



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Titulación
Grado en Enología

***El mapa genético de la vid:
Revisión bibliográfica***

Alumno: Iván Gómez García

Tutora: Elena Hidalgo Rodríguez

Abril de 2019

INDICE	Pág.
1. RESUMEN _____	3
2. INTRODUCCIÓN _____	4
2.1. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LA VID _____	4
2.2. MAPAS GENÉTICOS _____	5
2.3. USOS DE LOS MAPAS GENÉTICOS _____	6
2.4. JUSTIFICACIÓN _____	7
3. OBJETIVOS _____	8
4. METODOLOGÍA _____	9
4.1. MÉTODOS DE BÚSQUEDA Y RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN _____	9
4.2. ELABORACIÓN DEL TRABAJO _____	11
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	12
5.1. EI PRIMER MAPA DE VID _____	12
5.2. LOS MAPAS GENÉTICOS BASADOS EN LOS NUEVOS MARCADORES MOLECULARES _____	17
5.3. LOS MAPAS GENÉTICOS ACTUALES BASADOS EN LA SECUENCIACIÓN _____	22
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO _____	24
7. BIBLIOGRAFÍA _____	25

1. RESUMEN

A pesar de que a la vid (*Vitis vinífera* L.) se la considere como uno de los cultivos frutales más extensos y más rentables económicamente a nivel mundial (OIV, estadísticas 2017), se tiene muy poco conocimiento a nivel genético sobre esta planta y se ha avanzado muy poco en la mejora genética de sus características y peculiaridades más representativas, en relación con sus capacidades adaptativas a las diversas condiciones ambientales del medio, a sus parámetros de producción o incluso a las cualidades para la elaboración del vino.

La posibilidad de poder contar con mapas genéticos saturados resulta vital, tanto para conocer mejor los genes implicados en las características de mayor relevancia, como para poder identificar su localización dentro de los cromosomas y aún más importante, aumentar las posibilidades de llevar a cabo una mejora genética de esas características, ya sea mediante la vía tradicional del cruzamiento y la selección de descendientes, o bien con estrategias de mejora basadas en la ingeniería genética o en la edición de genes (CRISPR-CAS).

Los primeros mapas genéticos de vid se elaboraron a partir del desarrollo de marcadores moleculares y se fueron completando añadiendo nuevos daos, a medida que iban avanzando las tecnologías genéticas y aparecían nuevos marcadores moleculares eficaces y a medida que las necesidades de los mapas genéticos evolucionaban. La versión más actual y completa del mapa genético de la vid, fue desarrollada por A. Canaguiera en colaboración con otros investigadores en 2017, con un nivel de cobertura muy alto y una profundidad de 12X del genoma de referencia.

En este trabajo, se revisan los mapas genéticos de la vid a lo largo de la historia, poniendo en perspectiva las necesidades que cubren y su utilización en el conocimiento y mejora genética de la vid.

ABSTRACT

Although the vine (*Vitis vinifera* L.) is considered one of the most extensive and economically profitable fruit crops worldwide (OIV, statistics 2017), there is very little genetic knowledge about this plant and very little progress has been made in the breeding of its most representative characteristics and peculiarities, in relation to its adaptive capacities to the different environmental conditions of the environment, to its production parameters or even to the qualities for winemaking.

The possibility of having genetic maps saturated is vital, both to know better the genes that are involved in the most relevant characteristics, as well as to be able to identify their location within the chromosomes and even more important, to increase the possibilities of carrying out breeding programmes of these characteristics, either by carrying out the traditional way of crossing and selecting descendants, or with improvement strategies based on genetic engineering or edition through (CRISPR-CAS).

The first genetic maps of grapevine were elaborated from the development of molecular markers and they were completed and reconstructed with new informations, as the genetic technologies were advancing and as the needs of the genetic maps evolved. The last and more complete version of the genetic map of the vine was

carried out by A. Canaguiera in collaboration with other researchers in 2017, with a very high level of coverage and a depth of 12X of the reference genome.

In this work, the genetic maps of the vine are reviewed throughout history, putting in perspective the needs that they cover and the uses of genetic maps in the knowledge and breeding of the vine.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LA VID

Desde el punto de vista genético, la vid (*Vitis vinifera L.*) ($2n = 38$) es una planta diploide con un genoma pequeño de entre 475 y 500 Mb lo que hace que sea una especie de fácil estudio a nivel molecular (Martínez Cutillas, A., 2009). Sin embargo, el conocimiento genético de esta especie ha estado muy limitado hasta la aplicación masiva de los estudios moleculares. Esto se debió en gran medida a que sus características genéticas, como la gran heterocigosis o la larga juvenilidad entre otras, no permitían el abordaje del estudio de la vid a nivel genético por los métodos clásicos de cruzamiento y seguimiento de la descendencia.

El primer mapa genético de la vid data de la primera mitad de los 90 (Lodhi *et al.*, 1995). Este primer mapa se desarrolló en un momento en el que se contaba con muy pocos marcadores moleculares, por lo que el mapa resultante estaba poco saturado y por tanto no era muy representativo como referencia para la vid. Con el tiempo fueron desarrollándose nuevos marcadores moleculares que abarcaban más superficie del genoma y hacían posible conocer mejor los genes implicados en las características de mayor importancia y la localización de un mayor número de características dentro de los cromosomas. A principio de los años 2000 se generalizó el uso de la secuenciación, lo que hizo posible el conocimiento completo del genoma, y en consecuencia, se establecieron mapas de referencia para todo tipo de organismos, incluida la vid (Doligez *et al.*, 2006). Este tipo de mapas han sido progresivamente actualizados y completados con el fin de dar respuesta a las numerosas y novedosas aplicaciones de los mismos (Canaguier *et al.*, 2017).

La evolución en el conocimiento de la genética de la vid y los avances en la lectura del genoma de ésta, se han ido sucediendo con la llegada del nuevo siglo, haciendo posible multitud de aplicaciones nuevas destinadas a la mejora del conocimiento genético de la vid, como es el caso de la adquisición de nuevas características asociadas a caracteres de resistencia frente a plagas y enfermedades o la adaptación al cambio climático entre otras (Ibáñez *et al.*, 2013).

En último lugar, también se han asentado las bases que permitan identificar los genes y las variantes genéticas responsables de los distintos caracteres de interés en esta especie (Ibáñez *et al.*, 2013).

Además de las posibilidades que la mejora genética ha ofrecido gracias al mayor conocimiento de su genoma, disponer de nueva información sobre la vid ha dado lugar a infinidad de posibilidades para identificar variedades o clones ya que algunos marcadores moleculares pueden ayudar a la identificación de estas variedades y poder reconstruir la genética de sus vides predecesoras o para poder estudiar las relaciones de parentesco que pueden existir entre variedades, lo que permite la caracterización y recuperación de variedades que se encontraban en peligro de desaparecer y las cuales pueden llegar a suponer una solución a alguna de las

necesidades de mejora de los cultivos, como puede ser el caso de mejorar el equilibrio productivo de las variedades o una mayor tolerancia a determinados factores ambientales (Ibáñez *et al.*, 2013).

2.2. MAPAS GENÉTICOS

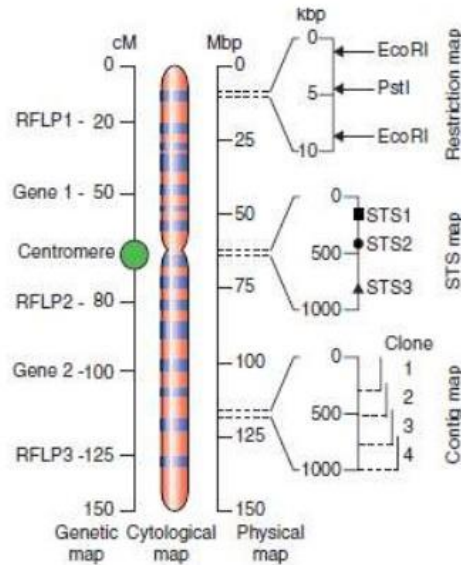
Según el NIH (National Human Genome Research Institute), un mapa genético es un mapa cromosómico que muestra la ubicación relativa de los genes y otras características genéticas importantes (Hurle B., 2019). Los mapas se van a generar a partir de dos características las cuales se quiere comprobar si se heredan de forma conjunta o no. Cuanta más distancia exista entre las localizaciones de los genes correspondientes, existirá mayor posibilidad de sobrecruzamientos y por tanto esas características se separen. En cambio, cuanto más cerca estén con más frecuencia se van a heredar de forma conjunta.

Para explicarlo de manera más detenida, para construir los mapas, se deben definir los rasgos genéticos que se quieran situar en el mapa; a continuación, se hacen cruzamientos entre dos progenitores que contengan distintas versiones de esos dos rasgos. Para poder determinar estos dos rasgos genéticos se utiliza para ello los descendientes de dicho organismo de estudio y se lleva a cabo el seguimiento de las veces que los dos rasgos genéticos se heredan de forma conjunta. Cuanto mayor sea el porcentaje de ambas características genéticas de los descendientes al mismo tiempo, más cerca van a estar los genes responsables de dichas características en el cromosoma (Hurle B., 2019).

Hasta la década de los 80 el tipo de genes que se podían mapear (localizar en los mapas genéticos) era muy bajo, lo que daba lugar a mapas muy poco saturados, de utilidad bastante baja, porque una gran parte de los genomas no estaban mapeados. Sin embargo, a partir del desarrollo de la PCR (1989) y de los marcadores moleculares derivados de ella (SSR, RAPDs, AFLPs, SNPs...etc), se obtuvieron mapas mucho más saturados para muchas especies y se obtuvo información genética de una gran parte del genoma de especies poco conocidas desde el punto de vista genético. Con estos marcadores moleculares se consigue poner muchos puntos dentro del genoma, de forma que cualquier característica genética va a estar cerca de cualquier marcador. Por último, a partir de los primeros años del siglo XXI y a raíz del proyecto del genoma humano (PGH) se desarrollan técnicas de secuenciación masiva baratas y accesibles, lo que supone una nueva era en el conocimiento genético de las especies, incluido el desarrollo de mapas genéticos de nueva generación, mucho más completos y precisos.

Existen diversos tipos de mapas genéticos que aportan información genética a distintos niveles. Son capaces de aportar gran cantidad de información genética sobre los individuos de interés de estudio. Entre los distintos mapas que se pueden realizar, los más comunes son los mapas físicos, los mapas cromosómicos y los mapas de ligamiento, pero son estos últimos los de mayor importancia ya que son los que ofrecen la mayor cantidad de información y de manera más eficaz (Secal, 2019).

En la figura 1 se observa una representación del mapa genético de un cromosoma (a la izquierda) junto con su representación física (a la derecha de la figura). En él, se ve representado el cromosoma en estudio junto con la localización concreta de los genes responsables de las características de interés (gen 1 y gen 2) y el mapa físico (a la derecha del cromosoma) en el que se indican los distintos marcadores moleculares que se han utilizado (sitios de restricción, STS y mapa de *contigs*).



4

Figura 1. Representación gráfica de un cromosoma en el que se encuentran representados su mapa genético y su mapa físico. (Fuente: *Gene Mapping Tools*. SlideShare. <https://es.slideshare.net/UsmanArshad53/gene-mapping-tools>).

Para concluir con este epígrafe, como ya mencioné anteriormente, la importancia que tienen estos marcadores en la construcción de los mapas es muy grande, ya que durante el proceso de recombinación genética en la célula, si un gen concreto se sitúa cerca de un marcador de ADN, es muy probable que tanto el gen como el marcador se encuentren juntos durante este proceso, y por ello es casi seguro que se hereden conjuntamente en la descendencia. Por tanto, cuanto más amplia sea la cantidad de marcadores de ADN que haya en un mapa genético, mayor va a ser la posibilidad de que al menos uno de los marcadores se encuentre localizado cerca de un gen responsable de la característica que presenta el individuo que se está estudiando, por lo que más fácil será la identificación de dicho gen (Mapeo genético, 2019).

2.3. USOS DE LOS MAPAS GENÉTICOS

Son muchas las posibilidades que ofrecen los mapas genéticos, como la posibilidad de cubrir completamente el genoma de un individuo para su estudio, la localización de las regiones genéticas que controlan los caracteres de importancia y localizar a su vez los genes de interés en la planta de estudio, para obtener información de una especie mediante el estudio de otras y para poder cuantificar el efecto de cada una de estas regiones, además de esto también ofrece la posibilidad de descomponer caracteres complejos en sus componentes mendelianos, hasta direccionar esta información y poder aplicarla en selección asistida. (Zavala Martínez, K. C., 2002).

La principal utilidad que tienen los mapas genéticos es desarrollar estrategias más eficaces y con un coste menor para llevar a cabo la identificación de genes nuevos y poder entender su función.

Estos mapas genéticos nos van a servir como un medio para localizar un carácter de cualquier tipo, de un individuo a su descendencia, ligado a uno o más genes y aportar además información sobre el cromosoma que contiene el gen y la localización del

mismo en el interior del cromosoma (Mapeo genético, 2019) y permiten además la identificación de las regiones cromosómicas implicadas en el control genético de los caracteres de interés.

Otra de las utilidades más importantes que ofrecen los mapas genéticos es la posibilidad de visualizar las regiones cromosómicas en las que pueden localizarse los genes que son los responsables de una determinada característica, incluso de las características cuantitativas (QTL o *Quantitative trait loci*) ya que cuando las características genéticas no dependen de un gen sino de varios genes, estos genes suelen estar agrupados.

Los QTLs son regiones de ADN delimitadas por marcadores moleculares que están ligados estrechamente a los genes que afectan al rasgo cuantitativo en cuestión. Cada QTL es una región de ADN asociada estadísticamente con la aparición de un rasgo fenotípico. El conocimiento de los QTLs permite mapear rasgos cuantitativos. Esto supuso un punto de partida para acotar el estudio de identificación y secuenciación de estos genes, es una ventaja a la hora de buscar un gen candidato. Esta estrategia es más eficaz cuanto más saturados estén los mapas de partida (Cervera et al., 2001).

2.4. JUSTIFICACIÓN

Según la OIV (Oficina Internacional de la Viña y el vino), la vid es uno de los cultivos leñosos con mayor extensión del planeta con unas 7,6 millones de ha en todo el mundo (OIV, 2017), y por ello, se puede considerar también según un artículo publicado por el director del IMIGRA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrícola) Adrián Martínez Cutillas, que es uno de los cultivos económicamente más importantes y rentables del mundo (Martínez Cutillas, A., 2009) (ver gráfico de la fig.2). Además de ser la especie frutal más extensa del planeta, se la considera la especie frutal cultivada más importante del mundo (Tinlot y Rousseau, 1993; Lodhi *et al.*, 1995).

Esta especie frutal se ha ido expandiendo a más países y se ha llegado a considerar en algunos como uno de los productos de referencia y su consumo en forma de vino se encuentra en constante crecimiento tanto en volumen como en valor económico suponiendo una fuente de ingresos de gran importancia para el país productor (OIV Statistical report on World Vitiviniculture, 2017). Esta expansión ha hecho necesario un mayor conocimiento genético de la vid ya que su estudio aporta resultados relevantes para la mejora de las variedades de vid tanto a nivel de vinificación como a nivel agronómico.

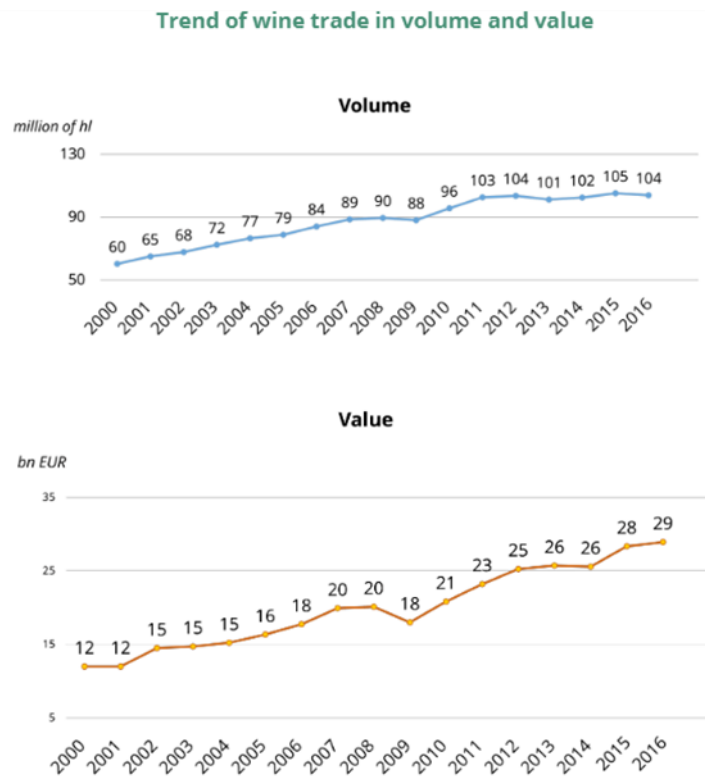


Figura 2. Evolución del comercio del vino entre los años 2000 y 2016 en relación al volumen producido a nivel mundial (en millones de hectolitros) y su valor económico (en billones de euros) (Fuente: OIV *Statistical report on World Vitiviniculture*, 2017).

Además de los motivos que acabo de mencionar, existen otros que hacen necesario el conocimiento más completo de la genética de la vid. Estos son las posibilidades que el genoma ofrece a la hora de llevar a cabo la selección e identificación de variedades y también debido a la constante evolución de los gustos del consumidor que ha hecho imprescindible el conocimiento en mayor profundidad de la genética de la vid.

Para todos estos motivos la técnica del mapeo genético puede ser una de las soluciones que resuelvan este desconocimiento genético que posibilite la mejora genética de la vid. Y con los mapas genéticos se espera que sean el marco donde poder localizar los genes y poder extrapolar la información genética que se desprende de ellos a partir del conocimiento genético de otras especies.

En resumen, la genética de la vid ha sido tradicionalmente muy difícil de abordar debido a sus características genéticas citadas en la introducción. Además de esto, se conocía muy poco de las bases genéticas de casi todos sus caracteres, hasta la llegada de los marcadores moleculares que han permitido hacer mapas muy eficaces y a través de la secuenciación se han conseguido mapas muy completos. En este contexto disponer de mapas genéticos completos y saturados es muy útil y como hasta el momento no ha existido ninguna revisión ni ha habido novedades, me parece muy interesante realizar una revisión bibliográfica sobre este tema.

3. OBJETIVOS

Los objetivos que pretendo conseguir con el presente trabajos son los siguientes:

1.- Como objetivo principal, pretendo revisar el estado actual y la historia de los mapas genéticos de vid, así como sus posibles aplicaciones en genética y mejora de la vid, ya

que son una de las principales fuentes de información fiable de las que se puede disponer a la hora de manejar las características que presenta esta especie.

2.- Como objetivos parciales puedo considerar los siguientes:

- Definir los mapas genéticos y revisar la tecnología en la que se apoya su construcción
- Revisar los sucesivos mapas genéticos que se han construido para la vid, incidiendo sobre los distintos tipos de marcadores moleculares utilizados en cada caso
- Comprender el funcionamiento que tienen los marcadores moleculares a la hora de elaborar los mapas genéticos
- Revisar las posibles aplicaciones pasadas, presentes y futuras de los mapas genéticos en vid

4. METODOLOGÍA

4.1. METODOS DE BUSQUEDA Y RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN

Para llevar a cabo este trabajo de revisión he utilizado diferentes métodos de búsqueda, utilizando como buscadores de webs aquellos de interés académico, para encontrar los artículos de información las webs *Science Direct*, *ResearchGate* o *Dialnet* entre otros y he realizado una selección de los artículos científicos según el impacto de estos, según la trayectoria del autor o autores de los artículos o revisiones. Aunque para otro tipo de revisión, la antigüedad de la bibliografía suele ser un criterio de selección, en este caso no se dispone de mucha información sobre este tema en concreto y toda ella es relativamente reciente.

También he utilizado como método de búsqueda para recopilar información, el buscador Google Académico, introduciendo las palabras clave “*Vitis*” “*Genetic*” “*Map*”. En la fig. 3 se puede observar un ejemplo de la búsqueda realizada.

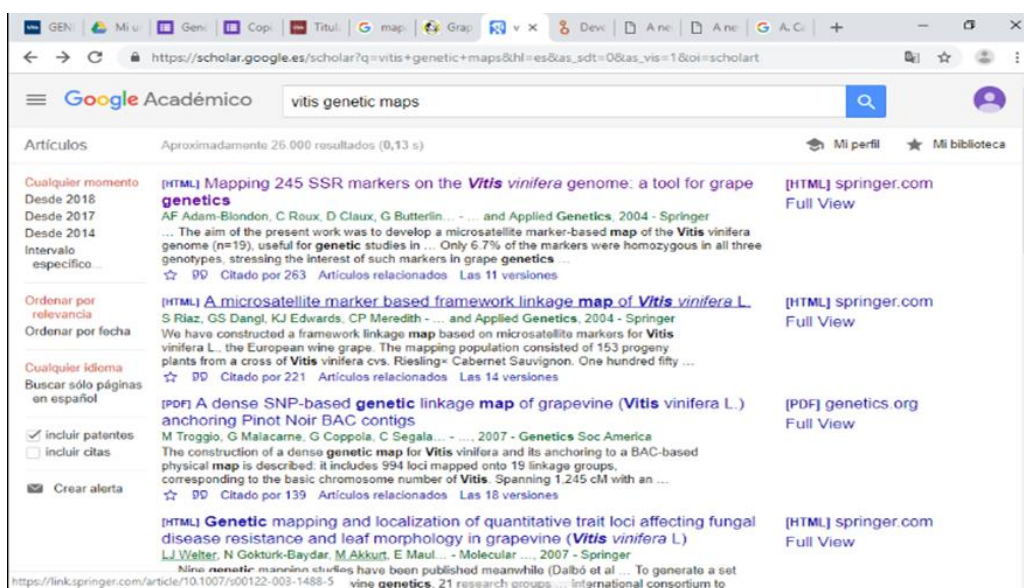


Figura 3. Metodología de búsqueda de información (Fuente: Google Académico).

Al realizar las primeras búsquedas de información en las webs citadas he podido comprobar que en los resultados de búsqueda no aparece ninguna revisión bibliográfica acerca del tema sobre el que trata este trabajo.

Tras llevar a cabo la búsqueda, se puede apreciar que el número de resultados para estas palabras no es muy elevado, siendo del orden de 26.800 resultados, en comparación con el número de resultados que se pueden obtener con otro tipo de temas relacionados con la vid como podría ser por ejemplo la genética de las variedades de vid, introduciendo en el buscador de Google Académico las palabras clave “*Vitis*” “*Varieties*” y “*Genetic*” (como se puede observar en la fig. 4) en la que se obtiene un número de resultados mucho mayor, del orden de 45.400.

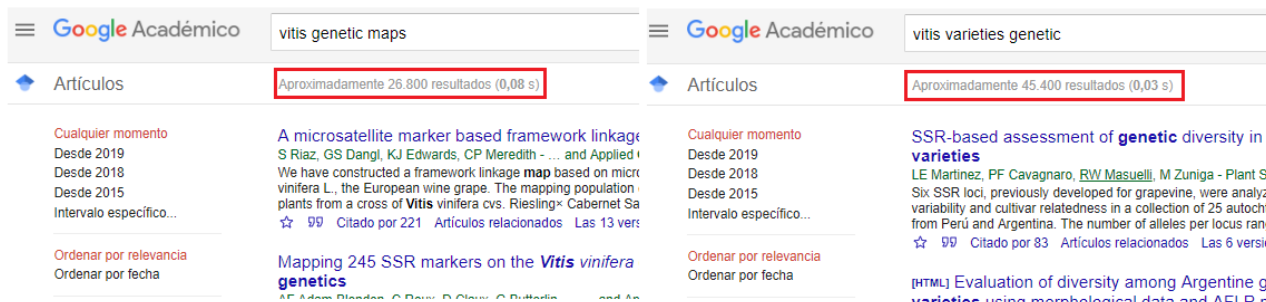


Figura 4. Comparativa del nº de resultados obtenidos entre dos búsquedas de información sobre temas distintos dentro de la genética de la vid utilizando el buscador Google Académico (Fuente: Google Académico).

Para seleccionar los artículos he considerado como más importantes, además de los criterios mencionados anteriormente, aquellos que traten el tema de forma general sobre los mapas genéticos y en concreto los que hablen sobre la vid o alguna de sus variedades.

Después de seleccionar los artículos que he considerado más importantes, también he leído algunas de las referencias de los términos relacionados que aparecían al final de la búsqueda (como se aprecia en la fig. 5), lo que me ha permitido encontrar algunos artículos y tesis bastante interesantes para poder cumplimentar el trabajo.

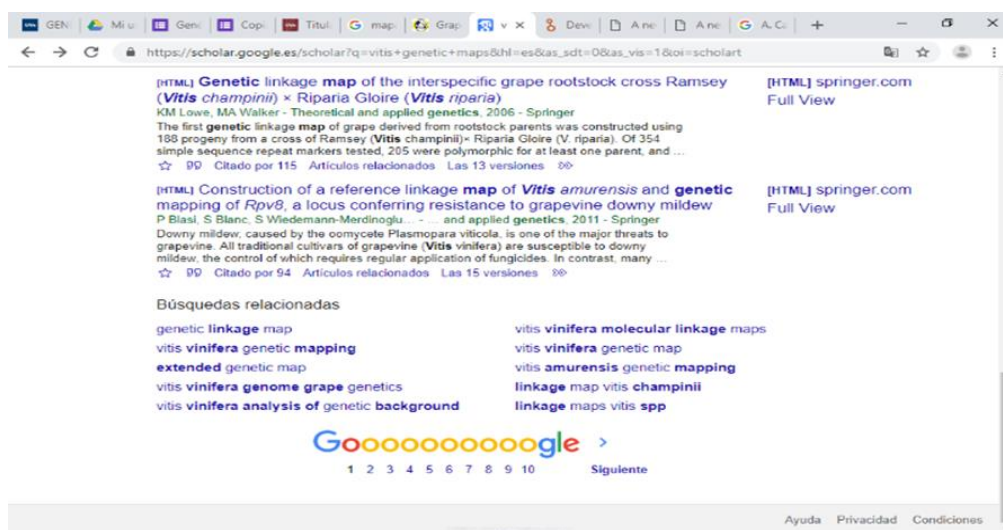


Figura 5. Relación de términos sugeridos por google como forma de búsqueda (Fuente: Google Académico).

Entre las fuentes que he utilizado para obtener información se encuentran las revistas científicas que se centran en la viticultura y enología. Una de las revistas clave de la que mayor información he podido extraer es la revista ACEnología (Asociación Catalana de Enólogos) de carácter científico y profesional sobre enología.

Dentro de la biblioteca de artículos de esta revista utilizando las mismas palabras clave que anteriormente (“*Vitis*”, “*Genética*” y “*Mapas*”) he seleccionado los artículos que más me han interesado.

Una vez que había encontrado una información que he utilizado como base, a medida que he ido elaborando el trabajo, he ido realizando búsquedas paralelas sobre temas más concretos sobre algunos de los apartados del trabajo para obtener información más concreta y precisa. Igualmente, he utilizado la colección de artículos de genética de la vid y algunos libros de la biblioteca de la ETSIIAA sobre Mejora Vegetal.

Como último método de búsqueda utilizado para cumplimentar la información he llevado a cabo la búsqueda de alguno de los artículos concretos que se han citado dentro de los artículos o tesis que he usado y he buscado en la bibliografía de estos artículos y tesis.

4.2. ELABORACION DEL TRABAJO

A la hora de realizar el trabajo, he tomado como base dos artículos clave que tratan concretamente sobre los mapas genéticos de vid. Estos artículos son, el artículo a cerca del primer mapas genético de *Vitis* creado por Lodhi titulado “*A molecular marker based linkage map of Vitis*” y el otro de los artículos “*Development of a new version of the grapevine reference genome assembly (12X.v2) based on genetic maps and paired-end sequences*”, el cual trata sobre uno de los últimos mapas genéticos de vid que se han elaborado.

Por otro lado, he de destacar que aunque las tesis doctorales no se consideren publicaciones y no se suelen recoger en los índices de impacto internacionales, en este caso son una importante fuente de información debido a la gran cantidad de datos y explicaciones que contienen y que se puede extraer de ellas. Además han sido importantes en este trabajo puesto que ha sido donde mayor cantidad de información referente a este tema he podido encontrar siendo el tema del que trata este trabajo bastante concreto dentro de la genética y no es de actualidad. Además estas tesis doctorales que he encontrado me parecen interesantes ya que algunas de ellas se encuentran avaladas y revisadas por científicos de prestigio reconocido en el mundo de la ciencia y genética vegetal, como es el caso del Dr. Javier Ibáñez Marcos (Jefe de Sección de Conservación y Restauración Ambiental del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA)) o como el Dr. Fernando Martínez de Toda Fernández (Catedrático de Producción Vegetal del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja).

Son varias tesis las que he revisado y de las que he extraído información relevante para el trabajo. De entre las tesis utilizadas, son dos las que he considerado más relevantes. La primera de ellas es la tesis doctoral llevada a cabo por el Doctor Iván Carreño Ruiz en 2012 que lleva el título de “Identificación de regiones cromosómicas implicadas en el control genético de caracteres de interés para la mejora genética de uvas de mesa”. La otra tesis que he utilizado como base para el trabajo fue escrita por Kattina Cecilia Zavala Martínez como proyecto para poder obtener el título de grado en Bioquímica en el año 2002 y lleva el título de “Desarrollo de un mapa de ligamiento genético en *Vitis Vinífera* L., basado en marcadores moleculares SSR y AFLP”.

Los demás artículos que he utilizado para complementar el trabajo aparecen en la bibliografía de este Trabajo Fin de Grado.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. EL PRIMER MAPA DE VID

En este epígrafe describiré el primer mapa genético de vid que se construyó en 1994 por parte de Lodhi y otros autores y que fue publicado en 1995 con el título “*A molecular marker based linkage map of Vitis*” en el que se describe el primer mapa genético de vid (Lodhi *et al.*, 1995). De forma que la mayor parte de este apartado se basa en este artículo de 1995 elaborado por M.A. Lodhi.

Los investigadores M.A. Lodhi, G-N. Ye, N.F. Weeden y B.I. Reisch pertenecientes al departamento de ciencias hortícolas desarrollaron este proyecto en la Estación Experimental de la Universidad de Cornell en Geneva (Estado de Nueva York) en colaboración con M. J. Daly perteneciente al Instituto Whitehead para la Investigación Biomédica (Cambridge, Estado de Massachusetts). El artículo científico resultante fue publicado por la revista de divulgación científica “*Genome*” en septiembre de 1995.

Los motivos que llevaron a la elaboración de este primer mapa genético fueron derivados de la necesidad de hacer la mejora genética en la vid de forma más eficaz, para lo cual era necesario disponer de mapas genéticos de esta especie. En vid, la mejora requiere de mucha mano de obra, lo cual supone un alto coste económico y pocos resultados, debido a la falta de líneas puras, que había dificultado la realización de pruebas genéticas. Por tanto, se consideró necesario llevar a cabo una serie de estrategias de selección asistida por medio de mapas de ligamiento molecular mediante la utilización de marcadores (O’Brien, 1993; Lodhi *et al.*, 1995).

El material vegetal del que partieron para realizar este proyecto fue una familia que procedían del cruce entre híbridos interespecíficos de *Vitis vinífera*, que fue mapeada mediante el uso de marcadores RFLP, RAPD y con isoenzimas. La construcción de estos mapas se llevó a cabo a partir de una población de 60 plantas resultado del cruzamiento entre las variedades de vid Cayuga White y Aurore. Estos mapas fueron construidos utilizando 422 marcadores RAPD junto con 16 marcadores RFLP e isoenzimas. El cruzamiento de estas dos variedades fue llevado a cabo por Bruce I. Reisch y fue elegido este cruce porque la progenie resultante presentaba mayor resistencia a enfermedades y otros rasgos importantes.

Las isoenzimas fueron la primera familia de moléculas en ser utilizadas como marcadores moleculares. En un inicio fueron definidas como formas moleculares múltiples de las enzimas que ofrecen múltiples posibilidades ofreciendo funciones idénticas o muy similares las cuales se encuentran presentes en el mismo individuo (Market y Moeller, 1959). Estas isoenzimas tienen la capacidad de presentar diversas formas alélicas en un *locus* en concreto, lo que se conoce como aloenzimas. Estas aloenzimas son selectivamente neutras y son empleadas como marcadores hereditarios para poder cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos lo que ayuda a comprender la composición genética de una población (Pérez Nasser y Piñero, 1997).

El empleo de isoenzimas comenzó siendo una técnica usada para investigar problemas de sistemática, evolución o para medir los niveles de variación genética en vid a finales de los 80 (Royo *et al.*, 1989) y comenzaron a utilizarse en vides para

llevar a cabo la identificación de ligamientos genéticos (Weeden et al., 1988). Posteriormente su uso se ha visto limitado debido al reducido número de *loci* que pueden estudiarse (Zavala Martínez, K. C., 2002) y se vio restringido a relaciones de parentesco (Parfitt y Arulsekhar, 1989; Ohmi et al., 1993; Zavala Martínez, K. C., 2002) y al análisis de diversidad genética de portainjertos, ya que presentan un grado de divergencia genética mayor, identificándose varios alelos en cada *loci* (Walker y Liu, 1995; Zavala Martínez, K. C., 2002).

El uso de isoenzimas en vid se ha visto reducido con el paso del tiempo a la identificación de relaciones de parentesco y reducidas también al análisis de diversidad genética que presentan los portainjertos como acabo de mencionar anteriormente. Por motivos como estos se ha preferido trabajar con otros marcadores moleculares ya que presentan ventajas frente a las isoenzimas como es la superación de los efectos en las interacciones genéticas con el ambiente y la posibilidad de acumular una mayor cantidad de información haciendo posible abarcar un mayor número de *loci*, entre otras ventajas, a la hora de realizar el análisis directo del genoma de la planta. (Zavala Martínez, K. C., 2002).

Para llevar a cabo la identificación de las isoenzimas se utiliza la técnica de separación de moléculas cargadas conocida como electroforesis. Las diferencias en la movilidad electroforética de las isoenzimas son el resultado de las diferencias en la parte proteica de los enzimas, que en último lugar, son debidas a las diferencias en las secuencias del ADN que codifican estas enzimas.

Las principales ventajas que presentan las isoenzimas es que es una técnica muy barata, accesible y no destructiva ya que se utiliza para su análisis pequeñas cantidades de material. También el control genético de la gran mayoría de isoenzimas es conocido haciendo posible el llevar a cabo deducciones genéticas a partir de los patrones de bandas observados en los geles.

Desde su descubrimiento las isoenzimas tuvieron un papel importante como marcadores. Con el paso del tiempo su uso se fue restringiendo y limitando mucho ya que presentaban ciertas desventajas. Estas desventajas son, la imposibilidad de cubrir todo el genoma (solamente son capaces de detectar la variación de los genes que codifican para la expresión de una característica del individuo y su precisión no es muy buena), no es capaz de detectar el polimorfismo en tejidos distintos del individuo y al poseer polimorfismos ontogenéticos, los resultados que se obtengan van a ser distintos dependiendo de si se trabaja con tejido vegetal adulto o joven.

Tras las isoenzimas aparecieron los RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) o polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción que fueron los primeros marcadores moleculares basados en ADN que se utilizaron (Botstein et al. 1980) y se basaban en polimorfismos en la secuencia de ADN. El polimorfismo ocurre como consecuencia de diferencias en el tamaño de fragmentos generados al digerir el ADN con enzimas de restricción (endonucleasas). La variación se detecta en función del patrón de los fragmentos de ADN genómico o ADN mitocondrial digeridos. La detección de los fragmentos cortados se realiza por medio de una sonda de ADN genómico o de ADNc (ADN copiado a partir de ARN mensajero) la cual estará marcada radiactivamente o por medio de reactivos quimioluminiscentes (Masuelli, R. W., 1999).

Estos RFLPs tienen ciertas ventajas con respecto a otros marcadores desarrollados posteriormente ya que presenta una naturaleza codominante, se trata de marcadores robustos y transferibles entre laboratorios. En cambio, como inconvenientes presenta la necesidad de disponer de cantidades suficientes de ADN (del orden de microgramos) del o de los individuos a analizar, no permite su automatización, solo se

pueden utilizar un *locus* o muy pocos *loci* por reacción y además existe la posibilidad de que los niveles de polimorfismo identificados sean bajos (Masuelli, R.W., 1999). Otro de los inconvenientes que presenta es que se necesita disponer de una fuente de sondas y que las sondas pierden señal (luminescencia o radiactividad) con el tiempo.

Posteriormente se descubrieron los RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA* o AND polimórfico amplificado al azar) que construyen una serie de marcadores moleculares que no necesitan un conocimiento previo sobre el genoma del individuo de estudio, por lo que en aquella época (años 90) fue considerada una de las técnicas más versátiles desde su desarrollo (Gogorcena et al., 1993) Durante algunos años, debido a su elevado polimorfismo y su bajo coste se estuvieron utilizando para poder identificar variedades (Collins y Symons, 1993; Gogorcena et al., 1993; Moreno et al., 1997). Al tratarse de marcadores ubicados en localizaciones concretas del genoma y debido a su polimorfismo pronto se vio la posibilidad de aplicarlos también para mapeos genéticos de numerosas especies vegetales.

Estos marcadores utilizan una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en amplificar fragmentos de ADN genómico usando cebadores cortos, de unos 10 nucleótidos de longitud, con una secuencia arbitraria que se unen a zonas del ADN de los genomas de distintas especies y variedades que se quieren estudiar, generando patrones específicos (Moreno et al., 1997).

Esta técnica de PCR hace posible la amplificación del genoma de un individuo en cualquier zona en las que los cebadores son capaces de hibridar con el ADN molde en ambas cadenas y además en direcciones opuestas. Esta amplificación solo se producirá si los cebadores están situados entre sí a una distancia corta, de entre 200 y 2000 pb (Carrillo, J.M., 2000). Estos polimorfismos son detectados al separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa (Moreno et al., 1997). Al conjunto de bandas de un individuo obtenidas en la electroforesis con un cebador concreto se le denomina patrón de RAPDs y es el que se utilizara a la hora de identificar a un individuo (Moreno et al., 1997). Para utilizar esta técnica, no se necesitaba de un conocimiento previo del genoma del organismo de estudio.

Las principales ventajas que presentan los RAPDs respecto a las isoenzimas son varias, entre ellas está el poder realizar la amplificación sobre material procedente de cualquier parte de la planta y en cualquier etapa de la vida de la planta, y poder realizarse en cualquier época del año, ya que se analiza el ADN. Otra ventaja es que el número registrable de *loci* es ilimitado y además muestra un alto nivel de polimorfismo. (Gogorcena et al., 1993). El inconveniente de estos marcadores es que inicialmente, su precio en reactivos y maquinaria era relativamente alto aunque con el paso de los años ha ido abaratándose debido a la competencia entre casas comerciales y la posibilidad de clonar la enzima utilizada para la PCR, la *Taq* polimerasa. Esto contribuyó a que su uso se fuera extendiendo muy rápidamente. Sin embargo, los marcadores RAPD se consideran dominantes, lo cual supone una desventaja en comparación con las isoenzimas y con los marcadores RFLP, que se consideran codominantes.

En vides existen numerosos ejemplos de aplicación de RAPD, tanto para diferenciar cultivares como para mapeo genético (Ye et al., 1993; Weeden et al., 1994; Lodhi et al., 1995).

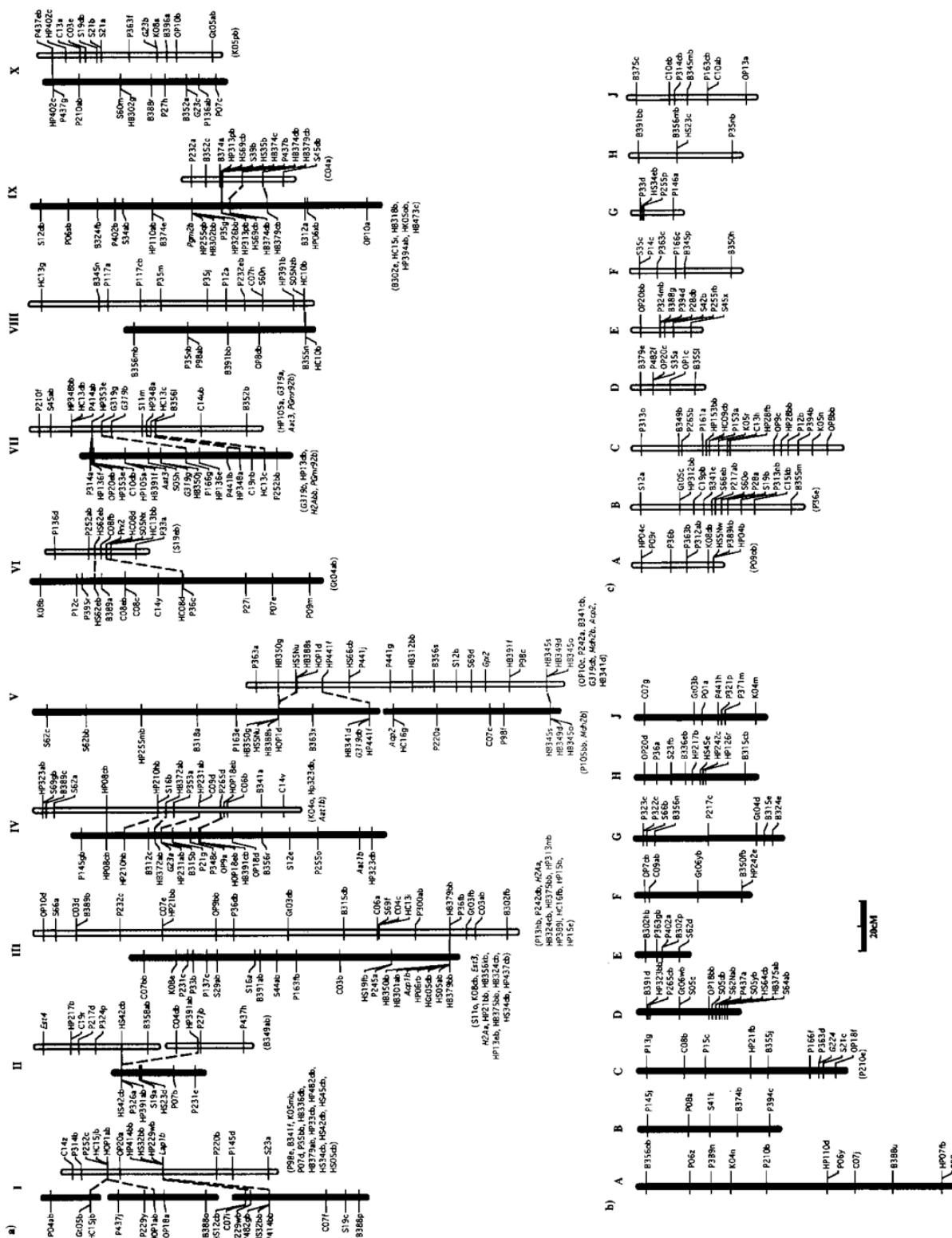


Figura 6. Mapa genético de Vid elaborado por M. A. Lodhi (Fuente: Lodhi *et al.*, 1995).

Los primeros análisis de ligamiento se realizaron por separado en marcadores heterocigóticos en Aurore o Cayuga White. De entre los 364 marcadores analizados, 299 se asignaron a ambos progenitores (de los cuales 151 marcadores se encontraron agrupados en 20 grupos de ligamiento Cayuga White y 148 marcadores fueron agrupados en 22 grupos de ligamiento en Aurore) y otros 23 marcadores mostraron vínculos con diferentes grupos ya que no se encontró para ellos un orden lineal definido. También se utilizaron 29 marcadores de tipo isoenzimático y RFLP para el análisis de ligamiento, de los cuales 16 se colocaron en orden lineal en los mapas y hubo 9 adicionales que mostraron vinculación con diferentes grupos por lo que estos no pudieron colocarse en un orden lineal definido.

La estrategia de mapeo por pseudocruzamiento resultó en un principio en dos mapas, uno para cada progenitor. El mapa obtenido para Cayuga White constaba de 214 marcadores que cubrían 1196 cM (centiMorgans, medida de la proximidad física entre marcadores) en 20 grupos de enlaces. El mapa Aurore constaba con 225 marcadores que cubrían 1477 cM en 22 grupos de enlaces. Además, 35 marcadores en Cayuga White y 23 marcadores en Aurore han sido asignados a diferentes grupos de ligamiento en ausencia de un orden lineal definido. El número de grupos de ligamiento se redujo finalmente a 19, lo cual corresponde con el número de cromosomas de la vid ($2n=38$). Todos estos marcadores e isoenzimas utilizados dieron como resultado para el análisis, dos mapas genéticos, uno para la madre y otro para el padre. Estos mapas se rearmaron en un mapa único (figura 6) con marcadores que son heterocigóticos en ambos padres (segregando 3 a 1 en la progenie) o con marcadores codominantes.

Se comprobó también con el análisis que el mapa de la variedad Aurore cubría una mayor distancia del mapa en comparación con el mapa Cayuga White. Esta diferencia puede deberse a que haya más marcadores en el mapa Aurore lo que haría que cubriese mayor cantidad del genoma. En cambio, también se observaron distintas frecuencias de recombinación cuando los marcadores comunes a ambos fueron examinados. En ambos mapas los marcadores no estaban bien distribuidos en todo el genoma y presentaban regiones con una alta densidad de marcadores (como ocurre en el cromosoma IV de la figura 6) y otras regiones menos saturadas (cromosoma VIII de la figura 6).

Los mapas de enlaces de la variedad Cayuga White y la variedad Aurore no estaban saturados por completo ya que varios marcadores RAPD, RFLP e isoenzimas no se pudieron mapear a pesar de haber sido asignados a grupos de ligamiento. El error en el mapeo de muchos de los marcadores doblemente heterocigóticos puede ser el resultado de una incapacidad para distinguir los heterocigotos de homocigotos.

El software utilizado para el análisis de vinculación tenía sus limitaciones, pero aun con estas limitaciones los mapas de enlaces de densidad media se utilizaron con éxito para examinar los *loci* de rasgos cuantitativos (QTL: *Quantitative Trait Loci*) para más de 40 caracteres distintos en la uva. Estos mapas también se utilizaron para la clonación de genes y también podían utilizarse para desarrollar programas de selección asistida por marcadores para detectar progenies híbridas en una etapa temprana de crecimiento.

La creación del primer mapa genético de vid a manos de M. Lodhi dio el pistoletazo de salida a la hora de embarcarse en el estudio del conocimiento del genoma de la vid por medio de los mapas genéticos. Los estudios posteriores se centraron en elaborar nuevos mapas de vid utilizando nuevos marcadores genéticos.

5.2. LOS MAPAS GENÉTICOS BASADOS EN LOS NUEVOS MARCADORES MOLECULARES

Durante la primera mitad de los años 90, se conocían muy pocos marcadores y las técnicas de mapeo no eran muy buenas, por ello el mapa de Lodhi no estaba muy saturado y había grandes regiones sin mapear. A lo largo de la década de los 90 y durante los primeros años de los 2000 se desarrollaron nuevos marcadores, algunos de los cuales poseían mejores características para el mapeo que los que se habían utilizado hasta la fecha. Estos nuevos marcadores permitían saturar más el mapa con lo que se dio lugar a una nueva generación de mapas más completos.

Para la elaboración de los nuevos mapas genéticos se pueden utilizar un gran número de marcadores genéticos. Se entiende por marcador genético a cualquier segmento de ADN con una ubicación física concreta en un cromosoma y que se puede determinar. Estos marcadores genéticos se utilizan en el mapeo de genes para rastrear la herencia de un gen cercano, aunque no haya sido identificado, pero cuya localización aproximada es conocida (Hurle B., 2019). Debido a que la expresión de los marcadores es codominante son capaces de detectar un nivel de polimorfismo elevado, también tienen entre otras características una amplia distribución a lo largo del genoma.

Para entender un poco mejor lo que son este tipo de marcadores se puede definir como cualquier diferencia fenotípica existente controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético. Este marcador tiene la posibilidad de usarse para marcar o señalar el *locus* que controla la diferencia fenotípica o bien para marcar otro *locus* próximo que controle algún carácter de interés. Un marcador es dominante cuando los individuos homocigotos no se pueden diferenciar de los heterocigotos, se describen por presencia o ausencia de un fragmento (Moreno-González, J., 2002), aunque también puede definirse como toda característica heredable que permite identificar las diferencias genéticas (a nivel de genotipo) existentes entre individuos (Carreño Ruiz, I., 2012).

Si cualquier característica, sea un gen, una proteína, etc., está asociada a la presencia o expresión de otra característica, como el vigor, la altura, resistencia a algún tipo de parásito o enfermedad, etc., se utilizaron como marcador, debido a que la presencia del primer carácter necesariamente implica la presencia del otro carácter (Solís-Ramos, L. Y, 2005).

Cabe destacar que los marcadores moleculares han sido desde su descubrimiento y hasta el desarrollo de las técnicas de secuenciación una herramienta clave a la hora de desarrollar los mapas genéticos. Su uso para asignar individuos a poblaciones y la identificación de individuos, presentan muchas aplicaciones en la conservación poblacional (Godoy J.A., 2009), sin olvidarnos que han sido de gran importancia para hacer posible la identificación rápida y de manera fiable de las distintas variedades de vid (Ibañez et al., 2010) y poder realizar una mejora de las variedades más usadas en el sector vitícola y enológico. Estos marcadores tienen un gran valor para el estudio de las relaciones genéticas que poseen entre variedades ya que se ha convertido en uno de los datos más importantes y a tener en cuenta en la viticultura moderna (Martínez Zapater, J.M., 2017).

Como he explicado anteriormente, el primer mapa genético para *Vitis vinífera* L. a cargo de Lodhi y su grupo de trabajo fue construido mediante el uso de marcadores RFLP, RAPD y con isoenzimas. A partir de estos, los siguientes mapas construidos se apoyaron fundamentalmente en marcadores de tipo AFLPs, RAPDs, CAPS y SSCPs

(Lodhi *et al.*, 1995) y junto a estos se consiguieron mapas más complejos y saturados con el desarrollo de nuevos marcadores moleculares del tipo SNP y SSR.

Los SNP, son marcadores basados en el polimorfismo originado por variaciones de un solo nucleótido en la secuencia de ADN. Este tipo de marcadores se pueden localizar en cualquier región del genoma por ello puede marcar cualquier gen de interés para la mejora genética (Ramírez-Bello, J., 2013).

El polimorfismo que presentan, similar entre las regiones codificantes y no codificantes, es el más abundante entre la mayoría de organismos. En el caso de la vid, se ha observado la presencia de un SNP por cada 64 o 250 pares de bases (Lijavetzky *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007; Carreño Ruiz, I., 2012).

La principal ventaja que posee este tipo de marcadores es que son codominantes (modelo de herencia no mendeliana en el que el estado heterocigoto no contiene un alelo recesivo sino que ambos alelos se comportan como dominantes y ambas características se manifiestan sin mezclarse) y altamente reproducibles entre laboratorios y técnicas de detección. Gracias a todas estas características se han considerado como marcadores de gran interés y utilidad para la construcción de mapas genéticos además de para la identificación varietal (Ramírez-Bello, J., 2013).

Algunos de los métodos usados para la detección de SNPs fueron los SSCPs, los CAPs, técnicas de secuenciación de ESTs, secuencias terminales de BACs o técnicas como la secuenciación de genomas completos como es el caso del genoma de la vid (Carreño Ruiz, I., 2012).

Por otro lado, los marcadores SSR, también llamados microsátelites o secuencias simples repetidas, son regiones de secuencias genéticas pequeñas formadas por de 2 a 5 nucleótidos que se repiten entre 5 y 10 veces y series que a su vez se repiten muchas veces en todo el genoma, las cuales se encuentran muy repartidas por el ADN (Zavala Martínez, K.C., 2002). Estas secuencias de ADN son altamente variables y altamente mutables. La base genética que presentan del polimorfismo detectado es la variabilidad del número de repeticiones en tándem entre los individuos y de la variación del tamaño de los fragmentos amplificados (Moreno *et al.*, 1997).

Las variaciones detectadas por los SSR son el resultado de cambios en el número de unidades repetidas (Lowe *et al.*, 2004).

Además de ser marcadores muy polimórficos y abundantes, son codominantes, altamente reproducibles y transferibles entre cruzamientos (Carreño Ruiz, I., 2012). Las repeticiones que ocurren en los SSR están concentradas en regiones grandes del ADN que no codifican para genes conocidos y que se han llamado macrosatelites, por lo que es muy probable que no sean tan útiles como aquellos marcadores que están distribuidos al azar (Zavala Martínez, K. C., 2002).

Los SSRs presentan un nivel adicional de información genómica que puede usarse para diferenciar genotipos con alto grado de parentesco (clones) y usarse para los estudios de mapeo genético y para la determinación de polimorfismos (Masuelli, R. W., 1999). Son excelentes marcadores moleculares sobre todo en el estudio de caracteres cuantitativos y otros estudios genéticos en plantas, por ello han sido utilizados como un planteamiento general para un mapeo genético en eucariotas (Zavala Martínez, K. C., 2002).

El uso de estos marcadores iba a estar limitado debido a su difícil localización dentro del genoma y debido a la necesidad de determinar previamente las secuencias que flanquean la repetición (Carreño Ruiz, I., 2012). También estos marcadores SSR son

muy útiles para el estudio de ligamientos genéticos en plantas y el mapeo físico, estudios poblacionales y la identificación de variedades (Masuelli, R. W., 1999).

En las últimas décadas estos marcadores han sido comúnmente utilizados para la identificación y discriminación de distintos cultivares de vid debido a su alto nivel de polimorfismo, su herencia mendeliana codominante y su alta reproducibilidad (Zavala Martínez, K. C., 2002).

La principal ventaja que presentan estos marcadores es que son muy informativos ya que, aunque solo permiten analizar un *locus* por experimento, permiten diferenciar las variedades alélicas de los *loci* analizados y por tanto identificar grupos de ligamiento entre diferentes mapas genéticos (Moreno *et al.*, 1997).

Inicialmente, el desarrollo de nuevos microsatélites se consideraba laborioso. Un inconveniente es que su desarrollo es bastante laborioso ya que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas como es el caso de las secuencias adyacentes al microsatélite. Y, como para poder desarrollarlos se necesita conocer su secuencia genética, en los primeros años de uso eran menos numerosos que otros marcadores de carácter dominante (Moreno *et al.*, 1997). Inicialmente otro de los inconvenientes que presentaba era que se necesitaba conseguir clones de las secuencias repetidas pero poco a poco, se fueron proponiendo con el paso de los años otras formas alternativas que no requieren el clonamiento de estas secuencias, pero parecen no ser tan eficientes como los SSRs basados en las propias secuencias aleatorias (Zavala Martínez, K. C., 2002).

En la tabla 1 se recogen las principales características de los marcadores más importantes utilizados en la elaboración de los mapas genéticos. Cabe destacar que los datos e información que se desprenden de esta tabla, algunas características de los marcadores han evolucionado con el tiempo y, de alguna manera han cambiado su nivel de aplicabilidad en la construcción de mapas genéticos.

Tabla 1. Principales características de los marcadores moleculares más útiles para elaborar los mapas de vid y sus distintas propiedades (Elaboración propia a partir de los artículos “Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen” (Claros Díaz, 2019), “Breve revisión de los marcadores moleculares” (Rentarías Alcántara, 2002) y “Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética” (FAO, 2010) entre otros).

PROPIEDADES	MARCADORES						
	RFLP	RAPD	AFLP	SNP	SSR	CAP	VNTR
Técnica en la que se basa	Enzimas de restricción, Southern blot	PCR con primers aleatorios	Digestión con enzimas y PCR de determ. fragmentos	PCR	PCR dirigida a regiones cortas y repetidas	Digestión con enzimas de los productos de PCR	Hibridación del ADN y técnicas basadas en PCR
Tipo de polimorfismo	Cambio de bases, inserciones, deleciones	Cambio de bases, inserciones, deleciones	Cambio de bases, inserciones, deleciones	Variaciones de un solo nucleótido en la secuencia del ADN	Variabilidad nº repeticiones en tándem y del tamaño de fragmentos amplificados	Cambio de bases, inserciones, deleciones	Variabilidad nº repeticiones en tándem
Abundancia en el genoma	Alta	Muy alta	Muy alta	Media	Muy alta	Alta	Variable
Nivel de polimorfismo	Medio	Medio	Muy alta	Muy alta	Muy alta	Medio	Muy Alta
Dominancia	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante	Codominante	Codominante
Cantidad de ADN requerido	2-10 ug	10-25 ug	10-25 ng	64-250 pb	20-50 ng	50-100 ng	20-50 ng
Información sobre secuencia	No	No	No	Si	Si	No	No
Radiactividad	Si/No	No	Si/No	No	No	No	No
Costes	Medio/Alto	Bajo	Alto	Alto	Medio	Medio	Medio/Alto
Utilidad en mapas	Alta	Alta	Alta	Alta	Media	Desuso	Alta

Además de su importancia en la construcción de los mapas, todos estos marcadores posibilitan la descripción de los patrones genéticos en las poblaciones (Godoy J.A., 2009).

Desde los primeros años de los 2000 toda la información disponible sobre los microsatélites identificados en el genoma de la vid se encuentran recopilados en la base de datos UniSTS del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) (Martínez *et al.*, 2006).

En el año 2000 los alemanes Buck y Zyprian construyeron los mapas genéticos de dos variedades de *Vitis vinífera* (Regent y Lamberger) para conocer la base genética de las resistencias a mildiu, oídio y podredumbre gris que presentan estas variedades. Para la construcción de estos mapas genéticos utilizaron marcadores del tipo RAPD y SCAR (Cervera *et al.*, 2001). Sin embargo, este tipo de mapa no supuso un avance sustancial en la construcción del mapa de la vid ya que utilizaba el mismo tipo de marcadores que en la versión de Lodhi.

Mientras tanto el grupo italiano integrado por M.S. Grando, D. Bellin, A. Madini, M. Stefanini, C. Pozzi y R. Velasco se encontraba construyendo los mapas genéticos de *Vitis vinífera* L. cv. *Moscato bianco* y *Vitis riparia* utilizando para su construcción AFLPs y microsatélites para hacer posible la identificación en el mapa genético de *Vitis riparia* los *loci* que controlan los caracteres de resistencia que presenta esta variedad frente a mildiu y oídio (Grando *et al.*, 2000). Este mapa utilizó por primera vez microsatélites en vid.

También tras la construcción del mapa de Lodhi, en Francia con el objetivo de controlar la apirenia entre otros caracteres presentes en variedades de uva de mesa, se estaban realizando estos análisis mediante la construcción de mapas genéticos utilizando para ello AFLP, Microsatélites, isoenzimas y SCAR (Lahogue *et al.*, 1998).

En 2001 a manos de Cabezas y los demás miembros que integraban un proyecto común, se llevó a cabo un mapa integrado a partir de poblaciones provenientes del cruzamiento entre 8 variedades de vid distintas. Estas variedades eran Dominga, Autumn Seedless, Monastrell, Cabernet Sauvignon, Ruby Seedless, Moscatel de Hamburgo y Sugraone (Cabezas *et al.*, 2001).

A partir de 2004 se desarrollaron nuevos microsatélites en vid y comenzaron a utilizarse con mayor frecuencia marcadores moleculares del tipo SSR o microsatélites ya que resultaban muy útiles para comparar GLs (grupos de ligamiento) homólogos entre distintos mapas. A esta etapa corresponde el primer mapa integrado a manos de Doligez junto a su grupo de trabajo, usando 5 progenies desarrolladas por diferentes grupos de investigación. Las progenies utilizadas fueron provenientes del autocruzamiento de Riesling, del cruce entre Siraz y Garnacha, del cruzamiento entre Chardoney y Bianxa, cruce de Riesling con Cabernet Sauvignon y otro proveniente del cruzamiento entre variedades de uva de mesa (MTP2223-27: Dattier de Beyrouth x 75 Pirovano y MTP2121-30: Alphonse Lavallée x Sultanina). Este mapa contenía alrededor de 502 marcadores SSR capaces de ser transferibles y muy útiles en la construcción de otros mapas genéticos (Doligez *et al.*, 2006).

Con las mejoras tecnológicas en 2007, tuvo lugar el desarrollo de nuevos marcadores moleculares del tipo SNP incorporándolos a los mapas genéticos y además, ese mismo año debido a la gran necesidad de encontrar QTLs (*quantitative trait locus*) de un carácter cuantitativo relacionados con la resistencia a determinadas enfermedades se llevó a cabo la creación de otro tipo de mapa genético integrado a partir de otros 4 mapas parentales provenientes del cruce interespecífico entre Chardonay x Bianca y

Cabernet Sauvignon empleando SSRs y marcadores derivados de genes análogos de resistencia (RGAs) (Carreño Ruiz, I., 2012).

Al año siguiente, en 2008 Vezzulli junto con otros investigadores crearon un mapa integrado a partir de 3 cruzamientos intraespecíficos en el que se incluyen 283 SSRs y 501 SNPs. (Siraz x Pinot Noir, Siraz x Garnacha, Cabernet Sauvignon x Riesling) (Vezzulli *et al.*, 2008).

En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestra a modo de resumen un histórico de los mapas genéticos de la vid de mayor relevancia desde la creación del primer mapa de vid hasta la actualidad.

Tabla 2. Descripción de los principales mapas genéticos de la vid de forma cronológica desde el primer mapa creado para la especie del género *Vitis* hasta los que conocemos actualmente (elaboración propia).

HISTÓRICO DE MAPAS GENÉTICOS			
Publicación (*)	Material vegetal utilizado	Marcadores	Usos
<i>Lodhi et al., 1995</i>	Cayuga White Aurore	Isoenzimas RAPDs RFLPs	Llevar a cabo mejora genética de la vid de manera eficaz y estudio de caracteres relacionados con resistencia a oídio, podredumbre gris, tolerancia al frío y con la producción
<i>Buck y Zyprian, 2000</i>	Regent Lemberger	RAPDs SCARs	Conocimiento de la base genética de la resistencia a mildiu, oídio y podredumbre
<i>Grando et al., 2000</i>	Moscato Bianco Vitis riparia Mchx	AFLPs Microsatélites	Identificación en el mapa de los caracteres de resistencia que presenta <i>Vitis riparia</i> frente a mildiu y oídio
<i>Cabezas et al., 2001</i>	Dominga Autumn Seedless Monastrell Cabernet Sauvignon Ruby Seedless Moscatel de Hamburgo Sugraone	AFLPs Microsatélites	Estudios de la apirenia y estudio de caracteres como fotorreacción, tiempo de floración, tiempo de maduración o vigor de la cepa
<i>Doligez et al., 2006</i>	Riesling x Riesling Syrah x Garnacha Chardoney x Bianca Riesling x Cabernet Sauvignon Cruce de dos variedades de uva de mesa	SSRs	Para la construcción de otros mapas genéticos
<i>Vezzulli et al., 2008</i>	Syrah x Pinot Noir, Syrah x Garnacha Cabernet Sauvignon x Riesling	SSRs SNPs	Encontrar en los mapas caracteres relacionados con la resistencia a determinadas enfermedades
<i>Canaguiera et al., 2017</i>	Riesling x Gewürztraminer Chardonay x Bianca Syrah x Garnacha	SNPs SSRs	Mapa de referencia del genoma de vid
<i>Zhu et al., 2018</i>	Red Globe Venus Seedless	SNPs	Último mapa de integración de la vid. Facilita el estudio genético de la vid, evalúa la vid y el descifrado de la base genética de rasgos económicos y genéticos importantes. Proporciona datos genéticos básicos para la mejora en reproducción de la vid.

* Las publicaciones correspondientes están referenciadas en el apartado de BIBLIOGRAFÍA.

En la actualidad, el mapa más completo que se conoce es el de A. Canaguiera y su grupo de trabajo, que crearon una nueva versión para la unión del genoma de referencia de vid publicado por Jaillon *et al.* De la versión 8X y su anotación VCost. V3 y consiguieron desarrollar la versión 12X del genoma de referencia (Canaguiera., 2017).

5.3. LOS MAPAS GENÉTICOS ACTUALES BASADOS EN LA SECUENCIACIÓN

El desarrollo de las nuevas técnicas de secuenciación generadas a raíz del Proyecto Genoma Humano (PGH) y su aplicación masiva en las dos primeras décadas de los años 2000 llevó a desarrollar una nueva generación de mapas genéticos.

La secuenciación del genoma de referencia de la vid fue publicada por O. Jaillons y otros autores en 2007, donde la secuencia para la primera versión del genoma se obtuvo usando la técnica de *shotgun* (Técnica para determinar la secuencia del ADN del genoma mediante la ruptura del mismo en una colección de pequeños fragmentos de ADN ordenados de forma individual. Mediante una serie de coincidencias en la secuencia del ADN que descifra un programa informático, se colocaron los fragmentos individuales en el orden correcto para construir el genoma) del genoma completo utilizando para ello la tecnología de secuenciación de Sanger (Canaguiera, 2017) que consiste en sintetizar secuencialmente la hebra de ADN complementaria a la hebra molde de cadena simple mediante el enzima ADN polimerasa (Garrigues F., 2017).

Esta versión del genoma se recopiló mediante lecturas que representan una cobertura de 8X. Más adelante, se realizó una mejora del ensamblaje mediante la adición de 4X de cobertura adicional, incluyendo más secuencias finales de cromosomas artificiales bacterianos para una mejora del esqueleto de la secuencia. Los soportes y secuencias en bruto resultantes así como un conjunto de cromosomas nuevos basados en una nueva versión mejorada de los mapas usados para la versión del genoma 8X, se ubicaron en los archivos del EMBL (Laboratorio Europeo de Biología Molecular).

Aunque ha habido algunos borradores intermedios y se ha llevado a cabo la construcción de mapas nuevos como el caso de la construcción de un mapa de nueva generación altamente saturado de *Vitis* (Zhu et al., 2018), la versión más completa y fiable actualmente es la que se describe en el artículo de A. Canaguiera y otros autores en 2017 que lleva por título “*A new version of the grapevine reference genome assembly (12X.v2) and of its annotation (VCost.v3)*”.

Estas técnicas de ensamblaje y lectura en profundidad para conseguir una mayor cobertura que mejoró los mapas genéticos se conoce dentro de todo el conjunto de vides como la versión 12X. v0 del genoma de referencia de vid.

Esta nueva versión requería algunas mejoras que solucionaran la falta de anclaje a los cromosomas de algunas secuencias que suponían en torno a un 9% de la secuencia y además existía otro 3,5% de la secuencia que podía unirse a algunos cromosomas pero de manera aleatoria sin mucha certeza de ser el correcto.

Por tanto, el ensamblaje cromosómico del genoma de referencia de vid se mejoró usando dos estrategias distintas. La primera consistió en la saturación mediante marcadores SNP de 6 mapas parentales, y la otra usando para los andamios o estructuras una colección de secuencias emparejadas y apareadas mediante fragmentos de ADN de 2kb de la variedad Kishmish vatkana de la especie *V. vinifera*. El resultado fue la versión 12X.v2 del ensamblaje del genoma de referencia de la vid.

Todas estas versiones del ensamblaje del genoma han ido acompañadas de una exhaustiva anotación de genes que consiste en la búsqueda *in silico* dentro de la secuencia de aquellas características propias de los genes o secuencias similares a genes ya descritos para otras especies. La anotación de la primera versión del genoma, la versión 8x, incluía 30.434 genes. La primera versión mejorada del genoma,

conocida como 12X.v0, contenía 27.043 genes putativos lanzada por el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica). La versión 12X.v1 resultado de la unión de la v0 y una predicción de genes mediante un software contenía 29.971 genes y la última versión del ensamblaje del genoma, la versión 12X.v2, la conformaban 33.568 genes.

Para llevar a cabo la elaboración de los mapas genéticos de alta densidad sobre el genoma de referencia de vid se utilizaron 3 poblaciones de mapeo. La primera población constaba con 120 individuos proveniente de dos cruces de especies de *V. vinífera*, estos fueron cruces entre el clon 49 de la variedad Riesling con el clon 643 de la variedad Gewürztraminer (Riesling x Gewürztraminer). La segunda población contaba con 358 individuos provenientes del cruce entre la variedad Chardonnay de la especie de *V. vinífera* con la subespecie de *V. vinífera* "Bianca" (Chardonnay x Bianca). Y, por último, una población constituida por 192 individuos provenientes de dos cruces recíprocos entre la variedad Syrah perteneciente a una especie de *V. vinífera* y la variedad Garnacha al igual que la anterior procedente de una especie de *V. vinífera* (Syrah x Garnacha). Los posibles errores en los datos producidos en la segregación fueron revisados de manera meticulosa en estos mapas.

Para conseguir el ensamblaje o unión correcta de los cromosomas se hizo siguiendo 3 pasos. El primer paso fue alinear todos los marcadores en los andamios del ensamblaje del genoma 12X generándose un primer orden basado en los resultados obtenidos contando únicamente con los mapas de los progenitores. El segundo paso fue realizar las uniones entre los andamios adyacentes se conformaron usando información de pares de parejas. Tan solo los andamios con un anclaje de al menos dos mapas o de un mapa y una unión de pareja fueron retenidos en el ensamblaje. El último paso fue realizar las interacciones necesarias entre los andamios colocados en las extremidades de los cromosomas de forma manual para poder detectar la presencia de telómeros repetidos, permitiendo así el anclaje de estos andamios y poder corregir su orientación si fuera preciso o en su caso confirmar hacia dónde se encuentran orientados.

Los marcadores que se utilizaron para ordenar y orientar los andamios de la estructura del genoma de referencia de la vid fueron marcadores SSR, marcadores SNP desarrollados a partir de la resecuenciación de Sanger y para la progenie resultante del cruce de Riesling con Gewürztraminer e utilizaron 1580 marcadores SNP.

Para el mapeo del genoma de referencia de vid mediante los 6 mapas parentales desarrollados, los *loci* mapeados se distribuyeron bastante bien entre los cromosomas usándose desde 100 *loci* para los menos cubiertos hasta 242 *loci* para los más cubiertos.

Los marcadores comunes entre los mapas corresponden fundamentalmente con los marcadores SSR, y fueron muy importantes para poder conocer el orden relativo que los *contigs* (segmentos de ADN superpuestos, que juntos representan una región consenso de ADN) habían anclado en cada mapa parental individual.

Para llevar a cabo el ensamblaje del genoma de la versión 12X.v2 los marcadores no redundantes se alinearon en los andamios de la secuencia del genoma de referencia de *V. vinífera*, obteniéndose como resultado un primer borrador de ensamblaje de los cromosomas. Para ello se utilizaron 103.463.614 lecturas de una longitud media de unas 100 pb de illumina (Secuenciación de siguiente generación o NGS que es una metodología de alto rendimiento que permite la secuenciación rápida de los pares de bases en muestras de ADN o ARN con baja tasa de error y con bajo coste) y a partir de 51.731.807 inserciones de un tamaño promedio de 2 kb a partir de una única biblioteca de la variedad de vid Kishmish Vatkana. Estas lecturas se alinearon en los

extremos de la secuencia de los andamios de la secuencia del genoma de referencia de *V. vinífera* para generar solapamientos entre los andamios. Los alineamientos se inspeccionaron manualmente, teniendo en cuenta los datos resultantes de los mapas genéticos. La combinación de estas dos capas de información además de una verificación de forma manual de la presencia de repeticiones teloméricas en la extremidad de los cromosomas hizo posible el desarrollo del conjunto de datos de ensamblaje del cromosoma 12X.v2. Esta versión se compone de 9 cromosomas de vid que contienen 366 andamios con un total de 458.641.822 pares de bases, una pseudomolécula adicional de 2.654.308 pares de bases llamada chr00 formada por 1.692 andamios restantes que aún no han sido anclados.

El ensamblaje de la versión v2 consta de 19 secuencias de cromosomas y una pseudomolécula aleatoria de cromosomas.

El ensamblaje de la versión 12X.v2 contiene una secuencia más orientada que la versión 12X.v0 y casi todas las secuencias de cromosomas se benefician de esta mejora.

Este mapa genético tiene una complejidad mucho mayor y una fiabilidad mucho más alta que el primer mapa de vid ya que se ha logrado avanzar en todos estos años en nuevas técnicas que puedan resultar útiles a la hora de realzar mapas de vid y aportar una cantidad de información infinitamente mayor que el primer mapa generado por M. A. Lodhi.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Hasta el desarrollo de las técnicas moleculares de marcadores y de secuenciación del genoma, se sabía muy poco sobre la genética de la vid, debido a sus características genéticas: alta heterocigosis, amplia juvenilidad y a que sus principales características dependen de numerosos genes que interactúan entre sí y con el ambiente.

La elaboración de mapas genéticos en la vid aporta conocimientos relevantes para la mejora de las variedades de vid tanto a nivel de vinificación como a nivel agronómico y permite obtener mayor conocimiento sobre las interacciones de la vid y el medio. La caracterización genética de la vid, permitirá llevar a cabo dos de las estrategias más importantes de mejora genética en vid: la mejora mediante cruzamientos y selección de descendientes y la mejora basada en técnicas de ingeniería genética.

Por otro lado, la diversidad genética se considera como un elemento indispensable para el futuro de la vid, de forma que las variedades y clones sean capaces de adaptarse a las necesidades ambientales y a las necesidades del mercado. Todo esto se refleja también en la estructura de los mapas genéticos de la vid. Una amplia mayoría de las variedades de vid que podemos encontrar en el mundo van a poder ser identificadas por medio de cualquiera de los marcadores moleculares de los que he hablado en este trabajo y por extensión podrán ser mapeadas.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos esfuerzos para poder obtener la mayor cantidad de información acerca del genoma de la vid, y se ha producido así un rápido incremento de los recursos y del número de herramientas del que disponer para la investigación en este ámbito genético. Toda esta nueva información sobre el genoma de la vid ha sido posible en parte gracias a la construcción de mapas genéticos que han ayudado a plasmar la localización e identificación de los diversos caracteres y ayudar con esto a la diferenciación o distinción entre variedades de vid. La identificación de genes y marcadores moleculares en los mapas genéticos, que

controlan los caracteres de calidad, acelerará el proceso de mejora creando nuevas oportunidades para este cultivo.

Desde 2007 disponemos de toda la secuencia del genoma de la vid (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007), sin embargo, aún queda mucho esfuerzo por hacer respecto a la identificación de genes interesantes y de las posibles variaciones de nucleótidos (alelos) precursoras de la variación fenotípica de los diversos caracteres de interés dentro de la vid. En los últimos años se ha empezado a integrar todo este conocimiento, que se ha obtenido con técnicas diferentes y sobre variedades o cruces diferentes a lo largo del tiempo. Este esfuerzo de integración ha dado como resultados algunos de los más modernos y completos mapas: Canaguiera y Zhu, sobre los que se sigue trabajando actualmente. Actualmente, en la base de datos del NCBI se han identificado más de 15000 unigenes del género *Vitis*. Además, se han ido produciendo numerosos mapas genéticos (Doligez *et al.*, 2002; Grando *et al.*, 2003; Zyprian *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Riaz *et al.*, 2004; Adam-Blondom *et al.*, 2004; Cabezas *et al.*, 2006) donde muchos de ellos han sido integrados en un mapa de referencia (Doligez *et al.*, 2006; Cutillas *et al.*, 2009).

En este sentido, el programa internacional del genoma de la Vid (IGGP, International Grape Genome Program), creado en 2001 para promover la colaboración internacional y desarrollar recursos utilizables por la comunidad científica de la vid, ha contribuido a liberar y ordenar muchos de los resultados obtenidos en distintas bases de datos públicas (Cutillas, *et al.*, 2009).

Además, existe una plataforma denominada “Proyecto Genoma de *Vitis vinífera*” en el centro de secuenciación GENOSCOPE (Francia) en la que se encuentra la secuencia de todo el genoma de *Vitis vinífera*. Esta base de datos, que es de acceso libre y gratuito, permite conocer, con toda exactitud, la secuencia de cada uno de los cromosomas y acceder en tiempo real a toda la información que se vaya obteniendo sobre cualquier gen y sobre toda la información genética de la vid. Este proyecto me parece de gran importancia como referencia en la búsqueda de información acerca de cualquier dato o aspecto del genoma de vid.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aurand J. M., Statistical report on World Vitiviniculture. Paris: International Organisation of Vine and Wine; 2017.

Balda Manzanos P. J., Martínez de Toda Fernández F. (dir). Identificación y caracterización completa (ampelográfica, genética, agronómica, enológica, polifenólica, aminoacídica, aromática y sensorial) de variedades tintas minoritarias de la D.O.Ca. Rioja [Tesis doctoral]. [Logroño]: Universidad de la Rioja; 2014 [citado 15 de febrero de 2019]. Recuperado a partir de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/43838.pdf>

Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Elsevier. 1980; 32 (3): 314-331.

Cabezas, J.A., Cervera, M.T., Cenís, J.L., Zapater, J.M. Construcción de un mapa genético de AFLPs y microsatélites en *Vitis vinífera*. En: IV Reunión de Biología Molecular de Plantas, Toledo. 2001.

Canaguier A., Grimplet J., Di Gaspero G., Scalabrin S., Duchêne E., Choisne N., Mohellibi N., Guichard C., Rombauts S., Le Clainche I., Bérard A., Chauveau A., Bounon R., Rustenholz C., Morgante M., Le Paslier M.-C., Brunel D., Adam-Blondon A.-F. A new version of the grapevine reference genome assembly (12X. v2) and of its annotation (VCost. v3). Elsevier, Genomics Data 14. 2017; 56-62.

Carreño Ruiz, I., Ruiz García L. (dir), Carreño Espin J. (dir). Identificación de regiones cromosómicas implicadas en el control genético de caracteres de interés para la mejora genética de la uva [tesis doctoral en internet]. [Murcia]: Universidad de Murcia; 2012 [Citado 15 de enero de 2019]. Recuperado a partir de: https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/28936/1/Tesis%20Doctoral_iv%C3%A1n%20Carre%C3%B1o%20Ruiz.pdf

Carrillo J. M., Nuez F. editores. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia: Editorial de la UPV; 2000. 579 p.

Cervera M. T., Cabezas J. A., Martínez Zapater J. M. Análisis genético de la vid, una asignatura pendiente [Internet]. Acenología. 2001 [Citado 2 de febrero de 2019]. Recuperado a partir de: http://www.acenologia.com/ciencia56_1.htm

Claros Díaz M.G. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen [Internet]. Blog de Encuentros en la biología: Universidad de Málaga. 2019 [citado 26 de febrero de 2019]. Recuperado a partir de: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>

Doligez A., Adam-Blondon A.F., Cipriani G., Di Gaspero G., Laucou V., Merdinoglu D., Meredith C.P., Riaz S., Roux C., This P. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. NCBI. 2006; 113(3):369-82.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación). Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. En: Rischkowsky B., Pilling D. editores. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura [Internet]. Roma (Italia). 2010; p. 393-419. Recuperado a partir de: <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s17.pdf>

Fernández Nieto M. J., Mulas Fernández R., Ramos García M. T. Para empezar a entendernos. 2008

Garrigues F. Técnica Sanger [Internet]. Genética Médica. 2017 [Citado 16 febrero de 2019]. Recuperado a partir de: <https://revistageneticamedica.com/blog/sanger/>

Gene Mapping Tools. [Internet]. SlideShare. 2016 [Citado 5 marzo de 2019]. Recuperado a partir de: <https://es.slideshare.net/UsmanArshad53/gene-mapping-tools>

Godoy J. A. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. AEET. 2009; 18 (1): 23-33. Grape Genome Browser (12X). Genoscope [Internet]. Recuperado a partir de: <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>

Gogorcena Y., Arulsekar S., Dandekar A., Parfitt D. Molecular markers for grape characterization. *Vitis*. 1993; 32:183-185.

Grando M.S., Bellin D., Madini A., Stefanini M., Pozzi C., Velasco R. Construction of an AFLP and SSR genetic map of *Vitis* from an interspecific hybrid population. En: Plant & Animal Genome Conference VIII, San Diego. 2000.

Grattapaglia D., Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*. 1994; 137: 1121-1137.

Hidalgo Fernández-Cano L., Hidalgo Togores J. Tratado de viticultura. Madrid:Ediciones Mundi-Prensa; 2011. 1031p.

Hurle B. Mapa genético [Internet]. National Human Genome Research Institute. 2019 [citado 10 de enero de 2019]. Recuperado a partir de: <https://www.genome.gov/glossarys/index.cfm?id=85>

Ibañez J., Cabezas J. A., Lijavetzky D., Vélez M^a. D., Ruiz-García L., Thomas M. R., Rodríguez V., Bravo G., Zinilabidine H., Martínez Zapater J. M. Identificación rápida de variedades de vid mediante nuevos marcadores de ADN: SNP. 2010.

Ibañez J., De Andrés M. T., Hasna Zinelabidine L., Cabezas J. A., Gaforio L., Muñoz G., Cabello F., Martínez Zapater J. M. Estudio de parentesco de variedades de vid mediante marcadores de ADN. UAM. 2013; 275-281

Lahogue F., This P., Bouquet A. Identification of a codominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998; 97: 950-959.

Lodhi M. A., Daly M. J., Ye G. -N., Weeden N. F., Reisch B. I. A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome*. 1995; 38: 786-794.

Secal [Internet]. Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. 2014 [citado 10 de enero de 2019]. Recuperado a partir de: <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/06-GENETICA-Pba-2.pdf.pdf>

Lowe A. J., Moule C., Trick M., Edwards K. J. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in Brassica crop species. *TAG. Theoretical and Applied Genetics* 2004; 108(6): 1103-1112.

Mapas genéticos [Internet]. CeFeGen - Centro de Fertilidad y Genética. 2019 [Citado 15 de enero de 2019]. Recuperado a partir de: <https://cefegen.es/blog/mapa-genetico-para-que-sirve-como-se-hace>

Mapeo genético [Internet]. National Human Genome Research Institute. 2019 [citado 10 de enero de 2019]. Recuperado a partir de: <https://www.genome.gov/27562617/mapeo-genetico/#al-2>

Markert C. L., Moller F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species-specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1959; 45: 753-763.

Martínez L., Cavagnaro P., Masuelli R. Caracterización molecular de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) de calidad enológica por marcadores microsatélites. *FCA*. 2006; 38(1): 77-86.

Martínez Cutillas A., Ruiz García L. El cambio climático y la resistencia a plagas marcan el futuro de la mejora genética de la vid. *Vida Rural*, 2009; 292, 45-49.

Martínez Zapater J. M. La diversidad genética de la vid, una herramienta para afrontar los retos del cambio global [Internet]. ACEnología. 2017 [Citado 16 de enero de 2019]. Recuperado a partir de: http://www.acenologia.com/dossier/dossier159_0217.htm

Masuelli R., Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas. Avances en horticultura. 1999 4 (1): 54-66.

Moreno S., Gogorcena Y., Ortiz J.M. Progreso en la caracterización y mejora de la vid (*Vitis vinífera* L.) mediante marcadores moleculares. ITEA. 1997; 93 (3): 135-155.

Moreno-González J. Marcadores moleculares en la mejora genética de plantas [Internet] Sociedad Española de Genética. 2019 [citado 27 de enero de 2019]. Recuperado a partir de: <http://www.segenetica.es/docencia/marcmol.html>

OIV. Aspectos de la coyuntura mundial. 2017 (Abril).

Pérez Nasser N., Piñero D. Isoenzimas. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 1997; 60:77-84.

¿Por qué Genética y Vid? [Internet]. ACEnología. 2001 [citado 10 enero de 2019]. Recuperado a partir de: <http://www.acenologia.com/dossier56.htm>

Ramírez-Bello J., Vargas-Alarcón G., Tovilla-Zárate C., Fragoso J. M. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. Gaeta Médica [Internet]. 2013 [citado 16 febrero de 2019]; 149: 220-28. Recuperado a partir de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm1321.pdf>

Rentaría Alcántara M. Breve revisión de los marcadores moleculares [Internet]. Bog.mx. 2019 [citado 26 de febrero de 2019]. Recuperado a partir de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap18.pdf>

Royo B., Gonzalez J., Laquidain M. J. y Larumbe M.P. Puesta a punto de una técnica de extracción de enzimas. Aplicación a la caracterización isoenzimática de distintos cultivares de vid (*Vitis vinífera* L.). E.U.I.T.A. 1989; 4 (3): 333-341

Solís-Ramos, L. Y. y Andrade-Torres A. ¿Qué son los marcadores moleculares? La Ciencia y El Hombre. 2005; XVIII (1): 41-46

Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D. A., Cestaro A., A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PloS ONE. 2007; 2(12): e1326. doi.org/10.1371/journal.pone.0001326

Vélez Tébar M^a. D., Ferrer Cebrián E. (dir). Estudio de un sistema de marcadores microsatélites para la protección y defensa legal de variedades de vid (*Vitis vinífera* L.) [Tesis doctoral]. [Alcalá de Henares]: Universidad de Alcalá; 2007. Recuperado a partir de: <https://core.ac.uk/download/pdf/58902625.pdf>

Vezzulli S., Troggio M., Coppola G., Jermakow A., Cartwright D., Zharkikh A., Stefanini M., Grando M. S., Viola R., Adam-Blondon A., Thomas M., This P., Velasco R. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinífera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers. Theor Appl Genet. 2008; 117: 499-511.

Zavala Martínez K. C., Hinrichsen R. P. (dir), León G. (dir). Desarrollo de un mapa de ligamiento genético en *Vitis vinifera* L., basado en marcadores moleculares SSR y AFLP [tesis doctoral en internet]. [Valdivia]: Universidad Austral de Chile; 2002 [Citado

15 de enero de 2019]. Recuperado a partir de:
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fcz.12d/doc/fcz.12d.pdf>

Zhu J., Guo Y., Su K., Liu Z., Ren Z., Li K. and Gou X. Construction of a highly saturated Genetic Map for Vitis by Next-generation Restriction Site-associated DNA Sequencing. BMC Plant Biology. 2018; 18:347.