ITEA (1997), Vol. 93V N.º 3, 135-155

PROGRESOS EN LA CARACTERIZACIÓN Y MEJORA DE LA VID (*Vitis vinifera* L.) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

S. Moreno*
Y. Gogorcena**
J. María Ortiz*

* Dpto. Biología Vegetal, E.T.S. Ingenieros Agrónomos (U.P.M) Ciudad Universitaria, 28040 Madrid
** Dpto. Nutrición Vegetal, E.E. Aula Dei C.S.I.C., Apdo. 202, 50080 Zaragoza

RESUMEN

En este trabajo se revisa la contribución de los marcadores moleculares en la identificación y mejora de variedades de vid, así como en el estudio de relaciones genéticas entre ellas. La correcta identificación de variedades se ha convertido en una necesidad de primer orden en la viticultura moderna. Debido a que los métodos tradicionales de identificación son arduos se han desarrollado marcadores moleculares que posibilitan una identificación rápida y fiable de variedades. Por otra parte, la mejora de la vid, se ha basado principalmente en la detección de los genotipos más interesantes dentro de cada variedad mediante un largo proceso de selección clonal. Para ciertos caracteres de interés, la selección clonal no es aplicable pero tampoco la mejora mediante cruzamientos, ya que se enfrenta a limitaciones culturales, técnicas y económicas. La utilización de ciertos marcadores moleculares puede facilitar y acortar el proceso de selección clonal, hacer viable en muchos casos la mejora mediante cruzamientos e, incluso, la introducción de genes de interés mediante biotecnología. Las relaciones genéticas entre variedades de vid apenas han sido estudiadas, pero para este análisis, una combinación de datos aportados por distintos tipos de marcadores moleculares, es probablemente la mejor opción.

Palabras clave: AFLP, Mejora genética, Relaciones genéticas, Identificación, Isoenzimas, Marcadores moleculares, RAPD, RFLP, STMS, *Vitis vinifera*, Vid.

ABSTRACT

MOLECULAR MARKERS FOR GRAPEVINE CHARACTERIZATION AND BREEDING

We review here recent contributions of molecular markers to grapevine identification, breeding and study of genetic relationships among varieties. The accurate identification has become a major concern of the modern viticulture. Traditional procedures, mainly based on morphological data, are time consuming and labor extensive. Molecular markers have been developed that permits easy and accurate identification. Grapevine breeding has been traditionally based on clone selection, which aims to uncover valuable genotypes within each variety. For some breeding goals, neither

clone selection nor cross breeding, that face cultural, technical and economical constraints, are useful. The use of molecular markers may simplify the process of, clone selection, cross breeding and the development of genetic engineered grapevine. Genetic relationships among grapevine varieties, has been hardly investigated. A combination of data from different molecular markers may probably be the best choice.

Key words: AFLP, Plant breeding, Genetic relationships, Identification, Isozyme, Molecular markers, RAPD, RFLP, STMS, *Vitis vinifera,* grapevine.

Introducción

Concepto de variedad de vid

Restos fósiles de polen y de semillas indican que la vid, como planta silvestre (*Vitis vinifera silvestris* o lambrusca), existió durante el terciario en Europa oriental, Asia occidental y América. Posteriormente, durante el periodo glaciar cuaternario, desapareció de América y se mantuvo en los bosques circunmediterráneos y del sur del mar Caspio, produciéndose a partir de ese momento un proceso de evolución independiente de las distintas poblaciones (LEVADOUX, 1956).

El cultivo de la vid se inició en la región transcaucásica hace unos 6000 años, cuando el hombre se hizo sedentario y descubrió el interés alimentario de esta planta. Mutaciones sobre las lambruscas pudieron favorecer la aparición de formas hermafroditas más interesantes para el cultivo, que los hombres multiplicarían por estaquillas y 'domesticarían' mediante la poda, dando lugar, a través de un largo proceso de selección, a lo que se ha denominado como *Vitis vinifera sativa.*

Las vides cultivadas de Europa occidental tienen distintos orígenes: (REYNER, 1991): i) vides cultivadas en la faja nororiental del Mediterráneo (desde Grecia hasta Afganistán) traídas a occidente por aqueos, dóricos, griegos y romanos. Este material ha evolucionado como consecuencia de mutaciones y por efecto de la selección realizada por el hombre; ii) cruzamientos naturales entre las vides cultivadas importadas de oriente y las lambruscas autóctonas; iii) selección de las lambruscas indígenas. Las nuevas variedades obtenidas durante los siglos XIX y XX mediante cruzamientos artificiales, se han difundido poco y hoy sólo ocupan un 3% de la superficie total del viñedo eurasiático.

Una variedad tradicional de vid está formada por un conjunto de genotipos lo suficientemente similares entre sí pero diferentes de otros (desde el punto de vista morfológico, y en ocasiones también tecnológico), como para que el viticultor les asigne un nombre común (DOAZAN, 1988; REYNER, 1991). Dada esta heterogeneidad intravarietal, sería más propio hablar de variedad-población. Este concepto de variedad, que resulta peculiar en relación al aplicado en otros cultivos leñosos, ha propiciado la aparición de un nombre específico tanto en Francia (*cépage*) como en Italia (*vitigno*).

Marcadores moleculares

La historia de los marcadores moleculares comienza cuando en 1959 MARKERT y MOLLER acuñan el término isoenzima para referirse a las distintas formas moleculares de un enzima, que proceden del mismo individuo y comparten actividad catalítica. En general el polimorfismo isoenzimático tiene una base genética, ya que las distintas ban-

das isoenzimáticas derivan de distintos alelos para el mismo o distintos *loci*. Los usos y ventajas de los isoenzimas para caracterización y análisis genético de plantas han sido revisados entre otros por TANKSLEY (1983), pero la aplicación en el caso de especies frutales ha sido excelentemente analizada por MOORE y DURHAM (1992).

Hasta hace muy pocos años el más común de los llamados marcadores ADN eran los RFLPs (*restriction fragment length polymorphisms*), (GRODZICKER *et al.*, 1974; BOTSTEIN *et al.*, 1980). La detección de RFLPs depende de diferencias en la secuencia de ADN de los individuos en estudio. Para detectar esas diferencias se fragmenta el ADN mediante enzimas de restricción. El ADN fragmentado se separa por tamaño mediante una electroforesis, se desnaturaliza y transfiere a una membrana, y se hibrida con una sonda de ADN que deberá estar marcada para poder visualizar los fragmentos de restricción que hibridan con la sonda. Cuando se realiza esto en dos individuos y se comparan los resultados, probablemente, se observen diferencias en el tamaño de los fragmentos de restricción que hibridan. Estas diferencias pueden ser debidas a uno o más cambios de bases que han alterado un lugar de restricción en el individuo, o a cambios estructurales mayores (inversiones, traslocaciones, deleciones, etc.) que modificarían la distancia entre lugares de restricción. La utilización de los RFLPs en mejora de plantas ha tenido gran trascendencia y ha sido objeto de diversas revisiones (TANKSLEY *et al.*, 1989; IGLESIAS y ROJAS, 1992), en particular su uso en el estudio de frutales ha sido tratado por MOORE y DURHAM (1992), y más recientemente por HORMAZA (1996).

En 1984, un grupo de investigadores desarrolló un método de amplificación de ADN *in vitro*, que permitía producir fácilmente grandes cantidades de uno o más fragmentos específicos (productos amplificados) a partir de un ADN molde de gran complejidad. Lo denominaron reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction* (SAIKI *et al.*, 1985)). Para que se produzca la amplificación de ADN, el método requiere una ADN polimerasa y 2 cebadores. El ADN amplificado puede ser visualizado por simple tinción, sin necesidad de una sonda. La PCR detecta diferencias en la secuencia nucleotídica de los fragmentos amplificados de los individuos en estudio. Estas diferencias pueden ser debidas al cambio de una o más bases en el sitio de unión de los cebadores o a cambios estructurales mayores que modificarían la distancia de unión entre los cebadores. La PCR ha permitido el desarrollo de marcadores moleculares que han abierto nuevas perspectivas para resolver los tradicionales problemas de caracterización.

En este trabajo se presenta una revisión sobre el uso de marcadores moleculares para el estudio de la vid. Se tratan cuatro aspectos: identificación de variedades, mejora de la vid mediante selección clonal y mediante cruzamientos, y relaciones genéticas entre variedades.

Identificación de las variedades

Aunque el material de vid en cultivo es el resultado de una larga evolución, hay, sin embargo, dos acontecimientos que han tenido una influencia notable en la conformación del viñedo actual: la invasión de la filoxera en el último cuarto del siglo XIX y los trabajos de selección clonal y sanitaria, iniciados a mitad del presente (DOAZAN, 1988). Ambos hechos han causado la pérdida de diversidad genética (TRUEL, 1990), pero han simplificado el panorama varietal,

propiciando la aparición de normativas o reglamentos relativos a la utilización de las variedades en las distintas zonas vitícolas. La correcta identificación de las variedades de vid se ha convertido así en una necesidad que se ha incrementado en los últimos años. Por una parte, debido a la creciente participación de los viveros en la producción y distribución de variedades y por otra a la introducción de variedades procedentes de otros países. El problema de la identificación pues afecta e interesa tanto a viticultores, como a viveristas y a organismos oficiales de control.

Ampelografía clásica

El primer trabajo sistemático de descripción de las variedades de vid, con objeto de facilitar su identificación, lo acometen VIALA y VERMOREL (1901-1910). Coincide en el tiempo con el inicio de la viticultura moderna, tras la crisis filoxérica. Estos autores, realizan la descripción de las características morfológicas, agronómicas y tecnológicas de gran número de variedades de vid. La culminación de estos trabajos, 50 años después, se debe a GALET (1964). En 1982 expertos de la O.I.V. (Oficina Internacional de la Viña y el Vino) y de la U.P.O.V. (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales) aprueban una lista de 130 caracteres morfológicos para su utilización internacional, en la descripción, evaluación y conservación de las diferentes variedades de vid (O.I.V., 1984). Se pretende así que las descripciones sean menos ambiguas y menos dependientes de factores ambientales. Posteriormente, a partir de dicha lista, se crean otras más reducidas, específicas para la distinción de variedades, establecimiento de colecciones de genes, trabajos de mejora y descripción de variedades (DETTWEILER, 1991). Con todo, la utilización de este tipo de caracteres descriptivos presenta dos serios inconvenientes: cada carácter debe examinarse en un estado fenológico determinado, y deben utilizarse plantas adultas. Otros métodos propuestos para la identificación de variedades de vid, como el estudio de caracteres morfométricos (RAVAZ, 1902; GALET, 1967), histológicos (KASZAB, 1976), morfología de polen (AHMEDULLAH, 1986; BEN SLIMANE y ASKRI, 1990; CABELLO, 1992), o composición en ácidos grasos de las semillas (FANIZZA, *et al.* 1986), o bien presentaban los inconvenientes citados anteriormente, o bien no generaban suficiente polimorfismo para permitir la correcta identificación de variedades.

Isoenzimas y RFLPs

El estudio de sistemas isoenzimáticos ha tenido bastante transcendencia. Los trabajos desarrollados fundamentalmente durante los años 80 y principios de los 90, llevaron a la selección de un cierto número de sistemas isoenzimáticos adecuados para la identificación de variedades de vid (WOLFE, 1976; SCHWENNESEN *et al.,* 1982; STAVRAKAKIS y LOUKAS, 1983; BACHMANN y BLAISCH, 1988; CALÒ *et al.,* 1989; CABELLO, 1992; Vidal, 1996). Esta técnica es barata, rápida y reproducible bajo ciertas condiciones experimentales (ROYO *et al.,* 1997). La exigencia sobre el momento en que debe realizarse el análisis no es tan estricta como en el caso de los caracteres morfológicos. El principal inconveniente está en que el número de sistemas isoenzimáticos que se puede analizar, y por ende el polimorfismo que se puede alcanzar es limitado. Esta dificultad se salva adecuadamente mediante el análisis de RFLP con sondas minisatélite (JEFFREYS *et al.,* 1985). Las sondas minisatélite hibridan con regiones del ADN constituidas a

partir de la repetición de una secuencia núcleo de 16 a 64 pb (llamadas minisatélites). En cada genoma, la sonda suele hibridar en más de un punto, por lo que se exploran simultáneamente varios *'loci'*. En cada *loci* el ensayo permite detectar polimorfismos en el nivel de repetición de la secuencia núcleo cuando se comparan unos individuos con otros. Una misma sonda puede utilizarse con éxito en organismos muy distintos, sin necesidad de un conocimiento previo del genoma de los organismos a estudiar. El número de polimorfismos que se pueden obtener es suficiente para la identificación de variedades de vid (STRIEM *et al.*, 1990; BOWERS *et al.*, 1993). No obstante, el ensayo RFLP es comparativamente costoso, técnicamente exigente y requiere bastante tiempo.

Marcadores moleculares basados en la PCR

En los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas moleculares basadas en la PCR. Una de las mas sencillas se denomina RAPDs (*random amplified polymorphic DNA*, (WELSH y MCCLELLAND,, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990, Figura 1) y analiza el polimorfismo obtenido al amplificar el ADN genómico con cebadores escogidos al azar y, por tanto, no es necesario un conocimiento previo sobre el genoma del organismo a estudiar. Dado el elevado polimorfismo que proporciona y su bajo coste, se ha utilizado con éxito para la identificación varietal en vid (COLLINS y SYMONS, 1993; GOGORCENA *et al.*, 1993; JEAN-JAQUES *et al.*, 1993; MORENO *et al.*, 1995) y en otros cultivos leñosos (WILDE *et al.*, 1992; KOLLER *et al.*, 1993; GOGORCENA y PARFITT, 1994; WEISING *et al.*, 1995). No obstante, los problemas de reproducibilidad entre laboratorios desaconsejan su utilización en el establecimiento de bancos internacionales de datos para la identificación varietal (WEISING *et al.*, 1995; WOLFF *et al.*, 1995; MORENO, 1996).

Para este fin, el estudio de ADN repetitivo de secuencia simple (SSR: *simple sequence repeat*) o ADN microsatélite mediante PCR (STMS, *sequence tagged microsatellite site*, (LITT y LUTY, 1989; WEBER y MAY, 1989), fig. 1) ha sido propuesto de forma entusiasta por un grupo de investigación australiano (SCOTT y THOMAS, 1994). Los microsatélites son muy abundantes y se encuentran regularmente distribuidos por todo el genoma. Para el análisis STMS se utiliza una pareja de cebadores que son complementarios de las regiones que flanquean a un determinado microsatélite y que permiten su amplificación. El polimorfismo deriva de diferencias en el nivel de repetición de la unidad repetida dentro del microsatélite, obteniéndose, numerosas variantes alélicas (Figura 2). El ensayo es rápido, sencillo y reproducible y tiene la gran ventaja de que tanto el recuento de bandas como el análisis de datos puede automatizarse. Como consecuencia los datos son fácilmente transferibles entre usuarios (SCOTT y THOMAS, 1994). En Internet se pueden encontrar varias bases de datos con los genotipos microsatélite de numerosas variedades[1]. El principal inconveniente es que la selección y caracterización de los *loci* microsatélites útiles requiere un trabajo arduo que implica la construcción de librerías genómicas enriquecidas en clones que contengan microsatélites,

1. http://wineserver.ucdavis.edu/cpm/grapedna.html
http://cgswww.adl.hort.sciro.au/cgsmain.html.

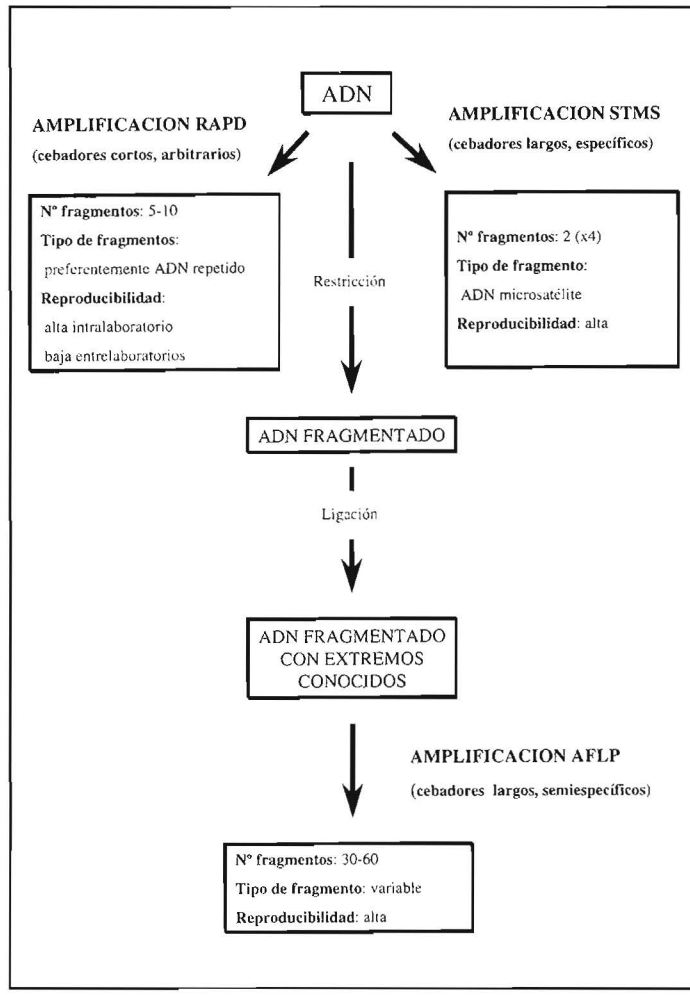


Figura 1. Características de los principales marcadores moleculares basados en la PCR utilizados para el estudio de la vid

Figure 1. Main properties of PCR-based molecular markers used for grapevine studies

su secuenciación y el diseño de cebadores que amplifiquen *locus* específicos y polimórficos. Hasta la fecha sólo han sido publicados los cebadores para el estudio de nueve *loci* microsatélite en vid (THOMAS y SCOTT, 1993; BOWERS *et al.*, 1996). No obstante, hoy son numerosos los laboratorios interesados en la utilización de este tipo de marcadores para identificación de variedades de vid (BOWERS y MEREDITH, 1994; CIPRIANI *et al.*, 1994; BOTTA *et al.*, 1995; BOWERS *et al.*, 1996).

Otra técnica que permite detectar variaciones en la secuencia nucleotídica y que

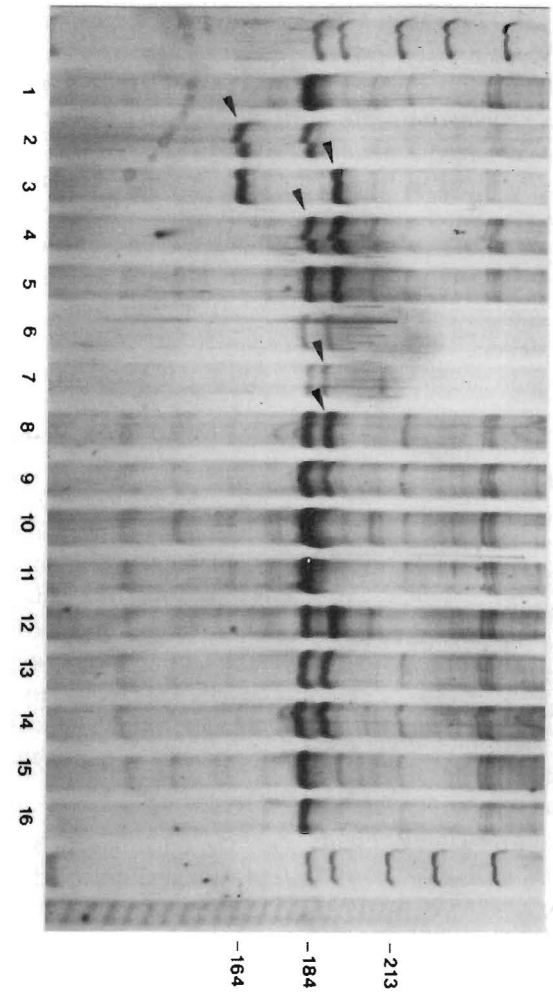


Figura 2. Identificación varietal en vid mediante STMS. El examen del *locus* microsatélite VVS1 en 16 variedades de uva de mesa que identifica un total de 5 alelos, señalados por las flechas. Cada una de las variedades estudiadas queda definida por un par de alelos. En total se observan 6 genotipos distintos. Los números situados a la derecha indican tamaño molecular en pares de bases (cortesía de Juan P. Martín y Eva M. Sánchez)

Figure 2. Grapevine identification with STMS. The analysis of VVS1 microsatellite locus in 16 table grape varieties yields 5 alleles (pointed by arrows). Each variety is defined by a pair of alleles. Overall 6 different genotypes are found. Numbers on the right indicate molecular size in base pairs (courtesy of J.P. Martín and E.M. Sánchez)

puede ser de interés para la identificación varietal en vid es AFLP[2] (ZABEAU y VOS, 1993; VOS *et al.*, 1995). En este caso, el ADN molde se somete primero a un tratamiento de restricción y posteriormente a una ligación de pequeños oligonucleótidos de secuencia conocida llamados 'adaptadores' (Figura 1). La amplificación se realiza utilizando cebadores que constan de dos partes, una secuencia complementaria al adaptador y que contiene completa la diana de restricción, y una secuencia selectiva que tiene por objeto que sólo amplifique una fracción del conjunto de fragmentos de restricción generados. A diferencia de los RFLPs, ahora el polimorfismo deriva principalmente de la presencia/ausencia de los fragmentos de restricción amplificados, más que de diferencias en la longitud de los mismos. Varios grupos trabajan en la identificación varietal en vid basada en AFLPs (CERVERA Y MARTÍNEZ-ZAPATER, comunicación personal; REISCH, comunicación personal). Es de esperar que muy pronto se conozca la utilidad real de estos marcardores. Aunque hay dudas sobre si los RAPDs proporcionan una mejor relación *loci* polimórficos a *loci* totales, el número de *loci* polimórficos por ensayo es mucho mayor en el caso de AFLPs (LU *et al.*, 1996). Por otra parte, parece que la reproducibilidad entre laboratorios del ensayo AFLP es superior a la que se obtiene con RAPDs (VOS *et al.*, 1995; HILL *et al.*, 1996), por lo que con ellos sería más factible la utilización en un banco de datos internacional. La difícil automatización del análisis de resultados y el elevado coste unitario del ensayo, quizás sean las desventajas principales de AFLP frente a STMS cuando se trata de resolver problemas de identificación.

Sea cual fuere el marcador molecular que se utilice, a efectos de identificación lo ideal es contrastar en un mismo ensayo la variedad problema con las variedades para las que se conoce el *fingerprint* o patrón de bandas característico. Una misma combinación de marcadores en la variedad problema y en alguna de las variedades conocidas, indica que probablemente dichas variedades sean idénticas. Se están llevando a cabo estudios para determinar esa probabilidad cuando se utilizan marcadores RAPD y AFLP (IBAÑEZ, comunicación personal; CERVERA y MARTÍNEZ-ZAPATER, comunicación personal). Según BOWERS *et al.* (1996) la identificación de cultivares no se debe basar únicamente en la coincidencia de perfiles entre cultivar caracterizado y cultivar problema. Se debe incorporar además una estima de la frecuencia del genotipo problema en la población de cultivares de *V. vinifera*. La presencia común de alelos raros en la variedad problema y en la variedad referencia avalaría una identidad con mayores garantías que la presencia común de alelos de alta frecuencia.

De igual modo, se puede rechazar la identidad si la variedad problema presenta una combinación de marcadores diferente a la que caracteriza a la variedad referencia. También en este caso se debe admitir cierta posibilidad de error ya que no se puede asegurar que un marcador es característico de una variedad hasta que no se han analizado todos los miembros de esa variedad, lo que en la práctica es inalcanzable. No se ha investigado con detalle la magnitud de la variabilidad molecular en el interior de variedades de vid antiguas, pero los primeros estudios indican que en algunos casos es importante (ROYO *et al.*, 1989; MORENO,

2. El nombre AFLP no debe usarse como acrónimo.

1996; SENSI *et al.*, 1996). De hecho Sensi y col. han encontrado que aparentemente ciertos materiales pertenecientes a la variedad 'Colorino' difieren molecularmente más entre sí que cuando son comparados con otra variedad. En estos casos existe un riesgo evidente de tomar un polimorfismo intravarietal por polimorfismo varietal, lo que se puede evitar realizando previamente estudios ampelográficos clásicos, ya que son éstos y no los métodos moleculares los que han servido para clasificar en variedades el material de vid.

Mejora mediante selección clonal

Origen y uso de la diversidad intravarietal

En la mayoría de los países con tradición vitivinícola, el cultivo de la vid está reglamentado y se basa en la utilización de variedades tradicionales, soporte fundamental, junto a las condiciones edafoclimáticas y las técnicas de elaboración, de la tipicidad del vino (BESSIS *et al.*, 1995). Como consecuencia, la selección clonal o selección de los individuos más interesantes (cabezas de clon) dentro de las variedades-población de vid, es hoy el principal método para la mejora de la vid de vinificación.

Tres pueden ser los orígenes de la heterogeneidad dentro de una variedad de vid (REYNIER, 1991). En primer lugar, *cruzamientos naturales* sucesivos que dieron lugar a una descendencia heterogénea y que el viticultor primitivo clasificó en grupos más homogéneos de acuerdo con su fenotipo; cada uno de estos grupos constituiría una variedad (origen policlonal de las variedades). En segundo lugar *mutaciones* que modificaron ligeramente la morfología u otras características de los individuos. En una variedad de vid multiplicada vegetativamente durante siglos sobre grandes superficies, es muy probable la existencia de una diversidad de genotipos resultado de mutaciones (ROYO *et al.*, 1989). Estos cambios en general pasan desapercibidos, pero en algunos casos han sido tan relevantes que han dado lugar a la constitución de una nueva variedad. La última fuente de variabilidad serían *enfermedades víricas* que modifican la morfología y fisiología de los individuos. La diversidad originada por cualquiera de estas tres vías es seleccionada por el hombre de forma diferente en las distintas zonas de cultivo. De esta forma, la misma variedad en distintas zonas puede estar constituida por un conjunto de genotipos (clones) diferente (RIVES, 1961).

El que una variedad sea considerada como una unidad, se debe a que las diferencias entre los distintos clones que la componen no son obvias. Dos clones de una cierta variedad pueden diferir en la fenología, en detalles morfológicos poco evidentes como p. ej. la morfología floral, en el comportamiento frente a enfermedades, en la fecundidad, en las características tecnológicas, etc. (HIDALGO, 1993; MUÑOZ ORGANERO, 1995). Muchos de estos factores son susceptibles a influencias ambientales y a agentes patógenos, por ello, los métodos utilizados para seleccionar los clones con las características deseadas, requieren la realización de observaciones periódicas durante muchos años, la verificación constante del buen estado sanitario de las cepas, y un cuidadoso diseño estadístico para la obtención y evaluación de datos (RIVES, 1961).

La utilización de marcadores moleculares para el polimorfismo intravarietal en vid podría tener interés en las tres fases de una estrategia de selección clonal. Primero, para evaluar de forma rápida la diversidad intravarietal y localizar el material sobre el que, preferentemente, podría iniciarse el proceso de selección clonal. Segundo, si se dispusie-

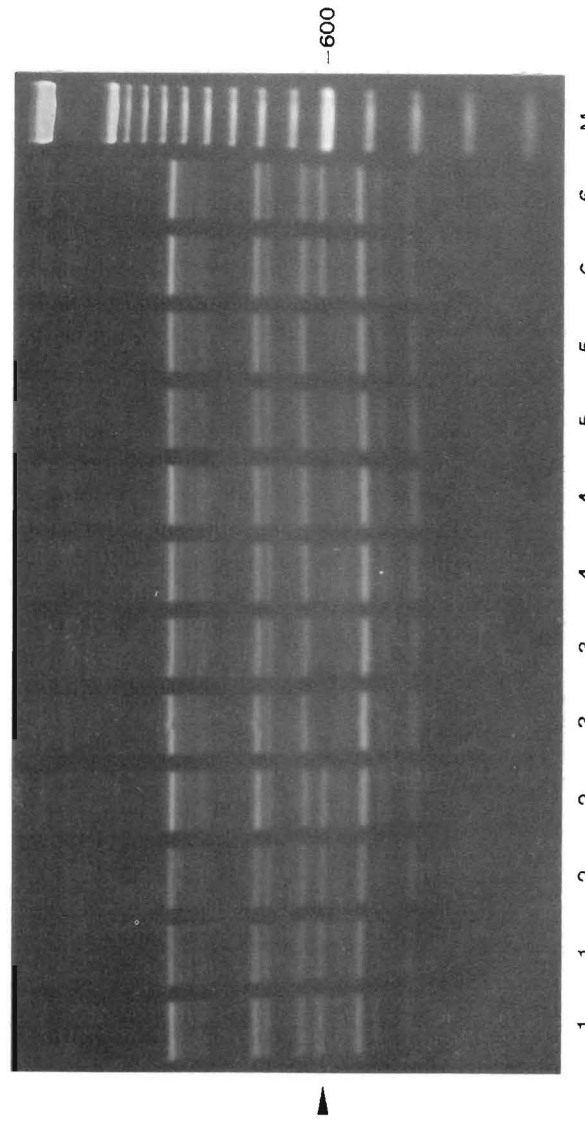


Figura 3. Detección de polimorfismo intravarietal mediante amplificaciones RAPD con un cebador decámero (BC-493). Las seis accesiones habían sido clasificadas mediante un estudio ampelográfico clásico como pertenecientes a la variedad 'Garnacha', sin embargo presentaron dos modelos de bandas RAPD. De cada accesión se muestran dos amplificaciones. El número situado a la derecha indica tamaño molecular en pares de bases.

Figure 3. Detection of intravarietal polymorphisms with the 10-mer RAPD primer (BC-493). The six accessions studies were classified after an ampelographic analysis as 'Garnacha' variety. However, two different RAPD band patterns were found. For each accession two amplifications are shown. The number on the right side indicates molecular size in base pairs.

se de marcadores ligados a genes de interés se podrían localizar rápidamente los genotipos con el carácter deseado y concentrar sobre ellos el trabajo de selección clonal. En tercer lugar, los marcadores moleculares ayudarían a caracterizar e identificar de forma rápida y fiable los materiales seleccionados.

Detección del polimorfismo intravarietal

Trabajos desarrollados recientemente han llevado a la conclusión de que al menos una parte del polimorfismo intravarietal puede ser fácilmente accesible a un análisis de *fingerprinting* (SENSI *et al.*, 1996). Probablemente se trate de una diversidad originada a partir de cruzamientos naturales (origen policlonal); los miembros de una variedad estarían estrechamente emparentados pero presentarían genomas con notables diferencias y fácilmente detectables en el análisis molecular. Estas diferencias escaparían, no obstante, a un análisis ampelográfico clásico porque no se expresan o porque afectan a caracteres, como el tamaño de la hoja o el tamaño y compacidad del racimo, resistencia a enfermedades, fenología, etc., difíciles de interpretar debido a las interferencias ambientales.

Por el contrario, otra parte de la heterogeneidad intravarietal, probablemente aquella que es consecuencia de las mutaciones somáticas, se ha resistido generalmente a todo análisis molecular de *fingerprinting*. Aunque hay algunas excepciones (SCHWENNESEN et al., 1982; MORENO, 1996), como la mostrada en la figura 3, en general se ha encontrado que ni el estudio de isoenzimas (STAVRAKAKIS y LOUKAS, 1983; CALÓ *et al.*, 1989; ALTUBE *et al.*, 1991), RFLPs, (BOURQUIN *et al.*, 1993; BOWERS *et al.*, 1993; GOGORCENA *et al.*, 1993), RAPDs (COLLINS y SYMONS, 1993; GOGORCENA *et al.*, 1993) es capaz de detectar este tipo de polimorfismo intravarietal.

La utilización de marcadores moleculares que permitan explorar simultáneamente un gran número de *loci* altamente variables podría mejorar la detección de mutaciones somáticas. En estudios sobre vid y peral, YE *et al.* (1996) han observado que la realización de un ensayo RAPD con cebadores de entre 16 y 20 pb da lugar a un mayor número de bandas polimórficas por ensayo respecto a cuando se utilizan cebadores decámeros. AFLP es potencialmente interesante para la caracterización de este tipo de mutantes (CERVERA, comunicación personal), ya que permite examinar regiones del genoma con variabilidad comparable a la examinada mediante RAPD, pero, dado el gran número de *loci* examinados en cada ensayo AFLP la eficiencia en este caso es mucho mayor (fig. 4). Recientemente se han desarrollado algunas técnicas moleculares que posibilitan el estudio simultáneo de regiones altamente variables (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994; ROHDE, 1995). No obstante, su utilidad en la detección de mutaciones somáticas está todavía por demostrar (MORENO, 1996).

Las técnicas de *fingerprinting* con marcadores moleculares como minisatélites, RAPD, STMS, AFLP, etc, realizan un análisis del genoma en el que la detección de polimorfismos se confía al azar, por lo que se suelen llamar técnicas de 'análisis ciego' (HAYMER, 1994). En la práctica, este análisis sólo permite la exploración de una fracción bastante reducida del genoma y quizás insuficiente para la detección de mutaciones que afectan a uno o pocos fragmentos. Por ello se están buscando métodos que realicen la detección de mutaciones de una forma más eficaz.

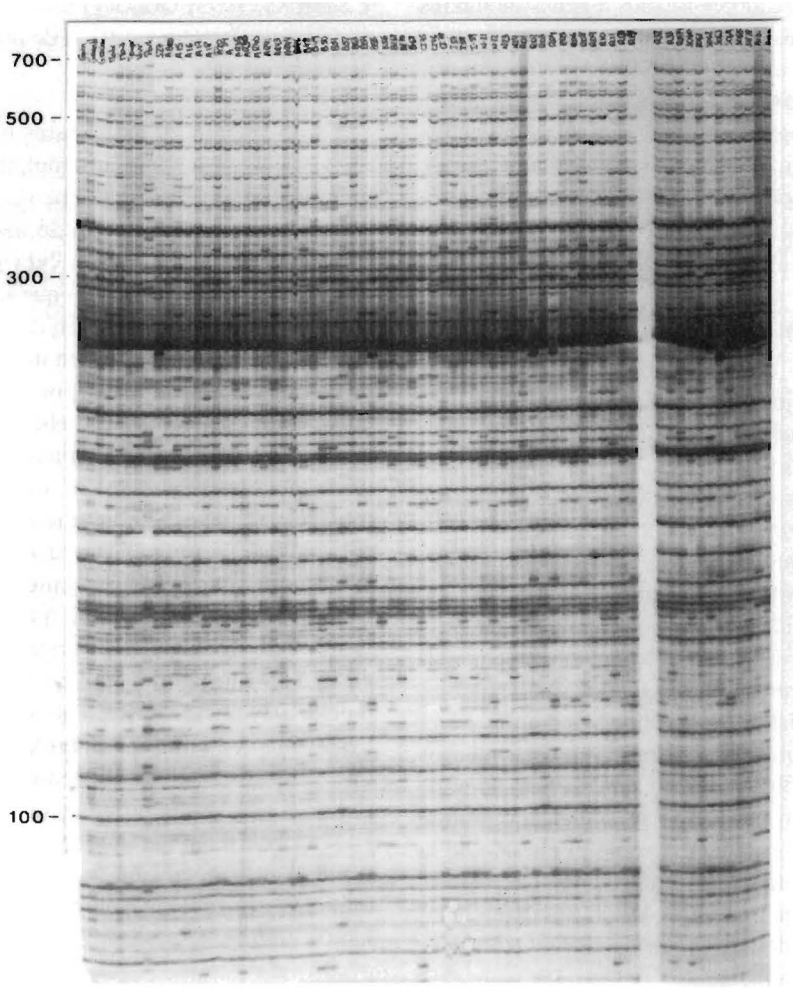


Figura 4. Detección de polimorfismos AFLP en vid. El ADN genómico de las 69 muestras se sometió a un tratamiento combinado con 2 enzimas de restricción (EcoRI y MseI), una ligación de fragmentos de ADN de secuencia conocida (adaptadores) y una amplificación en dos etapas utilizando cebadores basados en la secuencia de los adaptadores, más 1-3 nucleótidos selectivos. Los números situados a la izquierda indican tamaño molecular en pares de bases (cortesía de M. Cervera y J.M. Martínez)

Figura 4. Detection of grapevine AFLP polymorphisms. Genomic DNA of 69 accessions was subjected to a combined treatment with 2 restriction enzymes (EcoRI and MseI), ligation of short DNA fragments of known sequence (adapters), and a two step amplification using primers based on the adapters sequence plus a 1-3 nucleotides selective sequence. Numbers on the left side indicate molecular size in base pairs. (courtesy of M. T. Cervera and J.M. Martínez)

Los métodos de enriquecimiento diferencial de ADN (LISITSYN *et al.*, 1993; ROSENBERG *et al.*, 1994) desarrollados para el estudio de mutaciones en animales podrían ser utilizados en plantas. Estos se basan en técnicas de hibridación sustractiva que permiten la purificación o enriquecimiento de los fragmentos de ADN presentes en el genotipo mutante y no en el normal o viceversa. Una vez clonado el fragmento diferencial, puede utilizarse para construir una sonda o para definir un ensayo de PCR específico. Pancaldi *et al.* (Universidad de Bolonia, comunicación personal) están tratando de caracterizar mutantes somáticos de manzano mediante una de estas técnicas.

También es posible que las mutaciones somáticas no sean detectadas, porque no afecten o afecten mínimamente a la movilidad del ADN en un gel de agarosa. En este caso las llamadas *DNA screening techniques* (LESSA y APPLEBAUM, 1993), que permiten la separación de las moléculas de ADN no sólo en función de su tamaño sino también de su secuencia, pueden complementar eficazmente el análisis tradicional de *fingerprinting*. La más sencilla de estas técnicas sería el análisis heterodúplex de amplificaciones RAPDs (MCCLELLAND *et al.*, 1994). El descubrimiento de que la molécula heterodúplex formada a partir de productos de amplificación de naturaleza alélica podía detectarse como una banda nueva, fue realizado por Ayliffe y col. en 1994, cuando buscaban marcadores RAPDs ligados a genes de avirulencia en un hongo parásito de lino (AYLIFFE *et al.*, 1994). Las moléculas heterodúplex se pueden formar si se mezcla ADN molde (*template mixing*) de dos individuos con distinto alelo (individuo 'normal' e individuo mutante) antes de la PCR, o si se mezclan productos de amplificación alélicos obtenidos independientemente (*product mixing*) y se desnaturaliza y renaturaliza lentamente la mezcla (DAVIS *et al.*, 1995). Otra de estas técnicas, también muy fácilmente adaptable a un análisis de *fingerprinting* mediante PCR, se denomina SSCP (*single stranded conformation polymorphisms* (ORITA *et al.*, 1989)). La capacidad de distinguir fragmentos de ADN mutantes se basa en dos principios: i) la conformación molecular del ADN de cadena sencilla es dependiente de la secuencia de nucleótidos y es por tanto modificada por mutaciones puntuales, inserciones y deleciones; ii) cambios, incluso menores, en la conformación del ADN de cadena sencilla pueden afectar a su movilidad en geles nativos de poliacrilamida. La técnica SSCP permite distinguir fragmentos de ADN (<300 pb) que difieren en tan sólo la sustitución de un par de bases entre varios cientos de bases.

Mejora mediante cruzamientos

Mejora clásica

Los primeros trabajos sistemáticos de mejora de la vid mediante cruzamientos se realizaron en Francia a finales del siglo pasado para luchar contra la filoxera y enfermedades fúngicas procedentes de América. La estrategia consistió en cruzar *Vitis vinifera* con distintas especies de *Vitis* americanas resistentes a dichas enfermedades. En la mayoría de los casos los híbridos, si bien ganaban en resistencia, perdían en aptitud para vinificación ya que los caracteres no deseados eran difíciles de eliminar mediante retrocruzamientos por ser de tipo poligénico y los parentales 'élite' altamente heterocigotos. Este hecho junto con la solución que supuso la utilización de patrones resistentes llevó a que los programas de mejora se abandonaran al poco tiempo de

haber comenzado. La mejora de la vid mediante cruzamientos intraespecíficos ha tenido mayor éxito, pero en el caso de las variedades para vinificación su desarrollo se ha visto frenado por la controversia sobre la calidad y uso de las nuevas variedades. Tal polémica no se basa según ALLEWELDT y POSSINGHAM (1988) en criterios objetivos, sino que sería más bien un debate que enfrenta la visión progresista y tradicionalista de la viticultura.

La mejora de la vid supone normalmente el cruzamiento de unos parentales altamente heterocigotos y la selección sobre la población resultante (*pseudotestcross population*) que segrega: i) 1:2:1 o 3:1 para caracteres co-dominantes y dominantes, respectivamente, presentes en heterocigosis en ambos parentales y ii) 1:1 para caracteres presentes en heterocigosis en un parental y en el otro como homocigótico recesivo. Los individuos seleccionados se mantienen mediante reproducción vegetativa. El proceso requiere bastante tiempo, es laborioso y caro por varios motivos. Primero, la vid presenta un periodo juvenil de 2 a 5 años que impide la selección temprana de los caracteres sólo observables en plantas adultas. Esto retrasa y encarece el proceso de selección haciendo impracticable trabajar, como sería deseable, sobre grandes poblaciones segregantes. Segundo, muchos de los carateres de interés, tales como forma de la baya y del racimo (SPIEGEL-ROY, 1980), momento de la maduración (SPIEGEL-ROY, 1981), resistencias horizontales a plagas como la filoxera, o enfermedades como oidio y mildiu (LODHI, 1994), son poligénicos. Por último, para algunos de los caracteres la variación del fenotipo que es atribuible a efectos genéticos no es alta (baja heredabilidad), por lo que el proceso de selección es poco eficiente (RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 1988).

Etiquetado de genes

Si se dispone de marcadores moleculares ligados a genes de interés, el mejorador en lugar de seleccionar a través del fenotipo observable en campo lo haría en función del genotipo ('fenotipo molecular'). De esta forma, se puede acometer una selección temprana, se puede abordar con éxito la selección de caracteres poligénicos, y por último, se puede seleccionar incluso para caracteres de baja heredabilidad ya que la variación del fenotipo molecular es casi exclusivamente atribuible a efectos genéticos (RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 1988).

Para que el etiquetado de genes de interés sea efectivo, es necesario que el marcador molecular y el gen no disten más de 5cM (MOORE y DURHAM, 1992). En general, esto es difícil de conseguir mediante la utilización de isoenzimas o de RFLPs, en el primer caso por el reducido número de marcadores disponibles y en el segundo por el elevado coste. En este sentido la utilización de técnicas PCR basadas en la utilización de cebadores arbitrarios resulta muy ventajosa, ya que proporciona un número virtualmente ilimitado de marcadores a un coste bajo. Como ocurre en otras leñosas (HORMAZA, 1996), en vid no se han desarrollado líneas casi isogénicas, por lo que el marcaje molecular de genes mayores se debe realizar mediante la estrategia denominada *bulked segregant analysis* BSA (MICHELMORE *et al.*, 1991). Con este procedimiento se han encontrado marcadores RAPD ligados al carácter apireno (STRIEM *et al.*, 1994). La detección de poligenes o QTL (*quantitative trait loci*) debe realizarse, en cambio, mediante otros métodos como el de mapeo por intervalos de marcadores adyacentes (LANDER y BOTSTEIN, 1989) en un mapa de ligamiento. Hasta ahora no se cuenta con un mapa genético para *Vitis vinifera* y sólo se

dispone de un mapa para *Cayuga White* (un híbrido complejo de *Vitis vinifera, V. labrusca, V. rupestris y V. aestivalis*) y otro para *Aurore* (híbrido complejo de *V. vinifera, V. rupestris y V. aestivalis*) (LODHI *et al.*, 1995a). Estos mapas fueron construidos a partir del estudio de una población resultante del cruce de dichas variedades. Se tuvieron en cuenta marcadores isoenzimáticos, RAPD y RFLP. Su análisis permitió la localización de QTLs para 34 caracteres vegetativos, reproductivos y de resistencia a enfermedades. La rapidez de obtención y bajo coste de los marcadores RAPDs permite saturar rápidamente los mapas. Su principal inconveniente es que no siempre es posible utilizar los marcadores RAPDs en otras poblaciones distintas a aquellas en las que fueron detectados por primera vez (LODHI *et al.*, 1995b). Los marcadores AFLP son especialmente interesantes para la saturación de mapas genéticos. En este caso, el costo unitario del ensayo es muy bajo ya que se aprovecha completamente la capacidad de los AFLP para analizar muchos *loci* simultáneamente. Además, la reproducibilidad de estos marcadores es generalmente superior a la de los RAPDs, pero al igual que con estos, se deben construir nuevos mapas con cada nuevo cruzamiento.

Es de esperar que en un breve plazo se disponga de poblaciones obtenidas del cruce *V. vinifera x V. vinifera* segregantes para caracteres de interés en nuestra viticultura. En lo que a uva de mesa respecta se han dado ya los primeros pasos (CENIS, comunicación personal).

En países como España, Italia o Francia en los que las variedades para vinificación tradicionales tienen gran arraigo, no hay apenas demanda de nuevas variedades ni de vinos con características novedosas. En estos casos, no tiene sentido la mejora mediante cruzamientos. La introducción de genes de interés, como resistencia a enfermedades y otros, debería hacerse sin alterar por lo demás las características del material a mejorar. La transformación genética via *Agrobacterium* o mediante 'bombardeo' de genes puede también ser de gran interés en el futuro (LE GALL *et al.*, 1994; MARTINELLI y MANDOLINO, 1994; KRASTANOVA *et al.*, 1995). La existencia de marcadores moleculares muy estrechamente ligados a los genes de interés puede ser de gran utilidad para su clonaje y para el seguimiento de los genes a insertar (MICHELMORE, 1995).

Relaciones genéticas entre las variedades

Unidades taxonómicas de Negrul

Para la clasificación de las variedades de vid, LEVADOUX (1956) recomienda utilizar las unidades taxonómicas propuestas en 1938 por NEGRUL, según el cual, las variedades que con un mismo origen geográfico, comparten caracteres ampelográficos y agronómicos, forman un 'sortotipo' o 'familia de variedades'. Cada 'sortotipo' está compuesto a su vez de 'sortogrupos', concepto similar al de variedad pero ampliado a los clones aparecidos por mutación somática. Los componentes de un 'sortogrupo' se distinguen generalmente por un carácter o un pequeño número de caracteres como ocurre por ejemplo entre *Pinot Noir, Pinot Gris, Pinot Blanc* y *Pinot Meunier.* Lamentablemente, falta un trabajo de agrupación de las variedades españolas utilizando estas unidades taxonómicas.

Isoenzimas y RFLPs

Se ha tratado de encontrar una base genética para las agrupaciones de Negrul me-

diante la utilización de distintos marcadores moleculares. Al estudiar proteínas de reserva o isoenzimas mediante un análisis de presencia-ausencia, la agrupación obtenida frecuentemente no se correspondía con la esperada en función del origen geográfico y la morfología de las variedades (BENIN *et al.,* 1988; SCIENZA *et al.,* 1994). Según estos autores, la falta de correlación quizá se deba a que se han estudiado muy pocos marcadores (entre 30 y 50 bandas según los casos), y sobre un número demasiado reducido de variedades. Por el contrario, mediante el análisis presencia-ausencia de 111 bandas RFLP, BOURQUÍN *et al.* (1993) encontraron, en general, una buena correspondencia con las agrupaciones derivadas de estudios ampelográficos clásicos. Como ocurría para la identificación de variedades, esta metodología es adecuada pero resulta cara y laboriosa.

Marcadores moleculares basados en la PCR

Mediante marcadores RAPDs, se han investigado las relaciones en el interior del grupo de variedades tipo "Riesling y del sortogrupo Pinot", no encontrándose una relación molecular entre la mayoría de los elementos del primer grupo pero sí del segundo (TSCHAMMER y ZYPRIAN, 1994). Se han estudiado, asimismo, las relaciones genéticas entre 12 variedades de vid antiguas pertenecientes a dos zonas de cultivo bastante alejadas dentro de España, Madrid y Pontevedra (MORENO, 1996; VIDAL, 1996). La mayoría de las variedades de cada zona de cultivo quedaron agrupadas. También este tipo de marcadores ha sido utilizado para estudiar las relaciones entre *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* (lambruscas) y variedades cultivadas (GRANDO *et al.,* 1995). En este caso no se han encontrado diferencias significativas entre los materiales silvestre y cultivado, lo que iría en favor del origen 'postcultural' (antiguas variedades que se han asilvestrado) o subespontáneo (material procedente de semilla de variedades cultivadas) de las lambruscas. Los resultados obtenidos en estos trabajos no aclaran si los RAPDs pueden proporcionar una explicación genética a las agrupaciones de Negrul. Sin embargo, aunque en ocasiones exista discrepancia entre las relaciones establecidas mediante datos morfológicos y datos RAPDs, ello no implica una menor calidad de estos últimos. Estas discrepancias podrían ser debidas a que los marcadores RAPDs permiten la exploración de regiones no codificantes y con ello el examen de la genética que no ha sufrido interferencia de la presión de selección (HAYMER, 1994).

Recientemente SENSI *et al.* (1996) han utilizado la técnica AFLP para el estudio de relaciones genéticas entre distintas accesiones de *Sangiovese* y *Colorino,* dos antiguos cultivares de vid originarios de Italia. En general, se ha encontrado que las distintas accesiones de cada cultivar quedan agrupadas pero, en algunos, accesiones correspondientes a la misma variedad presentan un grado de similitud molecular inferior al que presentan accesiones pertenecientes a distintas variedades. Según los citados autores esto puede ser debido a que probablemente *Sangiovese* y *Colorino* sean variedades cuya diversidad intravarietal es de origen sexual, aunque no hay que descartar que alguno de los materiales estudiados no pertenezcan (a pesar de su nombre) a ninguna de las dos variedades.

Hasta el momento sólo han sido caracterizados 9 *loci* microsatélite (THOMAS y SCOTT, 1993; BOWERS *et al.,* 1996), un número demasiado bajo para obtener una estimación no sesgada de las relaciones genéticas entre variedades. En el futuro, a medida

que este número aumente y el análisis se extienda a nuevas variedades, la acumulación en una única base de datos de los resultados obtenidos por distintos laboratorios, permitirá obtener una visión general de las relaciones genéticas del germoplasma cultivado mundialmente (BOWERS, *et al.*, 1996).

Conclusiones y perspectivas futuras

Es de esperar que la mayor parte de las más de 5.000 variedades de vid que existen en el mundo pueda ser caracterizada con fines de identificación mediante cualquiera de los marcadores PCR mencionados. No obstante, es posible que la utilización de STMS de cebadores largos y específicos se acabe imponiendo por su buena adecuación para el establecimiento de bases de datos internacionales y por la gran ventaja que supone la automatización del análisis cuando se estudian miles de muestras.

La utilización de marcadores moleculares en el proceso de selección clonal de vid puede tener en el futuro gran importancia. Ahora se están dando los primeros pasos en la caracterización de la variabilidad intravarietal en la vid. Una parte de esta variabilidad, probablemente aquella originada a partir de cruzamientos naturales, puede ser detectada fácilmente como RAPDs o mediante AFLPs. En cambio la variabilidad asociada a mutaciones que afectan a pocos *loci* no es fácilmente accesible a un análisis de *fingerprinting*. En este caso, la utilización de las llamadas *DNA screening techniques* y de las técnicas de enriquecimiento diferencial de ADN deberán ser consideradas en estudios futuros.

Factores culturales, económicos y técnicos han propiciado la selección clonal como principal método de mejora de la vid. En el futuro, la simplificación y abaratamiento de los métodos de selección (clonal o en poblaciones segregantes), por un lado, mediante la utilización de marcadores moleculares. Por otro, la posibilidad de clonaje e introducción de genes de interés procedentes de otras especies además de las exigencias derivadas de una agricultura más respetuosa con el medio ambiente, probablemente, apuntarán nuevos caminos para la mejora de la vid. Para estos objetivos el 'etiquetado' de genes de interés sería el primer paso.

En general, las relaciones genéticas entre las variedades españolas y entre éstas y las cultivadas en otros países de tradición vitícola están todavía por determinar. Es un trabajo amplio y multidisciplinar en el que métodos PCR basados en la utilización de marcadores (RAPD, AFLP, etc.) pueden ser muy útiles para realizar una primera aproximación al problema. No obstante, en la medida en que nuevos *loci* microsatélite vayan siendo caracterizados, podrán ser utilizados para obtener una visión global de las relaciones entre las variedades de vid cultivadas en el mundo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a MT. Cervera y J M. Martínez (Dpto. Biología Molecular y Virología Vegetal, CIT-INIA) la revisión crítica y las valiosas sugerencias sobre el manuscrito, y a éstos y a J P. Martín (Dpto. Biología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos de Madrid) y EM. Sánchez (Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Murcia) el material gráfico cedido.

Durante la realización del trabajo SM ha disfrutado de una beca prodoctural de la Comunidad de Madrid.

Bibliografía

AHMEDULLAH, M. 1986. Pollen morphology of *Vitis cultivars us*ing scanning electron microscopy and the significante of pollen classification in grape improvement programme. 4th International Symposium on Grapevine Breeding, Vignevini.

ALTUBE H., CABELLO F. y ORTIZ J. 1991. Caracterización de variedades y portainjertos de vid mediante isoenzimas de los sarmientos. Vitis, 30, 203-212.

ALLEWELDT G. y POSSINGHAM J.V. 1988. Progress in grapevine breeding. Theor. Appl. Genet., 75, 669-673.

AYLIFFE M.A., LAWRENCE G.J., ELLIS J.G. y PRYOR A.J. 1994. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. Nucl. Res., 22, 1632-1636.

BACHMANN O. y BLAISCH R. 1988. Isoelectric focusing of grapevine peroxidases as a tool for ampelography. Vitis, 27, 147-155.

BEN SLIMANE M. y ASKRI F. 1990. La taille des grains de pollen comme moyen d'identification de souches de vignes tunisiennes. Bulletin de l'O.I.V., 717-718.

BENIN M., GASQUEZ J., MAHFOUDI A. y BESSIS R. 1988. Caractérisation biochimique des cépages de *Vitis vinifera* L. par électrophorèse d'isoenzymes foliaires: Essai de classification des variétés. Vitis, 27, 157-172.

BESSIS R., LENEUF N. y FOURNIOUX J.C. 1995. Bases de la tipicidad de los vinos. Investigación y Ciencia, febrero 95, 62-69.

BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M. y DAVIS R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Humman Genet. 32, 314-331.

BOTTA R., SCOTT N.S., EYNARD I. y THOMAS M.R. 1995. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. Vitis, 34, 99-102.

BOURQUIN J.C., SONKO A., OTTEN L. y WALTER B. 1993. Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. Theor. Appl. Genet., 87, 431-438.

BOWERS J.E., BANDMAN E.B. y MEREDITH C.P. 1993. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. Am. J. Enol. Viticult, 44, 266-274.

BOWERS J.E., DANGI G.S., VIGNANI R. y MEREDITH C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). Genome, 39, 628-6333.

BOWERS J.E. y MEREDITH C.P. 1994. Microsatellite length polymorphism within ancient wine grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). The Second International Conference on the Plant Genome, San Diego, California.

CABELLO F. 1992. Caracterización de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.).de interés comercial en la Comunidad de Madrid. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid.

CALÒ A., COSTACURTA A., CALÒ G. y PALUDETTI G. 1989. Suggestion of employment of isoenzimatic markers as cultivars discriminants in *Vitis vinifera*. Riv. Vit. Enol., 4, 3-8.

CIPRIANI G., FRAZZA G., PETERLUNGER E. y TESTOLIN R. 1994. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. Vitis, 33, 211-215.

COLLINS G.G. y SYMONS R.H. 1993. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. Plant Mol. Biol. Rep., 11, 105-112.

DAVIS T.M., YU H., HAIGIS K.M. y GOWAN MC. P.J. 1995. Template mixing: a method of enhacing detection and interpretation of codominant RAPD markers. Theor. Appl. Genet., 91, 582-588.

DETTWEILER E. 1991. Preliminar minimal descriptor list for grapevine varieties, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Germany.

DOAZAN J.P. 1988. Le renouvellement des cépages. Science & Vie,1 56, 22-33.

FANIZZA G., INTRIERI C. y IODICE F. 1986. Diversity analysis for seed fatty acid composition in *Vitis vinifera*. 4th International Symposium on Grapevine Breeding, Vignevini.

GALET P. 1964. Cépages et Vignobles de France. Le Paysan du Midi, Montpellier.

GALET P. 1967. Recherches sur la méthode d'identification et classification des Vitacées des zones temperés. Thèse de doctorat, Ecole National Superieur d'Agriculture de Montpellier

GOGORCENA Y., ARULSEKAR S., DANDEKAR A.M. y PARFITT D.E. Molecular markers for grape characterization. Vitis, 32, 183-185.

GOGORCENA Y. y PARFITT D.E. 1994. Evaluation of RAPD marker consistency for detection of poly-

morphism in apricot. Sci. Hortic. Amsterdam, 59, 163-167.

GRANDO M.S., DEMICHELI L., BIASETTO L. y SCIENZA A. 1995. RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. Vitis, 34, 37-39.

GRODZICKER T., WILLIAMS J., SHARP P. y SAMBROOK J. 1974. Physical mapping of temperate-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 439-446.

HAYMER D.S. 1994. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? Annals of the Entomological Society of America, 87, 717-722.

HIDALGO L. 1993. Tratado de viticultura general. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

HILL M., WITSENBOER H., ZABEAU M., VOS P., KESSELI R. y MICHELMORE R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* ssp. Theor. Appl. Genet., 93, 1202-1210.

HORMAZA J.I. 1996. Marcadores de ADN aplicados a la mejora de frutales I.T.E.A., 92V, 5-15.

IGLESIAS L. y ROJAS R. 1992. Utilización del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) en los programas de mejoramiento genético de plantas. Cultivos Tropicales, 13, 74-89

JEAN-JAQUES I., DEFONTAINE A. y HALLET J.N. 1993. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA markers. Vitis, 32, 189-190.

JEFFREYS A.J., WILSON V. y THEIN S.L. 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature, 316, 76-79.

KASZAB L. 1976. Histological characterization of some grapevine cultivars based on studies of the ventral side of one year old shoots. Derteszeti Egyetem Kozlemenyei, 39, 409-418.

KOLLER B., LEHMANN A., MCDERMOTT J.M. y GESSLER C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD. Theor. Appl. Genet., 85, 901-904.

KRASTANOVA S., PERRIN M., BARBIER P., DEMANGEAT G., CORNUET P., BARDONNET N., OTTEN L., PINCK L. y WALTER B. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of Grapevine Fanleaf Nepovirus. Plant Cell Reports, 14, 550-554.

LANDER E.S. y BOTSTEIN D. 1989. Maping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics, 121, 185-199.

LE GALL O., TORREGROSA L., DANGLOT Y., CANDRESSE T. y BOUQUET A. 1994. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). Plant Sci., 102, 161-170.

LESSA E.P. y APPLEBAUM G. 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. Mol. Ecol., 2, 119-129.

LEVADOUX L. 1956. Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. Ann. Amélior. Plantes, 1, 59-118.

LISITSYN N., LISITSYN N. y WIGLER M. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. Science, 259, 946-951.

LITT M. y LUTY J.A. 1989. A hypervariable microsatellite vealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Human Genet., 44, 397-401.

LODHI M.A. 1994. Genetic mapping and genome analysis of grape (*Vitis* sp.). Dissertation, Cornell University.

LODHI M.A., DALY M.J., YE G.N., WEEDEN N.F. y REISCH B.I. 1995a. A molecular marker based linkage map of *Vitis*. Genome, 38, 786-794.

LODHI M.A., MORENO S., WEEDEN N.F. y REISCH B. 1995b. Detection of quantitative trait *loci* controlling important traits and characterization of RAPD markers *in Vitis*. Plant Genome III. The International Conference on the Status of Plant Genome Research, San Diego, California.

LU J., KNOX M.R., AMBROSE M.J., BROWN J.K.M. y ELLIS T.H.N. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP-and PCR-based methods. Theor. Appl. Genet., 93, 1103-1111.

MARKERT C.L. y MOLLER F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 45, 753-763.

MARTINELLI L. y MANDOLINO G. 1994. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S). Theor. Appl. Genet., 88, 621-628.

MCCLELLAND M., ARENSDORF H., CHENG R. y WESH J. 1994. Arbitrarily primed PCR fingerprints resolved on SSCP. Nucl. Acids Res., 22, 1770-1771.

MICHELMORE R., 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistence genes. Annu. Rev. Phytopathol., 15, 393-427.

MICHELMORE R.W., PARAN I. y KESSELI R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis. A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 9828-9832.

MOORE G.A. y DURHAM R.E. 1992. Molecular markers. En: biotechnology of perennial fruit crops, pp. 105-139. F.A. hammerschlag y R.E. Litz (Ed.). CAB International.

MORENO S. 1996. Caracterización de Germoplasma de vid (*Vitis vinifera* L.) mediante marcadores moleculares. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid.

MORENO S., GOGORCENA Y. y ORTIZ J.M. 1995. The use of RAPD markers of identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera*) L.). Sci. Hortic. Amsterdam, 62, 237-243.

MUÑOZ ORGANERO G. 1995. Estudio comparativo de la fenología, maduración, y composición bioquímica del fruto en variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en la Comunidad de Madrid. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid.

NEGRUL A.M. 1938. Evolucija Kuljturnyx form vinograda. Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R., XVIII, 585-588.

O.I.V., 1984. Código de los caracteres descriptivos de las variedades y especies de *Vitis*. Dedon, A, París.

ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HAYASHI K. y SEKIYA T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 2766-2770.

RAVAZ L. 1902. Les vignes américaines. Coulet et fils, Montpellier.

RIEMENSCHNEIDER D.E., HASSIG B.E. y BINGHAM E.T. 1988. Integrating biotechnology into woody plant breeding programs. En: Genetic manipulation of woody plants, pp. 433-449. K.D. Hanover (Ed.). Plenum Press, N.Y.

RIVES M. 1961. Bases génétiques de la sélection clonale chez la vigne. Ann. Amelior. Plantes, 11, 337-348.

ROHDE W. 1995. Genome analysis of *Cocos nucifera* L. PCR amplification of spacer sequences separating a subset of copia-like EcoRI repetitive element J. Genet. Breed, 49, 179-186.

ROSENBERG M., PRZYBYLSKA M. y STRAUS D. 1994. "RFLP subtraction": A method for making libraries of polymorphic markers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 6113-6117.

ROYO B., GONZÁLEZ J., LAQUIDAIN M.J. y LARUMBE M.P. 1989. Caracterización mediante análisis isoenzimático de la vinífera "Garnacha" (*Vitis vinifera* L.). Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal, 4, 343-354.

ROYO J.B., CABELLO F., MIRANDA S., GOGORCENA Y., GONZÁLEZ J., MORENO S., ITOIZ R. y ORTIZ J.M. 1997. The use of isoenzymes in characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) influence of the environment and time of sampling. Sci. Hortic. Amsterdam, 69, 145-155.

SAIKI R.K., SCHARK S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A. y ARNHEIM N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230, 1350-1354.

SCIENZA A., VILLA P., TEDESCO G., PARINI L., ETTORI C., MAGENES S. y GIANAZZA E. 1994. A chemotaxonomic investigation on *Vitis vinifera* L. II Comparison among ssp. *sativa* traditional cultivars and wild biotypes of ssp. *silvestris* from various Italian regions. Vitis, 33, 217-224.

SCOTT N. y THOMAS M. 1994. DNA typing of grapevines. A universal technology for identification, cultivar description and evaluation of genetic relatedness, CSIRO.

SCHWENNESEN J., MIELKE E.A. y WOLFE W.H. 1982. Identification of seedless table grape cultivars and a bud sport with berry isozymes. HortScience, 17, 366-368.

SENSI E., VIGNANI R., ROHDE W. y BIRICOLTI S. 1996. Characterization of genetic biodiversity eiht *Vitis vinfera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. Vitis, 35, 183-188.

SPIEGEL-ROY P. 1980. Genetics and breeding of almond and grape. Genetic Agraria, 4, 275-293.

SPIEGEL-ROY P., ASSAF R. y BARON I. 1981. Inheritance of some characters in progenies in *Vitis vinifera* (Dabouki and Alphonse Lavallee). 3rd International Symposium on Grape Breeding.

STAVRAKAKIS M. y LOUKAS M. 1983. The between - and within-grape-cultivars genetic variation. Sci. Hortic. Amsterdam, 19, 321-334.

STRIEM M.J., BENHAYYIM G. y SPIEGEL-ROY P. 1994. Developing molecular genetic markers for grape breding, using polymerase chain reaction procedures. Vitis, 33, 53-54.

STRIEM M.J., SPIEGEL-ROY P., BEN-HAYYIM G., BECKMANN J. y GIDONI D. 1990. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multiloci probes. Vitis, 29, 223-227.

TANKSLEY S.D. 1983. Molecular markers in plant breeding. Plant Mol. Biol. Rep., 1, 3-8.

TANKSLEY S.D., YOUNG N.D., PATERSON A.H. y BONIERBALE M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Bio/Technology, 7, 257-264.

THOMAS M.R. y SCOTT N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theor. Appl. Genet., 86, 985-990.

TRUEL P. 1990. Rôle des collections ampélographiques dans la sélection de la vigne. Progrès Agricole et Viticole, 107, 255-257.

TSCHAMMER J. y ZYPRIAN E. 1994. Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. Vitis, 33, 249-250.

VIALA P. y VERMOREL V. 1901-1910. Ampélographie. Masson et Cie, Paris.

VIDAL J.R. 1996. Caracterización bioquímica de las variedades blancas de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en la denominación de origen 'Rías Baixas'. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.

VOS P., HOGERS R., BLEEKER M.,REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. y ZABEAU M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res., 23, 4407-4414.

WEISING K., NYBOM H., WOLFF K. y MEYER W. 1995. DNA. fingerprinting in plants and fungi. ed. Boca Ratón, Florida. CRC Press, Inc.

WEBER J.L. y MAY P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms wich can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Human Genet, 44, 388-396.

WELSH J. y MCCLELLAND M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res., 18. 7213-7218.

WILDE J., WAUGH R. y POWELL V. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randonly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet., 83, 871-877.

WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J. RAFALSKI J.A. y TINGEY S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as markers. Nucl. Acids Res., 18, 6531-6535.

WOLFE W.H. 1976. Identification of grape varieties by isozyme banding patterns. Am. J. Enol. Viticult., 27, 68-73.

WOLFF K., ZIETKIEWICZ E. y HOFSTRA H. 1995. Identification of Chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor. Appl. Genet., 91, 439-447.

YE G.N., HEMMAT M., LODHI M.A., WEEDEN N.F. y REISCH B.I. 1996. Long primers for RAPD mapping and fingerprinting of grape and pear. Biotechniques, 20, 368-371.

ZABEAU M. y VOS P. 1993. European Patent Application, publication number EP 0 534 858 A1.

ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A. y LABUDA D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20, 176-183.

(Aceptado para publicación el 17 de julio de 1997)