Cervera, M., Cabezas, J., Sancha, J., De Toda, F., & Martínez-Zapater, J. (1998). Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1-2), 51-59.
- Chambers, G., & MacAvoy, E. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126, 455-476.
- Chawla, H. (2000). Introduction to Plant Biotechnology. 368p. *Science publishers*, Enfield, NH, USA. 135.

- Cipriani, G., Spadotto, A., Jurman, I., Di Gaspero, G., Crespan, M., Meneghetti, S., & Pezzotti, M. (2010). The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(8), 1569-1585.
- Clímaco, P. (1997). *Influência da Cultivar e do Ambiente na Maturação da Uva e na Produtividade da Videira (Vitis vinifera L.)*. Tese de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 121 pp.
- Cunha, J., Teixeira-Santos, M., Veloso, M., Carneiro, L., Eiras-Dias, J., & Fevereiro, P. (2010). The Portuguese *Vitis vinifera* L. germoplasm: genetic relations between wild and cultivated vines. *Ciência e Técnica Vitivinícola/Journal of Viticulture and Enology* 25 (1) 25-36.
- Cunha, J., Teixeira-Santos, M., Brazão, J., Fevereiro, P., & Eiras-Dias, J. (2013). Portuguese *Vitis vinifera* L. germplasm: accessing its diversity and strategies for conservation. In: Poljuha, D. and Sladonja, B., Eds. *The Mediterranean genetic code – grapevine and olive* (InTech: Rijeka, Croatia), pp. 125 – 144.
- Cunha, J., Ibáñez, J., Teixeira-Santos, M., Brazão, J., Fevereiro, P., Martínez-Zapater, J., & Eiras-Dias, J. (2016). Characterisation of the Portuguese grapevine germplasm with 48 single-nucleotide polymorphisms. *Australian journal of grape and wine research*, 22(3), 504-516.
- DGAV, Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (2017). *Catálogo Nacional de Variedades de Videira*. Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural. Direção de Serviços de Sanidade Vegetal. Divisão de Inspeção Fitossanitária e de Materiais de Propagação Vegetativa. Lisboa.
- Diniz, I. (2006). *Aplicação da técnica de AFLP a clones de videira. Estudos preliminares de optimização*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 45 pp.

Eiras-Dias, J. (1984). Caracterização Ampelográfica de Castas Portuguesas (1ª parte). Divulgação I.N.I.A. (22).

Eiras-Dias, J. (1994). *O Polimorfismo Isoenzimático na Identificação de Cultivares de Vitis vinifera* L. Tese de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 78 pp.

Eiras-Dias, J. (2005). Programa Ampelográfico Nacional. Estratégia de caracterização, preservação e utilização do património vitivinícola português. In: *Programa de Investigação apresentado às provas de habilitação para o exercício de funções de coordenação científica, área científica de Viticultura e Enologia*. INIAP.

Eiras-Dias J., Paulos, V., Mestre, S., Martins, J., & Goulart, I. (2006). O Encepamento do Arquipélago dos Açores. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 21(2), 99-112.

Eiras-Dias, J., Faustino, R., Clímaco, P., Fernandes, P., Cruz, A., Cunha, J., Veloso, M., & Castro, R. (2011). *Catálogo das castas para vinho cultivadas em Portugal*. Volume 1. Instituto da Vinha e do Vinho I. P. (Chaves Ferreira – Publicações: Lisboa. Portugal.

Eiras-Dias, J., Faustino, R., Clímaco, P., Fernandes, P., Cruz, A., Cunha, J., Veloso, M., & Castro, R. (2013). *Catálogo das castas para vinho cultivadas em Portugal*. Volume 2. Instituto da Vinha e do Vinho I. P. (Chaves Ferreira – Publicações: Lisboa. Portugal.

Emanuelli, F., Lorenzi, S., Grzeskowiak, L., Catalano, V., Stefanini, M., Troggio, M., & Grando, M. (2013). Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. *BMC plant biology*, 13(1), 39.

FAO/IAEA (2002). *Mutant Germplasm Characterization using Molecular Markers*. Vienna, IAEA.

Faria, M. (2005). *Desenvolvimento de métodos de biologia molecular para a identificação de castas e clones de videira: Aplicação ao estudo de mostos e*

vinhos. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto. 295 pp.

Fatahi, R., Ebadi, A., Bassil, N., Mehlenbacher, S. & Zamani, Z. (2003). Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers. *VITIS-GEILWEILERHOF*, 42(4), 185-192.

Fossati, T., Labra, M., Castiglione, S., Failla, O., Scienza, A., & Sala, F. (2001). The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave". *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 102(2), 200-205.

França, R. (1981). *Estudo ampelográfico de algumas castas de Vitis vinifera L. (Bastardo, Complexa, Sercial, Terrantez, Verdelho)*. Relatório final de curso de engenheiro agrónomo. Secretaria Regional de Agricultura e Pescas. Região Autónoma da Madeira.

Franks, T., Botta, R., Thomas, M., & Franks, J. (2002). Chimerism in grapevines: implication for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 104:192-199.

Freitas, B. (2011). A Região Demarcada da Madeira – Características e Património Vitícola. In: *Seminário Vitivinicultura Atlântica – Construir o Futuro. Ilha do Pico, Açores*. pp. 1-12.

Galet, P. (1979). *A practical ampelography: grapevine identification*. University Press, Ithaca, New York.

Galet, P. (1991). Précis d'ampélographie pratique. In: Galet P (ed). Imprimerie Déhan, 6^{ème} edn. Montpellier, p. 257.

Galet, P. (2000). *Dictionnaire encyclopédique des cépages*. Hachette, p. 936.

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The journal of investigative dermatology*, 133(3), e6.

- Gonçalves, F. (1983). *Portugal País Vinícola*. Editora Portuguesa de Livros Técnicos e Científicos, Lda. Lisboa. 269 pp.
- Goulão, L., & Oliveira, C. (2001). Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, 122(1), 81-89.
- Grassi, F., Labra, M., Imazio, S., Spada, A., Sgorbati, S., Scienza, A., & Sala, F. (2003). Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(7), 1315-1320.
- Guerra, B., & Meredith, C. (1995). Comparison of *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* rootstock cultivars by restriction fragment length polymorphism analysis. *Vitis*, 34, 109-112.
- Hancock, J. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In Goldstein, D. B., Schlöterer, C. (Ed.) *Microsatellites: Evolution and applications*, (pp. 1-9). Oxford, Oxford University Press.
- Hokanson, S., Szewc-McFadden, A., Lamboy, W., & McFerson, J. (1998). Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* Borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5), 671-683.
- IPGRI., UPOV., OIV. (1997). Descripteurs de la vigne (*Vitis* spp.). *Union internationale pour la protection des obtentions végétales*. Genève, Suisse/office international de la Vigne et du Vin, Paris, France/Institut international des ressources phytogénétiques, Rome.
- Jones, C., Edwards, K., Castaglione, S., Winfield, M., Sala, F., Van de Wiel, C., & Brettschneider, R. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular breeding*, 3(5), 381-390.

- JORAM, Jornal Oficial da Região Autónoma da Madeira (2015). Portaria n.º 39/2015, de 13 de fevereiro. I Série, n.º 28.
- JORAM, Jornal Oficial da Região Autónoma da Madeira (2017). Portaria n.º 395/2017, de 9 de outubro. I Série, n.º 176.
- JORAM, Jornal Oficial da Região Autónoma da Madeira (2017). Portaria n.º 396/2017, de 9 de outubro. I Série, n.º 176.
- Karp, A., Isaac, P., & Ingram, D. (eds) (1998). *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman and Hall, London.
- Krake, L., Scott, N., Rezaian, M., & Taylor, R. (1999). *Graft-transmitted Diseases of Grapevines*. CSIRO Publishing, Austrália.
- Lanza, M., Guimarães, C., & Schuster, I. (2000). Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Levadoux, L. (1956). Les populations sauvages et cultivees de *Vitis vinifera* L. *Ann Amelior Plantes*, 6:59-118.
- Lodhi, M., Ye, G., Weeden, N., & Reisch, B. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13.
- Lopes, M., Sefc, K., Dias, E., Steinkellner, H., Machado, M., & Machado, A. (1999). The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(3-4), 733-739.
- Machado, R. (2017). *Efeitos da desfolha precoce à floração da casta “Folgasão” B (Terrantez) (Vitis vinifera L.) na Ilha da Madeira: componentes de rendimento e qualidade da uva*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 60 pp.

- MAMAOT, Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território (2012). Portaria nº 380/2012, de 22 de Novembro. Diário da República, 1ª série – N.º 226. Lisboa.
- Marques, A. (2006). *Caracterização genética de variedades de Vitis vinifera L. pelo método de amplificação de regiões de microssatélites (SSRs)*. Relatório de Estágio de Fim de Curso de Engenharia Biotecnológica. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança. 58 pp.
- Martín, J., Santiago, J., Pinto-Carnide, O., Leal, F., Martínez, M., & Ortiz, J. (2006). Determination of relationships among autochthonous grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) in the Northwest of the Iberian Peninsula by using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(6), 1255-1261.
- Menezes, P. (1896). *Apontamentos para o Estudo da Ampelographia Portuguesa*. Boletim da Direcção Geral de Agricultura (Ministério das Obras Publicas, Comercio e Industria, Imprensa Nacional). Sexto Anno, nº 7. Lisboa. 525 pp.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T., Yano, M., Bhatia, C., & Sasaki, T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular breeding*, 3(2), 87-103.
- Monteiro, F. (1999). Caracterização e identificação genética de castas de videira. *Boletim de Biotecnologia*, 63, 5-9.
- Moreno-Sanz, P., Loureiro, M., & Suárez, B. (2011). Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain). *Scientia Horticulturae*, 129(3), 433-440.
- Mueller, U., & Wolfenbarger, L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree*, 14, n.º 10.
- OIV, Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2009). *Descriptor list for grapevine varieties and Vitis species*, 2nd edn. Paris, France.

- Ouborg, N., Piquot, Y., & Van Groenendael, J. (1999). Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*, 87(4), 551-568.
- Parfitt, D., & Arulsekhar, S. (1989). Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science (USA)*.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2:225-238.
- Riaz, S., Garrison, K., Dangi, G., Boursiquot, J., & Meredith, C. (2002). Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127:508-514.
- Rodríguez-Torres, I. (2017). *Variedades de vid cultivadas en Canarias*. Descriptores Morfológicos. Caracterización Morfológica, Molecular, Agronómica y Enológica. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. 200 pp.
- Rossetto, M., McNally, J., & Henry, R. (2002). Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(1), 61-66.
- Sá-Correia, I., Moreira, I., & Fialho, A. (2003). Engenharia Genética. Biotecnologia Fundamentos e Aplicações. Editado por Lidel – Edições Técnicas, Lda. Lisboa. pp. 123-161.
- Scott, K., Egger, P., Seaton, G., & Rossetto, M. (2000). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 723-726.
- Sefc, K., Regner, F., Turetschek, E., Glössl, J., & Steinkellner, H. (1999). Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42, 367-373.

- Sefc, K., Lefort, F., Grando, M., Scott, K., Steinkellner, H., & Thomas, M. (2001). Microsatellite markers for grapevine: A state of the art. *In: Roubelakis-Angelakis K. A. (Ed): Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*. pp. 433-463.
- Sefc, K., Pejić, I., Maletić, E., Thomas, M., & Lefort, F. (2009). Microsatellite markers for grapevine: tools for cultivar identification & pedigree reconstruction. *In Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Springer Netherlands. pp. 565-596.
- SIGSVV, Sistema Integrado de Gestão do Sector Vitivinícola (FV-SIGSVV) do Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, I.P.-RAM (IVBAM, I.P.-RAM), pelos concelhos da Região Autónoma da Madeira (RAM). (consultado em 07/02/2018).
- Soldado, J. (2005). *Utilização de técnicas de biologia molecular na identificação de castas e detecção em mostos e vinhos*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 43 pp.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., & Grando, S. (2004). Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(7), 1448-1458.
- This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics*, 22(9), 511-519.
- Thomas, M., & Scott, N. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 985-990.

- Thomas, M., Cain, P., & Nigel S. (1994). "DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness." *Plant Molecular Biology*, 25(6), 939-949.
- Valvilov, N. (1926). Studies on the origin of cultivated plants. *Bulletin of Applied Botany of Genetics and Plant Breeding* (16): 1-248
- Veloso, M., Almandanim, M., Baleiras-Couto, M., Pereira, H., Carneiro, L., Fevereiro, P., & Eiras-Dias, J. (2010). Base de dados de microssatélites das castas (*Vitis vinifera* L.) utilizadas na produção de vinho em Portugal. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 25 (2), 53-61.
- Vieira, A., Palma, C., & Homem-Cardoso (1998). *O Vinho da Madeira*. Enciclopédia dos Vinhos de Portugal. Chaves Ferreira – publicações S.A. 143 pp.
- Vignani, R., Bowers, J., & Meredith C. (1996). Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* 'Sangiovese'. *Scientia Horticulturae*, 65:163-169.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- Walter, T., Posluszny, U., & Kevan, P. (1989). Isoenzyme analysis of the grape (*Vitis*). I. A practical solution. *Canadian Journal of Botany*, 67(10), 2894-2899.
- Wright, S. (1978). *Evolution and the Genetics os Populations*, Vol. 4. University of Chicago Press, III.
- Zinelabidine, L., Cunha, J., Eiras-Dias, J., Cabello, F., Martínez-Zapater, J., & Ibáñez, J. (2015). Pedigree analysis of the Spanish grapevine cultivar 'Hebén'. *VITIS- Journal of grapevine research*, 54, 81-86.

Web Referências Bibliográficas

GRAPEGEN_06 (Management & Conservation of Grapevine Genetic Resources) (<https://www1.montpellier.inra.fr/grapegen06/accueil.php>), consultado em 15/02/2018.

MEGA 7.0.26 (<http://www.megasoftware.net>), consultado em 15/02/2018.

Vitis Canárias (<http://vitiscanarias.com/publico/muestra.aspx?id=40>), consultado em 20/02/2018.

VIVC, *Vitis* Internacional Variety Catalogue. (<http://www.vivc.de/index.php?r=passport%2Fview&id=3507>), consultado em 20/02/2018.

Legislação

Decreto-Lei n.º 194/2006 de 27 de setembro. Diário da República, I Série, n.º 187.

Decreto Regulamentar Regional n.º 20/85/M, de 21 de outubro. Diário da República, I Série, n.º 242.

Portaria n.º 86/99, de 12 de maio, do Jornal Oficial da Região Autónoma da Madeira (JORAM). I Série, n.º 50

Portaria n.º 380/2012, de 22 de novembro, do Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território (MAMAOT). Diário da República, 1ª série – n.º 226. Lisboa.

Portaria n.º 39/2015, de 13 de fevereiro, do Jornal Oficial da Região Autónoma da Madeira (JORAM). I Série, n.º 28.

Portaria n.º 395/2017, de 9 de outubro, do Jornal Oficial da Região Autónoma da Madeira (JORAM). I Série, n.º 176.

Portaria n.º 396/2017, de 9 de outubro, do Jornal Oficial da Região Autónoma da Madeira (JORAM). I Série, n.º 176.

Anexos

Anexo I - Extração de ADN

Método de extração de ADN em folhas jovens proposto por Lodhi *et al.* 1994, com ligeiras alterações.

Soluções:

- Tampão de extração:
 - ▶ 20 mM EDTA sódio
 - ▶ 100 mM tris-HCl, ajustado pH para 8 com HCl
 - ▶ 1,4 M NaCl
 - ▶ 2,0 % (g/v) CTAB (dissolver a 60 °C e guardar a 37 °C)
 - ▶ 0,2 % de β-mercaptoetanol, juntar mesmo antes de utilizar
- Clorofórmio: álcool isomílico 24:1 (v/v)
- 5 M NaCl
- Tampão TE:
 - ▶ 10 mM Tris-HCl
 - ▶ 1 mM EDTA, ajustar pH para 8 e esterilizar a 121 °C, durante 20 minutos.
- PVP (Sigma P6755)
- RNase A (Sigma R9009: 10 mg/mL)

Método:

1. Num almofariz triturar 10mg de folhas jovens com azoto líquido (-80°C).
2. Colocar o tecido triturado em tubos eppendorf de polipropileno de 15ml. Adicionar 500µl de tampão de extracção e 10mg de PVP (Sigma P6755). Colocar no gelo.
3. Realizar um spin, de forma a misturar todos os compostos e vai a incubar a 60°C, em banho-maria, por 25 minutos. Deixar arrefecer à temperatura ambiente.
4. Adicionar 12ml de clorofórmio: álcool isomílico e agitar os tubos (spin) até se formar uma emulsão.
5. Centrifugar a 6000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente.
6. Transferir o sobrenadante para tubos eppendorf e adicionar 6ml de clorofórmio: álcool isomílico. Realizar um spin.
7. Centrifugar a 6000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente.
8. Transferir o sobrenadante para novos tubos eppendorf e adicionar 0,5 volumes de 5M NaCl à solução resultante dos passos anteriores e misturar.

9. Adicionar 2 volumes de etanol a 95% frio (-20°C) e refrigerar (4 a 6°C) por 15 a 20 minutos até começarem a aparecer as cadeias de ADN.
10. Centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos, aumentar a velocidade para 5000 rpm por mais 3 minutos.
11. Decantar o sobrenadante e lavar o pellet com etanol 76% frio (0 a 4°C).
12. Remover o etanol do pellet sem secar o ADN deixando os tubos descobertos a 37°C durante 20 a 30 minutos.
13. Dissolver em 200 a 300µl de TE.
14. Ressuspender com 1µl de RNase A por 100µl de solução de ADN e incubar a 37°C por 15 minutos.
15. Guardar o ADN a - 70°C, se por um período longo, ou a - 20°C, por um período curto.

Anexo II - Quantificação de ADN

Soluções:

- Gel de agarose a 0,8% (p/v) em TBE 0,5x (pH 8,3)
- Brometo de etídio
- ADN extraído
- Tampão TBE 0,5x
- Solução dye 6x

Método:

1. Preparar o gel de agarose a 0,8 % (p/v) em TBE 0,5x (pH 8,3, Merck);
2. Colocar numa tina de eletroforese horizontal, imerso em tampão de corrida TBE 0,5x;
3. Misturar 5 µL de cada suspensão de ADN com 1 µL de solução loading dye 6x;
4. Pipetar integralmente para cada poço a solução descrita acima;
5. Correr a eletroforese á voltagem de 120 V (EPS 3001, Amersham Pharmacia Biotech), durante cerca de 30 min;
6. Após a corrida revelar o gel em brometo de etídio (Merck), a 0,5 µg/mL. Visualizar as bandas num transiluminador de luz UV com comprimento de onda de 312 nm;
7. Fotografar com uma máquina digital (Kodac EDAS 290), e trabalhar a imagem no programa Kodac 1D Limited edition v.3.5.4.;
8. Determinar a concentração aproximada do ADN através da impressão da fotografia, e por comparação das bandas obtidas.

Anexo III - Descrição morfológica dos 10 acessos segundo os descritores da OIV

OIV	Descrição	Tinta Antiga do Curral	Triunfo	Deliciosa	Boal (Madeira)	Malvasia Cândida Roxa	Listrão	Verdejo Blanco	Carão de Moça	Esganoso Castelo Paiva	Bastardo
1	Pâmpano Jovem (extremidade): Forma	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
3	Pâmpano Jovem (extremidade): Intensidade de pigmentação antociânica	1	5	1	1	5	5	5	5	5	3
4	Pâmpano Jovem (extremidade): Densidade de pêlos prostrados	5	1	5	5	1	5	1	5	5	3
6	Pâmpano: Porte	3	3	7	5	5	5	3	3	5	3
7	Pâmpano: Cor da face dorsal dos entrenós	2	1	2	2	3	3	2	2	2	2
8	Pâmpano: Cor da face ventral dos entrenós	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1
16	Pâmpano: Número de gavinhas consecutivas	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
51	Folha Jovem: Cor da página superior (4ª folha)	1	3	3	2	3	3	3	3	3	3
53	Folha Jovem: Densidade de pêlos prostrados entre as nervuras principais na página inferior da 4ª folha	5	1	7	7	1	7	1	5	5	5
67	Folha Adulta: Forma do limbo	4	4	2	3	2	3	2	2	3	4
68	Folha Adulta: Número de lóbulos	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3
70	Folha Adulta: Distribuição da pigmentação antociânica das nervuras principais da página superior	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1
72	Folha Adulta: Enrugamento do limbo	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1
74	Folha Adulta: Perfil da folha na secção transversal	2	2	1	2	3	3	2	3	5	5
75	Folha Adulta: Bolhosidade da página superior	3	3	1	3	3	5	5	3	5	3
76	Folha Adulta: Forma dos dentes	3	5	2	5	5	5	5	5	5	5

(Cont.)

OIV	Descrição	Tinta Antiga do Curral	Triunfo	Deliciosa	Boal (Madeira)	Malvasia Cândida Roxa	Listrão	Verdejo Branco	Carão de Moça	Esganoso Castelo Paiva	Bastardo
241	Bago: Formação de grânhas	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
351	Vigor do Pâmpano	7	3	3	5	1	3	3	3	5	7
351	Vigor do Pâmpano	7	3	3	5	1	3	3	3	5	7
502	Cacho: Peso (g)	265,0	213,0	405,0	222,0	103,0	671,0	228,0	609,0	79,0	206,0
503	Bago: Peso (g)	2,0	3,5	3,4	2,4	1,2	3,6	3,1	2,0	1,9	2,3
505	Mosto: Teor de açúcar (° Brix)	23,0	20,0	22,0	16,6	23,0	18,4	18,0	17,4	23,4	17,6
506	Mosto: Acidez Total (g de ácido tartárico/L)	6,6	11,0	6,7	11,6	5,4	6,7	4,2	10,5	9,8	8,7
508	Mosto: pH	3,30	2,96	3,25	2,97	2,85	3,26	3,22	2,76	3,13	2,98