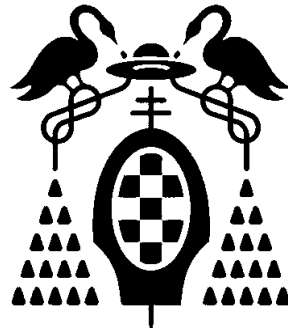


UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Biología Celular y Genética



**ESTUDIO DE UN SISTEMA DE MARCADORES
MICROSATÉLITES PARA LA PROTECCIÓN Y DEFENSA
LEGAL DE VARIEDADES DE VID
(*Vitis vinifera* L.)**

M^a Dolores Vélez Tébar

Alcalá de Henares, 2007



Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo
Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA)
CONSEJERÍA DE ECONOMÍA Y CONSUMO

Comunidad de Madrid

D. JAVIER IBÁÑEZ MARCOS, Doctor en Ciencias Biológicas y Jefe de Sección de Conservación y Restauración Ambiental del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA)

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de un Sistema de Marcadores Microsatélites para la Protección y Defensa Legal de Variedades de Vid (*Vitis vinifera* L.)**”, que presenta D^a. M^a DOLORES VÉLEZ TÉBAR en el Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá, para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Investigación Agroalimentaria del I.M.I.D.R.A., y reúne los requisitos necesarios para ser defendida ante el Tribunal.

Y para que así conste, expido el presente documento en Alcalá de Henares a 18 de Septiembre de dos mil siete.

Fdo.: Javier Ibáñez Marcos

V.ºB.º TUTORA,

Fdo. Esther Ferrer Cebrián



Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo
Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA)
CONSEJERÍA DE ECONOMÍA Y CONSUMO

Comunidad de Madrid



**UNIVERSIDAD DE
ALCALÁ**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE UN SISTEMA DE MARCADORES
MICROSATÉLITES PARA LA PROTECCIÓN Y DEFENSA
LEGAL DE VARIEDADES DE VID
(*Vitis vinifera* L.)**



M^a DOLORES VÉLEZ TÉBAR
Alcalá de Henares, Septiembre de 2007

Agradecimientos

Me gustaría comenzar esta tesis expresando mi gratitud a todas aquellas personas y entidades que de algún modo, han contribuido durante estos años a la realización de este trabajo.

Al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) de la Comunidad de Madrid, por la concesión de la Beca Predoctoral que me permitió llevar a cabo esta tesis doctoral, y al INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias)-Ministerio de Ciencia y Tecnología, por financiar el Proyecto VIN01-025-C2-1 en su Programa Nacional de Alimentación, que permitió llevar a cabo el estudio de Homogeneidad y Estabilidad.

Mi más sincero agradecimiento es sin duda para el Dr. Javier Ibáñez Marcos, por haber confiado en mí y brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo, por su buena disposición y por la gran cantidad de tiempo y esfuerzo dedicado.

A mi tutora en la Universidad de Alcalá, la Dra. Esther Ferrer Cebrián, por el interés y apoyo demostrado en la realización de este proyecto.

Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de numerosas personas e instituciones, tanto públicas como privadas, que han facilitado la recogida de material en las distintas áreas geográficas, tanto en territorio nacional como internacional. En concreto, el material vegetal de España correspondiente a variedades de uva de vinificación, se obtuvo esencialmente mediante la colaboración con numerosas Denominaciones de Origen: Almansa, Calatayud, Campo de Borja, Cariñena, Tarragona, Condado de Huelva, Costers del Segre, Jerez, Jumilla, La Mancha, Métrida, Monterrei, Montilla-Moriles, Navarra, Penedés, Ribeira Sacra, Ribeiro, Ribera de Duero, Ribera del Guadiana, Rueda, Rioja, Málaga, Utiel-Requena, Valdeorras, Valdepeñas, Valencia, Vinos de Madrid y Yecla. Entre las personas que contribuyeron personalmente a la recogida de muestras, se encuentran: José María Hurtado (Superior Frutícola S.A., Murcia); Edit Hajdu (FVM Szőlészeti és Borászati Kutató Intézete, Hungría); Patricio Hinrichsen (Centro experimental La Platina (INIA), Chile); Tim Sheehan (Sheehan Genetics,

USA); Jean Satterwhite (National Clonal Germoplasm Repository for Nut Crops, USA); Erika Dettweiler (Institute for Grapevine Breeding, Alemania); Jorge Cerolo (Agrovolcán, Tenerife); Nuria Cid (Estación de Viticultura y Enología de Galicia, Orense); Peter Alderman (Top Fruit, Sudáfrica); Thierry Lacombe (DGPC-Diversité et Génomes des Plantes Cultivées, Francia); Miguel Lara (CIFA-Centro de Investigación y Formación Agraria, Jerez de la Frontera); Javier Ibáñez, Joaquín Borrego, Paz Fernández, Maite de Andrés, Carlos González, Alba Osorio, Gregorio Muñoz, Cristina Rubio y Mariano Cabellos (IMIDRA).

Una obligada y merecida mención es para mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Agroalimentación del IMIDRA. Gracias por los buenos momentos que hemos compartido, por vuestra ayuda, apoyo, ánimo, comprensión... Todos estos años, me han servido para darme cuenta de que a parte de ser unos estupendos compañeros, sois unos amigos inigualables. Gracias a Silvia, Paz, Alba, Carmen, Carlos, Maite, Javier y Joaquín.

Tampoco puedo olvidarme de mis "Compañeras Becarias": Alba, Visi, Maite y Loli, con las que tantas risas y agobios he compartido. Ánimo chicas, las siguientes sois vosotras!

Quiero agradecer de forma muy especial a mis amigos el enorme apoyo y comprensión prestados durante este tiempo.

Y por último, quiero dar las gracias a mi familia, en concreto a mis padres, ya que siempre confiaron en mí y estuvieron a mi lado en este largo camino.

A todos y cada uno,

GRACIAS

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADPIC: Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA: Análisis Molecular de la Varianza
BMT: Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in particular
CGIAR: Grupo Consultivo sobre Investigación Agrícola Internacional
CIFA: Centro de Investigación y Formación Agraria
CIOFORA: International Community of Breeders of Asexually Reproduced Ornamental and Fruit Varieties
DHE: Distinción, Homogeneidad, Estabilidad
DUS: Distinctness, Uniformity, Stability
EDV: Variedades Esencialmente Derivadas
EFV: Especies de la Familia Vitáceas no del género *Vitis*
EGV: Especies del Género *Vitis* no *vinifera*
EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg
EST: Expression Sequence Tag
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Fst: Índice de Fijación
HPD: Híbridos Productores Directos
Ho: Heterocigosidad observada
IMIDA: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
IMIDRA: Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario
INIA: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias
IPGRI: International Plant Genetic Resources Institute
ISF: Federación Internacional de Semillas
LR: Likelihood Ratio
MAAP: Polimorfismo de "Amplicones" Múltiples Arbitrarios
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MCMC: Cadena de Markov Monte Carlo
NCBI: National Center of Biotechnology Information
OCVV: Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales
OEVV: Oficina Española de Variedades Vegetales
OIV: Organización Internacional de la Viña y el Vino
OMC: Organización Mundial de Comercio
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI: Probabilidad Total de Identidad
PTI: Portainjertos
PVPP: Poli Vinil Poli Pirrolidona
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SDL: seedless (sin semillas)
SSR: Repeticiones de Secuencias Simples
STMS: Sequence-Tagged Microsatellite Site
STS: Sitios Marcados por Secuencia
UPOV: Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. VITICULTURA	1
1.1.1. Origen de la vid.....	1
1.1.2. Encuadre taxonómico de la vid.....	4
1.1.3. Clasificación de las variedades de vid por el destino de sus productos	5
1.1.4. Cultivo de la vid en el mundo y en España.....	7
1.1.5. Diversidad genética de la vid	9
1.1.5.1. Variedad-población, sortogrupos, variedad y clon.....	9
1.1.5.2. Homonimias y sinonimias	11
1.1.5.3. Colecciones de variedades de vid	11
1.2. CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES DE VID	12
1.2.1. Ampelografía.....	13
1.2.2. Métodos morfométricos.....	15
1.2.3. Técnicas moleculares bioquímicas	15
1.2.4. Técnicas moleculares basadas en el análisis de ADN	15
1.2.4.1. Microsatélites.....	17
1.2.4.1.1. Características de los microsatélites	18
1.2.4.1.2. Uso de los STMS para caracterización de vid	20
1.3. MARCO LEGAL	22
1.3.1. Principios básicos sobre las variedades de vid.....	22
1.3.1.1. Registro de Variedades Comerciales	23
1.3.2. Protección legal de las obtenciones vegetales	23
1.3.2.1. Normativa	24
1.3.2.2. Protección y defensa legal	29
1.3.2.2.1. Exámenes DHE	30
1.3.2.2.2. Identificación, distinción y derivación esencial	31
1.3.3. Posiciones frente al empleo de los marcadores moleculares en la protección y defensa legal de variedades vegetales	34
1.3.3.1. En la protección legal (exámenes DHE)	34
1.3.3.2. En la defensa legal (identificación y establecimiento de la derivación esencial)	37
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. MATERIALES	41

3.1.1.	Material vegetal	41
3.1.1.1.	Estudio de Distinción	41
3.1.1.2.	Estudio de Identificación.....	44
3.1.1.3.	Estudio de Homogeneidad y Estabilidad.....	44
3.1.1.3.1.	Selección de variedades	44
3.1.1.3.2.	Toma de muestras	46
3.1.1.4.	Establecimiento de descriptores microsatélite.....	71
3.2.	MÉTODOS	73
3.2.1.	Extracción de ADN.....	73
3.2.2.	Estimación de la calidad y cantidad del ADN extraído.....	73
3.2.3.	Métodos de análisis de microsatélites (STMS) de genoma nuclear	74
3.2.3.1.	Amplificación de las secuencias STMS mediante PCR.....	74
3.2.3.2.	Determinación del tamaño de los alelos de los STMS	74
3.2.3.3.	Categorización de alelos para los estudios de Distinción e Identificación.....	76
3.2.4.	Análisis de microsatélites adicionales	78
3.2.5.	Diseño experimental	79
3.2.5.1.	Protección legal	79
3.2.5.1.1.	Estudio de Distinción	79
3.2.5.1.2.	Estudio de Homogeneidad y Estabilidad	82
3.2.5.2.	Defensa legal.....	84
3.2.5.2.1.	Estudio de Identificación	84
3.2.5.2.1.1.	Análisis matemático de la coincidencia.....	85
3.2.5.2.1.2.	Análisis de estructura.....	86
3.2.5.2.2.	Establecimiento de la derivación esencial.....	89
3.2.6.	Elaboración de descriptores microsatélite.....	89
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
4.1.	SISTEMA DE 9 MICROSATÉLITES EMPLEADO	91
4.1.1.	Extracción y cuantificación de ADN.....	91
4.1.2.	Selección de los microsatélites.....	92
4.1.3.	Diseño de la PCR múltiple para los 9 loci microsatélite	95
4.1.4.	Análisis en un analizador genético	98
4.2.	ESTUDIO DE DISTINCIÓN.....	101

4.2.1. Estudio de una colección para el cálculo de la distancia mínima.....	101
4.2.2. Cálculo de la distancia mínima	108
4.2.3. Utilidad del sistema de 9 loci microsatélite para el estudio de Distinción	114
4.3. ESTUDIO DE IDENTIFICACIÓN.....	118
4.3.1. Idoneidad de la colección utilizada	118
4.3.2. Análisis de la estructura de la colección	120
4.3.3. Análisis matemático de la coincidencia genotípica.....	133
4.3.4. Utilidad del sistema de 9 loci microsatélite y de la colección de referencia, para el estudio de Identificación.....	138
4.4. ESTUDIO DE HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD	139
4.4.1. Evaluación de la selección varietal	140
4.4.2. Muestreo para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad.....	143
4.4.2.1. Errores de muestreo	147
4.4.3. Evaluación de los datos microsatélite obtenidos	149
4.4.3.1. Análisis de las diferencias superiores a 1 nucleótido	163
4.4.4. Identificación de posibles quimeras en las variedades Merlot y Cardinal	175
4.4.4.1. Consecuencias del quimerismo en los exámenes de Homogeneidad y Estabilidad	181
4.4.5. Utilidad del sistema de 9 loci microsatélite para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad	182
4.5. PROPUESTA DE UTILIZACIÓN DEL SISTEMA Y TOMA DE DECISIONES.....	183
4.5.1. Defensa legal	183
4.5.1.1. Identificación de variedades de vid	183
4.5.1.2. Establecimiento de la derivación esencial.....	186
4.5.2. Protección legal.....	188
4.5.2.1. Exámenes DHE	188
4.5.2.2. Manejo de una colección de referencia.....	190
4.5.3. Análisis crítico individualizado de los 9 loci microsatélite	190
4.6. PROPUESTA DE 5 NUEVOS DESCRIPTORES MICROSATÉLITE.....	192
5. CONCLUSIONES	199
6. BIBLIOGRAFÍA	203

7. ANEXOS	211
7.1. ANEXO I.....	211
7.2. ANEXO II.....	223
8. SUMMARY	229

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. VITICULTURA

1.1.1. Origen de la vid

En la actualidad, la vid es uno de los mayores cultivos hortícolas del mundo, el cual ha estado estrechamente relacionado con el desarrollo de la cultura humana. Su principal producto, el vino, fue considerado como una bebida de los dioses, jugando también un papel muy importante en la cultura mediterránea.

En This et al. (2006) se recoge una reciente revisión histórica acerca de este cultivo. La vid pertenece a la familia *Vitaceae*, la cual está compuesta por casi mil especies, agrupadas en 17 géneros. La mayoría de ellos se encuentran ubicados en regiones intertropicales, siendo muchas de sus plantas empleadas ornamentalmente. El único género de importancia agronómica lo constituye el género *Vitis*, formado aproximadamente por 60 especies interfértiles representadas casi todas ellas en el Hemisferio Norte. Entre ellas, *Vitis vinifera* es la única especie empleada en la producción mundial de vino. Es la única especie del género *Vitis* nativa de Eurasia, lo que parece indicar que su primera aparición data de hace aproximadamente 65 millones de años. Dos formas coexisten hoy en día en Eurasia y en el Norte de África: la forma cultivada, *V. vinifera* subespecie *vinifera* (o *sativa*) y la forma silvestre *V. vinifera* subespecie *silvestris* (o *sylvestris*). Esta separación histórica en subespecies pudo basarse en diferencias morfológicas debidas al aislamiento geográfico u ocurrir como resultado de la domesticación de la vid por los humanos a lo largo del tiempo. Hoy en día existen miles de variedades pertenecientes a las formas cultivadas de *Vitis vinifera*, clasificadas generalmente de acuerdo a sus productos finales: uvas para mesa, uvas para vinificación y uvas para pasificación. En contraste, las formas salvajes de *Vitis vinifera* son escasas, extendiéndose desde Portugal hasta Turkmenistán, y desde las riberas del Rin hasta los bosques del norte de Túnez. Se cree que estas formas salvajes son los antepasados de las variedades cultivadas en la actualidad. La domesticación de la vid parece estar muy ligada al descubrimiento del vino, no estando muy claro qué acto sucedió primero. Durante la domesticación de la vid, su biología sufrió cambios muy drásticos, dirigidos a asegurar un mayor contenido de azúcar en las uvas para una mejor fermentación, un mayor rendimiento y una producción más regular. En este proceso, los cambios sufridos en las bayas, en el tamaño de los racimos y el cambio de plantas dioicas (en las formas silvestres) a hermafroditas (en las formas

Introducción

cultivadas) fueron cruciales. También ocurrieron cambios en la morfología de las semillas, y aunque su importancia biológica es desconocida, son de gran utilidad para el estudio de restos arqueológicos, pudiéndose diferenciar si las semillas proceden de vides silvestres o de vides cultivadas. Se desconoce si esos cambios ocurrieron lentamente mediante cruzamientos sexuales, naturales o artificiales (selección humana), o por el contrario ocurrieron rápidamente a través de mutaciones, llevándose a cabo posteriormente los procesos de selección y propagación mediante reproducción vegetativa. Todavía existe la incertidumbre de cuando y donde tuvo lugar la primera domesticación y si existieron también domesticaciones secundarias independientes. Aunque las especies silvestres estuvieron probablemente presentes en muchos lugares de Europa durante el Neolítico, pruebas arqueológicas e históricas sugieren que la primera domesticación ocurrió en Oriente Próximo. La primera evidencia de la producción de vino fue encontrada en Irán, exactamente en el yacimiento neolítico de Hajji Firuz Tepe, situado al norte de los Montes Zagros, hacia el 7.400-7.000 a.C. Semillas de vides domésticas datadas del 8.000 a.C., fueron encontradas en Georgia y Turquía. Sin embargo, restos de semillas halladas en el Neolítico, en Europa Occidental, sugieren la explotación de la vid en esta época. También se encontraron restos de semillas de vides silvestres en asentamientos franceses de la Edad de Bronce.

Otros estudios que ponen de manifiesto posibles eventos de domesticación de la vid, son los llevados a cabo en Arroyo-García et al. (2006), y en Imazio et al. (2006). En el primero, se estudió el ADN cloroplástico tanto de muestras pertenecientes a *V. vinifera sativa* como a *V. vinifera sylvestris*. Éstas correspondían a distintos lugares geográficos: Península Ibérica, Europa Central, Norte de África, Italia, Balcanes, Europa del Este, Oriente Próximo y Oriente Medio. Los resultados obtenidos en este estudio, apuntan a la existencia de al menos dos posibles eventos de domesticación, uno en Oriente Próximo y otro en la región del Mediterráneo Occidental, el cual dio lugar a muchas de las variedades presentes actualmente en Europa Occidental. En Imazio et al. (2006) también se estudió el ADN cloroplástico de 141 variedades de vid, éstas eran representativas de 4 regiones geográficas distribuidas entre Oriente Medio y Europa Occidental. Los resultados alcanzados en este estudio sugieren la existencia de un único y común centro de domesticación para todos los cultivares europeos, el cuál estaría localizado en la región de Oriente Medio.

Desde los primeros lugares donde se llevó a cabo la domesticación, Oriente Próximo, hubo una extensión gradual facilitada por la multiplicación vegetativa a regiones adyacentes tales como Egipto y la Baja Mesopotamia (5.500-5.000 a.C.), y otra más dispersa alrededor del Mediterráneo siguiendo las principales civilizaciones (Asirios, Fenicios, Griegos, Romanos, Etruscos y Cartagineses), (This et al., 2006). El cultivo de la vid se extendió hasta China (Siglo II d.C.) y Japón (3.200 a.C.). Bajo la influencia de los romanos, *Vitis vinifera* se extendió a las islas y alcanzó muchas regiones templadas de Europa, llegando incluso hasta el norte de Alemania. Esta expansión a menudo seguía las principales rutas del comercio (ej. ríos tales como el Rin, el Ródano, el Danubio y el Garona). Al final del Imperio Romano, los lugares europeos donde se cultivaba la vid coinciden en su mayoría con los de hoy en día. Los romanos fueron los primeros en dar nombre a las variedades de vid, aunque es difícil relacionarlos con los nombres de las variedades actuales. En esa época, probablemente ya se distinguiría entre variedades de uva de mesa y de vino, así como los distintos colores que éstas pueden presentar.

En la Edad Media, la iglesia Católica reemplazó a los romanos en la difusión del cultivo de la vid hacia nuevas regiones, y facilitaron el intercambio de material vegetal a través de las cruzadas y con la expansión de su religión hacia el Norte de Europa. La extensión del Islam al Norte de África, España y Oriente Medio también jugó un importante papel en el esparcimiento de la vid (principalmente variedades de uva de mesa). Durante la Edad Media aparecieron nombres de variedades que todavía se siguen utilizando en la actualidad.

Siguiendo al Renacimiento (Siglo XVI), *Vitis vinifera* colonizó los países del Nuevo Mundo. Los misioneros la introdujeron en América, primero como semillas (fáciles de transportar) y después mediante esquejes desde sus países de origen (Francia, Alemania, España, Italia y Europa Oriental). Los esquejes también fueron introducidos en el siglo XIX en Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda, y un poco más tarde en el norte de África.

Al final del siglo XIX, después de varios milenios de expansión geográfica de la vid, aparecieron nuevos agentes causantes de enfermedades, tales como los hongos o la filoxera. Se extendieron desde América hasta Europa, causando la destrucción de muchos viñedos europeos, cambiando radicalmente la diversidad de esta especie, tanto en vides cultivadas como en vides silvestres. La diversidad presente hoy en día podría ser un pálido reflejo de la que existía antes de la llegada

Introducción

de la filoxera. La viticultura europea se libró de su extinción gracias a la introducción de varias especies no viníferas del género *Vitis* originarias de América, que fueron utilizadas como portainjertos y para la producción de híbridos interéspecíficos resistentes a enfermedades. Esos híbridos productores directos fueron ampliamente utilizados hasta la mitad del Siglo XX, siendo hoy en día muy escasos.

Desde finales de los años 50, el cultivo de la vid viene sufriendo otra drástica reducción de su diversidad, debido a la globalización del mercado del vino, favoreciendo la expansión de variedades mundialmente conocidas como Chardonnay, Cabernet sauvignon, Syrah y Merlot, y la desaparición de antiguas variedades locales.

De este modo, la diversidad de las variedades de vid presente en la actualidad, ha estado estrechamente influenciada por el ser humano. Hoy en día existen varios miles de variedades, la mayoría se encuentran recogidas en colecciones de variedades de vid.

1.1.2. Encuadre taxonómico de la vid

La familia *Vitaceae* pertenece al orden Rhamnales y jerárquicamente se clasifica en las siguientes categorías superiores: superorden *Celastranae*, subclase *Rosidae* (Rosiflorae), clase *Magnoliatae* (Dicotiledónea), subdivisión *Magnoliophytina* (Angio-spermae), división *Spermatophyta*.

Las plantas de esta familia son generalmente arbustos trepadores, con tallo vivaz y leñoso, con zarcillos opuestos a las hojas. Estas últimas son alternas y con estipulas, las flores son pequeñas, regulares y en general hermafroditas. Los estambres son opuestos a los pétalos y el pistilo tiene dos carpelos casi bilobulados. Algunas variedades poseen flores femeninas con estambres no funcionales denominados estambres reflejos. El fruto es una baya y la semilla, si la hay, es de testa dura y gruesa. De acuerdo con Galet (1967), dentro del género *Vitis* hay dos subgéneros o secciones:

Sección *Muscadinia*. Tienen zarcillos simples, $2n=40$ cromosomas, corteza adherente, nudos sin diafragma, bayas poco azucaradas y con una maduración escalonada. Son vides situadas en zonas cálidas y templadas del sudeste de América del Norte: EEUU y México. Incluye tres especies *V. rotundifolia* Michx, *V. munsoniana* Simpson y *V. popenoeii* Fen.

Sección Euvitis. Presenta zarcillos bifurcados o compuestos, $2n=38$ cromosomas, corteza exfoliable y nudos con diafragma. El grupo se divide en 11 series que, dependiendo de los autores, engloban entre 30 y 60 especies, incluyendo entre ellas *V. vinifera*. Hidalgo (1999) describe a la vid como un arbusto sarmentoso trepador, que se fija a tutores naturales o artificiales mediante órganos (zarcillos) de los que están provistos. Cuando faltan estos tutores se extiende sobre la superficie del terreno en una posición más o menos erguida ocupando extensiones de alguna consideración. En la planta se distingue una parte enterrada, formada por las raíces, cuyas extremidades se conocen con el nombre de “cabellera”, y una parte aérea en la que se reconocen el tronco, los brazos y los sarmientos, que duran varios años y en ellos se expanden las hojas, frutos y zarcillos, cuya duración normalmente no pasa de un año. La zona que une la parte subterránea y aérea se denomina “cuello”. Como ya se ha comentado, mientras que las variedades cultivadas de vid poseen en general flores hermafroditas, la subespecie silvestre es dioica, con plantas de flores masculinas y plantas de flores femeninas (Srinivasan y Mullins, 1976). Los frutos, bayas oligospermas agrupadas en racimos, están constituidos por una película exterior (el epicarpio) que se denomina hollejo, un mesocarpio (la pulpa) que rellena toda la uva, un máximo de cuatro pepitas situadas dentro del endocarpio, y el pincel (prolongación de los vasos conductores del pedicelo a través de los que se nutre la uva durante su formación).

1.1.3. Clasificación de las variedades de vid por el destino de sus productos

Las variedades de vid se pueden clasificar atendiendo a numerosos criterios: según su origen, su morfología, su distribución geográfica, etc., pero para los objetivos de este trabajo, resulta de mayor interés su clasificación de acuerdo al destino de sus productos. Así, se pueden distinguir tres tipos de variedades (Hidalgo, 1999):

Uvas para mesa

Corresponde a aquellas variedades que se aprecian más por las condiciones físicas y estructurales de sus frutos que por las características de sus mostos. En general son deseables los racimos grandes, bien conformados, de aspecto hermoso, con bayas sueltas de buen tamaño, pulpa crujiente, piel

Introducción

resistente, difícil desgrane, no excesivamente dulces y sabor fresco. Habitualmente, las uvas de mesa tienen un gran desarrollo de las pepitas, en tamaño y número, factor que si bien es negativo en cuanto a la calidad, está íntimamente ligado al crecimiento de las mismas.

Uvas para pasificación

Generalmente se utilizan variedades apirenas, aunque no en exclusiva. La apirenia o ausencia de semillas surge como consecuencia de mutaciones de yema en las vides cultivadas. Esta ausencia de semillas puede ocurrir por dos mecanismos: partenocarpia y estenospermocarpia (Hidalgo, 1999).

La pasificación es el único destino posible para las uvas sin semillas producidas por partenocarpia (tipo corinto), debido al pequeño tamaño de sus bayas. Este tipo de apirenia requiere que dos sucesos independientes se produzcan en el mismo individuo: el aborto de todos los óvulos y el desarrollo partenocárpico del fruto.

Las variedades apirenas estenospermocárpicas (tipo sultanina) pueden en principio utilizarse tanto para mesa como para pasificación. La mayoría de las variedades de interés comercial son de este tipo, y no son estrictamente variedades sin semillas: en ellas se produce fecundación, aunque el posterior desarrollo del embrión y/o del endospermo es incompleto y se interrumpe unas semanas después de la floración [Barrit, 1970, citado por (Carreño et al., 1997)]. Las bayas poseen esbozos de semillas rudimentarias, de tamaño muy pequeño, no lignificadas y, por tanto, no perceptibles por el consumidor.

Uvas para vino o mosto

El interés de la variedad se centra fundamentalmente en las características y la calidad de su mosto y las del vino a que da lugar. En general son variedades con racimos de tamaño medio a pequeño, apretado, con bayas de dimensiones reducidas o pequeñas, piel fina, elevado contenido en azúcar y pepitas escasas en número y tamaño.

La clasificación no puede ser rigurosa puesto que muchas variedades pueden servir para varios usos según las circunstancias. Por ejemplo, la variedad "Moscatel de Málaga" se utiliza para los tres fines citados.

El mercado de la uva de vino es mucho más importante económicamente, y estable, con respecto a las variedades usadas, porque en muchos casos los productores de vino de un determinado lugar tienen que usar ciertas variedades para conseguir una determinada etiqueta de “calidad”. Así, los esfuerzos de mejora genética están principalmente centralizados en la selección clonal. El mercado de la uva de mesa es mucho más dinámico, y la mayoría de las variedades que están siendo cultivadas en la actualidad, son diferentes con respecto a las cultivadas hace 30 años. El cruzamiento entre diferentes variedades está mucho más extendido en las uvas de mesa, y las nuevas obtenciones de interés son rápidamente distribuidas a otros países productores. Como consecuencia de ello, la protección legal de variedades de vid (similar a una patente o a una propiedad intelectual) afecta principalmente a estas variedades de uva de mesa.

1.1.4. Cultivo de la vid en el mundo y en España

El cultivo de la vid se conoce en España desde la llegada de los fenicios, y se extendió con rapidez hasta llegar a ocupar más de dos millones de hectáreas a finales del siglo XIX. Las primeras referencias fehacientes del cultivo de la vid en tierras españolas, se remontan al año 520 a.C., aunque la expansión de este cultivo y la producción del vino no llegarían a completarse hasta la dominación romana, e incluso posterior a ella en Cantabria y Asturias.

La superficie mundial de viñedo ha ido disminuyendo desde 1.986, con cerca de 9 millones de hectáreas, hasta llegar a una cierta estabilización en los últimos años, en cerca de los 8 millones de hectáreas (ha) (estadística de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), datos hasta 2.004). Según las estadísticas de la OIV presentadas por su director general en el XXIX Congreso Mundial de la Viña y el Vino celebrado en Logroño en Junio del 2.006, el 59% de la superficie vitivinícola está en Europa, el 22% en Asia, el 12% en América, el 5% en África y el 2% en Oceanía. España, con 1,1 millones de hectáreas, representa el 14,86% de la superficie mundial; seguida de Francia, con 890.000 (11,21%); Italia, 847.000 (10,66%); Turquía, 570.000 (7,18%); China, 487.000 (6,13%); Estados Unidos, 399.000 (5,02%); Irán, 296.000 (3,73%); Portugal, 250.000 (3,15%); Rumanía, 218.000 (2,74%); y Argentina, 217.000 (2,73%).

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), según su Anuario de Estadística Agroalimentaria de 2.004, correspondiente a datos del año 2.003,

Introducción

indica que España con más de un millón de hectáreas (1.172.797 ha), es el país del mundo con mayor superficie cultivada. De ellas, 22.711 ha (1,9%) se dedican a la producción de uva de mesa, 1.142.368 ha (97,4%) a la producción de uva para vinificación, 4.120 ha (0,35%) a la producción de uva para pasificación y 3.598 ha (0,30%) para viveros de viñedo. El total de la producción de uva en España está representado por 7.248.182 Tm. De ellas, 320.617 Tm (4,42%) pertenecen a uva de mesa, 6.919.884 Tm (95%) a uva para vinificación y 7.680 Tm (0,10%) a uva para pasificación. Como se puede observar el porcentaje de uva de mesa aumenta cuando se refiere a producción. Ello se debe al mayor rendimiento de la superficie en producción dedicada a la uva de mesa, por las condiciones de cultivo de cada tipo de explotación.

Comparando con datos de 1.996 de la OIV, se puede indicar que la producción total de uva en España contaba con casi 5 millones de Tm, mientras que en el 2.003 presenta casi 7 millones, mostrando en estos dos años prácticamente las mismas hectáreas de superficie de cultivo (cerca de 1,2 millones de ha), como ya se ha indicado. En 1.996 las hectáreas dedicadas en España a la producción de uva de mesa eran 34.000 ha, mientras que en el 2.003 el valor es de 22.711 ha. Aún presentando menos hectáreas de cultivo, en el 2.003 hay un mayor rendimiento en cuanto a la producción, debido principalmente, a la mejora de las condiciones de cultivo. En cuanto a la uva de vinificación, en 1.996, 1.123.308 ha se dedicaron a su producción, prácticamente el mismo número que en el 2.003 (1.142.368 ha). Con respecto a la producción de uva destinada para pasificación, en 1.996, 3.764 ha estaban dedicadas a este fin, siendo este valor muy parecido al presentado en el año 2.003 (3.598 ha).

Según datos del MAPA, correspondientes al año 2.003, las principales comunidades autónomas españolas destinadas a la producción de uva de mesa, vino y pasificación, respectivamente, serían las siguientes:

Uva de mesa: Comunidad Valenciana con casi 182.000 Tm (unas 178.000 Tm son producidas en Alicante), Murcia con casi 97.000 Tm y Andalucía con casi 36.000 Tm (unas 21.000 Tm son producidas en Sevilla).

Uva de vino: Castilla La Mancha con más de 3.600.000 Tm (las provincias más productivas son Ciudad Real con casi 1.500.000 Tm y Toledo con un poco más de 910.000 Tm), Extremadura con casi 625.000 Tm (unas 607.000 son producidas en

Badajoz) y Cataluña (siendo las provincias más productivas Tarragona con casi 228.000 Tm y Barcelona con casi 219.000 Tm).

Uva para pasificación: Andalucía (Málaga) con 7.548 Tm y Extremadura (Badajoz) con 132 Tm.

Con respecto al comercio exterior de estos tres tipos de uvas en España, los datos del MAPA correspondientes al año 2.003 fueron los siguientes:

Uva de mesa: España exportó 130.637 Tm de un total de 320.617 Tm, lo que significa un 40% de toda la producción. Los países receptores de esta uva de mesa son, fundamentalmente, de la Unión Europea (94,5% del total): Alemania (unas 33.500 Tm), Francia (unas 23.500 Tm), seguidos de Reino Unido (unas 29.300 Tm) y Portugal (unas 22.000 Tm).

Uva de vino: España exportó casi 265.000 Tm de uva de vinificación de un total de 6.919.884 Tm, lo que significa únicamente un 4% de toda la producción.

Uva para pasificación: únicamente el 10% de la producción total de estas uvas (7.680 Tm) se exportó a países extranjeros.

1.1.5. Diversidad genética de la vid

1.1.5.1. Variedad-población, sortogrupo, variedad y clon

Hasta no hace mucho tiempo, atendiendo a su origen, se podían distinguir dos tipos de variedades:

Variedades de origen policlonal: son aquellas que, aunque incluyen plantas que proceden de embriones diferentes, mantienen caracteres comunes, responsables de que sean reconocidas como pertenecientes a la misma variedad. Estas variedades, tradicionalmente se han denominado con el término de *variedad-población*. Según Cervera et al. (2001), el origen policlonal de una variedad probablemente corresponde a variedades pobremente caracterizadas, genética y morfológicamente y que, como consecuencia, incluyen distintas homonimias (variedades distintas designadas con el mismo nombre). En general, no se encuentran muchos ejemplos de variedades policlonales, aunque uno de ellos lo podría constituir el caso de las malvasías: se pueden encontrar diferentes tipos, como la riojana, la subirat parent o la de Sitges, entre otras.

Variedades de origen monoclonal: en la actualidad, todas las nuevas variedades de vid presentan un origen monoclonal. Están constituidas por individuos procedentes de un mismo embrión, con un genotipo original, y son por tanto genéticamente idénticos, salvo por las mutaciones somáticas, las cuales pueden ser estables en el tiempo y transmitirse a la descendencia a través de la reproducción vegetativa. Debido a estas mutaciones, no todos los individuos procedentes de un mismo embrión pertenecen a la misma variedad. En las mutaciones somáticas se basa la selección clonal dentro de estas variedades, monoclonales en su origen: la búsqueda de plantas con pequeñas diferencias genéticas, en un fondo esencialmente idéntico, que pueden provocar grandes diferencias agronómicas. A partir de esas plantas se establecen distintos clones de una variedad. En ocasiones, mutaciones somáticas evidentes, como las que afectan al color o tamaño de la baya, la forma del racimo, o al tiempo de maduración, dan lugar a clones que, por su importancia, se constituyen en nuevas variedades. Utilizando un término anglosajón, son los denominados “sports”, que son genéticamente idénticos a la variedad inicial excepto en uno o unos pocos caracteres. Este hecho es antiguo en viticultura, Negrul en 1946, citado por Bourquin et al. (1993) propuso el concepto de “sortogrupo”, donde se incluyen una variedad dada junto a todas las originadas a partir de un mismo embrión. Así, por ejemplo, pertenecen al mismo sortogrupo las variedades Pinot gris, Pinot noir, Pinot blanc y Pinot meunier (Regner et al., 2000a).

Cuando los “sports” derivan de una variedad inicial protegida legalmente, se denominan variedades esencialmente derivadas (EDV). Este concepto se introdujo en el Convenio de la UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales) por el Acta de 1991, para mantener un sólido sistema de protección, con el fin de promover la obtención de nuevas variedades vegetales.

Aparte de la variabilidad intravarietal originada por el origen policlonal y por las mutaciones somáticas, puede existir variabilidad causada por una heterogeneidad en el estado sanitario de las plantas que constituyen la variedad. Desde el punto de vista estrictamente genético, esta es una variabilidad ficticia, pero puede dar lugar a problemas graves, tanto en la selección clonal como en la caracterización. Especialmente importantes son las virosis, debido a que no existen remedios curativos para ellas. Actualmente, en España, los virus que afectan más gravemente a los cultivos de vid son los siguientes: entrenudo corto, enrollado,

jaspeado y madera rizada (Ventura Padilla (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario-IMIDA), comunicación personal).

1.1.5.2. Homonimias y sinonimias

La extensión del cultivo de la vid en el espacio y en el tiempo también ha generado una gran confusión en las denominaciones de las variedades, resultando muy común la existencia de sinonimias y homonimias. La primera hace referencia a que una misma variedad, puede presentar diversos nombres o sinónimos según el lugar donde se cultive. La variedad en cuestión es denominada oficialmente con el nombre más extendido, llamándose al resto de los nombres, sinónimos de esa variedad. Así, los nombres de Tempranillo, Tinto fino, Cencibel, Tinta de Toro, Tinta del País y Ull de Llebre (ojo de liebre) corresponden a la misma variedad en distintas localizaciones geográficas españolas, como por ejemplo, Rioja y Alicante, Madrid, La Mancha, Zamora, Ribera de Duero y Penedés, respectivamente (Ibáñez et al., 2006a).

En ocasiones, a variedades distintas se las conoce con el mismo nombre (homonimias), debido a errores o denominaciones populares. Así por ejemplo, en Guadalajara y en Madrid, a veces se denomina Malvar a la variedad Airén. También la variedad Marfal, cultivada en Extremadura, se ha confundido en ocasiones con Malvar, debido a la similitud ortográfica (Ibáñez et al., 2006b).

Debido a la gran confusión existente en la denominación de las variedades de vid, tanto en el territorio nacional como en el internacional, resulta extremadamente difícil en la actualidad, conocer el número real de variedades diferentes de vid. Por este motivo, entre otros, resulta fundamental la existencia de colecciones de variedades de vid, donde se conserva y estudia el máximo de diversidad genética de las especies cultivadas y sus afines silvestres.

1.1.5.3. Colecciones de variedades de vid

Según Alleweldt y Possingham (1988) existen aproximadamente unas 10.000 variedades distintas, de las cuales, la mayoría se encuentran recogidas en colecciones de variedades de vid distribuidas por todo el mundo. En cambio, en This et al. (2006), basándose en resultados obtenidos mediante perfiles de ADN, se

Introducción

especula que actualmente, el número más acertado de variedades diferentes de vid sería 5.000, estando muchas de ellas estrechamente relacionadas.

Aunque todas las colecciones varietales pueden tener la misma aplicación: fuente de material genético para la obtención de nuevas variedades o colección de testigos varietales, cuando dicho material tiene que reunir unas determinadas características sanitarias y garantías de autenticidad varietal, se estaría hablando de colecciones de referencia.

Las colecciones de referencia básicas en España son las de la OEVV (Oficina Española de Variedades Vegetales), ubicada en Aranjuez y, la de reserva, en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid. Actualmente se está preparando una nueva colección de referencia completa en Bullas (Murcia) por el Centro de Ensayos de Evaluación de Variedades del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), en colaboración con el IMIDA y la OEVV.

En España hay grandes colecciones varietales, pudiéndose decir que casi todas las Comunidades Autónomas disponen de ellas, pero debemos destacar las de la Finca de El Encín (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario-IMIDRA), situada en Alcalá de Henares (Madrid), y El Rancho La Merced (Centro de Investigación y Formación Agraria-CIFA), en Jerez de la Frontera (Cádiz), por ser las más importantes, y ser fuente de otras muchas implantadas o en proceso de implantación. En dichas colecciones, se localiza posiblemente todo el panorama varietal español, además de un gran número de variedades extranjeras.

1.2. CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES DE VID

Como se ha señalado anteriormente, la vid es uno de los cultivos más antiguos que se conocen, y existe una gran cantidad de variedades en todo el mundo. Muchas de estas variedades se cultivan desde hace siglos, y algunas son comunes a muchas localizaciones geográficas distintas. Es un hecho ancestralmente conocido por el hombre que distintas variedades de vid dan lugar a diferentes tipos de vino, lo que unido a los diferentes gustos existentes, dio lugar a una necesidad: la identificación, lo más precisa posible, de las distintas variedades disponibles en cada región vitícola. Esta necesidad se resolvió inicialmente, como en la totalidad de especies vegetales y animales, de la forma más natural e intuitiva

posible: mediante la descripción y comparación de determinados caracteres visibles. Con el tiempo, el estudio de la vid se hizo más sofisticado y alcanzó un rango elevado, pasando a constituirse en una ciencia propia: la Ampelografía (del griego *ámpelos*, vid).

1.2.1. Ampelografía

Tradicionalmente, se han utilizado métodos subjetivos de descripción de los caracteres morfológicos de los órganos de las vides. El International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), que es un centro del Grupo Consultivo sobre Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) y que está vinculado a la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), editó los “Descriptor para la vid (*Vitis* spp.)” en 1.997, (IPGRI et al., 1997). En un intento de consenso, las listas de descriptor se realizaron en colaboración con la OIV y la UPOV. Los descriptor morfológico seleccionados para la identificación de variedades de vid deben ser fácilmente detectados a simple vista y deben servir para hacer una discriminación fácil y rápida entre fenotipos. Generalmente son caracteres heredables, que se expresan igualmente en todos los ambientes.

Actualmente estos tres organismos: IPGRI, OIV y UPOV presentan descriptor propios, disponen de una lista de caracteres que se refieren a aquellas características de la planta suficientemente estables para ser válidas a la hora de definir y diferenciar las distintas variedades. Estas listas de caracteres coinciden en una gran parte pero no llegan a ser completamente idénticas, pues reflejan los criterios y alternativas elegidos por los distintos grupos de expertos que han conformado cada uno de los organismos internacionales mencionados. Durante los años 2.006 y 2.007, se han celebrado reuniones entre la UPOV y la OIV para tratar de unificar los descriptor morfológico seleccionados para la identificación de variedades de vid.

En cada descriptor, a cada carácter se le adjudica un código. Los niveles de expresión que pueden presentar cada uno de ellos se corresponden con dígitos enteros entre 1 y 9, y, con el fin de facilitar la determinación de estos niveles, se señalan variedades que sirven de referencia para cada uno.

Tanto para la protección de variedades como para la realización de los Registros de Variedades Comerciales (referencia oficial en cuanto al panorama

Introducción

varietal de la especie) en el ámbito de la Unión Europea, se ha fijado el descriptor UPOV como referencia obligada, si bien es frecuente, tener en cuenta el de la OIV, y para algunos cometidos de investigación el del IPGRI.

La descripción ampelográfica mínima de una variedad de vid, de acuerdo con la OIV, puede efectuarse con 40 caracteres, mientras que para la descripción completa son necesarios 130. En cualquier caso se incluyen caracteres de todas las partes del ciclo vegetativo de la planta, así como algunos fenológicos. Los órganos de la planta sobre los que se estudian los diversos caracteres de los descriptores son los siguientes: sumidad o pámpano joven, hoja joven, hoja adulta, pámpano, sarmiento, inflorescencia y flor, racimo, baya y semilla.

Entre los tratados clásicos de Ampelografía cabe destacar los desarrollados por Viala y Vermorel (1901) y Galet (1956-1964). En el ámbito nacional, merece resaltarse el trabajo de Borrego et al. (1990) y Rodríguez Torres (2001).

Pese a resultar indispensable, la Ampelografía adolece de unas características que limitan su utilidad frente a otras técnicas más recientes:

- Subjetividad: pese a la cuidadosa selección de los descriptores, sigue existiendo un cierto factor de subjetividad en la caracterización morfológica.
- Largo tiempo necesario para completar la descripción: desde que se inicia una plantación, pueden pasar 4 años hasta que las plantas estén listas para ser descritas. La descripción abarca un ciclo vegetativo completo de la planta, lo que implica un mínimo de cuatro visitas del ampelógrafo a la plantación a lo largo de unos seis meses. Además, debido a diferencias ambientales, el estudio debe realizarse durante varios años.
- El número de caracteres a estudiar es limitado, por lo que, dado el gran número de variedades de vid, no siempre es posible la identificación inequívoca. Ampliar la lista mínima a otros caracteres conlleva riesgos, pues muchos son susceptibles a las diferencias ambientales, lo que aumenta el riesgo de errores en la identificación.
- Los distintos tipos de poda afectan a los caracteres morfológicos de la planta, haciendo que los resultados no siempre sean comparables.

1.2.2. Métodos morfométricos

Se han buscado una serie de caracteres susceptibles de cuantificación estricta y objetiva, con la finalidad de eliminar la subjetividad del operador. Así nació la Ampelometría, método que complementa los estudios ampelográficos. Está basado en la descripción cuantitativa y en el análisis e interpretación de la forma de las hojas mediante el uso de un digitalizador, que facilita tanto las mediciones de longitudes y ángulos presentes en las hojas, como el procesamiento de los datos. En resumen, se trata de un método de simple y rápida aplicación, que sustituye en parte al trabajo del operador en el campo con el fin de identificar una variedad (Cabello et al., 2000).

1.2.3. Técnicas moleculares bioquímicas

Hace algunos años, fueron bastante utilizadas técnicas moleculares con las que se obtenían estimaciones de la variabilidad de variedades de vid atendiendo a caracteres de tipo bioquímico, tales como isoenzimas de hoja y sarmiento, y proteínas de endospermo. Hoy en día, éstas técnicas prácticamente han sido reemplazadas por aquellas basadas en el estudio de los ácidos nucleicos.

1.2.4. Técnicas moleculares basadas en el análisis de ADN

Las técnicas moleculares permiten estudiar polimorfismos en el ADN, origen de toda la variación genética, y constituyen por tanto una aproximación más fiable para determinar las diferencias entre variedades o especies. Además evitan problemas asociados con influencias medioambientales, factores fisiológicos y expresión específica de tejido y desarrollo.

El genoma de la vid acaba de ser secuenciado a través de un proyecto franco-italiano y se encuentra libremente disponible para todo el mundo entre otras, en la página web: www.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_ML/calendrier.html. La vid posee un tamaño genómico de 475 Mpb organizado en 19 cromosomas ($2n=38$). Es aproximadamente tres veces mayor que el tamaño del genoma más pequeño conocido en plantas, perteneciente a *Arabidopsis thaliana* (145 Mpb), similar al del arroz [*Oryza sativa* (419-463 Mpb)], y cinco veces más pequeño que el del maíz [*Zea mays* (2.292-2.716 Mpb)] (Lodhi y Reisch, 1995).

Introducción

El número de secuencias nucleotídicas totales presentes en el genoma de la vida, y publicadas en el NCBI-National Center of Biotechnology Information (USA) es de 555.200, la mayoría de estas secuencias (320.503) son ESTs (Expression Sequence Tags-secuencias del genoma que se expresan como ARN). Dentro de estas 555.200 secuencias nucleotídicas totales, 17.806 son secuencias unigenes.

La secuencia de ADN del genoma de una especie sufre a lo largo de su evolución mutaciones puntuales, deleciones y/o reorganización de fragmentos cromosómicos. Dada la dispersión de las secuencias codificantes en el genoma de los organismos superiores, la mayoría de estos cambios se acumulan en las regiones no codificantes. Los cambios ocurridos en el transcurso de la evolución en secuencias codificantes están sujetos a presión de selección, por lo que según para qué estudios, interesa trabajar con uno u otro tipo de secuencias, siendo las que afectan a regiones no codificantes de gran utilidad para análisis de identidad.

A partir de los años 70, aparecieron los llamados “marcadores moleculares”, que consisten en sistemas polimórficos basados en la detección de pequeñas diferencias existentes en las secuencias del ADN. Se trata por tanto de “polimorfismos moleculares” relativos a diferencias de bases nucleotídicas que se pueden detectar por una gama diversa de técnicas y que se pueden utilizar como alelos moleculares. Normalmente, se analiza un pequeño fragmento del ADN, que puede o no contener genes.

Los primeros marcadores utilizados fueron los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); una técnica laboriosa que inicialmente requería el empleo de materiales radiactivos, y no es fácilmente automatizable.

En los últimos años ha sido ampliamente utilizada la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite la amplificación de fragmentos específicos, hasta concentraciones muy elevadas, a partir de pequeñas cantidades de ADN molde. Para ello es necesario, además del ADN molde, una ADN polimerasa termoestable, nucleótidos y unos pequeños fragmentos monocatenarios de ADN que por complementariedad de bases se pueden unir al ADN molde y sirven de cebadores a la polimerasa. A partir de dos de estos cebadores que cumplan determinados requisitos, la polimerasa copia el fragmento contenido entre ellos. Este proceso se repite muchas veces, y en cada nuevo ciclo el fragmento recién sintetizado puede servir como molde; así el resultado es una amplificación exponencial de dicho fragmento. La especificidad del fragmento amplificado viene

dada por los cebadores, moléculas con secuencias complementarias a alguna zona del ADN molde. Dependiendo de la secuencia del ADN molde, un cebador concreto podrá o no unirse a él, dando lugar o no a la amplificación del fragmento determinado.

Cuando no se analiza una secuencia determinada, se utilizan cebadores de secuencia arbitraria, lo que genera amplificación de múltiples regiones polimórficas, que se han denominado MAAP (Polimorfismo de “Amplicones” Múltiples Arbitrarios), entre ellas se encuentran los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990), (Welsh y McClelland, 1990). El análisis de RAPD ha sido ampliamente utilizado en los últimos años debido a sus enormes ventajas en cuanto a su facilidad de uso, rapidez, mínimo requerimiento de muestra de ADN, economía y disponibilidad de un número ilimitado de cebadores útiles para detectar variabilidad. Sin embargo, presenta el inconveniente de la falta de codominancia, es decir, no es posible descifrar la heterocigosidad de los loci observados y adolece de falta de repetitividad cuando varían las condiciones experimentales. Esto hace plantear dudas, cuando de lo que se trata es de identificar variedades de vid con facilidad. Debido a ello, se han desarrollado técnicas alternativas que pueden paliar en parte este problema.

Una de esas técnicas serían los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos et al., 1995). Se basa en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción obtenidos en una digestión total de ADN genómico con enzimas de restricción. Presenta un grado de reproducibilidad mucho mayor que los RAPD. Aunque los AFLP, por su parte, también son unos marcadores de tipo dominante y su nivel de complejidad técnica es más alto que el de los RAPD, lo que representa una desventaja.

Frente a ellos, los microsatélites presentan una serie de características, detalladas a continuación, que los convierten en unos marcadores moleculares idóneos para la caracterización de variedades de vid entre los disponibles en la actualidad.

1.2.4.1. Microsatélites

En IPGRI et al. (1997), además de los “Descriptor para la Caracterización”, basada en el estudio de características morfológicas, estaban

reflejados los “Descriptores para la Evaluación”, de menor importancia, los cuales incluían a los microsatélites entre los marcadores moleculares. La situación hoy en día, diez años más tarde, ha cambiado considerablemente: muchos institutos de la vid utilizan los microsatélites como marcadores para identificar sus variedades, además de, o en vez de, las descripciones morfológicas. La OIV acaba de incorporarlos a su sistema como descriptores para la caracterización.

1.2.4.1.1. Características de los microsatélites

Los microsatélites consisten en una pequeña unidad de repetición, generalmente de menos de 4 nucleótidos, que puede estar repetida un número variable de veces en distintos puntos del genoma, normalmente con longitudes menores de 100 pb cada locus. También se llaman por ello repeticiones de secuencias simples (SSR). Desde su descubrimiento se intuyó la utilidad que estas secuencias podían tener como marcadores polimórficos (Tautz, 1989).

En Thomas y Scott (1993), se demostró que las secuencias repetidas presentes en el genoma de la vid (microsatélites, minisatélites, genes en tándem y secuencias altamente repetidas), son especialmente útiles para la identificación de cultivares de esta especie. Cabe destacar que, como otros eucariotas, el genoma de la vid es rico en secuencias microsatélites. En concreto observaron que las repeticiones de dinucleótidos (GA) y (GT) eran muy comunes y aparecían dispersas en el genoma, frente a repeticiones de tri o tetranucleótidos (CAC, GACA, GATA), que estaban en menor proporción.

Los microsatélites son muy útiles como marcadores genéticos cuando se utilizan como “Sitios Marcados por Secuencia o STS”, denominados en este caso particular STMS “Sequence-Tagged Microsatellite Site”. Para su análisis, es necesario determinar previamente las secuencias que flanquean a la repetición. A partir de las mismas se pueden diseñar cebadores específicos para cada locus, y obtener así por amplificación mediante PCR los distintos alelos para cada locus microsatélite particular. Si hay variación de un individuo a otro en el número de veces que la unidad está repetida, se observará una diferencia entre ambos en el tamaño del fragmento amplificado. Dado que la vid es diploide, se obtienen normalmente dos fragmentos amplificados (dos alelos) para cada individuo por locus, excepto en los homocigotos. De esta manera se puede establecer, para cada STMS, la composición alélica de cada variedad.

El polimorfismo se genera por un mayor o menor número de repeticiones de la unidad básica. Se han propuesto dos mecanismos para explicar cómo se generan las diferencias en longitud de los distintos alelos: el deslizamiento de las hebras complementarias de ADN durante la replicación del mismo (Levinson y Gutman, 1987), y errores durante el sobrecruzamiento en la meiosis, ambos sucesos pueden co-existir en la misma variedad y en el mismo locus (Riaz et al., 2002). Probablemente ambos contribuyen a la creación de variabilidad en los microsatélites (Ortiz, 1998), aunque el primero parece ser predominante (Wolff et al., 1989).

Además de estas mutaciones producidas por el aumento o disminución de repeticiones de la unidad básica, hay que tener en cuenta las mutaciones que producen alelos nulos (Regner et al., 2000b), (Crespan et al., 1999), (Bowers et al., 1996), (Sanchez-Escribano et al., 1999) etc. Los alelos nulos aparecen al producirse modificaciones en la secuencia diana de los cebadores, impidiendo la hibridación con el ADN molde. Por lo tanto, esas regiones no son amplificadas, con lo que no pueden ser observadas en el análisis. Este tipo de polimorfismo no es deseable, pues no es posible distinguir entre individuos heterocigóticos con un alelo nulo de los homocigóticos, y además, diferentes alelos nulos dan lugar al mismo fenotipo (ausencia de fragmento amplificado).

Los STMS tienen numerosas ventajas frente a otros tipos de marcadores moleculares:

- Polimorfismo muy elevado
- Análisis rápido y escrutinio de alelos fácil y objetivo
- Reproducibilidad muy alta
- Resultados transferibles entre laboratorios
- Herencia mendeliana codominante y por ello permiten análisis de genealogías
- No están influidos por el ambiente

Sin embargo, tienen el inconveniente de requerir el conocimiento previo de las secuencias flanqueantes de los loci microsatélite para poder diseñar los cebadores específicos. Naturalmente esto no es necesario si, como es el caso de la vid, ya se cuenta con un número suficiente de loci microsatélite descritos y libremente disponibles, además de estar su genoma ya secuenciado en la

actualidad. La altísima variabilidad de los STMS hace que sean necesarios muy pocos para estudios de identificación.

1.2.4.1.2. Uso de los STMS para caracterización de vid

Para el análisis de la vid, los microsatélites fueron descritos por primera vez por Thomas y Scott (1993). Describieron 5 microsatélites y las secuencias necesarias para su amplificación mediante PCR (VVS1, VVS2, VVS3, VVS4 y VVS5). Estos cebadores, cuyas secuencias se obtuvieron de *Vitis vinifera* L. cv Sultana, amplificaban además de en esta especie en otras del mismo género, así como en híbridos interespecíficos. Con estos 5 STMS distinguieron 26 cultivares de vinífera y demostraron su utilidad para confirmar o rechazar genealogías en vid. En una publicación posterior, Thomas et al. (1994) incluyeron otros dos microsatélites más: VVS19 y VVS29, y una propuesta de metodología universal para la construcción de una base de datos global de vid. Esta metodología incorporaba un análisis semiautomático de los fragmentos amplificados, merced a su marcaje con un fluorocromo. La determinación del tamaño de los fragmentos se realizaría de forma automática con un programa informático GeneScan, de Perkin Elmer. De esta forma se empezaron a aplicar los STMS para analizar variedades de vid, (Cipriani et al., 1994), (Botta et al., 1995). Con posterioridad se desarrollaron nuevos marcadores STMS de *Vitis vinifera*: VVMD5, VVMD6, VVMD7 y VVMD8 (Bowers y Meredith, 1996), obtenidos de la variedad Pinot noir. Hasta la actualidad se han publicado un gran número de trabajos en los que se han utilizado los STMS para caracterizar variedades de vid (Meredith et al., 1996), (Ibáñez, 1998), (Sefc et al., 1999), (Ibáñez et al., 2003), (Merdinoglu et al., 2005). Actualmente, en el NCBI se cuenta con más de 360 loci microsatélite de libre disposición (This et al., 2006), además de otros que se han obtenido pero son de uso restringido para los miembros de un Consorcio Internacional de Vid.

La utilidad de los STMS para distinguir variedades de vid es muy elevada, dada la cantidad de alelos existentes por loci y por ello, la improbabilidad de que dos variedades diferentes compartan los mismos alelos en todos sus loci. La técnica permite detectar las sinonimias y los problemas de identificación tan habituales en vides cultivadas. Los STMS también se han utilizado en estudios de similitud intervarietal en vid (Sefc et al., 1998), (Maletic et al., 1999), (Lopes et al., 1999), (Sefc et al., 2000).

Muchos grupos de investigación han desarrollado sus propios marcadores microsatélites, pero el principal intento internacional para armonizar un sistema basado en microsatélites para la identificación de variedades de vid fue llevado a cabo dentro de un proyecto de la Unión Europea (GENRES081). Los 10 laboratorios que colaboraron en el proyecto, entre los cuales se encontraba el laboratorio de Biología Molecular de la Finca El Encín (IMIDRA), representaban las mayores colecciones de vid europeas, persiguiendo como objetivo el desarrollo de una base de datos central europea que contuviera entre otros datos, alelos de referencia microsatélite para la identificación de accesiones de vid (This et al., 2004). Sin embargo, para que la base de datos resultara útil a diferentes laboratorios que emplearan diferentes equipos y métodos, los alelos debían ser estandarizados, como ya se había demostrado previamente para tomate (Bredemeijer et al., 2002) y para trigo (Röder et al., 2002). Seis microsatélites informativos fueron seleccionados: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, ssrVrZAG62 y ssrVrZAG79. Todos los participantes analizaron idénticas muestras de DNA (ring test), pertenecientes, siempre que fue posible, a variedades de vid bien conocidas y ampliamente distribuidas geográficamente, con el fin de que el trabajo tuviera la mayor utilidad posible dentro de la comunidad científica. Para cada alelo de cada locus microsatélite, se seleccionó una variedad de las que lo presentaban, que serviría de referencia para todos los laboratorios implicados, y ello permitiría el desarrollo de una base de datos común e internacional. Con los resultados obtenidos, se elaboraron descriptores para los 6 loci microsatélite estudiados.

Desafortunadamente, al comienzo de ese proyecto no había información de la posición en los mapas de los microsatélites, y entre los 6 microsatélites elegidos, cuatro de ellos estaban ligados genéticamente 2 a 2. Por esa razón, y porque no son capaces de discriminar todas las variedades diferentes (no “sports”) (Martín et al., 2003), ese set de 6 microsatélites no supone una optima selección. Por ello se hace necesario proponer otro conjunto de microsatélites más adecuado para llevar a cabo la caracterización de variedades de vid.

1.3. MARCO LEGAL

1.3.1. Principios básicos sobre las variedades de vid

La vid es una de las especies con una legislación más extensa, pues cubre tanto aspectos de cultivo y plantación como los de producción vinícola y de uva de mesa, el material de multiplicación y, por supuesto, el registro de variedades y protección de nuevas obtenciones (para revisión, Chomé et al. (2003). En cada ámbito existen referencias al tratamiento o regulación de las variedades, si bien, el único marco legal que define lo que es una variedad, su denominación y las distintas variedades presentes en el mercado es el relativo al Registro de Variedades Comerciales, que es la referencia oficial en cuanto al panorama varietal de la especie.

Con referencia a las variedades de vid, se destacan los siguientes principios básicos legales:

1. Se define una variedad sólo cuando se conoce la expresión de su genotipo en unos caracteres morfológicos o fisiológicos que resultan estables y homogéneos y permiten distinguirla de cualquier otra variedad conocida.
2. Cada variedad tendrá una sola denominación que permita distinguirla de las demás. Se podrán admitir sinonimias locales cuando se haya confirmado que se refieren a la variedad.
3. Sólo podrá comercializarse material de multiplicación de las variedades de vid que se encuentren inscritas y reconocidas en el Registro de Variedades Comerciales de plantas. Este es el único marco legal que define lo que es una variedad, su denominación y las distintas variedades presentes en el mercado. Es la referencia oficial en cuanto al panorama varietal de la especie, como ya se ha mencionado.
4. El material de multiplicación se comercializará siempre etiquetado conforme a su categoría y con referencia a la variedad.
5. En cada región sólo podrán plantearse para constituir viñedos las variedades de vid, previamente registradas, que figuren en sus listas de autorizadas o recomendadas.

1.3.1.1. Registro de Variedades Comerciales

La legislación española y la comunitaria, obligan a disponer de un Registro de Variedades Comerciales, llamado Catálogo de Variedades Comerciales, de las que están admitidas para su certificación o como material estándar, es decir, las autorizadas para ser producidas viverísticamente o importadas, (Chomé et al., 2003).

Todos los países de la Comunidad tienen su Registro o Catálogo, y la suma de dichos catálogos formarán el Catálogo Común de la Unión Europea. Para poder incluir variedades en el catálogo, éstas deben reunir una serie de requisitos, entre ellos, el de ser variedades distintas a las ya incluidas, estables y homogéneas. La Lista de Variedades Comerciales incluida en el Registro, es fruto de estudios amplios y complejos, realizados en el panorama varietal español, por diferentes profesionales de prestigio de la administración central y de las administraciones autonómicas. Las variedades en las que no se han finalizado todos los estudios de comprobación, figuran en la inscripción provisional. Estas variedades están en proceso de caracterización porque, o bien son variedades de cultivo más local, o bien son nuevas obtenciones o variedades extranjeras que se quieren introducir en España como variedades mejorantes (Cabello, 2004).

En la actualidad, la inscripción definitiva de variedades comerciales incluye 86 variedades, de las que 20 son de uva de mesa y el resto de vinificación. Por su parte, la inscripción provisional recoge 125 variedades de las cuales 38 son de mesa y el resto de vinificación.

1.3.2. Protección legal de las obtenciones vegetales

Existen dos tipos de protecciones legales sobre la actividad creadora: propiedad industrial y propiedad intelectual. La protección jurídica de la propiedad industrial se remonta al siglo XV, mientras que la de la propiedad intelectual no se empezó a considerar hasta la aparición de la imprenta (Represa, 1998). Las obtenciones vegetales pertenecían en principio a la primera categoría, y así se han considerado en algunas legislaciones, regulando la protección de las mismas con patentes o modelos de utilidad. Sin embargo, en la aplicación de este tipo de normativa a las obtenciones vegetales han surgido dificultades graves, debido a las

peculiaridades de las mismas. Esto ha puesto de manifiesto la conveniencia de una normativa específica para la protección legal de las obtenciones vegetales.

1.3.2.1. Normativa

En función del ámbito de cobertura de la protección legal de las obtenciones vegetales, se distinguen tres normativas: la Internacional, la de la Unión Europea y la de España.

Normativa Internacional

Antes del establecimiento del sistema UPOV, muchos países poseían sus propias reglas en lo que atañe al examen de variedades. Los criterios técnicos para la concesión de derechos eran diferentes de un país a otro, e incluso el concepto de variedad no era considerado de la misma forma en todos los países. Las normas técnicas y los procedimientos para el examen dependían en gran medida de los conocimientos especializados que poseía el examinador. Esa falta de armonización causaba problemas, en particular cuando un obtentor solicitaba protección para su variedad en varios países. Una variedad que había sido considerada distinta, homogénea y estable en un país, podía ser rechazada en otro, y viceversa. Se llegó a la conclusión de que era preciso introducir una armonización, y la UPOV asumió esa responsabilidad como resultado de la adopción del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales hecho en París en 1.961. Este Convenio fue revisado en Ginebra el 10 de noviembre de 1.972, el 23 de octubre de 1.978 y finalmente el 19 de marzo de 1.991 donde sufrió una profunda revisión para adecuarlo a las nuevas necesidades. Este nuevo Convenio entró en vigor en abril de 1.998.

Este reconocimiento de derechos, armonizado a escala internacional gracias a la UPOV, cuyos principios han sido recogidos en las normativas nacionales de los países miembros de la organización, permite el fomento de las complejas y costosas actividades de investigación y mejora de las variedades, que son un factor clave para la productividad y rentabilidad de las economías agrarias de los países y por ello una razón del progreso de las poblaciones. Es el equivalente al régimen de las patentes para los inventos industriales, enfocado al mundo de las plantas vivas y la agricultura, con una particularidad: no sólo se registran las variedades, sino que antes ha sido necesario haber demostrado, mediante un examen técnico, que la variedad, es distinta de las demás, homogénea, estable y también es nueva. En las

directrices del Convenio de la UPOV de 1.991 se definen estos cuatro conceptos de la siguiente manera:

1. Novedad: “La variedad será considerada nueva, si en la fecha de presentación de la solicitud del título de obtención vegetal, el material de reproducción o de multiplicación vegetativa o un producto de cosecha de la variedad no ha sido vendido o entregado a terceros por el obtentor o con su consentimiento para la explotación de la variedad o, habiéndolo sido, no han transcurrido los siguientes plazos: (...)”
2. Distinción: “Una variedad será considerada distinta si es posible diferenciarla claramente por la expresión de las características resultantes de un genotipo en particular o de una combinación de genotipos, de cualquier otra variedad cuya existencia, en la fecha de presentación de la solicitud, sea notoriamente conocida”. En particular, se considerará que una variedad es notoriamente conocida, a partir de la fecha en que se haya presentado en cualquier país una solicitud:
 - Bien de concesión de un derecho de obtentor, siempre que conduzca a la consecución de la protección solicitada.
 - Bien de inscripción de la variedad en un registro oficial, siempre que resulte finalmente inscrita.

Una variedad se considerará que se distingue claramente entre otras, si la diferencia en sus caracteres específicos es consistente y clara.

3. Homogeneidad: “Se considerará homogénea la variedad si es suficientemente uniforme en sus caracteres específicos, a reserva de la variación previsible habida cuenta de las particularidades de su reproducción sexuada o de su multiplicación vegetativa”.
4. Estabilidad: “Se considerará estable la variedad si sus caracteres específicos se mantienen inalterados después de reproducciones o multiplicaciones sucesivas o, en caso de un ciclo particular de reproducciones o de multiplicaciones, al final de cada ciclo”.

Además del Convenio de la UPOV, la segunda normativa que influye de forma importante en el establecimiento de sistemas de protección de obtenciones vegetales es, el acuerdo sobre los Aspectos de los Derechos de Propiedad

Introducción

Intelectual relacionados con el Comercio (ADPIC o TRIPS, en inglés), anexo incluido en la constitución de la Organización Mundial de Comercio (OMC) en abril de 1.994. Este acuerdo en el párrafo 3 (b) de su artículo 27, obliga a todos los Estados miembros de la OMC a proporcionar algún sistema de protección a todas las obtenciones vegetales, ya sea mediante patentes, mediante un sistema eficaz *sui generis*, tal como el sistema de la UPOV, o mediante una combinación de ambos sistemas.

Normativa en la Unión Europea

En la Unión Europea se aprobó el Reglamento CE 2100/94 del Consejo, de 27 de julio de 1.994, relativo a la protección comunitaria de las obtenciones vegetales, con cobertura y efectos en todos los Estados miembros de la Unión Europea. Es de aplicación directa, y no necesita por ello transposición o desarrollo por parte de los Estados miembros, si bien reconoce el derecho de los mismos a “conceder derechos de propiedad nacionales sobre las variedades vegetales”. En cualquier caso, este reglamento prohíbe expresamente la doble titularidad de derechos, nacionales y comunitarios. El sistema ha seguido el marco del Convenio UPOV de 1.991, y se ha creado la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCVV o CPVO, en inglés) para administrar y gestionar todo el sistema.

Dentro de este contexto, el procedimiento de concesión del derecho sobre una variedad, se inicia con una solicitud única dirigida a la OCVV o a cualquiera de las oficinas nacionales. Tras el examen correspondiente, si procede, se concede un título de protección único y válido en toda la Unión Europea. Esta es la única forma de protección comunitaria de la propiedad industrial para las obtenciones vegetales, y es aplicable a todos los géneros y especies, y también a los híbridos intergenéricos e interespecíficos.

Normativa en España

Hasta hace pocos años, el sistema de protección de los obtentores en España se basaba en la Ley 12/1975 de 12 de marzo, inspirado en el Convenio UPOV de 1.961, que fue suscrito y ratificado por España. Ésta legislación permitía la protección de obtenciones vegetales mediante patentes y/o modelos de utilidad, cuando no existía Registro de Variedades Protegidas para la especie en cuestión.

Con el fin de adaptar esa legislación al nuevo marco jurídico internacional, España estableció un sistema propio, aunque armonizado con la normativa europea

(concretado en la Ley 3/2000 de 7 de enero, modificada el 12 de marzo del 2.002), con el fin de reconocer a las Comunidades Autónomas la competencia para la tramitación de los procedimientos para la concesión de los títulos de obtención vegetal. Esta Ley sigue las directrices del Convenio UPOV de 1.991, y tiene como objetivos fundamentales la protección de los obtentores y mejorar el funcionamiento de la Administración pública en las gestiones correspondientes, con el fin de incentivar la investigación en este campo. A continuación se presentan algunos aspectos destacables de la Ley, en especial aquellos donde la aportación de expertos puede ser importante.

A efectos de la ley, se define una variedad como un conjunto de plantas de un solo taxón botánico del rango más bajo conocido que, con independencia de si responde o no plenamente a las condiciones para la concesión de un derecho de obtentor, pueda:

- a) Definirse por la expresión de los caracteres resultantes de un cierto genotipo o de una cierta combinación de genotipos.
- b) Distinguirse de cualquier otro conjunto de plantas por la expresión de uno de dichos caracteres por lo menos.
- c) Considerarse como una unidad, habida cuenta de su aptitud a propagarse sin alteración.

Los cuatro requisitos necesarios y suficientes para la concesión del título de obtención vegetal, son: Novedad, Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (salvo problemas con la denominación). Para ello, debe pasar un examen técnico cuya finalidad es:

- a) Comprobar que la variedad pertenece al taxón botánico descrito.
- b) Determinar que es distinta, homogénea y estable.
- c) Establecer una descripción oficial de la variedad.

El segundo punto se conoce como examen DHE (Distinción, Homogeneidad, Estabilidad) o test DUS (iniciales en inglés de Distinctness, Uniformity, Stability).

La ley define de forma precisa los derechos de los obtentores, determinando con claridad las actuaciones de terceros relacionadas con su variedad que requieren su autorización. Merece destacarse que la protección alcanza a las variedades derivadas esencialmente de la variedad protegida (EDV). A estos

Introducción

efectos, se considerará que una variedad es esencialmente derivada de otra variedad, denominada ésta última variedad inicial, si:

- a) Se deriva principalmente de la variedad inicial, o de una variedad que a su vez deriva principalmente de la variedad inicial, conservando al mismo tiempo las expresiones de los caracteres esenciales que resulten del genotipo o de la combinación de genotipos de la variedad inicial.
- b) Se distingue claramente de la variedad inicial, y
- c) Salvo por lo que respecta a las diferencias resultantes de la derivación, es conforme a la variedad inicial en la expresión de los caracteres esenciales que resulten del genotipo o de la combinación de genotipos de la variedad inicial.

De esta forma, se crea un halo de protección alrededor de la variedad protegida, de manera que el obtentor de la variedad inicial tiene ciertos derechos sobre las variedades esencialmente derivadas (EDV). Ejemplos de métodos o eventos que pueden llevar a una EDV son: mutaciones inducidas o naturales, variantes somaclonales, selección de individuos dentro de una variedad inicial, retrocruzamiento múltiple o transformación genética.

El examen técnico de las variedades se realiza por las autoridades oficiales nacionales, y, en el caso de España, son competencia actualmente de la Oficina Española de Variedades Vegetales como subdirección general del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, que continúa los trabajos y la experiencia del anterior organismo autónomo responsable, el Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero, ampliamente conocido en los ámbitos nacional e internacional.

Cuando las variedades sometidas a examen son nuevas, distintas, homogéneas y estables, se les adjudica un título de obtención vegetal que otorga a los obtentores derechos exclusivos de multiplicación y uso de dichas variedades.

La inscripción de variedades en el Registro de Variedades Protegidas tiene el mismo procedimiento técnico de examen que el Registro de Variedades Comerciales, por lo que suelen realizarse en un solo acto, utilizando la misma colección de referencia y organizado por el mismo organismo oficial competente.

La **Figura I1** que se muestra a continuación, detalla cuales son los organismos oficiales que otorgan títulos de obtención vegetal tanto en España como en Europa.

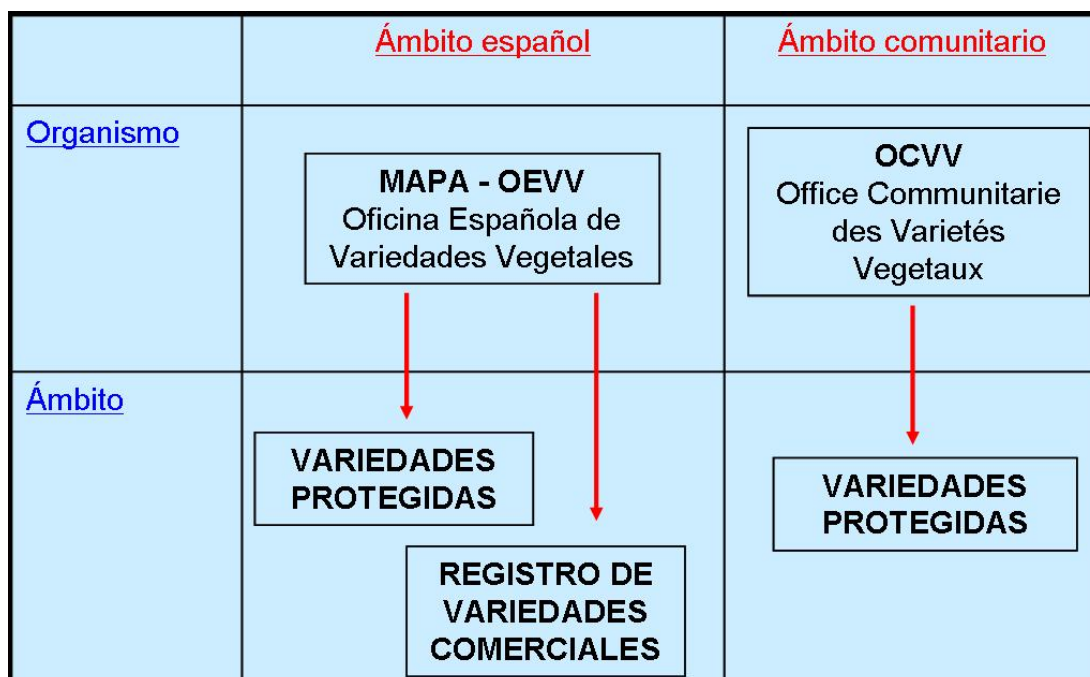


Figura I1. Detalle de los organismos que otorgan títulos de obtención vegetal tanto en España como en el ámbito comunitario (Chomé et al., 2003).

El pasado 18 de julio de 2.007, España ratificó oficialmente el Acta de 1.991 del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales.

1.3.2.2. Protección y defensa legal

Como ya se ha comentado, para conseguir un título de obtención vegetal es necesario que la variedad pase un examen técnico, realizado por los organismos oficiales competentes. Dentro de este examen, se encuentra el determinar si la variedad a proteger es distinta, homogénea y estable (exámenes DHE), además de nueva. Cuando el test de las variedades candidatas resulta positivo, es decir, si se cumplen los cuatro requisitos anteriores, a las nuevas variedades se les adjudica un título de obtención vegetal. La ley define los derechos de los obtentores, determinando las actuaciones de terceros relacionadas con su variedad que requieren su autorización. Ahora bien, una vez concedido el título, es competencia del obtentor la defensa de sus derechos, incluido llegado el caso, probar si una variedad es una EDV de una variedad suya, ante un tribunal de justicia.

1.3.2.2.1. Exámenes DHE

Los exámenes DHE son un aspecto esencial de la protección. En la actualidad estos exámenes se basan casi exclusivamente en el estudio de características morfológicas, y se apoyan en ocasiones en análisis de proteínas (isoenzimas, proteínas totales, etc.). Estos marcadores son en ocasiones lentos, costosos, subjetivos y/o no concluyentes, lo que en algunos casos puede conducir a una deficiente protección de las nuevas obtenciones. Es por ello que existe un gran interés internacional por incorporar nuevos marcadores, que ha dado lugar a la creación, entre otros, de un grupo de trabajo en el seno de la UPOV sobre “Técnicas Moleculares y Bioquímicas, en especial de perfiles de ADN”, en inglés “Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in particular” (BMT).

Según la UPOV (documento TG/1/3), las condiciones básicas que una característica debería reunir para ser usada en los test DHE, serían las siguientes:

1. proceder de un genotipo determinado o de una combinación de genotipos.
2. ser suficientemente homogénea en un determinado ambiente.
3. presentar suficiente variación entre variedades para ser capaces de establecer la distinción.
4. ser capaz de definir y reconocer las variedades.
5. permitir que los requisitos de homogeneidad se cumplan.
6. permitir que los requisitos de estabilidad se cumplan, es decir, que produzca resultados consistentes y repetitivos después de repetidas multiplicaciones o, donde corresponda, al final de cada ciclo de multiplicación.

La ISF (Federación Internacional de Semillas), que es una importante agrupación privada de obtentores, en ISF Position Papers (2003), apoya completamente lo estipulado por la UPOV en lo que respecta a las características para llevar a cabo el test DHE. Llama la atención a las autoridades competentes tanto nacionales como internacionales, para que concreten las características empleadas en los test DHE. Esto es necesario para asegurar la reproducibilidad de los resultados obtenidos y la consistencia de las observaciones realizadas por las diferentes autoridades competentes sobre la misma característica. La ISF propone la siguiente clasificación de las características usadas para llevar a cabo el test DHE:

1. Características morfológicas estándar de la UPOV (incluidas en sus directrices individuales).
2. Características morfológicas adicionales. Estas deben satisfacer el criterio general de las características del punto anterior. Tienen que ser usadas por al menos un grupo de trabajo de la UPOV y presentadas a esta institución.

Estas características son principalmente fisiológicas y pueden ser añadidas a la lista de características con el consentimiento del obtentor.

- Rendimiento
- Contenido en azúcar
- Resistencia a plagas o enfermedades
- Tolerancia a herbicidas

Esta lista de características morfológicas adicionales no es exhaustiva y está sujeta a cambios en función del tipo de cultivo.

3. Pruebas convincentes adicionales. Generalmente, son características proteicas. Si fueran usadas, debería ser:
 - Con el consentimiento del solicitante.
 - Solo si todas las demás características fallan al establecer la clara distinción, a pesar de que se encuentre alguna evidencia de distinción con las características estándar de la UPOV.
 - Solo si el procedimiento ha sido consentido por las autoridades competentes y los solicitantes de la protección.

Si se usaran estas características, ellas solo podrían establecer la distinción en combinación con las características morfológicas citadas en las categorías 1 y 2.

1.3.2.2.2. Identificación, distinción y derivación esencial

La diferencia entre distinción e identificación es que el test de Distinción establece que la variedad es única y constituye su descripción inicial, (Bould, 1996). Se basa fundamentalmente en caracteres morfológicos, y uno de ellos por sí solo puede ser suficiente para establecer que dos variedades son distintas. El proceso

Introducción

consiste en esencia, en buscar las diferencias de la variedad analizada respecto a las demás, usando una colección de referencia apropiada, y en determinar si esas diferencias son superiores a una distancia mínima. Para Le Buanec (2000) la diferencia entre identificación y distinción radica precisamente en el concepto de distancia mínima, todavía en discusión en el seno de la UPOV. A pesar de los problemas que presenta, el sistema funciona más o menos satisfactoriamente, proporcionando un perímetro de protección suficiente a los obtentores.

La UPOV divide los caracteres morfológicos en tres tipos: cualitativos, cuantitativos y pseudocualitativos. En teoría, para cada uno de estos caracteres, en el examen de Distinción, se establece la mínima diferencia que puede existir entre dos expresiones de un mismo carácter para considerarlas diferentes. Esta diferencia debe ser clara y consistente:

- Caracteres cualitativos: Aquellos que presentan estados de expresión distintos y discontinuos entre sí. Ej. los diferentes colores de un fruto o de una flor. Cada uno es diferente del otro y puede haber una gran cantidad de expresiones (colores): la diferencia es clara si los caracteres respectivos presentan expresiones correspondientes a dos estados diferentes.
- Caracteres cuantitativos: Aquellos que pueden medirse en una escala unidimensional y presentan una variación continua de un extremo al otro. A los efectos de la descripción se dividen en diversos estados de expresión. Ej. días de floración, altura de la planta, tamaño o peso del fruto: la diferencia deberá considerarse clara si puede establecerse con una probabilidad de error del 1%, por ejemplo, por el método de la mínima diferencia significativa. Las diferencias son coherentes si se producen en el mismo sentido en dos ciclos de cultivo o en dos de tres ciclos.
- Caracteres pseudocualitativos: Aquellos en los que los estados de expresión son, al menos parcialmente, continuos pero varían en más de una dimensión, y no pueden describirse adecuadamente definiendo únicamente los extremos de una gama lineal. Ej. la forma: oval, elíptica, redonda... Un nivel diferente en las Directrices de Examen de la UPOV no es necesariamente suficiente para establecer la distinción. No obstante, en ciertas circunstancias, variedades descritas con el mismo nivel de expresión pueden distinguirse claramente.

La identificación consiste en verificar la conformidad de una variedad con respecto a los modelos establecidos en una colección de referencia. No es un sustituto de la distinción, y por ello la identificación de “nuevas” variedades que puedan ser iguales a una preexistente es responsabilidad del obtentor de la misma.

El establecimiento de la derivación esencial también corresponde al obtentor. Dos variedades pueden ser diferentes en un carácter de suficiente importancia como para ser consideradas distintas por una oficina de protección. Si un obtentor considera que ha sido obtenida a partir de la suya en algunos de los supuestos contemplados en la derivación esencial, debe demostrarlo (prueba “prima facie”). Para ello, al igual que en la identificación, se pueden emplear marcadores distintos a los morfológicos, ya que no se persigue la obtención del título de obtención vegetal. Si finalmente, el propietario de la variedad inicial muestra pruebas suficientes de que la otra variedad ha sido obtenida a partir de la suya, el segundo obtentor debería tener que probar que él no ha usado la variedad inicial, o una variedad esencialmente derivada de esa variedad inicial.

La **Figura I2** muestra gráficamente el alcance de la protección: a partir de una variedad inicial (variedad A, situada en el centro de los círculos), la protección abarca en principio a todas las variedades que queden dentro de un círculo delimitado por la distancia mínima (variedad C). Una EDV (variedad D), por definición, es distinta de la variedad inicial, y quedaría en un círculo externo al marcado por la distancia mínima, pero con la legislación vigente aún quedaría dentro de la protección. La variedad B, correspondería a una variedad distinta de A, estaría situada fuera del círculo de protección legal.

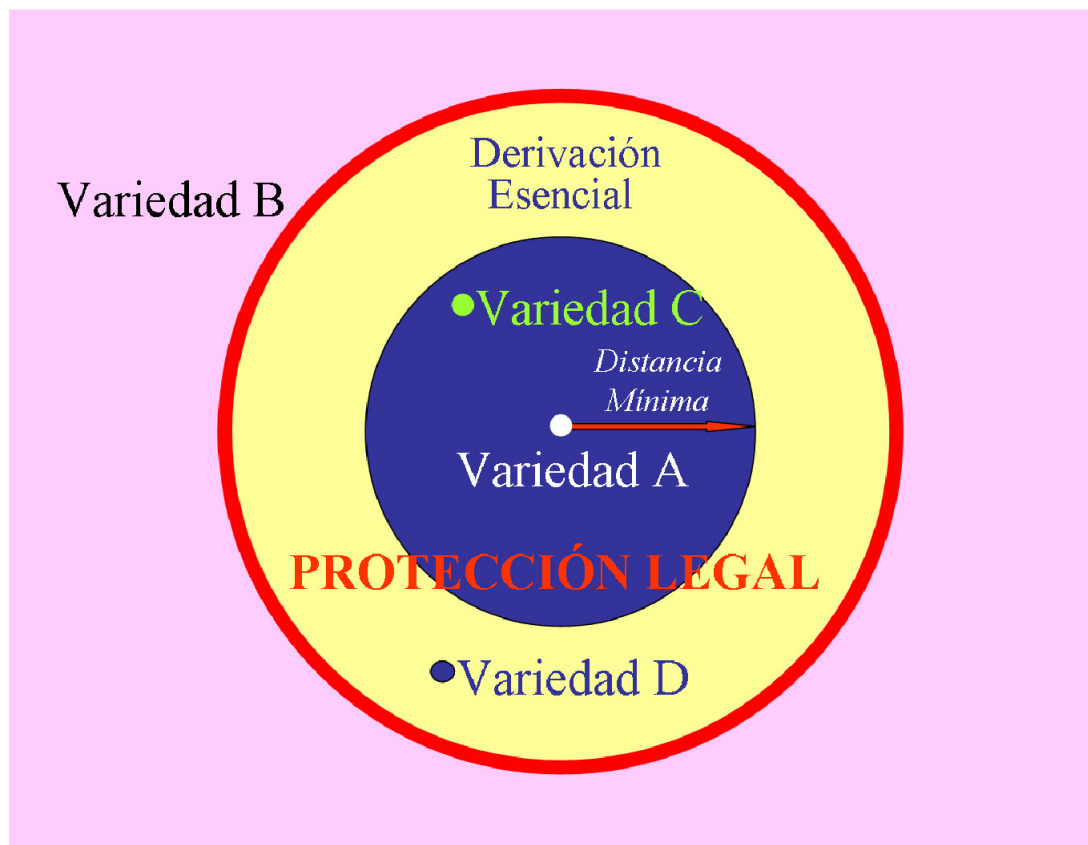


Figura I2. Descripción gráfica del alcance de la protección legal para una variedad A.

1.3.3. Posiciones frente al empleo de los marcadores moleculares en la protección y defensa legal de variedades vegetales

1.3.3.1. En la protección legal (exámenes DHE)

Los obtentores, en la sexta reunión del grupo de trabajo BMT, celebrada en Angers (Francia) 1-3 de marzo de 2.000, pusieron de manifiesto su temor ante el uso de los marcadores moleculares para los test DHE, por considerar que de momento traería consigo un debilitamiento de la protección de las nuevas (y antiguas) variedades. Consideran que una sola banda, alelo, etc., diferente podría llevar, según la definición de UPOV de distinción (“claramente distinguible”) a declarar una variedad distinta de otra, reduciendo el círculo interior de la **Figura I2** a su mínima expresión. Ello obligaría a hacer uso en cada caso del concepto de derivación esencial, con lo que ello supone (demostrar judicialmente la derivación esencial, con el consiguiente retraso, gasto, etc). Hoy en día, los obtentores siguen con los mismos temores.

Debido a que en la actualidad los exámenes DHE se basan casi exclusivamente en marcadores morfológicos, y a sus problemas citados, la UPOV tiene un claro interés en incorporar los marcadores moleculares al sistema de protección cuando existan garantías suficientes. El grupo de trabajo BMT celebra reuniones periódicas aproximadamente cada año y medio para estudiar la manera de mejorar el sistema de protección incorporando los marcadores moleculares. La UPOV, también tiene intención de incorporar estos marcadores al manejo de colecciones de referencia, que cada vez se hace más difícil debido al crecimiento del número de países integrados en la UPOV, lo que hace incrementar el número de nuevas variedades en estas colecciones, haciendo más complejo el examen DHE. Los marcadores que se utilicen para describir estas colecciones de referencia deben ser los mismos que se usen para los exámenes DHE.

Debido a que cada vez hay más países en el seno de la UPOV que podrían llegar a utilizar sistemas diferentes de protección, generando con ello una gran confusión y un aumento del coste para los solicitantes, la UPOV enfatiza sobre la necesidad de progresar en el grupo de trabajo BMT. No hay que olvidar además que uno de los objetivos de la UPOV precisamente es la armonización internacional de las descripciones y exámenes de las variedades entre los estados miembros.

Para incorporar un nuevo marcador a los exámenes DHE, además de demostrar su utilidad para la distinción, debe ser también homogéneo y estable, dado que una variedad debe ser homogénea y estable para los caracteres usados en la distinción. De lo contrario, obligaría a los obtentores a un trabajo de selección adicional para mantener estas características estables. Como consecuencia, se propuso profundizar en los estudios de aplicabilidad de los marcadores moleculares a especies modelo concretas, insistiendo en el concepto de distancia mínima, o distancia más pequeña que puede existir entre dos variedades para considerarlas diferentes.

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que la distancia mínima depende de la variabilidad genética intra e intervarietal existente, y por ello su problemática es muy distinta en las especies en que las variedades se propagan por vía vegetativa y en las que lo hacen sexualmente, y dentro de éstas, también es muy diferente la variabilidad genética intravarietal e intervarietal presente. Al final se hace necesario establecer una distancia mínima para cada especie.

Introducción

La Oficina Española de Variedades Vegetales realiza los exámenes DHE en base a los marcadores oficiales ampelográficos. Sin embargo, es consciente de la importancia que pueden tener los marcadores moleculares a la hora de complementar a los morfológicos, por lo que apoyan las iniciativas en el sentido de su posible inclusión futura en el sistema de protección, siempre que cumplan los requisitos planteados.

La ISF, en ISF Position Papers (2000), no se opone al empleo de los marcadores moleculares de ADN para el test DHE. Sin embargo, la introducción de las nuevas tecnologías y de nuevos conceptos debe resolver más problemas que los que crea y, de momento, la ISF considera que las pruebas DHE deberían continuar efectuándose en base a las características fenotípicas. Afirma que los marcadores moleculares no deben ser los únicos empleados para establecer la distinción, sino sólo una evidencia adicional para esa distinción. Considera que esta posición es coherente con la definición de variedad incluida en el Acta de 1991 del Convenio de la UPOV, en la que una variedad está definida por “la expresión de los caracteres resultantes de un cierto genotipo o de una cierta combinación de genotipos”.

Tanto en ISF Position Papers (2000), como en ISF Position Papers (2003), la ISF apoya la continuidad del trabajo del grupo BMT sobre el posible empleo de marcadores bioquímicos y moleculares para el examen DHE. En particular debería analizarse los siguientes aspectos:

- Definición de la distancia mínima para la distinción.
- Impacto sobre los conceptos de homogeneidad y estabilidad y evaluación de esos criterios.
- Diferencia práctica entre los conceptos de distinción y de derivación esencial cuando ambos son evaluados utilizando marcadores moleculares.
- Disponibilidad pública de los marcadores empleados, en ISF Position Papers (2006).

Mientras no existan claras respuestas a los problemas suscitados por estos temas, la ISF considera que el uso de marcadores moleculares para el examen DHE podría reducir el ámbito de protección, cuando el objetivo es fortalecerlo.

Considera que la introducción de nuevos caracteres para el test DHE, se debería utilizar sin crear nuevas obligaciones a los obtentores de variedades ya protegidas.

En la actualidad, la ISF sigue oponiéndose al empleo en solitario de los marcadores moleculares en el test DHE como características decisivas a la hora de conceder un título de obtención vegetal de acuerdo a la UPOV (ISF Position Papers, 2006).

En resumen, obtentores, mejoradores y organismos oficiales encargados de conceder títulos de obtención vegetal, siguen oponiéndose actualmente al uso exclusivo de los marcadores moleculares en los exámenes DHE. Sin embargo, ninguno de ellos se opone a su empleo en estos exámenes junto con los marcadores morfológicos oficiales, siempre que no se usen en exclusiva para establecer la distinción. Para ello, previamente es necesario demostrar su utilidad en el sistema de protección de obtenciones vegetales.

1.3.3.2. En la defensa legal (identificación y establecimiento de la derivación esencial)

En la décima reunión del grupo de trabajo BMT, celebrada en Seúl, del 21 al 23 de noviembre de 2006, la UPOV manifestó su interés acerca del empleo de los marcadores moleculares en la identificación varietal.

La Oficina Española de Variedades Vegetales, actualmente está utilizando el sistema de 9 loci microsatélite evaluados en esta tesis doctoral, para ayudar a caracterizar su colección de referencia de vid.

La ISF, en ISF Position Papers (2003) e ISF Position Papers (2006) está de acuerdo con que los marcadores moleculares de ADN se empleen para la identificación de variedades ya protegidas, en caso de presunto mal uso de esa variedad o el mal uso de una línea parental original en el caso de una variedad híbrida. Los marcadores moleculares también pueden ser usados para definir una similitud genética que dispare un proceso legal en casos de derivación esencial afirmada, o para determinar la presencia o ausencia de un determinado gen o una mutación cuya expresión o falta de expresión es responsable de una característica esencial de la variedad.

Introducción

Para esta demostración, en la ISF sería suficiente cumplir uno de los siguientes requisitos (ISF Position Papers, 2003):

1. Una fuerte similitud fenotípica
2. Sólo algunas pequeñas diferencias en algunos caracteres heredados
3. Una fuerte similitud genética

En esta décima reunión del grupo BMT, el representante de CIOFORA (International Community of Breeders of Asexually Reproduced Ornamental and Fruit Varieties), informó que estaban trabajando en un "Position Paper" sobre variedades esencialmente derivadas. La base de éste sería establecer umbrales para semejanza basándose en herramientas moleculares, e indicó que se necesitaría información de un gran número de especies, por lo que en este aspecto, los estudios llevados a cabo por el grupo BMT serían de gran ayuda.

En el laboratorio de Biología Molecular de la Finca El Encín (IMIDRA), se ha utilizado con frecuencia el sistema de 9 loci microsatélite evaluados en esta tesis para la identificación legal de variedades de vid. Se han llevado a cabo algunos trabajos como: la defensa de una variedad protegida por el supuesto infrincimiento de los derechos del obtentor, la identificación de plantas vendidas en viveros, la determinación de si las plantas de una plantación pertenecen a una lista de variedades autorizadas en una Denominación de Origen o a la Lista de Variedades Comerciales.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La concesión de protección legal a una variedad vegetal, es decir, de un título de obtención vegetal, requiere el cumplimiento de unas condiciones. Ese cumplimiento se evalúa mediante un examen en que se determina si la variedad, además de nueva, es distinta, homogénea y estable (DHE). En general, los exámenes DHE se basan exclusivamente en el estudio de marcadores morfológicos y, en algunos casos, bioquímicos. En el caso de la especie propuesta, *Vitis vinifera* L., existe una disciplina científica, la Ampelografía, que comprende la descripción morfológica de las plantas de vid, y que pese a resultar indispensable, adolece de unas características que limitan su utilidad frente a otras técnicas más recientes. Entre ellas, los marcadores moleculares de ADN presentan numerosas ventajas frente a los morfológicos y podrían complementarlos en numerosas ocasiones, con lo que los exámenes ganarían esencialmente tiempo y objetividad. Para poder incorporar cualquier nuevo marcador al sistema de protección es imperativo constatar su utilidad para estos propósitos tan específicos.

Una vez obtenido el título de obtención vegetal, es necesario disponer de herramientas que permitan al obtentor la defensa de la misma, tanto del uso ilegal de plantas de su variedad como de variedades derivadas de la misma.

En esta tesis doctoral se evaluará la utilidad de algunos marcadores moleculares microsatélites, tanto en la protección (incluyendo estudios de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad), como en la defensa legal (incluyendo estudios de Identificación y establecimiento de la derivación esencial) de variedades pertenecientes a la especie *Vitis vinifera* L. Para ello, se definieron los siguientes objetivos:

1. Seleccionar un número adecuado de microsatélites.
2. Analizar una gran colección de accesiones de vid, genotipada con el conjunto de microsatélites elegido. Determinar en la citada colección las diferencias intra e intersortogrupo, y en base a ellas, establecer la distancia mínima (punto clave en el estudio de Distinción) en número de alelos.

Objetivos

3. Llevar a cabo un estudio de Homogeneidad y Estabilidad con el sistema de microsátélites seleccionado, recolectando y estudiando el material vegetal necesario para ello.
4. Establecer una colección de referencia que resulte útil para la identificación de variedades de vid y el establecimiento de la derivación esencial.
5. Elaborar una propuesta práctica de utilización del sistema y toma de decisiones, tanto para la defensa legal de variedades de vid, incluyendo en ella la identificación, y el establecimiento de la derivación esencial; como para la protección legal, incluyendo en ella los exámenes DHE.
6. Elaborar descriptores para la utilización sistemática en la vid de los marcadores STMS estudiados, empleando para ello la información derivada de los estudios anteriores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Material vegetal

3.1.1.1. Estudio de Distinción

Se utilizaron un total de 1.281 accesiones para llevar a cabo el estudio de Distinción. Dentro de este conjunto se encontraban 112 accesiones del proyecto que lleva por título: “Detección de sinonimias entre las principales variedades de vid cultivadas en el mundo y las variedades españolas. Relación filogenética con las principales especies del Género *Vitis*”, coordinado por D. Gregorio Muñoz Organero (IMIDRA-Finca El Encín). Este material vegetal se empleó para la realización del Museo de Briones en La Rioja, y procede de las Colecciones de variedades de vid de “El Encín” (España), Jerez de la Frontera (España), Geilweilerhof (Alemania), Montpellier (Francia) y San Michele (Italia). Incluye una amplia representación de las variedades más cultivadas en los países vitícolas del mundo, además de portainjertos, híbridos productores directos, especies del género *Vitis* no *vinifera* y géneros de la familia Vitáceas. Dicho material recibirá el nombre de Briones a lo largo de este trabajo.

El material vegetal de Briones consistió en hojas jóvenes, que fueron introducidas de forma individual en sobres perfectamente identificados con el material que portaban y almacenadas en arcones a -80°C en el momento de su llegada al laboratorio. Estas muestras llegaron en malas condiciones, lo que influyó negativamente en pasos posteriores. La **Tabla M1**, presenta cada una de las accesiones de Briones con algunas características relevantes.

Además, se manejaron datos y ADN pertenecientes a 1.136 accesiones de las parcelas 22, 25, y de la parcela de portainjertos de la Colección de variedades de vid de El Encín. Información de las accesiones correspondientes a dichas parcelas, se encuentra publicada en Cabello (1995).

También se incluyeron datos correspondientes a una planta de cada una de las 19 variedades utilizadas en el estudio de Homogeneidad y Estabilidad (**Tabla M2**, página 45), y datos de 14 accesiones del estudio de establecimiento de descriptores microsatélite (**Tabla M24**, página 72).

La gran cantidad de material utilizado en el estudio de Distinción, perseguía incluir las accesiones presentes en los diferentes estudios llevados a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Finca el Encín (IMIDRA).

Tabla M1. Datos correspondientes a las 112 muestras de Briones.

VARIEDAD	PAÍS DE CULTIVO	ORIGEN DE LA MUESTRA	COLOR	OBSERVACIONES*
Richter 110		Viveros Provedo (Logroño)		PTI
Paulsen 1103		Viveros Provedo (Logroño)		PTI
Ruggeri 140		Viveros Provedo (Logroño)		PTI
Couderc 161-49		Viveros Provedo (Logroño)		PTI
Couderc 1616		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		PTI
Castel 196-17		Viveros Provedo (Logroño)		PTI
Millardet et Grasset 19-62		Finca del MAPA (Aranjuez)		PTI
Richter 31		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		PTI
Couderc 3309		Finca del MAPA (Aranjuez)		PTI
41 B M		Viveros Provedo (Logroño)		PTI
Millardet et Grasset 420A		Aranjuez		PTI
Aligoté	Francia	INRA-ENSA.Montpellier	Blanca	
Arinto	Portugal	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Blanca	
Arvine petite	Suiza	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Blanca	
Babic	Croacia	I.R. Geilweilerhof	Tinta	
Baga	Portugal	Finca El Encín	Tinta	
Barbera	Italia	Finca El Encín	Tinta	
Bicane		Finca El Encín		
Bonarda	Argentina	INRA-ENSA.Montpellier	Tinta	
Cabernet franc	Francia	Finca El Encín	Tinta	
Cabernet sauvignon	Francia	Finca El Encín	Tinta	
Chasselas blanc	Francia	Finca El Encín	Blanca	
Chasselas Michel Tompa		Finca El Encín		
Chenin	Francia	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Blanca	
Cinsaut	Francia	Finca El Encín	Tinta	
Colombard	Francia	Finca El Encín	Blanca	
Dabouki	Israel	Finca El Encín	Blanca	
Dimyat	Bulgaria	I.R. Geilweilerhof	Blanca	
Dolcetto	Italia	Finca El Encín	Tinta	
Emerald riesling	USA	Finca El Encín	Blanca	
Fercal		Viveros Provedo (Logroño)		PTI
Fernão pires	Portugal	Finca El Encín	Blanca	
Feteasca neagra	Rumanía	I.R. Geilweilerhof	Tinta	
Feteasca regala	Rumanía	I.R. Geilweilerhof	Blanca	
Furmint	Hungría	Finca El Encín	Blanca	
Gamay	Francia	Finca El Encín	Tinta	
Garganega	Italia	I.A. di San Michele	Blanca	
Gewürztraminer	Francia	Finca El Encín	Blanca	
Gibi	Argentina	I.A. di San Michele	Blanca	
Isabella	Brasil	Finca El Encín	Tinta	
Jacquez		Finca El Encín		HPD
Kadarka	Hungría	Finca El Encín	Tinta	
Kerner	Alemania	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Blanca	
Koshu	Japón	I.R. Geilweilerhof	Blanca	
Kratosija	Macedonia	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Tinta	
Malbec	Francia	Finca del MAPA (Aranjuez)	Tinta	
Malvasia di Candia	Italia	I.A. di San Michele	Blanca	
Melon	Francia	Finca El Encín	Blanca	
Merlot	Francia	Finca El Encín	Tinta	

VARIEDAD	PAÍS DE CULTIVO	ORIGEN DE LA MUESTRA	COLOR	OBSERVACIONES*
Mission	USA	Finca del MAPA (Aranjuez)	Tinta	
Monbadon	USA	INRA-ENSA.Montpellier	Blanca	
Montepulciano	Italia	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Tinta	
Müller-Thurgau	Alemania	Finca El Encín	Blanca	
Nebbiolo	Italia	I.A. di San Michele	Tinta	
Negro amaro	Italia	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Tinta	
Oberlin 595		Finca El Encín		HPD
Öküz gözü	Turquía	INRA-ENSA.Montpellier	Tinta	
Olivette noire		INRA-ENSA.Montpellier		
Pamid	Bulgaria	Finca El Encín	Tinta	
Parthenocisus		Viveros Sánchez (Cabanillas del Campo, Guadalajara)		EFV
Petit bouschet		Finca El Encín		
Petit verdot	Francia	Finca El Encín	Tinta	
Pinot blanc	Francia	Finca El Encín	Blanca	
Pinot gris	Francia	INRA-ENSA.Montpellier	Blanca	
Pinot meunier	Francia	Finca El Encín	Tinta	
Pinot noir	Francia	Finca El Encín	Tinta	
Pinotage	Sudáfrica	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Tinta	
Plavac mali	Croacia	I.R. Geilweilerhof	Tinta	
Portugais bleu	Alemania	Finca El Encín	Tinta	
Primitivo	Italia	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Tinta	
Prokupac	Serbia	Finca El Encín	Tinta	
Prosecco	Italia	I.A. di San Michele	Blanca	
Quebranta	Perú	INRA-ENSA.Montpellier	Tinta	
Rabo de Ovela	Portugal	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Blanca	
Riesling	Alemania	Finca El Encín	Blanca	
Rkatsiteli	Rusia	I.A. di San Michele	Blanca	
Ruby cabernet	USA	Finca del MAPA (Aranjuez)	Tinta	
Rupestris de Lot		Finca El Encín		PTI
Sangiovese	Italia	I.A. di San Michele	Tinta	
Saperavi	Rusia	I.R. Geilweilerhof	Tinta	
Sauvignon blanc	Francia	Finca El Encín	Blanca	
Semillon	Francia	Finca El Encín	Blanca	
Seyval	Canadá	Finca El Encín	Tinta	
Silvaner	Alemania	Finca El Encín	Blanca	
Smeredevka	Serbia	Finca El Encín	Blanca	
SO4		Viveros Provedo (Logroño)		PTI
Syrah	Francia	Finca El Encín	Tinta	
Tannat	Francia	INRA-ENSA.Montpellier	Tinta	
Tinta barroca	Portugal	INRA-ENSA.Montpellier	Tinta	
Tocai friulano	Italia	I.A. di San Michele	Blanca	
Touriga nacional	Portugal	Finca El Encín	Tinta	
Ugni blanc	Francia	Finca El Encín	Blanca	
Veltliner gruen	Austria	I.R. Geilweilerhof	Blanca	
Villard blanc		Finca El Encín		HPD
Viognier	Francia	INRA-ENSA.Montpellier	Blanca	
<i>Vitis aestivalis</i>		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		EGV
<i>Vitis arizonica</i>		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		EGV
<i>Vitis californica</i>		INRA-ENSA.Montpellier		EGV
<i>Vitis candidans</i>		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		EGV
<i>Vitis cinerea</i>		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		EGV

VARIEDAD	PAÍS DE CULTIVO	ORIGEN DE LA MUESTRA	COLOR	OBSERVACIONES*
<i>Vitis cordifolia</i>		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		EGV
<i>Vitis labrusca</i>		I.R. Geilweilerhof		EGV
<i>Vitis riparia</i>		Finca El Encín		EGV
<i>Vitis rupestris</i>		Finca El Encín		EGV
<i>Vitis silvestris</i> (hembra)		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		EGV
<i>Vitis silvestris</i> (hembra)		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		EGV
<i>Vitis silvestris</i> (macho)		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		EGV
<i>Vitis silvestris</i> (macho)		CIFA Rancho la Merced (Jerez)		EGV
Vranac	Macedonia	Finca El Encín	Tinta	
Xynisteri	Chipre	Finca El Encín	Blanca	
Xynomavro	Grecia	CIFA Rancho la Merced (Jerez)	Tinta	
Zweigeltrebe blau	Austria	I.R. Geilweilerhof	Tinta	

* EGV: Especies del Género *Vitis* no vinífera
 HPD: Híbridos Productores Directos
 EFV: Especies de la Familia Vitáceas no del género *Vitis*
 PTI: Portainjertos

3.1.1.2. Estudio de Identificación

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron datos de una colección de 495 variedades obtenida durante el estudio de Distinción.

3.1.1.3. Estudio de Homogeneidad y Estabilidad

3.1.1.3.1. Selección de variedades

Para realizar este trabajo se utilizó como material vegetal hojas jóvenes de 19 variedades de vid. En la **Tabla M2** se detalla para cada una de estas variedades, sus hectáreas mundiales de cultivo en 1.990 (Hidalgo, 2002), el uso de sus productos (vino, mesa, vino-mesa), si presentan o no apirenia y el color de sus bayas. Se puede observar que para las variedades Crimson SDL, Flame SDL, Napoleón, Red globe y Sugraone, no aparecen datos de hectáreas mundiales de cultivo en ese año, pese a las consultas realizadas en distintas fuentes.

Estas 19 variedades se seleccionaron cuidadosamente, buscando la mayor diversidad posible entre ellas. Se consideraron los siguientes aspectos:

- Empleo de las uvas (vino/menta).
- Color de la piel de la baya (blancas/tintas) (recomendado por la UPOV para el agrupamiento de diferentes variedades de vid).
- Presencia o ausencia de semillas (característica muy importante para las variedades de uva de mesa).
- Origen en el tiempo (si son más antiguas o más recientes).
- Origen geográfico (variedades que tienen su origen en diferentes países/ continentes).
- En cultivo actualmente.

Tabla M2. *Material vegetal empleado para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad.*

VARIEDAD	HECTÁREAS CULTIVADAS	USO	APIRENA	COLOR
Airén	476.000	Vino	No	Blanca
Cabernet sauvignon	140.000	Vino	No	Tinta
Cardinal	26.000	Mesa	No	Tinta
Chardonnay	35.000	Vino	No	Blanca
Crimson SDL*		Mesa	Sí	Tinta
Flame SDL*		Mesa	Sí	Tinta
Garnacha	419.000	Vino	No	Tinta
Italia	20.000	Mesa	No	Blanca
Merlot	145.000	Vino	No	Tinta
Monastrell	120.000	Vino	No	Tinta
Moscatel de Málaga	90.000	Ambas	No	Blanca
Napoleón		Mesa	No	Tinta
Ohanes	11.000	Mesa	No	Blanca
Palomino fino	60.000	Vino	No	Blanca
Red globe		Mesa	No	Tinta
Sauvignon blanc	20.000	Vino	No	Blanca
Sugraone		Mesa	Sí	Blanca
Tempranillo	85.000	Vino	No	Tinta
Thompson SDL*	350.000	Mesa	Sí	Blanca

*SDL: seedless (sin semillas)

3.1.1.3.2. Toma de muestras

Los criterios seguidos para llevar a cabo el muestreo fueron los siguientes:

Se tomó material vegetal de cada una de las 19 variedades en, al menos, 10 fincas diferentes (la **Tabla M3** resume el muestreo para cada variedad).

Tabla M3. Resumen del muestreo para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad.

VARIEDAD	PAISES RECOGIDA DE MATERIAL	Nº PLANTACIONES	Nº PLANTAS MUESTREADAS
Airén	España	10	205
Cabernet sauvignon	Alemania, Chile, España, Francia, Hungría, Sudáfrica, USA	13	215
Cardinal	España, Francia, Hungría , USA	13	213
Chardonnay	Alemania, Chile, España, Francia, Hungría, Sudáfrica, USA	12	213
Crimson SDL	Chile, España, Sudáfrica, USA	15	233
Flame SDL	Chile, España, USA	11	131
Garnacha	España	13	275
Italia	Chile, España, Hungría, USA	11	209
Merlot	Alemania, Chile, España, Francia, Sudáfrica, USA	13	266
Monastrell	España	10	192
Moscatel de Málaga	España, Francia, USA	15	312
Napoleón	España	12	216
Ohanes	España, Francia	11	210
Palomino fino	España	13	263
Red globe	España	10	206
Sauvignon blanc	Alemania, Chile, España, Francia, Hungría, Sudáfrica, USA	10	198
Sugraone	Chile, España, Sudáfrica	13	219
Tempranillo	España	10	205
Thompson SDL	Chile, España, Sudáfrica, USA	14	156
TOTAL	En 7 Países , 3 Continentes	229	4.137

Para el estudio de Homogeneidad se recolectaron muestras de 52 plantas en 3 fincas diferentes, de ellas se analizaron 50. Para el estudio de Estabilidad se recolectaron muestras de 7 plantas en 7 fincas diferentes, de ellas se analizaron 5

plantas. Por tanto, para cada variedad se analizaron 185 plantas. El material vegetal recolectado en exceso, se tomó por si fuera necesario repetir algún análisis. Pese al cuidado tomado en el muestreo, efectivamente se detectaron errores: algunas o todas las plantas muestreadas de varias fincas no se correspondieron con la variedad esperada. En este caso, si el número de muestras erróneas era bastante grande y no se disponía de material de reserva en el laboratorio, hubo que realizar nuevos muestreos.

En la recogida de material se procuró, siempre que fue posible, tomar muestras para cada variedad de lugares donde su cultivo es significativo. Por ejemplo, Airén en Castilla La Mancha.

Se pretendió optimizar al máximo los viajes para la recogida de material. Así, en cada una de las regiones geográficas visitadas, se intentó recoger el máximo material de la zona necesario para la realización del trabajo.

El material que se recogió, en general, estaba en cultivo comercial.

La toma de muestras se enfocó de manera diferente dependiendo de si se trataba de variedades de uva de mesa o de vino:

La uva de mesa en España se cultiva principalmente en el sur y sureste de la península. Por ello, la recogida de muestras de las variedades Cardinal, Crimson SDL, Flame SDL, Italia, Napoleón, Ohanes, Red globe, Sugraone y Thompson SDL, se centró principalmente en Alicante, Almería, Cádiz, Murcia y Huelva. La recolección de estas muestras en concreto, habría sido muy difícil sin la participación de José María Hurtado (Superior Frutícola S.A.), debido a la gran cantidad de contactos que posee en el sector productivo de uva de mesa.

Dentro de este material también se incluyeron algunas muestras extranjeras procedentes de plantaciones de Chile, Estados Unidos de América, Francia, Hungría y Sudáfrica. La obtención de las mismas se llevó a cabo contactando en primer lugar con centros e investigadores de todo el mundo y, posteriormente solicitando permisos de importación para el material vegetal que se iba a recibir.

En total, se dispuso de material de 25 plantaciones para el estudio de Homogeneidad y de 85 plantaciones adicionales para el estudio de Estabilidad.

Con respecto a las 10 variedades de vinificación, incluyendo aquí a la variedad Moscatel de Málaga (apta para vino, mesa y pasificación), el material de España se obtuvo esencialmente a través de la colaboración con numerosas

Denominaciones de Origen: Almansa, Calatayud, Campo de Borja, Cariñena, Tarragona, Condado de Huelva, Costers del Segre, Jerez, Jumilla, La Mancha, Métrida, Monterrei, Montilla-Moriles, Navarra, Penedés, Ribeira Sacra, Ribeiro, Ribera de Duero, Ribera del Guadiana, Rueda, Rioja, Málaga, Utiel-Requena, Valdeorras, Valdepeñas, Valencia, Vinos de Madrid y Yecla (**Tabla M4** y **Figura M1**, páginas 50 y 51).

Dentro de este material también se incluyeron algunas muestras procedentes de fuera de España, siguiendo para su obtención el mismo procedimiento que para las variedades de uva de mesa.

En total se dispuso de material de 35 plantaciones para el estudio de Homogeneidad y de 84 plantaciones adicionales para el estudio de Estabilidad.

En cada plantación, se siguió siempre que era posible, el siguiente protocolo de toma de muestras:

- Recolección, en la mayoría de los casos, de hojas jóvenes, de unos 4 a 7 cm de longitud, localizadas en pámpanos verdes en pleno crecimiento de plantas seleccionadas al azar.
- Introducción de cada una de las muestras en sobres de papel individuales, perfectamente identificados.
- Mantenimiento de los sobres en frío hasta su llegada al laboratorio. Generalmente en neveras con acumuladores de frío.
- Una vez en el laboratorio, almacenamiento de las muestras en arcones a -80°C , hasta su posterior utilización.

Se recabó toda la información posible de las plantaciones en las cuales se recogió material vegetal; en concreto, se solicitó:

- Nombre de la finca y del propietario de la misma.
- Localización geográfica: población, provincia, país y siempre que fue posible, datos GPS para la mayoría de las fincas españolas.
- Conducción de las plantas (en vaso, en espaldera, en parral, en lira etc.).
- Año de plantación: se intentó cuando fue posible, recoger muestras con un amplio rango en cuanto al año de plantación para cada variedad. En algunos casos no fue posible obtener una fecha de plantación, ya que en el lugar de recogida no se disponía de estos datos.
- Procedencia de las plantas (viveros, injertos, etc.)

- Pertenencia a alguna Denominación de Origen.

En total se muestrearon 4.137 plantas de 7 países diferentes. Debido a la gran cantidad de información recogida, fue necesario crear una base de datos relacional en Microsoft Access, con el fin de optimizar la extracción de información útil a partir de la misma, y facilitar su análisis.

Las **Tablas M5 - M23**, páginas 52 - 70, corresponden a cada una de las variedades estudiadas, donde se detalla exhaustivamente el muestreo para cada una de ellas. Se han omitido, por razones de confidencialidad, los nombres de las fincas y sus coordenadas GPS.

Tabla M4. Denominaciones de Origen presentes en el estudio. Se citan las variedades que corresponden a cada una de ellas y el número de muestras recogidas de cada variedad.

D.O	VARIETADES	Nº DE MUESTRAS POR VARIETADE	TOTAL
Almansa	Monastrell	7	7
Calatayud	Tempranillo	7	7
Campo de Borja	Moscatel de Málaga-Tempranillo	7-7	14
Cariñena	Garnacha-Moscatel de Málaga	7-52	59
Cataluña	Chardonnay-Monastrell-Moscatel de Málaga-Sauvignon blanc	7-7-52-52	118
Condado de Huelva	Palomino fino	52	52
Costers del Segre	Garnacha-Merlot	52-7	59
Jerez	Monastrell-Moscatel de Málaga-Palomino fino	52-21-125	198
Jumilla	Airén-Monastrell	59-53	112
La Mancha	Airén-Cabernet sauvignon-Garnacha	59-7-52	118
Méntrida	Garnacha	52	52
Monterrei	Palomino fino	7	7
Montilla-Moriles	Airén-Moscatel de Málaga	52-52	104
Navarra	Cabernet sauvignon-Chardonnay-Garnacha-Merlot	7-52-7-52	118
Penedés	Cabernet sauvignon-Tempranillo	7-52	59
Ribeira Sacra	Palomino fino	7	7
Ribeiro	Palomino fino	7	7
Ribera de Duero	Cabernet sauvignon-Garnacha-Merlot-Tempranillo	52-7-52-52	163
Ribera del Guadiana	Cabernet sauvignon-Chardonnay-Garnacha-Merlot-Monastrell-Tempranillo	7-52-7-7-7-7	87
Rioja	Garnacha-Tempranillo	52-7	59
Rueda	Palomino fino-Sauvignon blanc	52-59	111
Sierra de Málaga	Cabernet sauvignon-Chardonnay-Garnacha-Merlot- Moscatel de Málaga-Sauvignon blanc-Tempranillo	7-7-7-7-52-52-7	139
Utiel-Requena	Chardonnay-Garnacha-Merlot-Tempranillo	7-7-52-7	73
Valdeorras	Palomino fino	7	7
Valdepeñas	Airén-Tempranillo	14-52	66
Valencia	Chardonnay-Monastrell	7-52	59
Vinos de Madrid	Airén-Garnacha-Merlot	14-7-7	28
Yecla	Monastrell	7	7

Figura M1. Representación geográfica de las 28 Denominaciones de Origen que han participado en el estudio.

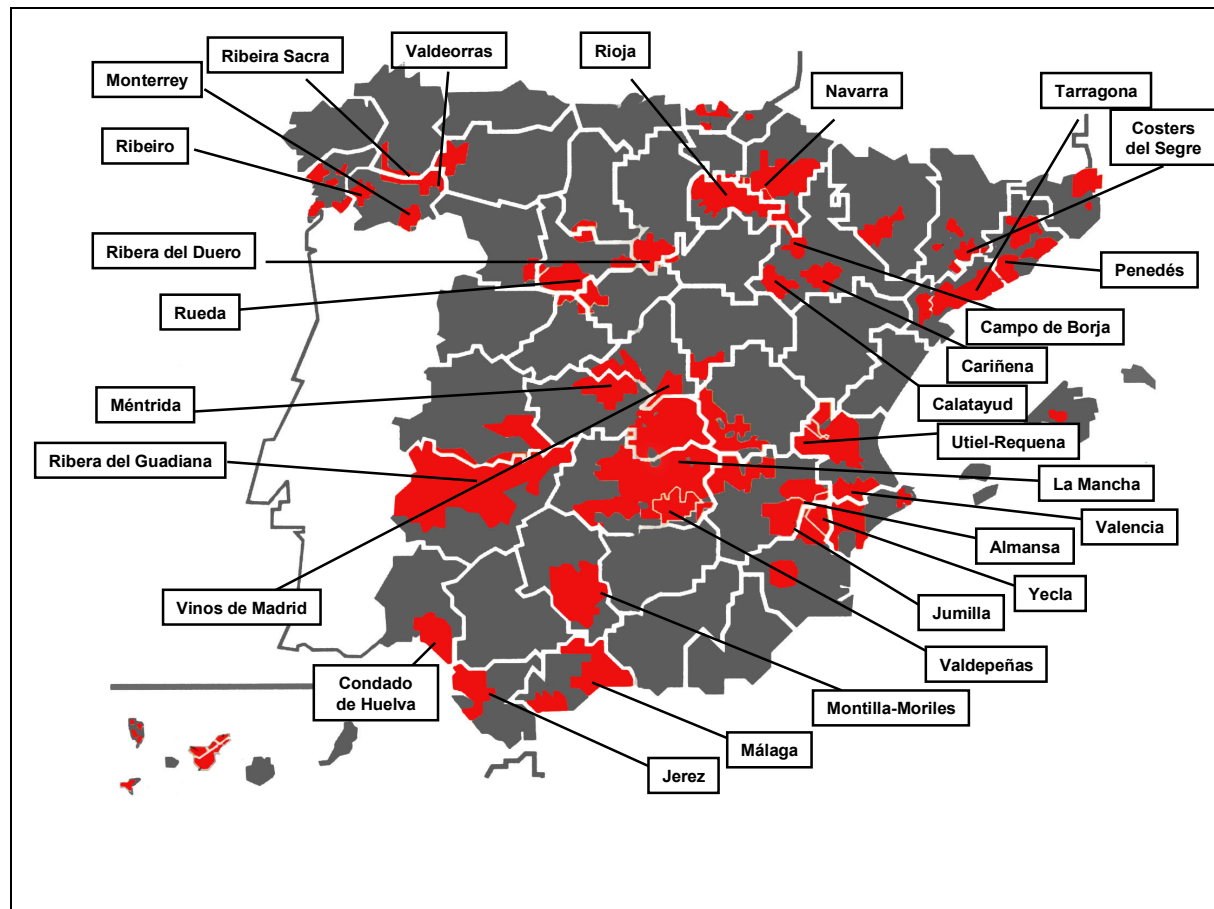


Tabla M5. Datos de la recogida de muestras de la variedad Airén.

VARIEDAD AIRÉN									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Ciudad Real	Alcázar de San Juan	52	2003	1963	La Mancha	La Mancha	Vaso
2	España	Murcia	Jumilla	52	2002	1990	Jumilla	Jumilla	Vaso. 8 plantas no eran Airén
3	España	Córdoba	Montilla	52	2003	1989	Montilla	Montilla-Moriles	Vaso. 6 plantas no eran Airén
4	España	Murcia	Jumilla	7	2002	1985	Jumilla	Jumilla	Vaso
5	España	Ciudad Real	Montiel	7	2003	1985	Vivero de Valencia	Valdepeñas	Vaso
6	España	Ciudad Real	Valdepeñas	7	2003	1978	Vivero de Valencia	Valdepeñas	Vaso
7	España	Ciudad Real	Alcázar de San Juan	7	2003	1984	Autóctono. Tradicional	La Mancha	Vaso
8	España	Guadalajara	Pioz	7	2003	1944	Cuenca		
9	España	Madrid	San Martín de Valdeiglesias	7	2003	1988		Vinos de Madrid	Vaso
10	España	Madrid	Arganda	7	2003	1959		Vinos de Madrid	Vaso

Tabla M6. Datos de la recogida de muestras de la variedad Cabernet sauvignon.

VARIEDAD CABERNET SAUVIGNON									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	Chile	Santiago de Chile	La Pintana	50	2003				
2	Sudáfrica	Western Cape	Stellenbosch	50	2003	2001	Sudáfrica		
3	España	Burgos	La Horra	52	2002		Rioja	Ribera de Duero	Espaldera
4	España	Ciudad Real	Alcázar de San Juan	7	2003	1995	Vivero de Valencia	La Mancha	Vaso
5	Hungría		Kecskemét	7	2003	1996			
6	España	Barcelona	Torrelavit	7	2003	1965	Burdeos	Penedés	Espaldera
7	España	Navarra	Olite	7	2002	1994	Viveros (clon certificado)	Navarra	Espaldera
8	Alemania		Siebeldingen	7	2002	2000	Vivero Freytag		
9	España	Badajoz	Alanje	7	2002	1995		Ribera del Guadiana	Espaldera
10	España	Málaga	Antequera	7	2002	1995	Francia	Sierra de Málaga	Espaldera
11	USA	California	Davis	4	2002				
12	Francia		Montpellier	5	2003	1954	Fronsac, Gironde (Francia)		
13	Francia		Montpellier	5	2003	1971	Finca Macula, Santiago de Chile(Chile)		

Tabla M7. Datos de la recogida de muestras de la variedad Cardinal.

VARIEDAD CARDINAL									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Sevilla	Los Palacios y Villafranca	52	2004	1992	Injerto		Vaso
2	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1991			Espaldera
3	Hungría		Kecskemét	7	2003	1988			Ninguna planta era Cardinal
4	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1988	Injerto		Espaldera
5	USA	California		7	2002	2000			
6	España	Cádiz	Jerez	7	2002	1984	Viveros "Vitis Jerez"		Espaldera
7	USA	California	Davis	2	2002				
8	Francia		Montpellier	5	2003	1956	EEUU		
9	España	Madrid	Alcalá de Henares	6	2003	1960	Embajada de España en Roma (Italia)		Espaldera/Vaso
10	España	Madrid	Alcalá de Henares	4	2004	1981	Málaga		Vaso
11	España	Sevilla	Dos Hermanas	52	2005	2005	Vivero Rauscedo(Italia)		Lira
12	España	Sevilla	Los Palacios	52	2005	1975	Autóctono		Vaso
13	España	Madrid	Alcalá de Henares	5	2005	1949	Italia		Espaldera

Tabla M8. Datos de la recogida de muestras de la variedad Chardonnay.

VARIEDAD CHARDONNAY									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Badajoz	Almendralejo	52	2002	1990		Ribera del Guadiana	Espaldera
2	España	Navarra	Olite	52	2002	1994	Viveros (clones comerciales)	Navarra	
3	Sudáfrica	Western Cape	Stellenbosch	50	2003		Sudáfrica		
4	Francia		Montpellier	5	2003	1952	Meursault, Cote d'Or (Francia)		
5	Chile	Santiago de Chile	La Pintana	7	2003				
6	España	Valencia	Utiel	7	2002	1996		Utiel-Requena	Espaldera
7	España	Tarragona	Montblanc	7	2003	1988		Cataluña	Espaldera
8	España	Málaga	Antequera	7	2002	1995	Francia	Sierra de Málaga	Espaldera
9	España	Valencia	Fontanars dels Alforins	7	2002	1996	Avignon (Francia)	Valencia	
10	Alemania		Siebeldingen	7	2002	2000	Vivero Freytag		
11	Hungría		Kecskemét	7	2003	1996			
12	USA	California	Davis	5	2002				

Tabla M9. Datos de la recogida de muestras de la variedad *Crimson seedless*.

VARIEDAD CRIMSON SEEDLESS									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Murcia	Alhama de Murcia	52	2002	1998			
2	España	Murcia	Alhama de Murcia	52	2002	1998			
3	España	Cádiz	Jerez	7	2004	2000			Espaldera
4	España	Murcia	Abarán	7	2002	1998			
5	España	Murcia	Alhama de Murcia	7	2002	2000			
6	USA	California		7	2002	1994			
7	España	Murcia		7	2002		USA		
8	USA	California		6	2002	1998			
9	USA	California		7	2002	1999			
10	España	Murcia	Cieza	7	2002	1997			
11	Chile	V Región	Llay Llay	7	2003				
12	Sudáfrica	Western Cape	Saron	5	2003		Sudáfrica		
13	Sudáfrica	Western Cape	Saron	5	2003		Sudáfrica		
14	Sudáfrica	Western Cape	Saron	5	2003		Sudáfrica		
15	España	Cádiz	Jerez	52	2005	2004	Viveros Santa Margarita		Parral

Tabla M10. Datos de la recogida de muestras de la variedad Flame seedless.

VARIEDAD FLAME SEEDLESS									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Murcia		52	2002		Viveros Provedo (Logroño)		
2	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1976			
3	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1992			
4	Chile	V Región	Llay Llay	9	2003				
5	USA	California	Davis	2	2002				
6	España	Murcia	Águilas	7	2002	1997	Viveros Valencia		
7	USA	California		7	2002	1998			
8	USA	California		6	2002	1994			
9	España	Murcia	Abarán	7	2002	1995			
10	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1988	Injerto		Espaldera
11	España	Cádiz	Jerez	20	2005	1988	Viveros "Vitis Jerez"		Espaldera

Tabla M11. Datos de la recogida de muestras de la variedad Garnacha.

VARIEDAD GARNACHA									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Ciudad Real	Alcázar de San Juan	52	2003	1995	Vivero de Valencia	La Mancha	Vaso. Todas la plantas eran Garnacha Tintorera
2	España	La Rioja	Logroño	52	2002		Autóctono (1825-1900)	Rioja	
3	España	Lérida	Balaguer	52	2003	1999	Francia	Costers del Segre	Espaldera
4	España	Badajoz	Alanje	7	2002	1998		Ribera del Guadiana	Espaldera
5	España	Málaga	Antequera	7	2002	1995	Francia	Sierra de Málaga	Espaldera
6	España	Burgos	La Horra	7	2002		Rioja	Ribera de Duero	Espaldera/Vaso
7	España	Zaragoza	Cariñena	7	2003	1943		Cariñena	Vaso
8	España	Madrid	San Martín de Valdeiglesias	7	2003	1963	Autóctono	Vinos de Madrid	Espaldera
9	España	Navarra	Olite	7	2002	1994	Viveros (clones comerciales)	Navarra	
10	España	Valencia	El Rebollar	7	2002	1974		Utiel-Requena	Vaso
11	España		Madrid	14	2001	1800			
12	España	Madrid	Alcalá de Henares	4	2004	1942	Madrid		Vaso
13	España	Toledo	La Torre de Esteban Hambrán	52	2005	1950		Méntrida	Vaso

Tabla M12. Datos de la recogida de muestras de la variedad Italia.

VARIEDAD ITALIA									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Alicante	Monforte	55	2002	1998	Valencia		
2	España	Murcia	Alhama de Murcia	52	2002	1995			
3	España	Murcia	Alhama de Murcia	51	2002	1996			
4	USA	California		7	2002	2000			
5	España	Murcia	Alhama de Murcia	7	2002	1996			
6	Hungría		Kecskemét	6	2003	1996			
7	Chile	Santiago de Chile	La Pintana	6	2003				
8	España	Huelva	Almonte	7	2002	1990	Alicante		Espaldera
9	España	Murcia	Abarán	7	2002	1997			
10	España	Murcia	Alhama de Murcia	7	2002	1998			
11	USA	California	Davis	4	2002				

Tabla M13. Datos de la recogida de muestras de la variedad Merlot.

VARIEDAD MERLOT									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Burgos	La Horra	52	2002		Rioja	Ribera de Duero	Espaldera/Vaso.Ninguna planta era Merlot
2	España	Navarra	Olite	52	2002	1994	Viveros (clones comerciales)	Navarra	
3	España	Valencia	Utiel	52	2002	1996		Utiel-Requena	Espaldera
4	Chile	Santiago de Chile	La Pintana	7	2003				
5	Sudáfrica	Western Cape	Stellenbosch	7	2003		Sudáfrica		
6	Alemania		Siebelingen	7	2002	2000	Vivero Freytag		
7	España	Madrid	Cenicientos	7	2003	1999	Francia	Vinos de Madrid	Vaso
8	España	Badajoz	Alanje	7	2002	2000		Ribera del Guadiana	Espaldera
9	Francia		Montpellier	5	2003	1956	Gauriac, Gironde (Francia)		
10	España	Málaga	Antequera	7	2002	1995	Francia	Sierra de Málaga	Espaldera
11	USA	California	Davis	4	2002				
12	España	Lérida	Marcovau	7	2003	1998		Costers del Segre	Espaldera
13	España	Madrid	Alcalá de Henares	52	2005	1974	Francia		Vaso

Tabla M14. Datos de la recogida de muestras de la variedad Monastrell.

VARIEDAD MONASTRELL									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Valencia	Fontanars dels Alforins	52	2002	1998	Viveros Soriano, Onteniente (Valencia)	Valencia	Espaldera
2	España	Cádiz	Jerez	52	2004	1995		Jerez	Espaldera. Sólo 5 plantas eran Monastrell
3	España	Murcia	Jumilla	53	2002	1962	Villena (Valencia)	Jumilla	Vaso
4	España	Badajoz	Alanje	7	2002	1992		Ribera del Guadiana	Vaso
5	España	Albacete	Almansa	7	2002	1992	Almansa	Almansa	Vaso
6	España	Tarragona	Vimbodí	7	2003	1993	Viveros Chauvin (Francia)	Cataluña	Espaldera
7	España	Murcia	Yecla	7	2002	1971	Autóctono	Yecla	Vaso. 1 planta no era Monastrell
8	España		Madrid	1	2001	1800			
9	España	Madrid	Alcalá de Henares	4	2005	1949	Albacete		Vaso
10	España	Madrid	Alcalá de Henares	2	2005	1949	Lérida		Vaso

Tabla M15. Datos de la recogida de muestras de la variedad Moscatel de Málaga.

VARIEDAD MOSCATEL DE MÁLAGA									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Córdoba	Montilla	52	2003	1997		Montilla-Moriles	Espaldera. Ninguna planta era Moscatel de Málaga
2	España	Málaga	Fuente de Piedra	52	2002	1994	Barcelona	Sierra de Málaga	Espaldera. Ninguna planta era Moscatel de Málaga
3	España	Tarragona	Vila Rodona	52	2003			Cataluña	Espaldera .1 planta no era Moscatel de Málaga
4	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1995		Jerez	Espaldera
5	España	Cádiz	Chipiona	7	2002	1980	Chipiona	Jerez	Vaso
6	España	Cádiz	Chipiona	7	2002	1977	Chipiona	Jerez	Vaso
7	España	Zaragoza	Ainzón	7	2003	1988		Campo de Borja	Espaldera. Ninguna planta era Moscatel de Málaga
8	Francia		Montpellier	5	2003	1971	Finca Pulenta, San Juan (Argentina)		2 plantas no eran Moscatel de Málaga
9	España	Tenerife	Güímar	7	2003	2001			
10	España	Tenerife	La Orotava	1	2003	1950			
11	USA	California	Davis	4	2002				
12	España	Zaragoza	Encina Corba	52	2003	1963		Cariñena	Vaso
13	España	Madrid	Alcalá de Henares	4	2004	1972	Torrox (Málaga)		Vaso
14	España	Málaga	El Borge	52	2005	1980	Autóctono		Vaso
15	España	Madrid	Alcalá de Henares	3	2005	1949	Lanzarote		Vaso

Tabla M16. Datos de la recogida de muestras de la variedad Napoleón.

VARIEDAD NAPOLEÓN									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Almería	Terque	54	2002	1995	Almería		
2	España	Alicante	Hondón de las Nieves	52	2002	1995			
3	España	Murcia	Alhama de Murcia	52	2002	1996			
4	España	Almería	Terque	7	2002	1994			
5	España	Murcia	Sotana	7	2002	1996			
6	España	Cádiz	Jerez	7	2002	1984	Viveros "Vitis Jerez"		Espaldera. Experimental
7	España	Murcia	Abarán	7	2002	1997			
8	España	Murcia	Abarán	7	2002	1990			
9	España	Murcia	Alhama de Murcia	7	2002	1990			
10	España	Murcia	Cieza	7	2002	1993			
11	España	Murcia	Alhama de Murcia	7	2002	1995			
12	España		Madrid	2	2001	1800			

Tabla M17. Datos de la recogida de muestras de la variedad Ohanes.

VARIEDAD OHANES									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Almería	Terque	54	2002	1986	Almería		
2	España	Almería	Berja	52	2004	1974	Yemas injertadas de la zona		Parral
3	España	Almería	Terque	7	2002	1995	Almería		
4	España	Almería	Bentarique	8	2002	1980	Almería		
5	España	Almería	Terque	7	2002	1982	Almería		
6	España	Almería	Terque	7	2002	1982	Almería		
7	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1991			Espaldera
8	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1991			Espaldera
9	Francia		Montpellier	5	2003	1952	Rajonska Poljoprior (Yougoslavia)		
10	España	Madrid	Alcalá de Henares	4	2004	1942	Almería		Vaso
11	España	Almería	Canjayar	52	2005	1975	Autóctono		Parral

Tabla M18. Datos de la recogida de muestras de la variedad Palomino fino.

VARIEDAD PALOMINO FINO									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Valladolid	La Seca	52	2002	1960		Rueda	Vaso. Ninguna planta era Palomino fino
2	España	Cádiz	Jerez	52	2002			Jerez	Espaldera
3	España	Huelva	Almonte	52	2002	1970		Condado de Huelva	Espaldera. 8 plantas no eran Palomino fino
4	España	Cádiz	Jerez	7	2002	1986	Colección Jerez 1943	Jerez	Espaldera
5	España	Ourense	Barzamedelle-Leiro	7	2002	1962		Ribeiro	
6	España	Ourense	Monterrei	7	2002	1972		Monterrei	Ninguna planta era Palomino fino
7	España	Ourense	A Rua	7	2002	1994	Injertos propios	Valdeorras	
8	España	Lugo	Concello de Sober	7	2002	1940		Ribeira Sacra	
9	España	Cádiz	Jerez	52	2004	1983		Jerez	Espaldera. 1 planta no era Palomino fino
10	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1995		Jerez	
11	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1991		Jerez	
12	España	Madrid	Alcalá de Henares	2	2004	1914	Huelva		Vaso
13	España	Madrid	Alcalá de Henares	4	2005	1949	Cigales (Valladolid)		Vaso

Tabla M19. Datos de la recogida de muestras de la variedad Red globe.

VARIEDAD RED GLOBE									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Almería	Terque	53	2002	2000	Cooperativa Albentillas (Almería)		6 plantas no eran Red globe
2	España	Murcia	Alhama de Murcia	52	2002	1999			
3	España	Alicante	Monforte	52	2002	1999	Valencia		
4	España	Alicante	Monforte	7	2002	1994	Valencia		
5	España	Murcia	Totana	7	2002	1999			
6	España	Murcia	Alhama de Murcia	7	2002	1997			
7	España	Murcia	El Paretón	7	2002	2000			
8	España	Murcia	Alhama de Murcia	7	2002	1999			
9	España	Murcia	Cieza	7	2002	1997			
10	España	Murcia	Águilas	7	2003	2003			

Tabla M20. Datos de la recogida de muestras de la variedad Sauvignon blanc.

VARIEDAD SAUVIGNON BLANC									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Valladolid	La Seca	52	2002	1989	Rueda	Rueda	Espaldera
2	España	Tarragona	Montblanc	52	2003	1988		Cataluña	Espaldera
3	España	Málaga	Antequera	52	2002	1995	Francia	Sierra de Málaga	Espaldera
4	Hungría		Kecskemét	7	2003	1996			
5	Chile	Santiago de Chile	La Pintana	7	2003				
6	Sudáfrica	Western Cape	Stellenbosch	7	2003		Sudáfrica		
7	España	Valladolid	Rueda	7	2002	1982	Francia	Rueda	Espaldera
8	Francia		Montpellier	5	2003	1954	Naujan et Postiac, Gironde (Francia)		
9	Alemania		Siebeldingen	7	2002	2000	Vivero Freytag		
10	USA	California	Davis	2	2002	2002			

Tabla M21. Datos de la recogida de muestras de la variedad *Sugraone*.

VARIEDAD SUGRAONE									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Murcia		52	2002		Sunworld (USA)		
2	Sudáfrica	Western Cape	Saron	50	2003		Sudáfrica		
3	España	Murcia	Águilas	53	2003	2000			
4	Chile	Santiago de Chile	La Pintana	7	2003				
5	España	Murcia	El Paretón	7	2002	1987			
6	España	Almería	Terque	7	2002	1998	Murcia		
7	España	Murcia	Águilas	7	2002	1997	Viveros Valencia		
8	España	Alicante	Monforte	7	2002	1997	Valencia		
9	España	Murcia	El Paretón	7	2002	2000			
10	España	Murcia	Archena	7	2002	1995			
11	Sudáfrica	Western Cape	Saron	5	2003		Sudáfrica		
12	Sudáfrica	Western Cape	Saron	5	2003		Sudáfrica		
13	Sudáfrica	Western Cape	Saron	5	2003		Sudáfrica		

Tabla M22. Datos de la recogida de muestras de la variedad Tempranillo.

VARIEDAD TEMPRANILLO									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	España	Ciudad Real	Montiel	52	2003	1985	Vivero de Valencia	Valdepeñas	Espaldera
2	España	Burgos	La Horra	52	2002		Rioja	Ribera de Duero	Espaldera
3	España	Barcelona	El Pla del Penedés	52	2003	1973	Autóctono	Penedés	Espaldera. 2 plantas no eran Tempranillo
4	España	Badajoz	Alanje	7	2002			Ribera del Guadiana	Espaldera
5	España	La Rioja	Logroño	7	2002	2000	Bodegas Berrueco, Villabuena de Álava (Álava)	Rioja	
6	España	Málaga	Antequera	7	2002	1995	Francia	Sierra de Málaga	Espaldera
7	España	Zaragoza	Ainzón	7	2003	1987	Rioja	Campo de Borja	Espaldera
8	España	Zaragoza	Alarba	7	2003	1988		Calatayud	Vaso
9	España	Valencia	Utiel	7	2002	1991		Utiel-Requena	Espaldera
10	España	Guadalajara	Pioz	7	2003	1944	Autóctono. Tradicional		

Tabla M23. Datos de la recogida de muestras de la variedad Thompson seedless.

VARIEDAD THOMPSON SEEDLESS									
Nº FINCA	LUGAR DE RECOGIDA			Nº PLANTAS RECOLECTADAS	AÑO RECOLECCIÓN	AÑO PLANTACIÓN	ORIGEN PLANTACIÓN	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	OBSERVACIONES
	PAÍS	PROVINCIA	POBLACIÓN						
1	Sudáfrica	Western Cape	Saron	49	2003		Sudáfrica		
2	España	Almería	Vicar	7	2004	2003	Rancho la Merced (Jerez)		En maceta. Ninguna planta era Thompson SDL
3	España	Cádiz	Jerez	7	2004	1988	Injerto		Espaldera
4	Sudáfrica	Western Cape	Saron	5	2003		Sudáfrica		
5	Sudáfrica	Western Cape	Saron	5	2003		Sudáfrica		
6	Sudáfrica	Western Cape	Saron	5	2003		Sudáfrica		
7	España	Murcia	Abarán	10	2002	1997			Ninguna planta era Thompson SDL
8	USA	California		7	2002	1984			
9	USA	California		7	2002	1982			
10	USA	California	Davis	2	2002				
11	Chile	Santiago de Chile	La Pintana	7	2003				
12	España		Madrid	1	2001	1800			
13	España	Cádiz	Jerez	39	2005	1988	Viveros "Vitis Jerez"		Espaldera
14	España	Madrid	Alcalá de Henares	5	2005	1949	Grecia		Espaldera

3.1.1.4. Establecimiento de descriptores microsatélite

El proyecto de la Unión Europea GENRES081 fue el principal intento internacional para armonizar un sistema basado en microsatélites para la identificación de variedades de vid. Se seleccionaron 6 microsatélites (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, ssrVrZAG62 y ssrVrZAG79), y se analizaron por 10 laboratorios diferentes, idénticas muestras de DNA, pertenecientes siempre que fue posible, a variedades de vid bien conocidas y ampliamente distribuidas geográficamente (This et al., 2004). Para cada marcador, cada uno de sus alelos se designó mediante un código basado en el nombre del cultivar tomado como referencia que presentó ese alelo en particular. Con ello, se perseguía desarrollar una base de datos común e internacional que contuviera alelos de referencia microsatélite para la identificación de variedades de vid. Con los resultados obtenidos, se elaboraron descriptores para los 6 loci microsatélite estudiados. Estos descriptores fueron aprobados por la OIV en la reunión celebrada en Junio del 2.007 en Budapest (Hungría).

En este estudio se siguió esencialmente la metodología desarrollada en This et al. (2004), para la elaboración de descriptores microsatélite. El material utilizado para ello, estuvo compuesto en su mayoría, por ADN de plantas de la Colección de vides de El Encín. La **Tabla M24** muestra aquellos cultivares utilizados en este estudio, pertenecientes a variedades empleadas en This et al. (2004), con algunas características relevantes. De todos ellos, 14 se tomaron del material con el que se llevó a cabo el estudio de This et al. (2004), ya que no estaban presentes en la Colección de vides de El Encín. Los cultivares Touriga nacional y Barbera, incluidos en el estudio anterior, no están presentes en este trabajo, ya que no se disponía de ellos.

Tabla M24. Cultivares de vid empleados para la elaboración de descriptores microsatélite. Color de la baya (B-blanco, N-negro y RG-rojo); True to type (variedades que estudiadas en This et al. (2004) mediante ampelografía, correspondían o no a la descripción oficial de la misma); Cultivares de referencia (cultivares empleados como referencia de alelos).

	NOMBRE VARIEDAD	COLOR BAYA	CÓDIGO	TRUE TO TYPE	CULTIVARES DE REFERENCIA
1	Admirable de Courtilier	B		SI	NO
2	Alvarelhao	N	AL	SI	SI
3	Argiogitiko	N		SI	NO
4	Cabernet franc	N	CF	SI	SI
5	Cabernet sauvignon	N	CS	SI	SI
6	Carignan	N		SI	NO
7	Castel 216-3*			SI	NO
8	Chardonnay	B	CH	SI	SI
9	Couderc 1616*		16C	SI	SI
10	Couderc 3309*		33C	SI	SI
11	Fercal*		FE	SI	SI
12	Furmint	B		SI	NO
13	Goethe 9*		GO	NO	SI
14	Hans	RG		SI	NO
15	Jacquez	N	JA	NO	SI
16	Kober 5 BB*		5BK	SI	SI
17	Madeleine royale	B	MAR	SI	SI
18	Malegue 44-53*		4MA	SI	SI
19	Mancin	N	MAN	SI	SI
20	Mauzac	B	MAU	SI	SI
21	Mavrodaphni	N	MAV	SI	SI
22	Merlot	N	ME	SI	SI
23	Millardet et Grasset 101-14*	N	1MG	SI	SI
24	Millardet et Grasset 420A*		4MG	SI	SI
25	Mourvedre	N		SI	NO
26	Muscat a petits grains blancs	B	MU	SI	SI
27	Muscat of Alexandria	B		SI	NO
28	Paulsen 1103*			SI	NO
29	Pinot noir	N	PI	SI	SI
30	Portugieser blau	N	PO	SI	SI
31	Richter 110*		11R	SI	SI
32	Richter 99*		99R	SI	SI
33	Romorantin	B	RO	SI	SI
34	Rondinella	N		SI	NO
35	Ruggeri 140*			SI	NO
36	Salvador (= Seibel 128)		SAL	SI	SI
37	Schwarzmann		SCH	SI	SI
38	Silvaner	B	SI	SI	SI
39	Sultanina gigas	B	SU	SI	SI
40	Teleki 5 C*		5C	SI	SI
41	Traminer rot	RG	TR	SI	SI
42	Trebbiano toscano	B		NO	NO
43	Veltliner rot	RG	VE	SI	SI
44	Vialla*	N	VIA	SI	SI
45	Vital	B	VI	SI	SI

* portainjertos

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, inicialmente se empleó el kit comercial “DNeasy Plant mini Kit” de la empresa Qiagen, mediante el cuál se extraían un máximo de 50 muestras al día. Posteriormente, se empleó el kit “DNeasy 96 Plant Kit” de la misma empresa, el cuál permitió procesar 192 muestras a la vez. Los dos kits eran casi idénticos, la única diferencia que existía entre ellos, era el formato de columnas para la extracción; individuales para el “DNeasy Plant mini Kit”, y en placas de 96 columnas para el “DNeasy 96 Plant Kit”. El ADN perteneciente a las 112 muestras de Briones (**Tabla M1**, página 42), se extrajo en su totalidad con el “DNeasy 96 Plant Kit”.

Para la extracción del ADN se utilizaron hojas jóvenes, obtenidas de los brotes tiernos que previamente habían sido congelados.

Independientemente del kit empleado, se siguió esencialmente el protocolo del fabricante. Las muestras se trituraron en el molino Mixer Mill MM300 (1 minuto a 20Hz). Por cada muestra se introdujo en un tubo 50 mg de hoja conservada a -80°C, una bolita de tungsteno y una pequeña cantidad de PVPP (Poli Vinil Poli Pirrolidona) para mejorar el rendimiento de la extracción, debido a la cantidad de polifenoles que presenta la hoja de vid. En el proceso de triturado se utilizó Nitrógeno líquido para evitar la descongelación de las muestras y permitir así la destrucción de las paredes celulósicas de las células vegetales por acción de las bolitas de tungsteno. Posteriormente se añadió tampón de lisis para romper la membrana celular y proteger el ADN de la degradación. Asimismo, se incorporó una ARNasa para degradar el ARN, el cuál podría interferir en la cuantificación del ADN y/o en la posterior reacción de PCR. Sucesivas etapas de precipitación, filtración, unión selectiva a una matriz, lavados alcohólicos y elución sirvieron para la purificación de ese ADN, eliminando restos de membranas, proteínas, polisacáridos y otros componentes celulares.

3.2.2. Estimación de la calidad y cantidad del ADN extraído

Para evaluar la calidad y la cantidad de los ADN, estos se sometieron a electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0,8% y tampón TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA pH 8 1mM). Tanto los geles como los tampones de

electroforesis, contenían bromuro de etidio a una concentración de 0,5µg/ml, para poder visualizar el ADN al iluminarlo con luz UV. Las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente y bajo una diferencia de potencial de unos 2 V/cm.

La calidad se evaluó atendiendo a la presencia de una banda nítida de alto peso molecular, y observando el grado de rotura y/o degradación presente, visible como un rastro a partir de esa banda.

Para estimar la cantidad, se incluyeron en el gel diferentes muestras de cantidades conocidas de ADN del fago lambda sin digerir junto a los ADN a cuantificar. Se obtuvieron distintas bandas con diferentes intensidades de fluorescencia, correspondientes a distintas cantidades de ADN. La comparación de la fluorescencia emitida por los ADN problema frente a los estándar permitió determinar la cantidad presente en los primeros.

Las imágenes se obtuvieron con un equipo de análisis de imagen (UVP 5000 Imagestore).

3.2.3. Métodos de análisis de microsatélites (STMS) de genoma nuclear

3.2.3.1. Amplificación de las secuencias STMS mediante PCR

En los 9 loci microsatélite seleccionados para realizar este trabajo, un cebador de cada pareja (cebador directo o “upper”) incorporaba una molécula de fluorocromo de entre tres posibles: 6-FAM, TET y HEX, para permitir la posterior detección del fragmento amplificado. El diseño hacía posible la amplificación y análisis conjunto de los 9 microsatélites mediante PCR múltiple (o multiplex). Para ello se optimizó una mezcla de reacción y un programa de amplificación que se muestran en el apartado de Resultados y Discusión.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 de MJ Research.

3.2.3.2. Determinación del tamaño de los alelos de los STMS

Se realizó esencialmente de acuerdo a Borrego et al. (2000). Tras la PCR se comprobó si se había producido la amplificación. Para ello se tomaron alícuotas de 7µl y se sometieron a electroforesis a temperatura ambiente en geles de agarosa al 2% (p/v) con tampón TAE 1X y bromuro de etidio (0,5µg/ml), aplicando una

diferencia de potencial aproximada de 5V/cm. Además de las muestras, se incorporó en un pocillo de cada peine el marcador de peso molecular: 0,5µg de ADN del fago φX174 digerido con la enzima de restricción Hae III.

El siguiente paso consistió en la separación y el análisis de fluorescencia de los microsátélites en el secuenciador ABI PRISM 310 con el software GeneScan (Applied Biosystems) empleado en este analizador genético. El ABI PRISM 310, es un secuenciador semiautomático. La electroforesis se lleva a cabo en el interior de un capilar donde las muestras se separan individualmente, a través de un polímero comercial ya preparado (POP4, de Applied Biosystems).

Cada muestra procedente de la amplificación mediante PCR, se diluyó con agua entre diez y cien veces de acuerdo a la intensidad de fluorescencia observada en el gel de agarosa al 2%. A 1µl de la dilución se le añadieron 20 µl de formamida y 0,2 µl de un marcador de peso molecular: TAMRA 500 (Applied Biosystems). Esta mezcla se sometió a un tratamiento de calor (95°C, 5 minutos) en el termociclador PTC-100 de MJ Research para desnaturalizar el ADN.

Las muestras así preparadas se sometieron a electroforesis capilar en el ABI PRISM 310, a una diferencia de potencial de 15.000 voltios y a 60°C de temperatura. Próximo al extremo final, el capilar presenta una ventana transparente que, convenientemente alineada con el láser, permite excitar los fluorocromos que van pasando a través de la misma. Un lector del aparato detecta el paso de las moléculas de ADN a través de la fluorescencia emitida, cuya intensidad es almacenada.

Tras la electroforesis, cada STMS se identificó por el color y el tamaño con el que aparecieron. Este color depende de dos factores: el fluorocromo que lleva incorporado el cebador en cada caso y el filtro utilizado para detectar la fluorescencia. El filtro adecuado para estos fluorocromos es el "C", que da lugar a los siguientes colores: azul (para el fluorocromo 6-FAM), verde (para TET), amarillo (para HEX) y rojo (para TAMRA).

Los datos brutos de intensidad de fluorescencia se recogieron en el programa informático ABI PRISM 310 Collection. Posteriormente, se analizaron con el software GeneScan. El análisis se realizó muestra a muestra, y comenzó por seleccionar manualmente los fragmentos o picos del marcador incorporado en cada una de ellas. En nuestro caso, TAMRA 500, se marcaron los picos correspondientes a los siguientes tamaños: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 300, 350 y 400, de

acuerdo a las instrucciones del fabricante y al rango de los tamaños de los fragmentos amplificados.

El método recomendado y que se siguió para asignar el tamaño molecular del producto de amplificación se llama "Local Southern". Los tamaños de los fragmentos amplificados, se calculan a partir de una recta de regresión entre los tamaños de los fragmentos del marcador de peso molecular y el tiempo de "elución" de los mismos (tiempo en el que pasan por el lector de la fluorescencia, menor cuanto menor es el tamaño). Como resultado de este proceso, no se obtienen valores enteros (que es lo esperable al medir el tamaño de los fragmentos de ADN, formados por un número determinado de nucleótidos) sino números reales con dos decimales. Estos valores expresados en números decimales, en el estudio de Homogeneidad y Estabilidad, se incorporaron a la base de datos de Access mencionada con anterioridad.

En ocasiones se observó que uno o varios de los nueve microsatélites no amplificaron correctamente. Cuando esto ocurrió, se procedió a repetir la PCR para los mismos, de manera individual, o en conjunto. Si aún así no amplificaban correctamente, se procedió a la amplificación de la muestra diluyendo la solución de ADN, normalmente a una concentración de 1/10, para de este modo disminuir la concentración de posibles impurezas que pudieran estar interfiriendo negativamente en la reacción de PCR. Si después de esta dilución no se obtenía amplificación, lo que se hizo fue proceder a una nueva extracción del ADN de las muestras afectadas.

3.2.3.3. Categorización de alelos para los estudios de Distinción e Identificación

Este proceso es necesario para construir una tabla de genotipos, que posteriormente sería de utilidad para llevar a cabo los estudios de Distinción e Identificación varietal.

Debido a que los valores obtenidos para cada alelo de cada locus microsatélite analizado mediante el Software GeneScan, venían expresados con decimales, para ciertos estudios hubo que ajustarlos a los correspondientes números enteros (que corresponden idealmente a los pares de bases de los alelos). Para ello se usaron unas tablas de rangos previamente definidas en el laboratorio

de Biología Molecular de la Finca El Encín, en las cuales se detalla una lista de valores enteros (alelos) para cada locus, y a la vez, para cada uno de ellos, dos valores GeneScan que corresponden a los valores máximo (rango inicio) y mínimo (rango fin) obtenidos para el mismo durante el análisis en el ABI PRISM 310 de un amplio número de ADN. En la **Tabla M25** se muestra un ejemplo de los valores obtenidos para varios alelos del locus VVMD27, que es uno de los microsatélites empleados en este trabajo.

Tabla M25. Rangos correspondientes a varios alelos del locus VVMD27.

VALOR ENTERO (ALELO)	RANGO INICIO	RANGO FIN
166	166,08	166,27
173	172,37	173,45
176	175,83	177,13
178	177,86	179,42
180	179,89	181,13
182	181,79	183,26
184	183,35	184,89
186	185,86	187,40
188	188,01	189,00
191	190,41	191,85
198	198,02	198,12

Estas tablas de rangos se obtuvieron realizando el proceso de categorización de alelos, en inglés “allele binning” o “allele calling”, que consiste en clasificar los valores obtenidos con GeneScan en diferentes categorías o “bins”, de manera que se incluyeran en la misma categoría aquellos valores que correspondieran al mismo alelo real. Para ello no se redondeó directamente el valor GeneScan al entero más próximo, sino que se llevó a cabo siguiendo esencialmente el algoritmo descrito por Ghosh et al. (1997).

Dependiendo del microsatélite, el resultado obtenido como consecuencia de aplicar el algoritmo fue definitivo o no. En algunos casos fue necesario un ajuste manual, para el que se tuvieron en cuenta los valores de desviación estándar y el tipo de repetición de los diferentes loci empleados, así como otros elementos de interés. A veces, también fue necesario obtener nuevos valores GeneScan para tomar una decisión.

Este proceso de “allele binning” se realizó durante el desarrollo del proyecto RF99-009, que llevaba por título “Caracterización del Banco de Germoplasma de

vid de 'El Encín' mediante marcadores moleculares: microsatélites (STMS)", desarrollándose la tabla de rangos inicial utilizada aquí para transformar valores GeneScan en números enteros asignándoles el valor de la categoría a la que corresponden.

Durante el estudio para evaluar la Distinción, se tuvieron que crear nuevas categorías debido a que hubo muestras de Briones que presentaron valores de alelos que no encajaron en ninguna de las categorías ya existentes.

3.2.4. Análisis de microsatélites adicionales

Durante el estudio de Distinción, fue necesario amplificar un determinado número de muestras con un número mayor de loci microsatélite. Se usaron 20 STMS: VVS2 (Thomas y Scott, 1993); VVMD5, VVMD7, VVMD21, VVMD24, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32 (Bowers et al., 1996) y (Bowers et al., 1999b); VMC4F3 (Di Gaspero et al., 2000); VVIN73, VVIP31, VVIP60, VVIQ52, VVIV37, VVIV67, VVIN16, VVIB01 y VVIH54 (Merdinoglu et al., 2005) y VMC1B11 (Zyprian y Topfer, sin publicar 2005). Cuatro de ellos (VVMD5, VVS2, VVMD27 y VVMD28) se encuentran incluidos también en el conjunto de 9 microsatélites que ocupan este trabajo.

La amplificación de algunas accesiones con los 20 loci microsatélite se hizo para aclarar dudas que surgieron acerca de su identidad cuando se analizaron con los 9 microsatélites iniciales.

En estos 20 loci, un cebador de cada pareja (cebador directo o "upper") incorporaba una molécula de fluorocromo de entre cuatro posibles: FAM, NED, VIC y PET, para permitir la posterior detección del fragmento amplificado.

La amplificación de estos 20 loci microsatélite se llevó a cabo mediante dos reacciones distintas de amplificación, una con 9 y otra con 11 loci, usando mezclas de reacción y programas de PCR previamente desarrollados en el laboratorio de Biología Molecular de la Finca El Encín (Vargas y col. en preparación). Estas reacciones de PCR se realizaron en el termociclador PTC-100 de MJ Research. Una vez concluido el proceso de amplificación, se comprobó su eficacia mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Posteriormente, estas muestras se sometieron a una electroforesis capilar en el analizador genético AB 3130. Tras la electroforesis, cada STMS se identificó, al

igual que en el ABI PRISM 310, por el color y el tamaño con el que aparecieron. Este color depende del fluorocromo que lleva incorporado el cebador en cada caso y del filtro utilizado para detectar la fluorescencia. El filtro adecuado para estos fluorocromos es el "G5", que da lugar a los siguientes colores: azul (para el fluorocromo FAM), rojo (para PET), amarillo (para NED), verde (para VIC) y naranja (para LIZ). LIZ corresponde al fluorocromo incorporado en el marcador de peso molecular utilizado en este análisis (LIZ 500 - Applied Biosystems).

Los dos analizadores genéticos empleados en este estudio, ABI PRISM 310 y AB 3130, básicamente poseen el mismo mecanismo de electroforesis, presentando el ABI PRISM 310 un capilar, y el AB 3130 cuatro, por lo que este último puede analizar cuatro muestras a la vez. Las diferencias más relevantes que presentan entre sí, en este trabajo, son las siguientes:

- Marcador de peso molecular incorporado junto con las muestras a analizar. En el ABI PRISM 310 se usó el TAMRA 500 mientras que en el AB 3130 el LIZ 500, ambos de la casa comercial Applied Biosystems.
- Número de colores que aparecen en los electroforetogramas para identificar los fragmentos amplificados. Cuatro, incluido el marcador de peso molecular en el ABI PRISM 310 y cinco, incluido el marcador de peso molecular en el AB 3130.
- Software informático utilizado para analizar los resultados obtenidos. En el ABI PRISM 310 se empleó el software GeneScan, mientras que en el AB 3130 se empleó el GeneMapper 3.7.
- Los resultados son análogos, pero no idénticos: hay variaciones en el tamaño molecular obtenido para un mismo fragmento con los dos aparatos, aunque estas diferencias son consistentes para cada microsatélite, lo que permite identificar los distintos alelos sin ninguna duda.

3.2.5. Diseño experimental

3.2.5.1. Protección legal

3.2.5.1.1. Estudio de Distinción

El estudio oficial de Distinción consiste fundamentalmente en buscar diferencias en caracteres morfológicos de la variedad analizada respecto a las demás, usando una colección de referencia apropiada, y en determinar si esas

diferencias son superiores a una distancia mínima (distancia más pequeña que puede existir entre dos variedades para considerarlas diferentes). Por ello, el punto clave para establecer la distinción es determinar la distancia mínima que debería existir entre dos variedades de vid para que fueran consideradas distintas. En la actualidad, no existe un criterio definido utilizando marcadores moleculares. En este estudio, para establecer la distinción, se planteó el siguiente criterio:

1. Determinar el menor número de alelos diferentes entre plantas pertenecientes a sortogrupos diferentes. En términos generales se hablaría de establecer la menor diferencia intervarietal, excluyendo sports o mutantes somáticos.
2. Determinar el mayor número de alelos diferentes entre plantas pertenecientes a un mismo sortogrupo (incluye individuos procedentes de un mismo embrión original: clones, variedades sinónimas, EDV o sports). En términos generales se hablaría de determinar la mayor diferencia intravarietal.

En función de la diferencia entre esos dos números, se podría o no determinar la distancia mínima con marcadores moleculares microsatélites.

Para este estudio de Distinción, se partió de todo el material disponible en la Colección de variedades de vid de El Encín analizado previamente con los 9 loci microsatélite. A estos datos se le añadieron los de las muestras de Briones (**Tabla M1**, página 42), una vez se analizaron de igual manera; datos pertenecientes al estudio de Homogeneidad y Estabilidad; y datos correspondientes al estudio de establecimiento de descriptores microsatélite.

Con ese conjunto de datos se obtuvo una colección que se estudió con el objetivo de establecer la distancia mínima (en número de alelos diferentes) requerida para declarar si una variedad es distinta de otra, o no. En esta colección, se llevaron a cabo comparaciones 2 a 2 entre todas las accesiones que la formaron, empleando para ello la aplicación de Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001). Este análisis permitió determinar en cuántos alelos de los 9 microsatélites coincidían las citadas accesiones. El análisis se centró en el estudio minucioso de las accesiones más próximas en cuanto a su genotipo para los 9 microsatélites. Se estudiaron las parejas de accesiones que coincidían en 18, 17 ó 16 alelos, de los 18 analizados (correspondientes a los 9 microsatélites), para estudiar si dentro de estos tres

grupos, las accesiones pertenecen o no al mismo sortogrupo. En base a la experiencia previa, se consideró que las muestras que sólo coinciden en 15 alelos o menos, de los 18 analizados, pertenecen todas a sortogrupos diferentes.

En el caso de coincidencia en 18, 17 o 16 alelos, se usaron dos importantes fuentes de información disponibles:

- Datos morfológicos de variedades de vinificación españolas [Félix Cabello, Inmaculada Rodríguez y Gregorio Muñoz (IMIDRA- Finca El Encín)].
- Datos morfológicos y de microsatélites de un elevado número de variedades de vinificación y de mesa, procedentes tanto de España como del extranjero (Laboratorio de Biología Molecular de la Finca el Encín).

En las accesiones que coincidieron en los 18 alelos, se comprobó si se habían considerado morfológicamente del mismo sortogrupo de acuerdo a los datos mencionados, y también a los datos encontrados en la siguiente bibliografía: (Borrego et al., 1990), (Galet, 2000) e (Ibáñez et al., 2003). Si era así, se procedió a seleccionar únicamente una accesión representativa para ese genotipo común que correspondería en principio a un determinado sortogrupo, y se eliminaron todas las demás de la tabla por considerarlas pertenecientes al mismo sortogrupo.

Cuando no se encontraron datos que justificaran esa igualdad entre las muestras que coincidieron en los 18 alelos, se analizaron las accesiones implicadas con 20 loci microsatélite. Las accesiones que coincidieron en 17 y 16 alelos de los 18 analizados, también se amplificaron con 20 loci, debido a la proximidad existente entre ellas. Los resultados obtenidos con estos 20 microsatélites, se consideraron definitivos, independientemente de que hubiera datos bibliográficos o no, ya que es extremadamente improbable que con 25 loci microsatélite pudieran presentar el mismo genotipo, variedades procedentes de distintos embriones originales.

Con estos datos, se determinó:

1. El menor número de alelos diferentes entre plantas pertenecientes a sortogrupos diferentes.
2. El mayor número de alelos diferentes entre plantas pertenecientes a un mismo sortogrupo (clones, variedades sinónimas, EDV o sports).

En base a estos dos números, se estableció la distancia mínima con el sistema de 9 loci microsatélite seleccionado.

Además, una vez eliminadas de la colección aquellas accesiones que presentaron entre sí el mismo genotipo con los 9 loci microsatélite y dejar únicamente una de ellas como representante, se obtuvo una colección formada por variedades de genotipos distintos, que se va a denominar a lo largo de este estudio “Colección de genotipos únicos”. Esta colección se tomó como referencia para realizar el estudio de Identificación varietal detallado más adelante.

3.2.5.1.2. Estudio de Homogeneidad y Estabilidad

Este estudio de Homogeneidad y Estabilidad constituye por sí solo el proyecto VIN01-025-C2-1, subvencionado por la Dirección General del INIA, que llevaba por título: “Evaluación de los marcadores moleculares STMS (microsatélites) para exámenes de Homogeneidad y Estabilidad en la protección legal de variedades de vid”.

Para evaluar la homogeneidad se estudiaron 50 plantas de cada variedad de 3 plantaciones distintas, y para evaluar la estabilidad se estudiaron 5 plantas de cada variedad de 7 plantaciones adicionales a las de homogeneidad. Por tanto, para realizar el proyecto se requería la recolección de al menos 185 muestras diferentes de hoja de vid, para cada una de las variedades seleccionadas (19), es decir, de un total de 3.515 muestras.

Para un estudio controlado de la estabilidad sería necesario multiplicar vegetativamente plantas de distintas variedades y comparar las “descendencias” con sus progenitores. Por ser la vid una planta leñosa de ciclo anual, llevar a cabo varias multiplicaciones sucesivas resultaría muy costoso en tiempo. Por ello se decidió aprovechar el hecho de que esa multiplicación se realiza de manera habitual para obtener las plantas que se utilizan al establecer los viñedos, bien por viveros, bien por los propios viticultores. El razonamiento seguido era que, al analizar plantas de la misma variedad de distintas procedencias lo que se haría en realidad sería precisamente estudiar la estabilidad, ya que con toda probabilidad procederían de distintos ciclos de multiplicación vegetativa respecto a la planta ancestral común originaria de la variedad. Por ello fue interesante comparar material antiguo con cepas más jóvenes de la misma variedad. En total, se

analizaron al menos 10 plantaciones diferentes por variedad (incluidas las del estudio de Homogeneidad), y 5 plantas por plantación.

Para el estudio de Homogeneidad hubo que estudiar un número elevado de plantas de cada variedad y plantación para constatar que los genotipos de los microsatélites se mantenían inalterables en todas ellas. Se asume que las plantas de cada plantación se encuentran aproximadamente en el mismo ciclo de reproducción vegetativa. Se analizaron las mismas variedades que para el estudio de Estabilidad, pero en este caso, un número mayor de plantas por plantación (50), y un total de 3 plantaciones diferentes por variedad.

Una vez extraídos y amplificados los ADN de las plantas recolectadas, se sometieron a electroforesis en el analizador genético ABI PRISM 310. Seguidamente, se analizaron los datos obtenidos en GeneScan de los alelos microsatélites para cada una de las plantas analizadas. Estos datos vienen expresados en números reales con dos decimales, debido al método empleado por el software GeneScan para la asignación del tamaño molecular del producto de amplificación, que básicamente es una regresión lineal de los valores del estándar. Por ello, para un mismo alelo se pueden obtener valores GeneScan ligeramente distintos (por ejemplo 148,34 y 148,51). Es necesario determinar si dos valores corresponden al mismo alelo o no. Por ello se hizo un análisis de las diferencias que se produjeron entre los valores obtenidos para los alelos de distintas plantas de cada variedad.

Para cada alelo de cada variedad se obtuvieron unos 185 valores GeneScan. Entre ellos, se determinaron los valores máximos y mínimos, y se estudió con más detalle cuando la diferencia entre esos valores fue superior a 1 nucleótido, lo que se consideró inicialmente como valor umbral para comprobar si existe cambio en el tamaño del alelo entre distintas plantas de la misma variedad. Debido a que los microsatélites utilizados tienen como unidad de repetición 2 nucleótidos, en principio, los alelos que esperamos se diferenciarían en 2 nucleótidos. En base a esto, y a la experiencia acumulada en el laboratorio de Biología Molecular de la Finca El Encín, durante el desarrollo de varios proyectos llevados a cabo con estos microsatélites, aceptamos que todos aquellos valores que se diferencien en menos de 1 nucleótido corresponden al mismo alelo.

Cuando se detectaron diferencias superiores a 1 nucleótido, se procedió de la siguiente manera:

1. Se seleccionaron los ADN de las muestras a las que pertenecieron los valores máximos y mínimos de cada uno de los alelos correspondientes a los microsatélites que presentaron las diferencias.
2. Se repitieron las PCR de forma individual para cada uno de ellos con la misma polimerasa utilizada a lo largo del desarrollo del trabajo. Complementariamente, para mayor seguridad, en algunos casos se amplificaron también empleando otra polimerasa, la Pyrobest DNA polimerasa (Takara) utilizando un programa de PCR específico para ella.

Dado que las variedades de vid son clónicas, si los microsatélites utilizados son homogéneos y estables en las variedades utilizadas, esperamos encontrar los mismos valores alélicos para cada microsatélite en cada una de las plantas que pertenezcan a la misma variedad, independientemente de su origen. En caso contrario, se tendrá que determinar dónde se ha producido la mutación, y la frecuencia con que tiene lugar ese suceso.

3.2.5.2. Defensa legal

3.2.5.2.1. Estudio de Identificación

El estudio de Identificación trata de buscar conformidad entre la planta analizada y alguna de las variedades que componen la colección de referencia.

En este trabajo se llevó a cabo el estudio de Identificación utilizando microsatélites, para ello se tomó como colección de referencia, la “Colección de genotipos únicos” obtenida en el estudio de Distinción y que estaba formada por variedades de genotipos distintos para los 9 loci microsatélite que ocupan esta tesis. Esta colección se analizó con la versión 4 del software Identity (Wagner y Sefc, 1999) (<http://www.uni-graz.at/~sefck/>). Con este análisis se determinó por un lado la Probabilidad Total de Identidad (PI) (probabilidad de que dos variedades distintas compartan el mismo genotipo al azar para los loci analizados); y por otro, la Heterocigosidad observada (H_o) de los 9 STMS elegidos, característica importante a la hora de determinar el poder de resolución del sistema en la identificación de las variedades que componen la colección. Para cada variedad se

puede llevar a cabo un análisis matemático de la coincidencia, que se puede ver influenciado por la presencia de estructura en la colección.

3.2.5.2.1.1. Análisis matemático de la coincidencia

Al analizar una planta, ésta puede presentar el mismo genotipo que una variedad determinada del conjunto estudiado. Esa coincidencia puede ser por azar, o porque realmente la planta pertenece a la variedad. En el ámbito legal, es conveniente acompañar el análisis molecular con un análisis matemático para conocer su fiabilidad.

Para calcular la probabilidad de que por azar, una planta de vid presente el mismo genotipo para los 9 loci STMS que alguna de las variedades pertenecientes a las poblaciones tomadas como referencia, se calculó el cociente de probabilidades, de manera análoga al “likelihood ratio” (LR) o razón de verosimilitudes utilizado para casos forenses humanos (Carracedo y Barros, 1996). Se determina el cociente entre las probabilidades de que el resultado obtenido coincidente provenga de una o dos fuentes de ADN diferentes, es decir, de la misma o de distintas variedades (Ibáñez, 2000). En forma matemática:

$$LR = \frac{P(R/V)}{P(R/NV)}$$

siendo P(R/V) la probabilidad de obtener el resultado coincidente si la muestra pertenece a la variedad y P(R/NV) la probabilidad de obtener el resultado coincidente cuando la muestra no pertenece a la variedad.

Aquí, en principio, al no haber variabilidad intravarietal, P(R/V) sería igual a 1, y el problema reside en calcular P(R/NV), que en definitiva, es la probabilidad de obtener el resultado coincidente por azar en las poblaciones tomadas como referencia.

La probabilidad de encontrar un genotipo concreto en una determinada población, depende de las frecuencias alélicas presentes en la citada población. El cálculo de las frecuencias genotípicas a partir de las alélicas requiere que los alelos de cada locus se combinen al azar para constituir los genotipos en la “población” (conjunto de variedades) utilizada, es decir que esté en Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW). Asumiendo una combinación al azar de esas frecuencias alélicas,

se calculó para cada muestra problema, la probabilidad de obtener al azar su genotipo en cada una de las poblaciones tomadas como referencia, es decir, p^2 para los homocigotos y $2pq$ para los heterocigotos, siendo p y q las frecuencias alélicas. Para calcular la probabilidad total de genotipo, $P(R/NV)$, se utilizó la regla del producto, que asume independencia estadística entre los distintos loci. Los 9 loci microsatélite evaluados en este estudio, no están ligados genéticamente.

En este trabajo, además de considerar como referencia a la “Colección de genotipos únicos”, también se utilizaron como referencia las poblaciones obtenidas al analizar esta colección con el software Structure 2.0 (Pritchard y Wen, 2003), detallado en el punto siguiente. Con ello se evaluó el efecto que tiene en el análisis matemático de la coincidencia, utilizar como referencia una población global o subpoblaciones de la misma. El uso de subpoblaciones es muy utilizado en genética forense de humanos cuando la población está estructurada. El hecho de que se utilice una colección de referencia más o menos adecuada a la muestra que se esté analizando, puede afectar considerablemente al resultado final. En general, cuanto más adecuada sea a la muestra a analizar, el resultado será más preciso.

Se seleccionaron “al azar” varias variedades de la “Colección de genotipos únicos”, y se analizaron como si fueran muestras problema, en distintas poblaciones de referencia.

3.2.5.2.1.2. Análisis de estructura

Con la “Colección de genotipos únicos”, obtenida durante el estudio de Distinción y formada por variedades de genotipos distintos para los 9 loci microsatélite, se realizaron test de estructuración genética utilizando los software Structure 2.0 (Pritchard y Wen, 2003) y Arlequín 3.11 (Excoffier et al., 2005). Esta colección incluía una amplia representación tanto de uva de mesa como de vinificación, además de portainjertos, híbridos productores directos, especies del género *Vitis* no *vinifera* y géneros de la familia Vitáceas.

El software Structure, mediante un algoritmo Bayesiano, trata de agrupar probabilísticamente a un conjunto de individuos en distintas poblaciones. Para ello, utiliza datos genotípicos de marcadores moleculares no ligados o débilmente ligados, como pueden ser microsatélites, RFLP y SNP. Se asume además, que los marcadores estén en equilibrio de ligamiento dentro de estas poblaciones.

Se asumió un modelo en el cuál las variedades que formaban la “Colección de genotipos únicos” analizadas con los 9 loci microsatélite, podían estar agrupadas en un número comprendido entre 1 y 15 poblaciones (K), cada una de las cuales se caracterizaría por presentar un determinado conjunto de frecuencias alélicas para los alelos de cada locus. Se usó una longitud de la carrera de la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) de 20.000 pasos, con 50.000 pasos previos de desmemorización. Estos pasos previos se efectúan antes de empezar a comparar las probabilidades de las tablas alternativas con la de la observada, y son necesarios porque la cadena de Markov comienza precisamente en la tabla observada. Unos pocos miles de pasos son suficientes para alcanzar un punto de comienzo aleatorio que corresponda a una tabla independiente de la observada. Para cada K, se realizó un número máximo de 10 iteraciones aleatorias. Una vez finalizado el análisis, se observó en cuantas poblaciones, entre 1 y 15, estaban agrupadas las variedades de la “Colección de genotipos únicos”, en función de su genotipo. Se utilizó el modelo de mezcla, el cual permite la presencia en una determinada población, de individuos con cierto grado de mezcla genética procedente de grupos vecinos. Junto con el modelo de mezcla, se empleó el modelo de las frecuencias correlacionadas citado en Falush et al. (2003); que asume el total de poblaciones representadas en la colección de partida, como procedentes de una hipotética población “ancestral”, a partir de la cual han derivado las demás poblaciones, de modo que las frecuencias alélicas de las diferentes poblaciones presenten cierto parecido entre sí. Este modelo, cuando se emplea un número adecuado de marcadores, permite agrupar con exactitud a individuos procedentes de poblaciones estrechamente relacionadas.

El criterio llevado a cabo en Pritchard et al. (2000) para detectar el verdadero número de poblaciones que hay en un conjunto de individuos, se basa en determinar el mayor valor logarítmico de la probabilidad de los datos obtenidos, lo cual puede no proporcionar una estimación correcta del número de poblaciones (K). Por ello, se empleó también la metodología descrita en Evanno et al. (2005) para determinar cuantas poblaciones se encontraban en la “Colección de genotipos únicos”. En este artículo se detallan diferentes cálculos estadísticos a los recomendados en Pritchard y Wen (2003), con los que se puede determinar de una forma gráfica y visiblemente más clara, cuántas poblaciones existen en una determinada colección. Concretamente, se determina cual es la tasa de cambio (ΔK) presente en los valores de la probabilidad en función de las poblaciones (K).

Se visualiza, representando gráficamente la variable estadística (ΔK) frente a (K). Evanno et al. (2005) confirma que el software Structure alcanza resultados fiables en cuanto al número de poblaciones que se pueden encontrar en un determinado conjunto de variedades analizadas con marcadores moleculares AFLP y microsatélites.

Una vez alcanzada la K más probable para la “Colección de genotipos únicos” con la metodología descrita en Evanno et al. (2005), se eligió aquella simulación de entre las 10 que se habían supuesto, que presentó la distribución más probable de genotipos para esa K .

La exactitud de la asignación de individuos a una determinada población dependerá de los siguientes factores (Pritchard et al., 2000):

- Número de individuos que componen la población (afecta a la exactitud de las estimas de las frecuencias alélicas de las poblaciones).
- Número de loci empleados (afecta a la exactitud con que se estima el grado de mezcla que presenta cada individuo).
- La cantidad de mezcla que presenta cada individuo.
- La diferencia existente entre las frecuencias alélicas presentes en las diferentes poblaciones.

Con el software Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005), se estudió si en cada una de las poblaciones detectadas con el software Structure en la “Colección de genotipos únicos”, los distintos loci se encontraban en EHW. Se sigue esencialmente el procedimiento descrito por Guo y Thompson (1992) usando cadenas de Markov, éstas tenían una longitud de 1.000.000 de pasos, con 100.000 pasos previos de desmemorización.

También se llevó a cabo un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA). A partir de los componentes de la varianza obtenidos se calcula el índice de fijación (F_{ST}). El programa calcula la varianza entre poblaciones permutando genotipos individuales entre las poblaciones.

Además se llevaron a cabo test exactos de diferenciación entre las poblaciones detectadas con el software Structure, empleando cadenas de Markov con una longitud de 1.000.000 de pasos y 100.000 pasos previos de desmemorización. Se estimó la probabilidad de encontrar resultados con menor o

igual probabilidad que el observado, bajo la hipótesis de que los individuos están distribuidos al azar en el conjunto de poblaciones estudiadas.

3.2.5.2.2. Establecimiento de la derivación esencial

En general, las principales vías de obtención de EDV son a través de mutaciones somáticas (inducidas o naturales) y, en el futuro a través de transformaciones genéticas. Su obtención a través de un uso recurrente de la variedad inicial, no representa en esta especie una práctica común, ya que ello supondría un gran coste de tiempo por ser la vid una planta leñosa de ciclo anual. Por ello, generalmente en vid, una variedad esencialmente derivada (EDV), mostrará los mismos genotipos con microsatélites que la variedad inicial de la que procede.

Es decir, la derivación esencial en vid se podría establecer en base a:

1. Distinción morfológica
2. Identidad con microsatélites

Para el segundo punto se utilizó la información obtenida durante el estudio de Distinción, donde se analizaron minuciosamente las parejas de accesiones presentes en una colección formada por 1.023 accesiones, que coincidían en 18, 17 o 16 alelos, de los 18 analizados. La bibliografía ayudó a determinar si variedades pertenecientes a un mismo sortogrupo eran EDV o no.

3.2.6. Elaboración de descriptores microsatélite

Siguiendo esencialmente la metodología desarrollada en This et al. (2004), se elaboraron descriptores para 5 microsatélites (ssrVrZAG29, ssrVrZAG67, ssrVrZAG83, ssrVrZAG112 y VVMD28) de los 9 que ocupan esta tesis, ya que los otros 4 (ssrVrZAG62, VVMD5, VVMD27 y VVS2), se encontraban incluidos en el estudio mencionado.

El material utilizado fue mayoritariamente, el representado en la **Tabla M24**, página 72. Las reacciones de amplificación de este material se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 de MJ Research, analizándose posteriormente en el secuenciador ABI PRISM 310. Tras este análisis, en el que se determinaron todos

Materiales y Métodos

los alelos obtenidos para los cultivares de la tabla anterior, se llevó a cabo un método de codificación de alelos, siguiendo básicamente el procedimiento descrito en This et al. (2004); codificando cada uno de los alelos en función de los códigos asignados a los cultivares que se tomaron como referencia. Cuando fue posible, para facilitar su uso, se emplearon los cultivares ya utilizados como referencia en los descriptores anteriores, mostrados en la **Tabla M24**, dando preferencia a aquellos cultivares más conocidos o más extendidos geográficamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SISTEMA DE 9 MICROSATÉLITES EMPLEADO

4.1.1. Extracción y cuantificación de ADN

El ADN se extrajo con los kits: “DNeasy Plant mini Kit” y “DNeasy 96 Plant Kit” de la empresa Qiagen. Con el primer kit se obtuvo un ADN de mayor calidad, pero el segundo permitió economizar una gran cantidad de tiempo obteniéndose además un ADN con la calidad suficiente como para llevar a cabo las posteriores amplificaciones.

El rendimiento de la extracción se vio influenciado por fenómenos como la densidad de pelos que presentaron las hojas en su envés (muy alto en la variedad Cabernet sauvignon, por ejemplo), o que las hojas se encontraran en mejor o peor estado debido a las alteraciones que hubieran podido sufrir durante su transporte y almacenamiento. Concretamente, las 112 muestras de Briones (**Tabla M1**, página 42 de Materiales y Métodos), llegaron al laboratorio en malas condiciones; como consecuencia de ello, el rendimiento de la extracción fue menor, y el ADN obtenido resultó de inferior calidad, afectando negativamente a la posterior reacción de PCR.

Estos métodos permitieron en general obtener una cantidad adecuada de ADN partiendo de poco material vegetal, unos 50 miligramos de hoja aproximadamente. En general, el rendimiento resultó ser más o menos constante en cada una de las muestras analizadas, entre 1,5 μg y 3 μg . Dado que se eluyó en un volumen final de 150 μl , las concentraciones obtenidas oscilaron entre 10 y 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Se estimó la calidad y la cantidad de los ADN cargándolos en un gel de agarosa al 0,8%. Un ejemplo se muestra en la **Figura R1**.

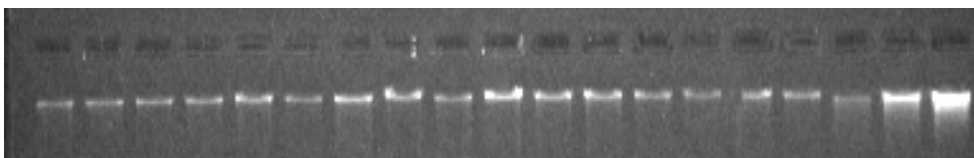


Figura R1. Ejemplo de cuantificación de ADN genómico. Fotografía obtenida tras una electroforesis en gel de agarosa (0,8%). Los tres últimos carriles corresponden a cantidades conocidas del estándar (fago λ : 10, 20 y 40 ng respectivamente).

4.1.2. Selección de los microsatélites

La selección de los microsatélites se llevó a cabo atendiendo a diferentes criterios:

- **Número:** se analizaron 9 microsatélites. En general, 6 serían suficientes para distinguir dos variedades cualesquiera de *vid* (This et al., 2004), pero en este caso se decidió seleccionar tres microsatélites más, por dos motivos: alguno de los microsatélites estudiados podría ser descartado como consecuencia de este estudio; además, dada la naturaleza legal y las implicaciones económicas que podrían generarse, también parecía interesante aumentar el número de loci microsatélite para incrementar así el grado de certeza de los análisis.
- **Disponibilidad:** en el momento de la selección existían más de un centenar de microsatélites cuyas secuencias habían sido publicadas (Bowers et al., 1996), (Bowers et al., 1999b), (Sefc et al., 1999), (Thomas y Scott, 1993) entre otras, y que podían usarse libremente, por lo que los nueve microsatélites a estudiar se eligieron entre ellos.
- **Independencia:** era fundamental elegir microsatélites no ligados genéticamente, por dos razones: por un lado para que la cobertura del genoma fuera mayor, al estar físicamente separados los distintos loci; por otra, para que se pudieran efectuar los análisis estadísticos que requieren independencia. En el momento de esta selección, había un mapa publicado de *vid* con datos de microsatélites, que se utilizó con este fin (Dalbó et al., 2000). Asimismo, había otros mapas en vías de publicación que también se emplearon para la selección de los microsatélites: Meredith, comunicación personal con referencia a Riaz et al. (2004), etc.
- **Polimorfismo:** era interesante elegir microsatélites polimórficos, pues son más discriminantes, y la certeza de la identidad sería mayor. Por ello se escogieron microsatélites con un alto grado de Heterocigosidad observada entre las variedades estudiadas por los autores que los habían descrito. En general, los microsatélites son bastante polimórficos en *vid*, por lo que, dentro de un orden, éste no fue un criterio limitante.
- **Rango de amplificación:** se buscaron rangos de amplificación compatibles con el desarrollo de una PCR múltiple.

- También se tuvo en consideración que los microsatélites no tuvieran alelos nulos conocidos ni alelos que se diferenciaron únicamente en 1pb.

En base a estos criterios, se seleccionaron los siguientes 9 microsatélites: *ssrVrZAG29* (abreviado *ZAG29*), *ssrVrZAG62* (*ZAG62*), *ssrVrZAG67* (*ZAG67*), *ssrVrZAG83* (*ZAG83*) y *ssrVrZAG112* (*ZAG112*) (Sefc et al., 1999); *VVMD5* (Bowers et al., 1996); *VVMD27* y *VVMD28* (Bowers et al., 1999b); *VVS2* (Thomas y Scott, 1993), cuyas características se detallan en la **Tabla R1**. Los grupos de ligamiento presentes en la tabla están tomados de Riaz et al. (2004).

Son loci que están en distintos grupos de ligamiento, las secuencias necesarias para su amplificación son públicas, son bastante o muy polimórficos (salvo uno, el *ZAG29*). Consisten en repeticiones de 2 nucleótidos, aunque en algunos casos estas repeticiones son imperfectas. Sus rangos de amplificación permitieron elegir los marcajes adecuados para su posterior análisis en un secuenciador genético, de manera que los 3 microsatélites marcados con el mismo fluorocromo amplificaran en distintos rangos y se pudieran diferenciar claramente. Los tres fluorocromos empleados fueron, como ya se ha comentado en Materiales y Métodos: 6-FAM, TET y HEX, que fluorescen en azul, verde y amarillo, respectivamente con el filtro "C", y los microsatélites marcados con cada uno de ellos se distribuyeron de la siguiente forma:

- *ZAG67*, *VVMD27* y *VVMD5* estaban marcados con 6-FAM.
- *ZAG29*, *ZAG62* y *ZAG112* estaban marcados con TET.
- *VVS2*, *ZAG83* y *VVMD28* estaban marcados con HEX.

Tabla R1. Características de los 9 loci microsatélite seleccionados. Se encuentran ordenados por marcaje y tamaño creciente.

LOCUS	GRUPO LIGAMIENTO	RANGO (pb)		SECUENCIA	Tm	FLUOROCROMO	TIPO DE REPETICIÓN
ZAG67	10	123-153	Cebador up Cebador lw	5'-ACCTGGCCCGACTCCTCTTGTATGC-3' 5'-TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG-3'	62,4 °C 60,8 °C	6-FAM (Azul)	Imperfecta (GA)5C(AG)2T(GA)3GG(GA)2T(AG)7
VVMD27	5	173-191	Cebador up Cebador lw	5'-GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT-3' 5'-ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT-3'	56,6 °C 54,7 °C	6-FAM (Azul)	Imperfecta (GA)15(AA)(GA)5
VVMD5	16	222-237	Cebador up Cebador lw	5'-CTAGAGCTACGCCAATCCAA-3' 5'-TATACCAAAAATCATATTCCTAAA-3'	51,6 °C 45,3 °C	6-FAM (Azul)	Imperfecta (CT)3AT(CT)11ATAG(AT)3
ZAG29	1	109-113	Cebador up Cebador lw	5'-ATAACCAGGACAAGTTATTCAAGCC-3' 5'-ACCCAATTGACCATCTTTTATGCTG-3'	54,2 °C 54,2 °C	TET (Verde)	Perfecta (GA)16
ZAG62	7	185-203	Cebador up Cebador lw	5'-GGTGAATGGGCACCGAACACACGC-3' 5'-CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC-3'	62,4 °C 60,8 °C	TET (Verde)	Perfecta (GA)19
ZAG112	14	227-259	Cebador up Cebador lw	5'-CGTTTAAAGCCAGCTGAATCTTGGG-3' 5'-TGGCTCCATACTGCTTCACGTAGGC-3'	57,5 °C 60,8 °C	TET (Verde)	Imperfecta (GA)18(TA)10
VVS2	11	130-149	Cebador up Cebador lw	5'-CAGCCCATAATGTATCCATC-3' 5'-AAATTCAAATTCTAATTCAACTGG-3'	52,2 °C 47,7 °C	HEX (Amarillo)	Perfecta (GA)22
ZAG83	4	190-201	Cebador up Cebador lw	5'-GGCGGAGGCGGTAGATGAGAGGGCG-3' 5'-ACGCAACGGCTAGTAAATACAACGG-3'	67,4 °C 57,5 °C	HEX (Amarillo)	Perfecta (GA)8
VVMD28	3	216-266	Cebador up Cebador lw	5'-AACCAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGA-3' 5'-TCATCAATTCGTATCTCTATTTGCTG-3'	53,9 °C 53,5 °C	HEX (Amarillo)	Perfecta (CT)14

4.1.3. Diseño de la PCR múltiple para los 9 loci microsatélite

Para optimizar la PCR múltiple se llevaron a cabo inicialmente amplificaciones individuales, y electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio para comprobar que todos los microsatélites empleados amplificaban correctamente con el mismo programa de PCR. Una vez ajustado el programa (**Tabla R2**), se tuvo en consideración la magnitud de la amplificación (en base a la intensidad de la fluorescencia del bromuro de etidio en el gel de agarosa) para calcular las concentraciones relativas de los distintos cebadores en la mezcla múltiple. Es decir, la concentración usada inicialmente para cada par de cebadores era inversamente proporcional a esa intensidad.

Tabla R2. Programa de PCR para la amplificación conjunta de los 9 loci microsatélite.

Nº CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	95°C	5 min
30	95°C	45 seg
	55°C	1 min
	72°C	30 seg
1	72°C	1 hora
1	4°C	ilimitado

Esta mezcla múltiple que incluía los cebadores necesarios para amplificar los 9 loci microsatélite, se sometió a PCR y electroforesis en el Analizador Genético ABI PRISM 310. En función de la altura de los picos obtenidos para cada uno de ellos, se fueron ajustando las distintas concentraciones de los cebadores de cada microsatélite hasta encontrar una mezcla que amplificara más o menos por igual todos ellos (**Tabla R3**).

Los ajustes mencionados se realizaron con un conjunto reducido de variedades y ADN, por lo que no siempre los resultados obtenidos fueron óptimos al analizar otras variedades/ADN.

Tras la PCR múltiple realizada con la mezcla de reacción final, se tomaron alícuotas de 7µl y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%. Un ejemplo se recoge en la **Figura R2**.

Tabla R3. Mezcla de reacción final (20,5 μ l). (Up: cebador marcado con fluorocromo, Lw: cebador sin marcar).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Tampón Biotools	1 X
Cl ₂ Mg	2,0 mM
dNTPs	0,25 mM
VVS2 Up	0,30 μ M
VVS2 Lw	0,30 μ M
VVMD5 Up	0,50 μ M
VVMD5 Lw	0,50 μ M
VVMD27 Up	0,12 μ M
VVMD27 Lw	0,12 μ M
VVMD28 Up	0,20 μ M
VVMD28 Lw	0,20 μ M
ZAG29 Up	0,07 μ M
ZAG29 Lw	0,07 μ M
ZAG62 Up	0,06 μ M
ZAG62 Lw	0,06 μ M
ZAG67 Up	0,06 μ M
ZAG67 Lw	0,06 μ M
ZAG83 Up	0,10 μ M
ZAG83 Lw	0,10 μ M
ZAG112 Up	0,07 μ M
ZAG112 Lw	0,07 μ M
Polimerasa Biotools	0,075 U/ μ L
ADN	1 μ l

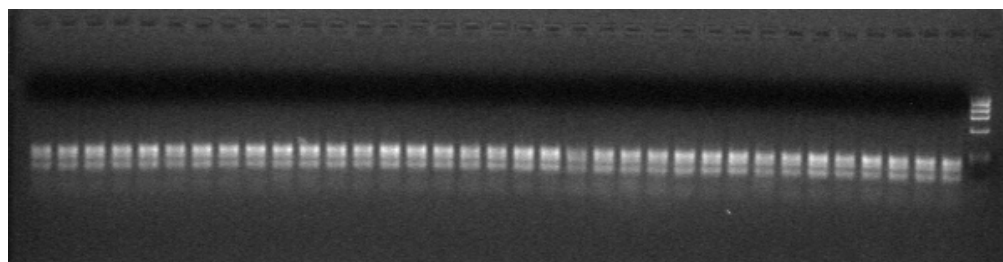


Figura R2. Ejemplo de la reacción multiplex con 9 microsatélites tras una electroforesis en gel de agarosa (2%). El carril de la derecha corresponde al marcador de peso molecular (ADN del fago ϕ X174 digerido con Hae III).

La calidad del ADN se reflejó en el rendimiento de las reacciones de PCR. Aquellos ADN que no presentaron una calidad suficiente en la extracción, hubo que diluirlos a una concentración 1/10 para obtener amplificaciones adecuadas, como fue el caso de las muestras de Briones. Se puede suponer que ello se debe a que

las impurezas presentes en la extracción eran un factor más limitante en este caso que la concentración de ADN, por lo que la dilución de las mismas posibilitaba la amplificación mediante PCR.

De las casi 3.800 PCR múltiples de 9 microsatélites realizadas en este estudio, en las que se amplificaron las muestras del estudio de Homogeneidad y Estabilidad así como las muestras de Briones, únicamente el 14% de estas PCR funcionaron bien, es decir, amplificaron los 9 loci microsatélite a la vez. En el resto hubo que recurrir a la amplificación individual o múltiple de los microsatélites no amplificados. A pesar de esto, hay que destacar que incluso en esas múltiples que no funcionaron bien del todo, se amplificaron conjuntamente entre 6 y 7 loci. Los microsatélites que presentaron más problema a la hora de la amplificación conjunta de los 9 loci, fueron el locus ZAG67 y el VVMD27, como se puede observar en la **Tabla R4**. En esta tabla se muestran los porcentajes de repetición para cada locus tras la amplificación conjunta de los 9 loci STMS en las casi 3.800 muestras citadas anteriormente.

Tabla R4. Porcentajes de repetición para cada locus tras la amplificación conjunta de los 9 loci STMS en casi 3.800 ADN.

LOCUS	%REPETICIÓN
ZAG67	52%
VVMD27	65,7%
VVMD5	19,4%
ZAG29	9,7%
ZAG62	6,8%
ZAG112	2,6%
VVS2	12,6%
ZAG83	2,0%
VVMD28	13,8%

No se ha podido determinar la causa de la falta de robustez de la técnica. Posiblemente la irregular amplificación puede ser debida a la inestabilidad de algunos cebadores con el paso del tiempo, a cambios en la producción de la enzima, a modificaciones en la pureza de los cebadores, etc.

En general, en vid no se han llevado a cabo muchos estudios en los que se amplifique conjuntamente en la misma reacción de PCR, un determinado set de loci microsatélite.

Un estudio relacionado con la técnica de la PCR múltiple sería el llevado a cabo por Frei et al. (2004), donde utilizaron marcadores moleculares microsatélite para construir una base de datos que incluía 147 cultivares de *Vitis vinifera* y cultivares interespecíficos, variedades históricas y 4 especies pertenecientes a la familia Vitaceae. En un principio, para el análisis de estos marcadores emplearon el método tradicional de tinción de geles con nitrato de plata, para posteriormente emplear la técnica de la PCR múltiple y el consiguiente análisis en un analizador genético con 16 capilares. Los autores catalogaron esta técnica con respecto a la utilizada inicialmente, como más rápida, más reproducible, más fiable, y más barata.

Otro estudio en vid concerniente a esta técnica sería el llevado a cabo por Merdinoglu et al. (2005), donde desarrollaron 169 loci fáciles de combinar entre ellos para llevar a cabo PCR múltiples. El hecho de marcar con distintos fluorocromos los loci que componen cada set, permite su fácil identificación al analizarlos en un analizador genético. Los autores afirman que empleando la técnica de la PCR múltiple frente a la individual, se reducen los costes de los reactivos empleados en la reacción de PCR en casi un 50%, y los de los reactivos empleados en la electroforesis llevada a cabo en un analizador genético, en más de un 85%.

Aún con las dificultades encontradas en este estudio al emplear una PCR múltiple, esta técnica presenta un mayor número de ventajas que la de amplificar marcadores moleculares microsatélites de forma individual, como se ha detallado también en la bibliografía consultada. Entre ellas, cabe destacar: mayor información obtenida por análisis, reducción de tiempo en la realización de los análisis y disminución de gastos en material fungible.

4.1.4. Análisis en un analizador genético

Cada una de las muestras amplificadas se sometió a electroforesis en el secuenciador ABI PRISM 310 para poder determinar su genotipo.

Los picos obtenidos para los microsatélites presentaron diferentes alturas como se ha citado en el apartado anterior, ello era debido a que no todos los microsatélites eran amplificados con la misma eficacia ni todos los fluorocromos emitían luz con la misma intensidad. La altura de cada pico era proporcional a la cantidad de fluorescencia detectada, que, en cierto modo, reflejaba la cantidad del fragmento de ADN presente en la electroforesis. En ocasiones, la altura de los dos alelos de un mismo microsatélite podía ser diferente, incluso marcadamente distinta. Este fenómeno puede ser debido entre otras causas, a la naturaleza del propio alelo.

Una vez obtenido el perfil electroforético había que identificar los picos que correspondían a los alelos. Para cada microsatélite analizado, normalmente aparecían 1 ó 2 picos principales que se interpretaban como genotipos homocigóticos o heterocigóticos, respectivamente. Para la interpretación se tuvo en cuenta la posible presencia de picos adicionales a los picos alélicos que podían complicar la identificación de éstos. Entre ellos estaban los llamados picos “tartamudos” (“stutter” en inglés), picos de menor tamaño molecular y altura que los alelos en sí, y que normalmente tenían 2, 4, y hasta 6 nucleótidos menos que ellos, y además, su altura disminuía a medida que se alejaba del alelo “verdadero”. También hay que nombrar los denominados picos “+A”, que eran picos un nucleótido mayores que el alelo real, y que aparecían como un pico independiente o como un hombro del pico alélico bajo análisis. Podía presentarse con mayor o menor intensidad que el alelo “verdadero”. Estos fragmentos se deben a la adición por parte de la Taq polimerasa de un nucleótido con la base adenina al final del fragmento. Teniendo estos aspectos en consideración, así como los datos publicados y los producidos en el laboratorio de Biología Molecular de la Finca el Encín, se identificaron para cada microsatélite los picos correspondientes a los alelos. La **Figura R3** muestra un ejemplo de una representación GeneScan típica para los 9 microsatélites.

Resultados y Discusión

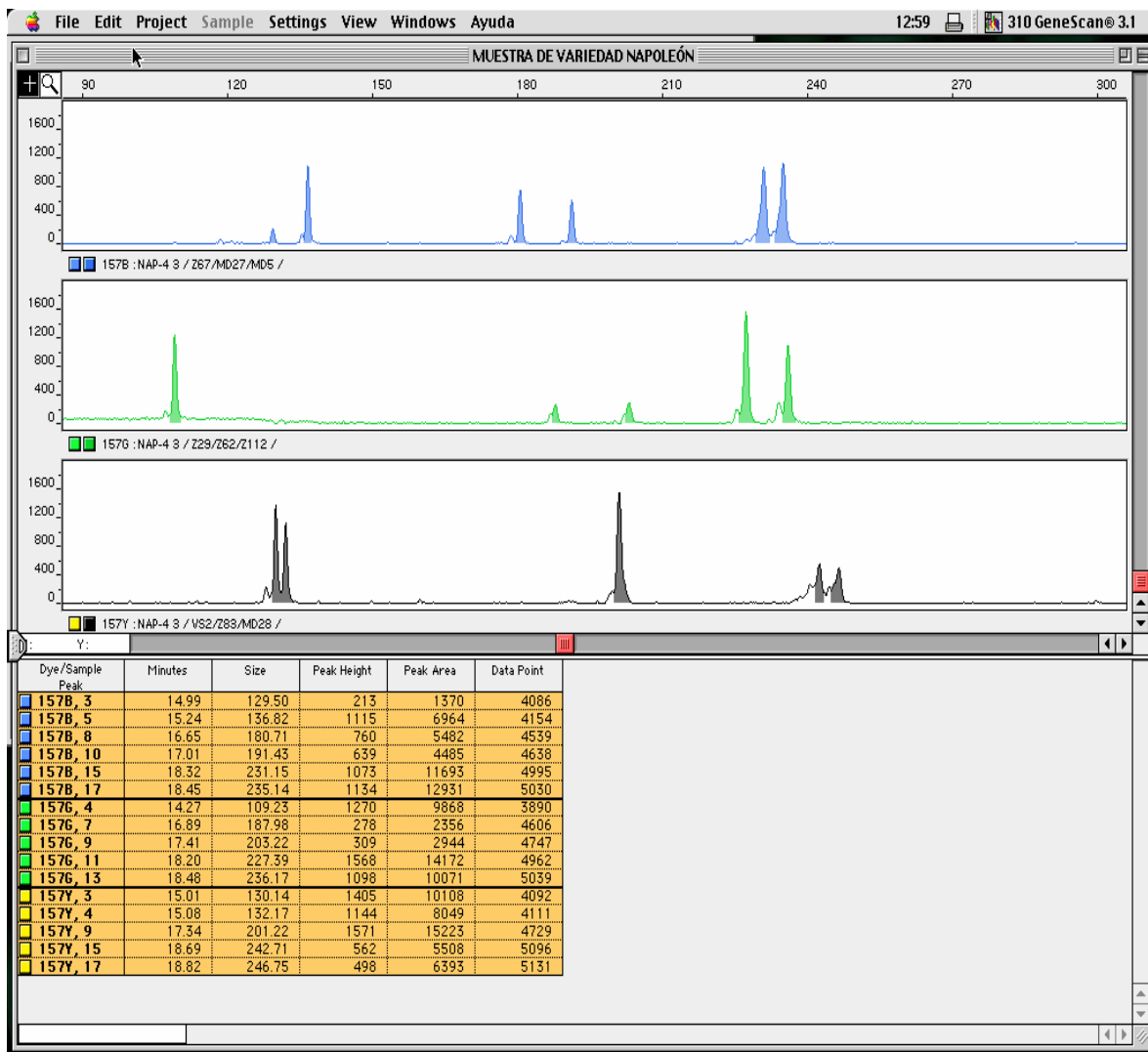


Figura R3. Representación en GeneScan de los nueve loci microsatélite para una de las muestras de la variedad Napoleón. La parte superior incluye los perfiles electroforéticos para los microsatélites ZAG67, VVMD27 y VVMD5 (azul), ZAG29, ZAG62 y ZAG112 (verde), VVS2, ZAG83 y VVMD28 (amarillo, representados en negro). La parte de abajo recoge la tabla de datos, siendo la tercera columna la de mayor interés: corresponde al tamaño aproximado en nucleótidos de los picos.

4.2. ESTUDIO DE DISTINCIÓN

4.2.1. Estudio de una colección para el cálculo de la distancia mínima

Para el estudio de Distinción, se partió de un total de 1.281 accesiones, que pertenecían a 4 fuentes diferentes de material:

- Accesiones de tres parcelas de la Colección de variedades de vid de El Encín: 819 accesiones pertenecían a la parcela 22, 311 a la parcela 25 y 6 a la parcela de portainjertos.
- 112 muestras de Briones detalladas en la **Tabla M1** de Materiales y Métodos, página 42.
- 14 accesiones de las utilizadas para el establecimiento de descriptores microsatélite, presentes en la **Tabla M24** de Materiales y Métodos, página 72 (estas fueron cogidas del propio material con el que se llevó a cabo el estudio de This et al. (2004), ya que no estaban presentes en la Colección de variedades de vid de El Encín).
- 19 muestras pertenecientes a las 19 variedades de las empleadas para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad.

De todas las accesiones disponibles, se seleccionaron 1.023 accesiones (**Anexo I**, página 211), que fueron las que presentaron datos completos para los 9 microsatélites que ocupan este estudio (597 accesiones pertenecían a la parcela 22, 307 a la parcela 25, 6 a la parcela de portainjertos, 80 a Briones, 14 a las del estudio para el establecimiento de descriptores y 19 a las del estudio de Homogeneidad y Estabilidad). Estas 1.023 accesiones se utilizaron como una colección global de partida para el estudio de Distinción. Por ello era muy importante que esta colección incluyera muestras lo más variadas posible, y a la vez, variedades muy cercanas entre sí (padres, hijos, hermanos, etc.). Así, este material incluía una amplia representación tanto de uva de mesa como de vinificación, además de portainjertos, híbridos productores directos, especies del género *Vitis* no *vinifera* y géneros de la familia Vitáceas. Entre todas ellas se podían encontrar accesiones sinónimas, sports y accesiones homónimas. Algunas de ellas se encontraban perfectamente definidas como tal en la bibliografía consultada y otras no, como se detalla más adelante.

Resultados y Discusión

El proceso del estudio de Distinción consiste, como ya se ha citado anteriormente, en buscar las diferencias de la variedad analizada respecto a las demás, usando una colección de referencia apropiada, y en determinar si esas diferencias son superiores a una distancia mínima (distancia más pequeña que puede existir entre dos variedades para considerarlas diferentes). Por ello, el punto clave para establecer la distinción es determinar la distancia mínima que debería existir entre dos variedades de vid para que fueran consideradas distintas. Usando marcadores moleculares microsatélites, y según el criterio seguido en este estudio, habría que determinar el menor número de alelos diferentes entre plantas pertenecientes a distintos sortogrupos y el mayor número de alelos diferentes entre plantas pertenecientes al mismo sortogrupo (clones, variedades sinónimas, EDV o sports).

El procedimiento que se siguió fue el siguiente: una vez confeccionada la base de datos con 9 STMS de la colección formada por 1.023 accesiones, se procedió al análisis de la misma. Se llevaron a cabo comparaciones 2 a 2 entre todas las accesiones que la formaban, empleando para ello la aplicación de Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001). El número total de parejas que se obtuvo fue 523.776. El análisis se centró, como ya se ha comentado en Materiales y Métodos, en el estudio de las accesiones que coincidían en 18, 17 ó 16 alelos, de los 18 analizados (correspondientes a los 9 microsatélites). En cada uno de estos tres grupos, se comprobó si las accesiones que los formaban se habían considerado morfológicamente del mismo sortogrupo de acuerdo a los datos de Cabello y col. y a los de la bibliografía consultada. Cuando fue así, se procedió a seleccionar únicamente una accesión representativa para ese genotipo común que correspondía en principio a un determinado sortogrupo y se eliminaron todas las demás de la colección formada por 1.023 accesiones. Cuando no se encontraron datos que justificaran esa igualdad, se analizaron las accesiones implicadas con 20 loci microsatélite, considerando estos resultados definitivos. Si las accesiones no pertenecían al mismo sortogrupo, estas se seguían manteniendo en la colección.

Accesiones que coincidían en los 18 alelos

Se encontró un total de 2.787 parejas de accesiones con idéntico genotipo. Después de la primera comprobación morfológica y bibliográfica, fueron eliminadas 501 accesiones por considerar que pertenecían al mismo sortogrupo, quedando la

colección representada por 522 accesiones. Entre éstas aún quedaban algunas que coincidían en los 18 alelos pero sus nombres no figuraban como pertenecientes al mismo sortogrupo en la bibliografía consultada (**Tabla R5**). Algunas variedades aparecen en la tabla con otro nombre entre paréntesis; este corresponde a su variedad sinónima, según estudios no publicados llevados a cabo en la Colección de variedades de vid de El Encín. (Inmaculada Rodríguez Torres-IMIDRA, comunicación personal).

Tabla R5. En cada fila de la tabla se muestra el nombre de las accesiones que presentaron entre ellas el mismo genotipo para los 9 loci microsatélite, y no estaban reflejadas como pertenecientes al mismo sortogrupo en la bibliografía consultada.

ACCESIÓN 1	ACCESIÓN 2	ACCESIÓN 3	ACCESIÓN 4
Agudelo	Chenin	-	-
Albarraz (Corazón de Cabrito)	Blanco gordal (Corazón de Cabrito)	-	-
Albillo blanco (Matza zuri)	Slavjanka	-	-
Aledo	Cherta	-	-
Apirena di Velletri	Kischmisch Ali blanc	-	-
Baga	Diminitis	-	-
Beba	Blanca Superior para Parral (Beba)	Tchaoutc	Valenci blanco (Beba)
Blanco de Mesa	Jerónimo de Tudela	Uva de Olaz	-
Bocalilla	Negra rayada	Rollales tinta	-
Caiño portugues	Jaquez	Yaqui	-
Corinto bianco	Don Bueno	Pedro Ximenez	-
De Rey (Mantúo de Pilas)	Forastera blanca (Mantúo de Pilas)	-	-
Escañavella	Lanjarón claro	-	-
Ferdinand de Lesseps	Pansá blanca (Xarel.lo)	-	-
Forcallat	Luisa blanca	-	-
Garganega	Ugni blanc	-	-
Japinkay	Palomino	Tempranillo de Granada	-
Moscatel (Moscatel de grano gordo)	Romé (Moscatel de grano gordo)	-	-
Pensal blanco (Rosetti)	Professor Aberson	-	-

Resultados y Discusión

Estas accesiones representadas en la **Tabla R5**, se analizaron con 20 loci microsatélite para comprobar si la identidad genotípica persistía. Los resultados obtenidos con estos 20 microsatélites (**Tabla R6**), determinaron que, efectivamente, las accesiones recogidas en cada fila de la **Tabla R5** presentaron el mismo genotipo al analizarse con los 20 loci, confirmándose así los resultados de los 9 loci iniciales. Ya que es extremadamente improbable que variedades procedentes de distintos embriones originales pudieran salir iguales con 25 loci microsatélite, se concluye que estas accesiones pertenecen al mismo sortogrupo, aunque no estén recogidas como tal en la bibliografía consultada. No obstante, no se puede descartar que exista algún error en la colección.

Al considerar las accesiones representadas en cada fila de la **Tabla R5** como pertenecientes al mismo sortogrupo, el siguiente paso fue seleccionar una única accesión de cada fila, representativa para cada genotipo, y eliminar todas las demás de la lista de 522 accesiones. En este paso se eliminaron 26 accesiones, quedando la colección representada por 496 accesiones.

Tabla R6. Genotipos obtenidos con 20 loci microsatélite, para las accesiones representadas en la **Tabla R5** que coincidían en los 18 alelos.

VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Agudelo Chenin	173:185	288:290	165:167	180:180	305:319	82:88	236:254	131:151	212:218	239:247
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Agudelo Chenin	263:263	167:173	151:151	365:372	249:249	254:270	176:189	236:250	225:229	163:165
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Albarraz Blanco gordal	185:189	290:307	167:167	176:188	317:321	84:86	236:236	131:144	208:210	239:239
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Albarraz Blanco gordal	263:263	167:173	151:153	372:375	249:249	260:270	181:185	236:236	231:235	161:177
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Albillo blanco Slavjanka	171:173	290:294	165:169	176:180	321:323	82:88	236:236	131:151	208:212	237:247
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Albillo blanco Slavjanka	263:263	173:173	151:153	365:365	249:249	239:270	181:189	248:260	223:231	163:163
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Aledo Cherta	167:189	294:294	167:167	190:192	321:321	84:88	236:240	131:142	208:210	237:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Aledo Cherta	263:263	187:189	151:153	357:372	255:255	270:270	181:189	246:250	229:237	161:163
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Apirena di Velletri Kischmisch Ali blanc	167:167	290:290	165:167	180:196	321:321	84:84	236:246	144:151	208:212	239:247
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Apirena di Velletri Kischmisch Ali blanc	263:263	179:189	153:157	375:399	243:255	248:270	181:189	246:250	225:231	163:180
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Baga Diminitis	171:175	290:294	165:167	190:190	329:331	84:88	236:240	133:142	208:218	237:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Baga Diminitis	256:263	173:187	149:153	357:357	249:255	270:270	185:185	250:250	237:237	171:177
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Beba Blanca Superior Parral Tchaoutc Valenci blanco	185:189	290:294	165:167	190:192	317:321	82:84	240:246	133:142	208:210	253:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Beba Blanca Superior Parral Tchaoutc Valenci blanco	256:263	187:187	151:153	365:372	249:255	254:270	181:189	246:260	233:237	161:163
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Blanco de Mesa Jerónimo de Tudela Uva de Olaz	185:189	290:294	167:169	184:190	231:327	84:88	240:240	133:142	208:210	253:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Blanco de Mesa Jerónimo de Tudela Uva de Olaz	263:263	167:187	153:153	361:372	249:249	248:270	194:194	250:260	231:235	152:161
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Bocallilla Negra rayada Rollales Tinta	167:185	290:294	167:169	184:192	317:317	82:88	246:246	131:133	208:208	239:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Bocallilla Negra rayada Rollales Tinta	256:263	167:187	151:153	361:365	243:255	254:254	189:194	246:246	225:229	152:163
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Caiño portuques Jaquez Yaqui	179:185	288:290	167:167	176:182	317:317	84:84	236: 236	137:142	208:218	253:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Caiño portuques Jaquez Yaqui	269:269	183:183	149:151	365:365	237:249	-	179:189	232:238	225:241	171:171

Resultados y Discusión

VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Corinto blanco Don Bueno Pedro Ximenez	169:189	290:307	167:167	176:188	321:321	88:88	236:236	131:144	208:212	239:247
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Corinto blanco Don Bueno Pedro Ximenez	263:263	167:173	149:153	365:365	243:249	248:270	181:185	260:266	233:237	163:177
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
De Rey Forastera blanca	185:189	307:307	167:169	176:190	319:327	84:88	244:246	131:142	208:208	237:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
De Rey Forastera blanca	263:263	183:189	151:153	372:375	243:249	270:270	181:181	246:248	223:231	161:161
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Escañavella Lanjarón claro	185:189	290:290	165:169	190:190	321:321	82:84	236:240	142:144	210:214	239:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Escañavella Lanjarón claro	263:263	187:187	153:153	357:372	249:249	254:270	185:194	260:260	237:237	161:177
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Ferdinand de Lesseps Pansá blanca	185:185	290:294	167:169	190:196	321:325	84:88	236:240	131:142	208:208	237:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Ferdinand de Lesseps Pansá blanca	263:263	167:179	151:153	359:372	249:253	248:254	181:189	238:260	233:237	161:163
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Forcallat Luisa blanca	173:189	290:294	167:167	180:186	321:327	84:88	231:236	135:142	208:208	253:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Forcallat Luisa blanca	263:263	175:189	149:151	357:361	255:255	260:270	183:194	246:250	231:231	152:177
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Garganega Ugni blanc	185:185	294:294	165:169	184:190	327:333	82:88	246:250	131:142	208:208	239:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Garganega Ugni blanc	256:263	173:187	151:151	365:375	243:249	248:270	179:183	246:250	223:229	163:171
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Japinkay Palomino Tempranillo de Granada	185:189	290:307	167:167	188:190	319:321	84:84	236:246	131:144	208:208	239:239
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Japinkay Palomino Tempranillo de Granada	256:263	175:206	151:151	365:365	243:249	254:256	185:194	238:250	225:237	163:167
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Moscatel Romé	167:185	290:294	167:167	188:192	317:321	82:82	246:248	131:149	212:212	247:247
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Moscatel Romé	263:263	181:206	149:151	375:389	255:265	262:270	179:194	246:270	225:229	263:263
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Pensal blanco Professor Aberson	185:185	290:294	167:179	174:184	317:317	82:84	236:246	131:133	208:208	247:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Pensal blanco Professor Aberson	263:263	167:189	151:151	357:361	255:255	256:270	185:185	260:260	223:229	150:163

Accesiones que coincidían en 17 alelos de los 18 analizados

Únicamente apareció 1 pareja con esa proporción, compuesta por las accesiones: Chasselas blanca y Chasselas Gros Coulard. Difierían entre sí en un alelo del locus ZAG83. Ambas accesiones no estaban descritas como pertenecientes al mismo sortogrupo en la bibliografía consultada, aunque su nombre indica una cierta relación entre ellas. Chasselas blanca presentó un

genotipo heterocigótico para el citado locus (192-201), mientras que Chasselas Gros Coulard presentó un genotipo homocigótico para el mismo (192).

Para comprobar si existía entre ellas alguna otra diferencia en cuanto a su genotipo, se analizaron 20 loci microsatélite más. Los resultados, recogidos en la **Tabla R7**, mostraron que ambas accesiones presentaban el mismo genotipo para esos STMS.

Tabla R7. Genotipos obtenidos con 20 loci microsatélite, para la pareja de muestras compuesta por Chasselas blanca y Chasselas Gros Coulard, que coincidían en 17 alelos de los 18 analizados.

VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Chasselas blanca Chasselas Gros Coulard	173:175	290:294	165:169	182:194	317:321	84:88	236:244	131:142	208:212	239:253
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Chasselas blanca Chasselas Gros Coulard	263:173	179:159	159:363	365:249	265:239	239:185	189:220	270:225	233:152	163:263

Con estos resultados se llegó a la conclusión de que Chasselas Gros Coulard es un sport de Chasselas blanca, que se habría originado por una mutación somática en un alelo del locus ZAG83, bien porque el alelo 201 hubiera mutado a 192 o bien a alelo nulo. Ambas accesiones procederían del mismo embrión original. Es decir, estamos en el caso de que las dos accesiones pertenecen al mismo sortogrupo, por lo que eliminamos la accesión Chasselas Gros Coulard de la colección formada por 496 accesiones, pasando a estar representada por 495 accesiones.

Accesiones que coincidían en 16 alelos de los 18 analizados

Aparecieron 2 parejas con esta proporción. Una de ellas correspondió a la compuesta por las accesiones denominadas Alfonso Lavallo y Princeps, ambas variedades estaban descritas en la bibliografía, pero no como pertenecientes al mismo sortogrupo. El segundo caso correspondió a la pareja de accesiones denominadas Pizzutelo Moscato Biondo y Galletta rosa. Estas variedades tampoco aparecían descritas como pertenecientes al mismo sortogrupo en la bibliografía consultada. En las dos parejas, los dos alelos que no coincidieron con los 18 totales correspondieron a microsatélites diferentes: en la primera pareja un alelo diferente correspondió al locus ZAG83 y el otro al VVS2, mientras que en la segunda, uno de los alelos diferentes perteneció al locus ZAG112 y el otro al VVMD5. Se

amplificaron ambas parejas con 20 microsatélites más para observar si presentaban diferencias, obteniendo para cada una de ellas 9 alelos diferentes en un total de 7 loci (**Tabla R8**, remarcados en azul). En base a estos resultados, se concluyó que pertenecían a distintos sortogrupos, por lo que se mantuvieron en la colección formada por 495 accesiones.

Tabla R8. Genotipos obtenidos con 20 loci microsatélite, para las dos parejas de muestras compuestas por Alfonso Lavallo-Princeps y Galletta rosa-Pizzutelo Moscato Biondo, las cuales coincidían en 16 alelos de los 18 analizados.

VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Alfonso Lavallo	167:175	294:294	165:167	188:188	321:327	82:84	246:252	131:133	208:212	237:253
Princeps	173:185	294:294	165:167	188:188	317:317	84:86	246:252	133:149	208:212	247:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Alfonso Lavallo	256:263	167:206	151:151	357:372	249:249	250:270	185:185	246:246	223:235	158:163
Princeps	256:263	167:206	151:151	357:389	249:249	250:270	185:185	246:246	223:235	158:171
VARIETADES	VMC1B11	VVIB01	VVIH54	VVIP31	VVIP60	VVIQ52	VVMD7	VVS2	VVMD24	VVMD25
Galletta rosa	173:185	290:294	165:167	188:190	321:321	82:84	240:246	131:135	208:208	247:253
Pizzutelo Moscato Biondo	173:185	290:294	165:167	182:192	321:321	88:88	240:246	131:135	208:208	237:253
VARIETADES	VVIN73	VMC4F3	VVIN16	VVIV67	VVMD21	VVMD32	VVMD27	VVMD28	VVMD5	VVIV37
Galletta rosa	263:263	187:206	151:151	357:365	265:265	260:270	183:194	238:246	225:229	161:163
Pizzutelo Moscato Biondo	263:263	187:203	151:151	357:375	249:265	260:270	183:194	238:246	223:225	161:163

En definitiva, partiendo de una colección formada por 1.023 accesiones, al analizar aquellas más próximas en cuanto a su genotipo para 9 microsatélites, se constituyó por eliminación una colección con 495 variedades, que aparecen marcadas con un asterisco en el **Anexo I**, página 211. Hubo 2 parejas compuestas por las accesiones Alfonso Lavallo-Princeps y Pizzutelo Moscato Biondo-Galletta rosa, que diferían entre sí en 2 alelos de los 18 analizados, y cuando se analizaron con 20 loci microsatélite, se confirmó que se trataba de variedades pertenecientes a diferentes sortogrupos. La colección final obtenida a lo largo del estudio de Distinción, estuvo formada por 495 variedades con genotipo diferente, considerándolas variedades pertenecientes a distintos sortogrupos. Esta colección se utilizó en varias ocasiones como colección de referencia y se denominó “Colección de genotipos únicos”.

4.2.2. Cálculo de la distancia mínima

La distancia mínima debe ser estable y no estar sujeta a variaciones interlaboratorio, en la medida de lo posible. Por ello se tuvieron en cuenta y se analizaron con especial minuciosidad, tanto los resultados obtenidos durante el análisis de la colección de 1.023 accesiones recién detallados, como datos bibliográficos acerca de los distintos tipos de variabilidad intrasortogrupo descritos

en vid usando microsatélites. Se analizó por separado la variabilidad intrasortogrupo debida a mutaciones que producen alelos nulos, y la debida a mutaciones producidas por el aumento o disminución de repeticiones de la unidad básica.

Variabilidad intrasortogrupo descrita en vid debida a mutaciones que producen alelos nulos:

Los alelos nulos aparecen al producirse modificaciones en la secuencia diana de los cebadores, impidiendo la hibridación con el ADN molde. Cuando esto ocurre, no es posible distinguir entre individuos heterocigóticos con un alelo nulo e individuos homocigóticos, y además, diferentes alelos nulos dan lugar al mismo fenotipo (ausencia de fragmento amplificado).

En la literatura se han descrito diferentes casos de mutaciones debidas a la presencia de alelos nulos:

En el trabajo de Crespan et al. (1999), para el locus VVMD8, la variedad Sultanina presenta el genotipo (145:157), mientras que en el trabajo de Bowers et al. (1996), la variedad Thompson seedless (considerada en este estudio como sinónima de Sultanina) presentó para el citado locus el genotipo (145:-). La presencia de alelos nulos en el locus VVMD8 ya había sido detectada en variedades que fallaron en su amplificación, para las cuales se consideró que tenían genotipos homocigóticos nulos para ese locus. En el trabajo de Bowers et al. (1996), donde se analizaron 4 STMS, aparecieron alelos nulos en los loci VVMD6 y VVMD8, en 3 de los 31 cultivares de mesa estudiados.

En los trabajos de Thomas et al. (1994) y Sanchez-Escribano et al. (1999), donde se amplificó el locus VVS3 en la variedad Marroo seedless, obtuvieron para este locus respectivamente, los siguientes genotipos: (216:-) y (216:222).

En el estudio llevado a cabo analizando 47 loci microsatélite, en clones de White Riesling (Regner et al., 2000b), la mayoría de las mutaciones presentadas eran debidas a la aparición de alelos nulos en los loci VVMD6, ssrVrZAG12, VRG1, VRG2 y VRG3.

Excepto en el trabajo de Regner et al. (2000b), donde estaban incluidos los 9 loci microsatélites de esta tesis, todos los demás estudios citados incluían 1 ó 2 de ellos (VVS2 ó VVMD5). Lo que hay que remarcar, es que ninguno de estos loci STMS estuvo implicado en mutaciones debidas a la aparición de alelos nulos.

Variabilidad intrasortogrupo descrita en vid debida a mutaciones producidas por el aumento o disminución de repeticiones de la unidad básica:

Este tipo de variabilidad se ha descrito varias veces en vid, y se encuentra ampliamente representado en la bibliografía científica. Se describió por primera vez en el trabajo de Ibáñez et al. (2000), donde se encontró una diferencia de 2pb en un alelo del microsatélite VVMD7 entre dos variedades sinónimas de Corinto negro (Black currant y Mavri corinthiaki), 246pb en Black currant y 248pb en Mavri corinthiaki. Se hipotetizó que ese cambio era debido a un aumento o disminución de una repetición de la unidad básica. Un razonamiento similar se aplicó en el caso descrito por Lefort y Roubelakis-Angelakis (2001), donde fueron capaces de distinguir Kolokythas lefkos de su sinónima Roditis lefkos. La diferencia entre estas variedades se encontró en el locus microsatélite ssrVrZAG64, en Kolokythas lefkos apareció un alelo con 139pb, y en Roditis lefkos para ese mismo locus aparecieron dos alelos con 137pb y 139 pb, respectivamente. Los mismos autores distinguieron Romeiko mavro de su sinónima Tsardana considerando los alelos del locus VVMD7, los cuales presentaban un valor de 236pb y 246 pb, y de 236pb y 244 pb, respectivamente. Más mutaciones de este tipo han sido encontradas en otras variedades como: Pinot (Regner et al., 2000a), y Refošk (Kozjak et al., 2001), (Kozjak et al., 2003) etc., e incluso algunos casos de quimerismo citados más adelante en este estudio.

En el trabajo de Crespan (2004) se presentaron cuatro mutaciones de este tipo: tres de ellas mostraron un incremento en la secuencia del fragmento amplificado de una repetición del motivo básico para los loci VVMD32 (de 265pb a 267pb), VVS2 (de 155pb a 157 pb) y VVMD7 (de 249pb a 251 pb) en las variedades Muscat d' Alsace, Greco di Tufo y Primitivo, respectivamente, mientras que una mutación en el locus ISV8 representó un incremento en tres repeticiones del motivo básico en la variedad Corvina veronese. En los datos de Franks et al. (2002) se mostraron dos mutaciones debidas al incremento de la longitud de los alelos, desde 186pb a 188 pb en el locus VVS19 para Primitivo de Gioia; y desde 121pb a 123 pb en el locus VVS5 para Pinot meunier. En ese estudio los resultados obtenidos en la secuenciación confirmaron la adición de una unidad de repetición.

En el estudio de Riaz et al. (2002), inicialmente analizaron 25 clones de Pinot noir y 22 clones de Chardonnay con 100 loci microsatélite. Se mostraron datos para 15 loci en Pinot noir, y para 9 en Chardonnay. Estos loci fueron

seleccionados de entre los 100 estudiados, por ser los más polimórficos en cada variedad y por aparecer en ellos distintos tipos de mutación. La mayoría presentaron dos genotipos posibles –el genotipo esperado y el mutado- pero en 5 marcadores SSR de Pinot noir (VMCNg1b9, VMCNg1e8, VMCNg2b6, VMCNg1d12 y VMCNg2f12) y en uno de Chardonnay (VVC5g7) llegaron a presentarse entre 3 y 4 genotipos distintos para un mismo locus. Algunos de los alelos mutados diferían del esperado en una o dos repeticiones del motivo básico, mientras que otros diferían del esperado en un rango de 10pb a 20pb o más. En este último caso habitualmente aparece un tercer alelo (posible quimerismo), el cual presenta un tamaño intermedio entre los dos alelos esperados.

En el trabajo de Moncada et al. (2006), empleando microsatélites, llevaron a cabo un estudio de diversidad genética y dispersión geográfica en clones de Cabernet sauvignon. En este estudio, analizaron 59 clones de esta variedad, procedentes de 7 países diferentes (Francia, Chile, España, Australia, Hungría, USA e Italia), con 84 marcadores microsatélites. Con 18 de ellos, los más polimórficos, detectaron 22 genotipos diferentes en Cabernet sauvignon, con un 97% de similitud genética entre ellos. De los 59 clones estudiados, sólo 2 mostraron el genotipo original. Los restantes 57 clones fueron distribuidos en 21 genotipos diferentes, que llegaron a mostrar para un mismo locus entre 2 y 4 genotipos distintos. El genotipo más frecuente, representado en 44 de los 59 clones, fue aquel en el que el locus VMC5g7 mostró un alelo adicional (198), presentando la combinación trialélica 194:196:198. De esos 44 clones, 29 presentaban únicamente ese polimorfismo, mientras que los 15 clones restantes presentaban polimorfismos adicionales basados en la aparición de nuevos alelos que diferían del esperado en un número determinado de repeticiones del motivo básico. La mayoría de los nuevos alelos diferían del alelo esperado en un rango de entre 1 y 4 repeticiones del motivo básico. En este caso, los autores sugirieron que el mecanismo de mutación implicado sería el “slippage” de la polimerasa. Mientras que los nuevos alelos detectados en los loci VVMD30 y VVMC8g9, diferían del alelo esperado en 16, 17 o 18 repeticiones del motivo básico. En este caso, los autores hipotizaron que el polimorfismo sería debido a que hubiera ocurrido una mutación en la región flanqueante del microsatélite. Con los resultados obtenidos, concluyeron que la diversidad genética presente en los clones de la variedad Cabernet sauvignon es debida a una estructura quimérica similar a la obtenida en las variedades pertenecientes al sortogrupo “Pinot” (Hocquigny et al., 2004). Tanto Cabernet

saUVignon como las variedades pertenecientes al sortogrupo "Pinot" presentan un origen muy antiguo, por lo que los resultados obtenidos en estos cultivares podrían explicar la diversidad genética existente en otras antiguas variedades de vid, no esperando encontrar esta variabilidad en clones o sports de variedades obtenidas recientemente en programas de mejora genética (Moncada et al., 2006).

Únicamente en el trabajo de Crespan (2004), un microsatélite de los 9 evaluados en esta tesis (VVS2) estuvo implicado en una mutación debida al incremento de una repetición del motivo básico en la secuencia del fragmento amplificado.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, y los descritos en la bibliografía, se puede establecer la distancia mínima para el sistema de 9 loci microsatélite según el criterio propuesto en este trabajo: a partir de la menor diferencia intersortogrupo y de la mayor diferencia intrasortogrupo. Ambas medidas en número de alelos diferentes.

Los resultados obtenidos en este trabajo durante el análisis de la colección global formada por 1.023 accesiones en base al estudio de aquellas más próximas en cuanto a su genotipo para los 9 loci microsatélite, se pueden resumir en:

- Todas las accesiones que coincidían en la totalidad de los alelos analizados, 18, se consideró que pertenecían al mismo sortogrupo y se seleccionó una sola accesión representativa de cada genotipo.
- Únicamente apareció una pareja de accesiones, Chasselas blanca y Chasselas Gros Coulard, que coincidía en 17 alelos de los 18 analizados. Dicha pareja difería entre sí en un alelo del locus ZAG83. Con el análisis de 20 loci microsatélite se concluyó que una de estas dos accesiones es un sport de la otra. La diferencia se consideró variabilidad "intrasortogrupo".
- Alfonso Lavalle-Princeps y Pizzutelo Moscato Biondo-Galletta rosa fueron las dos parejas que coincidieron en 16 alelos de los 18 analizados. Con el análisis de 20 microsatélites se llegó a la conclusión de que pertenecían a sortogrupos diferentes. La diferencia se consideró variabilidad "intersortogrupo".

Con los resultados obtenidos al analizar los distintos tipos de variabilidad intrasortogrupo descrita en la literatura en vid para los 9 microsatélites empleados, se llega a la misma conclusión que con los obtenidos en este trabajo. Es decir, el mayor número de alelos diferentes entre plantas pertenecientes a un mismo sortogrupo, sería 1.

Por lo tanto, con los resultados anteriores, la distancia más pequeña entre dos variedades para considerarlas pertenecientes a sortogrupos diferentes mediante el uso de los 9 loci estudiados, sería de 2 alelos.

Resultados idénticos a los obtenidos en esta tesis, en cuanto al valor de la distancia mínima, se muestran en Ibáñez (2000). Se analizaron 53 accesiones apirenas con 6 loci microsatélite, entre los cuales se encuentran el VVS2 y VVMD5 presentes en este estudio. Se estimó la distancia mínima en 2 alelos. Es decir, dos variedades se considerarían pertenecientes a sortogrupos diferentes si se diferenciaban en más de un alelo de los 6 loci analizados.

Hasta el momento, y en nuestro conocimiento, no se ha publicado ningún estudio en otras especies vegetales donde empleando microsatélites, se determine el valor de la distancia mínima en número de alelos.

Es importante resaltar, como muestra la bibliografía, que la tasa de mutación en las secuencias microsatélites es superior a la de otras zonas del genoma, y la aparición de nuevos alelos por mutación somática en plantas de la misma variedad es un hecho infrecuente, pero posible, por lo que debe ser tenido en cuenta a la hora de establecer la distancia mínima. Cuando se considera que las plantas se están propagando vegetativamente, como ocurre en los viñedos, la probabilidad de encontrar mutaciones en regiones microsatélites está afectada por algunos factores:

- Edad de la variedad. Debido a que las mutaciones son acumulativas, la probabilidad de encontrar mutaciones es directamente proporcional a la edad de la variedad.
- Extensión de cultivo de la variedad (número de clones/variedad).

- Número de loci microsatélite analizados.
- Homogeneidad y estabilidad de los loci microsatélite analizados. En el estudio posterior se analizará la homogeneidad y estabilidad de los 9 loci microsatélite que ocupan esta tesis, pero los datos bibliográficos ya indican que el comportamiento de distintos microsatélites es diferente.

En el trabajo de Crespan (2004), se estimó un ratio general de mutación por planta y microsatélite en vid de 8×10^{-5} . Para calcularlo tomaron datos, tanto del trabajo citado como de la literatura, de 224 individuos analizados con 948 loci, entre los cuales se encontraron 35 mutaciones. Es muy improbable, pero se ha descrito (Riaz et al., 2002), (Moncada et al., 2006), encontrar en la misma planta dos mutaciones independientes en distintos microsatélites. Hay que destacar que este fenómeno tan infrecuente no ha aparecido representado en la bibliografía consultada con los 9 loci utilizados en este estudio, y dentro del propio trabajo, donde se ha manejado una colección de casi 500 genotipos, únicamente la pareja representada por Chasselas blanca y Chasselas Gros Coulard, mostró una diferencia entre sí en un alelo del locus ZAG83.

Hay que tener en cuenta que el hecho de encontrar en una planta 1 o más mutaciones en un microsatélite, afectaría únicamente al microsatélite en cuestión. No es esperable que a raíz de esa mutación en el microsatélite aparezca una mutación morfológica en esa planta.

4.2.3. Utilidad del sistema de 9 loci microsatélite para el estudio de Distinción

Los 9 loci microsatélite empleados en este estudio han demostrado ser una herramienta muy útil para el análisis de la colección formada por 1.023 accesiones, siendo capaces de determinar en ella las diferencias intra e intersortogrupo. En base a estas diferencias se ha establecido la distancia mínima en 2 alelos.

Con referencia al sistema de análisis con microsatélites, de toda la bibliografía citada en el apartado anterior más los resultados obtenidos en este trabajo, se puede destacar que:

- Las variedades que generalmente presentan alelos mutantes son muy antiguas (varios siglos), por lo que, en principio, este fenómeno no se espera que pueda llegar a ocurrir durante el periodo de tiempo que comprende la protección legal de una nueva variedad vegetal.
- Ninguno de los 9 microsatélites en estudio estuvo implicado en mutaciones que producen alelos nulos, y solamente uno, el VVS2, lo estuvo en mutaciones debidas a un incremento en la secuencia del fragmento amplificado (Crespan, 2004).
- En este trabajo, empleando una colección de casi 500 genotipos, únicamente apareció una pareja de accesiones, Chasselas blanca y Chasselas Gros Coulard, que difería entre sí en un alelo del locus ZAG83. Ambas pertenecían al mismo sortogrupo.

En el análisis rutinario de variedades de vid, aquellas que morfológicamente no se distinguen, tampoco lo hacen al analizarlas con microsatélites. Sin embargo, variedades que con microsatélites muestran un mismo genotipo, al analizarlas morfológicamente pueden resultar distintas. Un ejemplo paradigmático de esto lo constituye el caso de Garnacha blanca y Garnacha tinta, siendo una de ellas un sport de la otra. Por lo tanto, los microsatélites, en base a la distancia mínima, permitirían establecer la distinción, aunque una identidad total en microsatélites no significaría que dos variedades no son distintas.

Asimismo, en base a los resultados expuestos, al igual que en morfología puede no establecerse distinción con un carácter morfológico, en STMS tampoco debe establecerse la distinción con 1 alelo. Por lo que, en este sentido, los microsatélites podrían resultar aptos en el estudio de Distinción.

Hay que recordar que en la actualidad, los marcadores de ADN no se admiten por la UPOV para realizar los test DHE, aunque se está trabajando en su seno (a través del grupo BMT) para estudiar su incorporación en varias especies. En la décima reunión del grupo de trabajo BMT, celebrada en Seúl, del 21 al 23 de noviembre de 2006, se expusieron otros trabajos, aparte del presentado por nuestro laboratorio ("Un sistema basado en microsatélites, útil para la identificación y protección legal de variedades de vid"), donde se manifestó que el empleo de marcadores moleculares microsatélites sería un complemento muy útil para los test

DHE. Con referencia a cultivos propagados vegetativamente, donde se encuentra la vid, se presentaron estudios de interés; y dado que resulta difícil el acceso a los mismos, merece la pena describir alguno de ellos:

- Expertos de Alemania, Holanda y Reino Unido, en el documento BMT/10/16, hacían referencia a un estudio basado en una colección de referencia de variedades de rosa.

Debido al gran número de variedades de rosa existente en todo el mundo, se hace complicado llevar a cabo los test DHE en esta especie. Para intentar resolver este problema, en este estudio se construyó una base de datos que contenía datos administrativos, morfológicos, moleculares y fotos para un gran número de variedades de rosa tanto de invernadero como de jardín, que servirían como referencia para identificación de variedades. Todo ello conduciría a reforzar los derechos de los obtentores. Actualmente, los test DHE en rosa están basados en el análisis de caracteres morfológicos y, cuando es necesario, de fotografías, ambos pueden estar afectados por las condiciones medioambientales y por lo tanto la información requiere una cuidadosa interpretación por parte de los examinadores, al igual que ocurre en vid. En esta base de datos se recogen datos para 12 loci microsatélite en aproximadamente 380 variedades distintas de rosa. Estos 12 loci demostraron ser muy informativos para identificar variedades de rosa. Concluyeron que estos marcadores pueden apoyar e incluso mejorar la calidad de los test DHE y la calidad de la protección de variedades de esta especie.

Usando los 12 loci de este estudio, la probabilidad de que dos variedades muestren el mismo perfil electroforético (PI), fue de 10^{-8} para rosas de invernadero y de 5×10^{-11} , para rosas de jardín. Esto significa que, cuando dos muestras presentan perfiles genéticos idénticos, la probabilidad de que sean iguales o pertenezcan al mismo grupo mutante (que aquí denominamos sortogrupo) es de casi el 100%. Cuando combinaron los datos microsatélite obtenidos para las rosas de jardín y las de invernadero, observaron que todas ellas (excluyendo mutantes dentro de un determinado grupo de rosas de jardín o de invernadero) mostraron perfiles diferentes.

A pesar de algunas dificultades, demostraron que los datos procedentes de dos laboratorios diferentes (ring test) eran sustancialmente equivalentes, y que los

datos moleculares producidos eran una herramienta muy útil para el manejo de colecciones de referencia.

- Expertos de Holanda, en el documento BMT/10/17, hacían referencia a un estudio basado en marcadores microsatélites para la identificación de variedades de claveles.

Como muchas plantas ornamentales, los claveles presentan un gran número de variedades. Actualmente, el registro y la protección de variedades de claveles están basados en caracteres morfológicos. En este estudio muestran los resultados obtenidos en el empleo de marcadores microsatélites para caracterizar variedades de clavel, así como la construcción de una base de datos molecular.

Se analizaron con 13 loci microsatélite 172 muestras que abarcaron una selección de variedades comunes de clavel así como algunos grupos de mutantes.

Con el set de 13 microsatélites, todos los mutantes bien conocidos y las variedades de las que proceden fueron correctamente agrupados juntos. La probabilidad de que dos muestras presenten el mismo perfil electroforético (PI), fue de 16×10^{-7} . El promedio de similitud entre muestras fue bajo (0,46), lo que indica un alto nivel de diversidad genética entre las muestras estudiadas. Así, el set de loci microsatélite descrito en este estudio puede ser usado para el genotipado de variedades de clavel y su consiguiente identificación. Aseguran que para supuestos prácticos, es recomendable analizar todas las muestras por duplicado y reanalizar todas aquellas que muestren diferencias en alelos antes de su incorporación a la base de datos. De esta forma, el valor umbral (valor usado para evitar que dos variedades sean consideradas diferentes debido a un error técnico) puede ser más bajo, consiguiendo un agrupamiento más preciso de las muestras.

- Expertos de Reino Unido, en el documento BMT/10/5, hacían referencia a un estudio basado en la identificación de cultivares de patata del Catálogo Común de la Unión Europea mediante el uso de marcadores microsatélite.

A principios del 2.006, la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales financió un proyecto para construir una base de datos que contuviera datos microsatélite y morfológicos para las variedades de patata presentes en el Catálogo Común de la Unión Europea. Los cuatro participantes de este proyecto eran los

responsables del test DHE en Alemania, Holanda, Polonia y Reino Unido. La base de datos creada contiene información para 9 loci microsatélite en 579 variedades de patata. Exceptuando muy pocos casos (variantes somaclonales y variedades mal identificadas), todas las variedades se pudieron diferenciar usando esos 9 loci.

En este estudio, se analizaron muestras pertenecientes a la misma variedad y procedentes de diferentes fuentes. Se demostró que existen errores en el etiquetado de variedades mantenidas en grandes colecciones de material. Concluyeron que, con esto, se manifiesta la importancia del empleo de los marcadores moleculares microsatélites como un complemento en el test DHE.

Aunque en ninguno de estos estudios se ha analizado un número de muestras tan elevado como en esta tesis doctoral, ni se ha realizado un análisis específico sobre cómo los microsatélites empleados serían de útiles para su utilización en el test DHE, todos han llegado a la misma conclusión con los resultados obtenidos: que los marcadores moleculares microsatélite aparte de su ya conocida utilidad para la identificación de variedades vegetales, supondrían un complemento muy útil para el test DHE.

4.3. ESTUDIO DE IDENTIFICACIÓN

4.3.1. Idoneidad de la colección utilizada

La identificación mide la conformidad de una variedad con algún modelo establecido. Por ello, los aspectos más importantes en el estudio de Identificación son la elección de una colección de referencia adecuada, y el sistema con que se estudia esa colección. En este estudio, se tomó como colección de referencia, la "Colección de genotipos únicos" derivada del estudio de Distinción, analizada con 9 loci microsatélite. Esta colección estaba constituida por 495 variedades de genotipos distintos. Con ello se pretendía evitar información redundante, y que las frecuencias alélicas de la colección fueran más exactas.

La Probabilidad Total de Identidad (PI) obtenida para el conjunto de los 9 loci microsatélite en esta colección mediante el software Identity, fue $6,87 \times 10^{-12}$, lo que indica una muy baja probabilidad de que dos variedades distintas compartan el mismo genotipo al azar para los loci analizados.

En general, los resultados obtenidos en este estudio son similares a otros trabajos publicados en los cuales se analizó un número considerable de muestras, como el de Ibáñez et al. (2003) (111 variedades y 13 microsatélites) en el que se obtuvo una PI total de $9,9 \times 10^{-12}$ y Sefc et al. (1999), donde analizando 120 variedades y 18 microsatélites, de los que solo presentaron la PI para 13 de ellos, obtuvieron un valor para PI total de $2,19 \times 10^{-10}$.

Hay que resaltar el alto poder de resolución del sistema de 9 microsatélites utilizado, ya que únicamente fueron necesarios 5 de los 9 STMS para identificar inequívocamente las 495 variedades que formaban la “Colección de genotipos únicos”. Dichos loci fueron: VVMD27, VVMD5, VVS2, ZAG83 y VVMD28, que resultaron ser los que tenían el valor de Heterocigosidad observada más alto de los 9, excepto el locus ZAG83, como se puede observar en la **Tabla R9**. Concretamente, con los loci VVMD27, VVMD5, VVS2 y VVMD28 se identificaron inequívocamente 485 variedades. El resto se pudieron distinguir con el locus ZAG83. Este poder de resolución depende entre otros factores, de la heterocigosidad de los STMS elegidos para la identificación, y de la variabilidad de las muestras que formen la colección de referencia. Dentro de las 495 variedades que formaban la “Colección de genotipos únicos”, se encontraban variedades tanto de uva de mesa (52,72%) como de vinificación (40,61%), portainjertos (2,83%), híbridos productores directos (0,81%), especies del género *Vitis* no *vinifera* y géneros de la familia Vitáceas (3,03%). A su vez, como ya se ha comentado, dentro de esta diversidad, se encontraban variedades muy cercanas entre sí (padres, hijos, hermanos, etc.).

Tabla R9. Valores de Heterocigosidad observada (H_o) en los 9 microsatélites del estudio. Destacados aparecen los 5 loci con los que se identificaron inequívocamente las 495 variedades de la “Colección de genotipos únicos”.

LOCUS	ZAG67	VVMD27	VVMD5	ZAG29	ZAG62	ZAG112	VVS2	ZAG83	VVMD28
Ho	0,78	0,82	0,87	0,33	0,81	0,80	0,88	0,78	0,87

Hay estudios en la bibliografía, por ejemplo el de Martín et al. (2003), donde partiendo de una colección de 176 variedades españolas de *Vitis vinifera*, analizadas con 6 loci microsatélite, no fueron capaces de identificar todas ellas

inequívocamente. Se indicó que ello podía ser debido a que la colección estaba formada por variedades estrechamente relacionadas.

En el trabajo de Ibáñez y Eeuwijk (2003), partiendo de una colección de 45 accesiones apirenas distintas, empleando 9 loci microsatélite, únicamente 3 fueron necesarios para identificar inequívocamente todos los cultivares presentes en la citada colección.

En los dos trabajos anteriores, 3 de los microsatélites empleados coincidían con los 9 de este estudio: VVMD5, VVS2 y ZAG62.

4.3.2. Análisis de la estructura de la colección

Para estudiar si la “Colección de genotipos únicos” estaba estructurada en función de los genotipos que presentaba para los 9 loci evaluados, se utilizó el software Structure 2.0 (Pritchard y Wen, 2003).

Siguiendo el criterio llevado a cabo en Pritchard et al. (2000), se detectaron 14 poblaciones en la colección compuesta por 495 variedades distintas. Como ya se ha comentado, este criterio puede no proporcionar una estimación correcta del número de poblaciones que podían existir en una determinada colección, por lo que se empleó la metodología descrita en Evanno et al. (2005). Se determinó ΔK (tasa de cambio presente en los valores de la probabilidad en función de K), y se representó gráficamente este valor frente a K (**Figura R4**). Se visualizó un pico muy claro en $K=4$, lo que pareció indicar que las 495 variedades que formaban la colección se agrupaban en cuatro poblaciones.

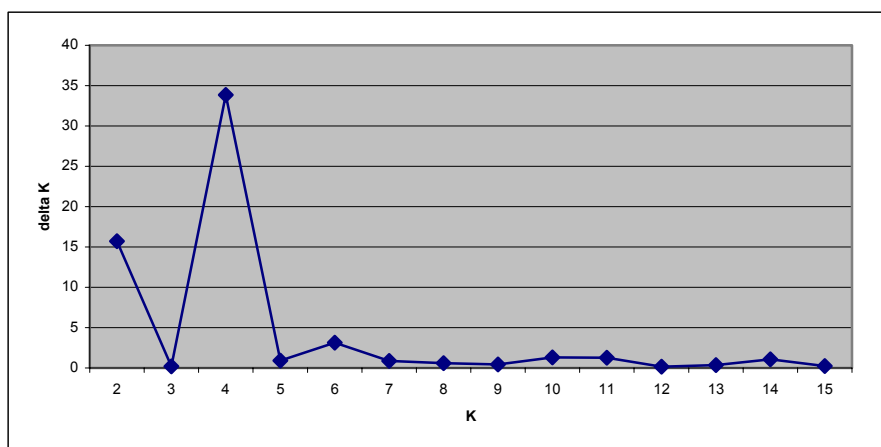


Figura R4. Representación gráfica de ΔK frente a K.

Una vez seleccionado el valor 4 para K, se eligió aquella simulación de entre las 10 realizadas en el análisis que presentó la combinación más probable de genotipos para esa K. De esta simulación, se obtuvieron los gráficos representados en las **Figuras R5** y **R6**. Estas dos figuras muestran a las 495 variedades que forman la “Colección de genotipos únicos”, agrupadas por poblaciones, y concretamente, por el grado de mezcla genética que presentan de cada una de ellas. Así, cada variedad se encuentra representada por una barra vertical, pudiendo ésta mostrar un máximo de 4 fragmentos coloreados cuyo tamaño dependerá de la probabilidad que tenga cada variedad de pertenecer a una de las 4 poblaciones detectadas en el análisis. Estas se encuentran representadas por un color predominante: rojo, verde, azul y amarillo, respectivamente. La **Figura R5** representa el gráfico de las 495 variedades, destacándose individualmente cada una de ellas. En la **Figura R6** se ha variado la escala para una mejor visualización de las 4 poblaciones detectadas en la “Colección de genotipos únicos”.

Resultados y Discusión

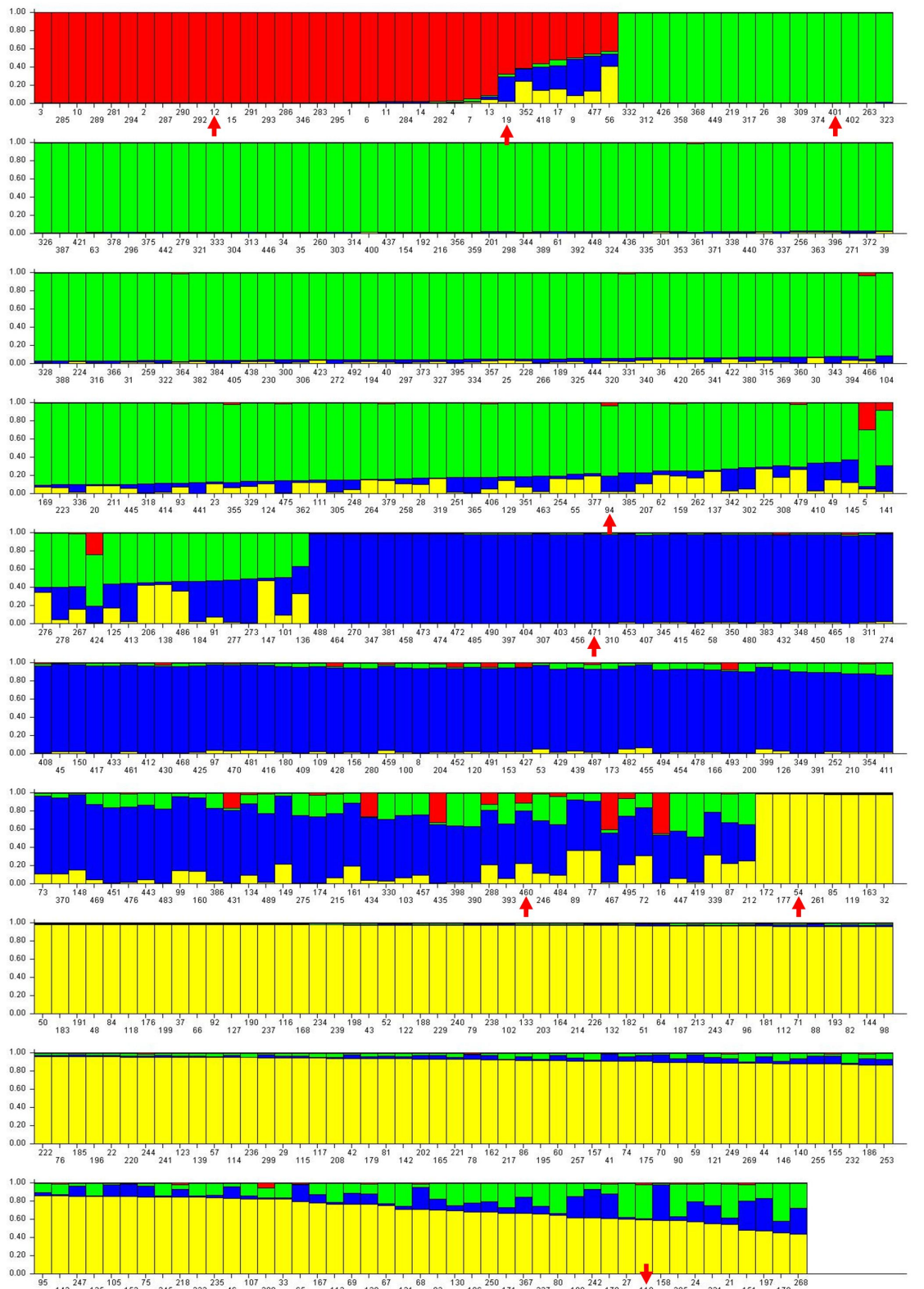


Figura R5. Representación gráfica de las 495 variedades que forman la “Colección de genotipos únicos”, destacando cada una de ellas individualmente. Se encuentran agrupadas en función del grado de mezcla genética que presentan de cada una de las 4 poblaciones detectadas en el análisis con el software Structure, y representadas cada una por un color diferente. Los números se corresponden con los de la **Tabla R10**, página 124.

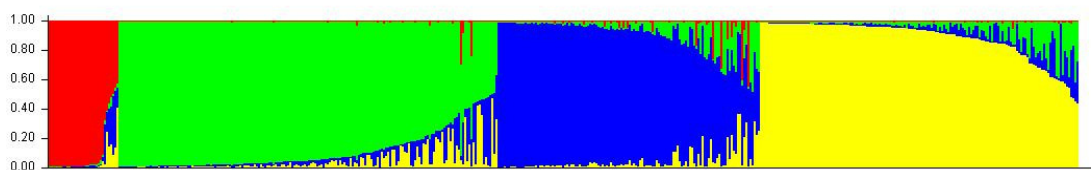


Figura R6. Representación gráfica de la **Figura R5** a diferente escala.

La **Tabla R10** presenta cada una de las 495 variedades que componen la “Colección de genotipos únicos” con algunas características relevantes.

Las variedades utilizadas tanto para mesa como para vino, representadas en la **Tabla R10** como MV, se consideraron en este análisis como variedades de uva de mesa.

Resultados y Discusión

Tabla R10. Se recoge (de izquierda a derecha) la siguiente información para las 495 variedades que forman la “Colección de genotipos únicos”: Nº con el que aparecen representadas en la **Figura R5**; Nombre de la variedad; Código de parcela en la Colección de variedades de vid de El Encín (las muestras de Briones, las seleccionadas del estudio de establecimiento de descriptores microsatélite y las obtenidas del estudio de Homogeneidad y Estabilidad, no presentan código por no pertenecer la mayoría de ellas a la colección de “El Encín”); Uso de las variedades [mesa (M); vino (V); Mesa/Vino (MV); especies del género *Vitis* no vinífera (EGV); híbridos productores directos (HPD) y portainjertos (PTI)]; y Origen [variedades españolas (ESP) y variedades extranjeras (EXT)].

Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN
1	VITIS CALIFORNICA		EGV	EXT	26	MOLINERA	22B05	M	ESP	51	PIROVANO 315	25-I-A-13	M	EXT
2	SO4		PTI	EXT	27	DE CILINDRO	22B08	M	ESP	52	REGINA DEI VIGNETI	25-I-A-14	M	EXT
3	VITIS RIPARIA		EGV	EXT	28	IMPERIAL ROJA	22B09	M	ESP	53	PRECOCE DE MALINGRE	25-I-A-15	M	EXT
4	VITIS SILVESTRIS (MACHO)		EGV	ESP	29	FONDO DE ORZA	22B50	M	ESP	54	PRECOCE DI ROMA	25-I-A-16	M	EXT
5	MILLARDET 19-62		EGV	EXT	30	IMPERIAL	22C05	M	ESP	55	JAOMET	25-I-A-17	M	EXT
6	COUDERC 1616		EGV	EXT	31	MANTUA	22C25	M	ESP	56	JULY MUSCAT	25-I-A-20	M	EXT
7	MILLARDET 420A		EGV	EXT	32	CARDINAL	22C42	M	EXT	57	EARLY MUSCAT	25-I-B-01	M	EXT
8	VITIS SILVESTRIS (MACHO)		EGV	ESP	33	MOSCATEL	22D10	M	ESP	58	MUSCAT SAINT LAURENT	25-I-B-04	M	EXT
9	41 B M		EGV	ESP	34	GREG	22D11	M	ESP	59	ANNA MARIA	25-I-B-05	M	EXT
10	RUPESTRIS DE LOT		EGV	EXT	35	FUMAT	22H08	M	ESP	60	PRIMIERA	25-I-B-06	M	EXT
11	VITIS CINEREA		EGV	ESP	36	CARDINAL	22M23	M	EXT	61	FERDINAND DE LESSEPS	25-I-B-07	M	EXT
12	COUDERC 161-49		EGV	EXT	37	ALFONSO LAVALLE	22M25	M	EXT	62	FONDO DE ORZA	25-I-B-10	M	ESP
13	VITIS LABRUSCA		EGV	EXT	38	NÁPARO	22N10	M	ESP	63	VILLARDIEL	25-I-B-11	M	ESP
14	VITIS AESTIVALIS		EGV	ESP	39	CRUJILLÓN	22E04	M	ESP	64	AUGUSTA	25-I-B-12	M	EXT
15	VITIS ARIZONICA		EGV	ESP	40	MOSCATEL NEGRO	22E60	M	ESP	65	CIRCA	25-I-B-13	M	EXT
16	SALVADOR(=SEIBEL 128)		HPD	EXT	41	PERLA DE CSABA	25-I-A-01	M	EXT	66	BRUNI 415	25-I-B-14	M	EXT
17	JACQUEZ		HPD	ESP	42	MADELEINE ANGEVINE	25-I-A-02	M	EXT	67	EL GOUZ	25-I-B-15	M	EXT
18	VILLARD BLANC		HPD	EXT	43	BRUNI 012	25-I-A-03	M	EXT	68	GRADISKA	25-I-B-17	M	EXT
19	OBERLIN 595		HPD	EXT	44	BRUNI 036	25-I-A-04	M	EXT	69	PROSPERI 008	25-I-B-18	M	EXT
20	NAPOLEÓN	22A47	M	ESP	45	MADELEINE ROYALE	25-I-A-05	M	EXT	70	ATTILIO RAGGIONERI	25-I-B-19	M	EXT
21	DE CUERNO	22A48	M	ESP	46	LUGLIENGA BIANCA	25-I-A-06	M	EXT	71	BRUNI 041	25-I-B-20	M	EXT
22	DOMINGA	22A49	M	ESP	47	GOLD	25-I-A-08	M	EXT	72	PANSE PRECOCE	25-II-A-01	M	EXT
23	OHANES	22A50	M	ESP	48	PRIMUS	25-I-A-09	M	EXT	73	ADMIRABLE DE COURTILLER	25-II-A-05	M	EXT
24	NEGRA TARDÍA	22B01	M	ESP	49	AGOSTENGA	25-I-A-11	M	EXT	74	BRUNI 100	25-II-A-06	M	EXT
25	CIRUELA ROJA	22B03	M	ESP	50	DONA MARIA	25-I-A-12	M	EXT	75	ALBA MAGNA	25-II-A-07	M	EXT

Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN
76	DELIZIA DI VAPRIO	25-II-A-08	M	EXT	101	PIROVANO 18	25-II-B-18	M	EXT	126	UVA JIJONA	25-IV-A-01	M	ESP
77	ANGIOLA BIANCA	25-II-A-10	M	EXT	102	MOSCATO GUSTAV SZAUTER	25-II-B-19	M	EXT	127	VIVONA 378	25-IV-A-02	M	EXT
78	SULIVAN	25-II-A-11	M	EXT	103	FAVORITA DI CONEGLIANO	25-III-A-02	M	EXT	128	PIROVANO 093	25-IV-A-03	M	EXT
79	CHASSELAS MICHEL TOMPA	25-II-A-12	M	EXT	104	INZOLIA BIANCA	25-III-A-03	M	EXT	129	DABOUKI	25-IV-A-05	M	EXT
80	PALESTINA I	25-II-A-14	M	EXT	105	WRATCHANSKI MISKET	25-III-A-04	M	EXT	130	OLIVETTE BARTHELET	25-IV-A-07	M	EXT
81	MATHIASZ JANOS DIADALA MUSKOTALY	25-II-A-15	M	EXT	106	BICANE	25-III-A-05	M	EXT	131	CORNIOLA DI MILAZZO	25-IV-A-09	M	EXT
82	PIROVANO 235	25-II-A-16	M	EXT	107	MOSCATO DI TERRACINA	25-III-A-06	M	EXT	132	AURATA	25-IV-A-10	M	EXT
83	DALMASSO VI-06	25-II-A-17	M	EXT	108	MARENGO	25-III-A-08	M	EXT	133	PERLONA	25-IV-A-11	M	EXT
84	BOGNI 17	25-II-A-18	M	EXT	109	COARNA BIANCA	25-III-A-09	M	EXT	134	LOCAL WHITE XYNISTERI	25-IV-A-12	M	EXT
85	PRINCEPS	25-II-A-19	M	EXT	110	SIDERITIS	25-III-A-11	M	EXT	135	PIROVANO 575	25-IV-A-13	M	EXT
86	PROSPERI 285	25-II-A-20	M	EXT	111	AURORA	25-III-A-12	M	EXT	136	ALEDO REAL	25-IV-A-17	M	ESP
87	FOSTER'S WHITE SEEDLING	25-II-B-01	M	EXT	112	ZARIZA NA LOSIATA X BOLGAR 19-2	25-III-A-13	M	EXT	137	CIMINNITA	25-IV-A-19	M	EXT
88	TRIESTE	25-II-B-02	M	EXT	113	LACRIMA DI MARIA	25-III-A-14	M	EXT	138	PIZZUTELLO MOSCATO BIONDO	25-IV-B-03	M	EXT
89	DORONA DI VENEZIA	25-II-B-03	M	EXT	114	REGINA ELISABETTA	25-III-A-17	M	EXT	139	AUSONIA	25-IV-B-04	M	EXT
90	ALBERTA	25-II-B-05	M	EXT	115	CICLÓPICA	25-III-A-18	M	EXT	140	SERVANT	25-IV-B-05	M	EXT
91	FORASTERA BLANCA	25-II-B-06	M	ESP	116	IMPERO	25-III-B-02	M	EXT	141	RODITIS	25-IV-B-06	M	EXT
92	THALLOCY LAJOS	25-II-B-07	M	EXT	117	BARESANA	25-III-B-03	M	EXT	142	PROSPERI 037	25-IV-B-07	M	EXT
93	CATALANESCA BIANCA	25-II-B-08	M	EXT	118	ZIBIBBO	25-III-B-04	M	EXT	143	TALISMANO	25-IV-B-08	M	EXT
94	SCHIRADZOULI BIANCO	25-II-B-09	M	EXT	119	ITALIA	25-III-B-07	M	EXT	144	LATINA	25-IV-B-13	M	EXT
95	GENERAL DE LA MARMORA	25-II-B-10	M	EXT	120	VERDEA	25-III-B-08	M	EXT	145	ALEDO	25-IV-B-15	M	ESP
96	DUCHESS OF BUCCLEUGH	25-II-B-11	M	EXT	121	ROSETI	25-III-B-09	M	EXT	146	HIMONIATICO	25-IV-B-19	M	EXT
97	MESLIER HÂTIF	25-II-B-12	M	EXT	122	PROSPERI 102	25-III-B-10	M	EXT	147	CALMERIA	25-IV-B-20	M	EXT
98	DIAMANT TRAUBE	25-II-B-13	M	EXT	123	CLOTILDE PROSPERI	25-III-B-11	M	EXT	148	VOLTA	25-V-A-01	M	EXT
99	SUPERZIBIBBO	25-II-B-15	M	EXT	124	NEHELESCOL	25-III-B-17	M	EXT	149	NOIR HÂTIF DE MARSEILLE	25-V-A-02	M	EXT
100	SAUVIGNON	25-II-B-17	M	EXT	125	GALLURA ZENNI DE DAMASCO	25-III-B-18	M	EXT	150	ROI DES PRECOCES	25-V-A-03	M	EXT

Resultados y Discusión

Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN
151	CHAOUCH ROSE	25-V-A-04	M	EXT	176	MOSCATEL DE HAMBURGO	25-VI-A-05	M	EXT	201	INZOLIA NERA	25-VI-B-17	M	EXT
152	PERLE DE CSABA ROUGE	25-V-A-07	M	EXT	177	TERESA PIROVANO	25-VI-A-08	M	EXT	202	DARKAIA NERA	25-VI-B-18	M	EXT
153	AGOSTENGA ROSA	25-V-A-08	M	EXT	178	CILIEGUIOLO NERO	25-VI-A-10	M	EXT	203	SUPERFRANKENTHAL	25-VII-A-01	M	EXT
154	GATETA	25-V-A-09	M	ESP	179	IGNEA	25-VI-A-12	M	EXT	204	LASSINA	25-VII-A-04	M	EXT
155	CHASSELAS ROUGE	25-V-A-12	M	EXT	180	TRENTAM BLACK	25-VI-A-13	M	EXT	205	AHMEUR BOU AHMEUR	25-VII-A-05	M	EXT
156	PORTUGUÉS AZUL	25-V-A-13	M	EXT	181	SUPERBA	25-VI-A-14	M	EXT	206	620 PIROVANO	25-VII-A-06	M	EXT
157	SCHIRAZ	25-V-A-14	M	EXT	182	PIROVANO 159	25-VI-A-15	M	EXT	207	ROSAKI NOIR DES SEMIS	25-VII-A-07	M	EXT
158	BRUNI 074	25-V-A-16	M	EXT	183	FUSCA	25-VI-A-16	M	EXT	208	FRAULA KAKINI	25-VII-A-09	M	EXT
159	COARNA NEAGRA	25-V-A-17	M	EXT	184	VERNACCIA NERA	25-VI-A-17	M	EXT	209	EL FARRYALI	25-VII-A-11	M	EXT
160	SCARLET	25-V-A-19	M	EXT	185	PERLA NERA	25-VI-A-18	M	EXT	210	GROS MAROC	25-VII-A-12	M	EXT
161	BRUNI 102	25-V-A-20	M	EXT	186	BRUNI 090	25-VI-A-19	M	EXT	211	DANUGUE	25-VII-A-13	M	EXT
162	DUC DE MAGENTA	25-V-B-01	M	EXT	187	ELETTRA	25-VI-A-20	M	EXT	212	MISTRESS HALL	25-VII-A-14	M	EXT
163	LOMBARDIA	25-V-B-02	M	EXT	188	DALMASSO XI-08	25-VI-B-01	M	EXT	213	DALMASSO III-33	25-VII-A-15	M	EXT
164	BRUNI 707	25-V-B-03	M	EXT	189	GEMRE	25-VI-B-02	M	EXT	214	BLACK ROSE	25-VII-A-16	M	EXT
165	FRANKENTHAL	25-V-B-04	M	EXT	190	BOGNI 08	25-VI-B-03	M	EXT	215	BLACK ALICANTE	25-VII-A-19	M	EXT
166	CORNICHON VIOLET	25-V-B-06	M	EXT	191	ARTURO MARESCALCHI	25-VI-B-04	M	EXT	216	JERÓNIMO DE TUDELA	25-VII-A-20	M	ESP
167	PRUNE DE CAZOULS	25-V-B-09	M	EXT	192	PLANTA MULA	25-VI-B-06	M	ESP	217	DATTIER NOIR	25-VII-B-01	M	EXT
168	PIROVANO 188	25-V-B-13	M	EXT	193	BARBABLEU	25-VI-B-08	M	EXT	218	LATTUARIO NERO	25-VII-B-02	M	EXT
169	APESORGIA NERA	25-V-B-14	M	EXT	194	NYMRANG	25-VI-B-09	M	EXT	219	NORE	25-VII-B-03	M	ESP
170	PIROVANO 531	25-V-B-17	M	EXT	195	DALMASSO XVIII-03	25-VI-B-11	M	EXT	220	OPHTALMO	25-VII-B-04	M	EXT
171	CEREZA	25-V-B-18	M	EXT	196	DALMASSO XI-20	25-VI-B-12	M	EXT	221	BARLINKA	25-VII-B-05	M	EXT
172	MOSCATEL NEGRO	25-V-B-19	M	ESP	197	GROS COLMAN	25-VI-B-13	M	EXT	222	MARSIGLIANA	25-VII-B-06	M	EXT
173	OILLADE NOIR	25-VI-A-01	M	EXT	198	PIROVANO 771	25-VI-B-14	M	EXT	223	GLACIÈRE	25-VII-B-08	M	EXT
174	NINCUSA	25-VI-A-03	M	EXT	199	MARIA ROSA	25-VI-B-15	M	EXT	224	PRUNESTA NERA	25-VII-B-09	M	EXT
175	MOSCATO DEL ADDA	25-VI-A-04	M	EXT	200	MAWRUD	25-VI-B-16	M	EXT	225	COLGAR ROJA	25-VII-B-10	M	EXT

Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN
226	PERGOLESE	25-VII-B-11	M	EXT	251	APIRENA DI VELLETRI	25-VIII-B-17	M	EXT	276	SANTA MAGDALENA	25-IV-B-10	MV	ESP
227	PIZZUTELLO NERO	25-VII-B-12	M	EXT	252	SLAVJANKA	25-VIII-B-18	M	EXT	277	PLOVDINA	25-V-B-16	MV	EXT
228	ALMERIA NERA	25-VII-B-14	M	ESP	253	BAYAD	25-VIII-B-19	M	EXT	278	PIRIQUITA	25-VI-A-02	MV	EXT
229	LOCAL BLACK	25-VII-B-17	M	EXT	254	CRIMSON SEEDLESS		M	EXT	279	TORRALBA	25-VII-A-03	MV	ESP
230	EMPEROR	25-VII-B-19	M	EXT	255	FLAME SEEDLESS		M	EXT	280	RUBY CABERNET		MV	EXT
231	OLIVETTA NERA	25-VII-B-20	M	EXT	256	RED GLOBE		M	EXT	281	COUDERC 3309		PTI	EXT
232	DELIGHT	25-VIII-A-01	M	EXT	257	SUGRAONE		M	EXT	282	FERCAL		PTI	EXT
233	LOOSE PERLETTE	25-VIII-A-03	M	EXT	258	RAGOL	22B02	MV	ESP	283	PAULSEN 1103		PTI	EXT
234	GRAZIELLA I	25-VIII-A-06	M	EXT	259	BEBA	22B13	MV	ESP	284	RUGGERI 140		PTI	EXT
235	SULTANINA	25-VIII-A-07	M	EXT	260	FERRAL	22B14	MV	ESP	285	CASTEL 216-3		PTI	EXT
236	MARIA PIROVANO	25-VIII-A-08	M	EXT	261	MOSCATEL	22B22	MV	ESP	286	COUDERC 1616		PTI	EXT
237	PIROVANO 166A	25-VIII-A-09	M	EXT	262	TORRONTÉS	22B32	MV	ESP	287	GOETHE 9		PTI	EXT
238	SULTANA MOSCATA	25-VIII-A-10	M	EXT	263	ALBARRAZ	22C28	MV	ESP	288	HANS		V	EXT
239	BASILE LOGOTHETIS	25-VIII-A-12	M	EXT	264	MALAGUENA MOSCATEL	22C34	MV	ESP	289	KOBER 5 BB		PTI	EXT
240	RODI	25-VIII-A-13	M	EXT	265	COJONATA	22C43	MV	ESP	290	MALEGUE 44-53		PTI	EXT
241	CANNER SEEDLESS	25-VIII-A-14	M	EXT	266	MALVASÍA BLANCA	22F02	MV	ESP	291	MILLARDET ET GRASSET 101-14		PTI	EXT
242	BRUNI 045	25-VIII-A-15	M	EXT	267	ALBILLO	22I16	MV	ESP	292	RICHTER 99		PTI	EXT
243	ITALIA X SULTANINA V-6	25-VIII-A-16	M	EXT	268	BOCALILLA	22J24	MV	ESP	293	SCHWARZMANN		PTI	EXT
244	ITALIA X SULTANINA VI-4	25-VIII-A-17	M	EXT	269	MOSCATEL	22L53	MV	ESP	294	TELEKI 5C		PTI	EXT
245	BRUNI 116	25-VIII-A-19	M	EXT	270	SEIBEL 11803	22P22	MV	EXT	295	VIALLA		PTI	EXT
246	SELECCION BRUNI 1	25-VIII-A-20	M	EXT	271	FOGONEU FRANCÉS	22E16	MV	ESP	296	VITAL		V	EXT
247	BEAUTY SEEDLESS	25-VIII-B-01	M	EXT	272	CALOP NEGRO	22E18	MV	ESP	297	GRACIANO	22A05	V	ESP
248	BLACK CURRANT	25-VIII-B-03	M	EXT	273	MALVASÍA BLANCA	22E54	MV	ESP	298	MAZUELO	22A07	V	ESP
249	BLACK MONUCCA	25-VIII-B-07	M	EXT	274	CHASSELAS DORÉ	25-I-B-03	MV	EXT	299	MOSCATEL GRANO MENUDO	22A18	V	ESP
250	EMERALD SEEDLESS	25-VIII-B-11	M	EXT	275	MALVASIA DE SITGES	25-II-A-04	MV	ESP	300	MORISCA	22A19	V	ESP

Resultados y Discusión

Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN
301	TURRUNTÉS	22A20	V	ESP	326	MOLLAR	22C17	V	ESP	351	SEÑÁ TINTO	22F48	V	ESP
302	MATURANA	22A21	V	ESP	327	GARRIDO MACHO	22C18	V	ESP	352	DE JOSÉ BLANCO	22F50	V	ESP
303	VIURA	22A25	V	ESP	328	PALOMINO	22C23	V	ESP	353	MOSCATEL BLANCO	22F53	V	ESP
304	CALAGRAÑO	22A26	V	ESP	329	JAÉN EMPINADILLO	22C30	V	ESP	354	VERDEJILLA TINTO	22F55	V	ESP
305	MATURANA TINTA	22A27	V	ESP	330	GARNACHA BASTA	22D07	V	ESP	355	PANSA ROSA	22G19	V	ESP
306	RIBOTE	22A31	V	ESP	331	MORISTELL	22D08	V	ESP	356	PARELLADA II	22G34	V	ESP
307	VERUÉS DE HUARTE	22A32	V	ESP	332	PANSERA	22D13	V	ESP	357	SUMOLL NEGRA	22G50	V	ESP
308	BENITILLO	22A33	V	ESP	333	ALCAÑON BLANCO	22D15	V	ESP	358	PANSA D'ALACANT	22G51	V	ESP
309	MORATE	22A34	V	ESP	334	SALCEÑO BLANCO	22D22	V	ESP	359	ROYAL	22G54	V	ESP
310	VERDEJO NEGRO	22A36	V	ESP	335	PARREL	22D23	V	ESP	360	CUATENDRÁ	22G55	V	ESP
311	REDONDAL	22A38	V	ESP	336	MIGUEL DE ARCO	22D29	V	ESP	361	TROBAT	22H02	V	ESP
312	TEMPRANILLO	22A40	V	ESP	337	BENEDICTO	22D42	V	ESP	362	MORAVIA	22H39	V	ESP
313	JAÉN NEGRO	22A45	V	ESP	338	MORENILLO	22D43	V	ESP	363	GARNACHA TINTORERA	22H42	V	ESP
314	LISTÁN	22B15	V	ESP	339	GARNACHA FRANCESA	22D48	V	ESP	364	ALBILLO	22H49	V	ESP
315	GARRIDO FINO DE VILLANUEVA	22B16	V	ESP	340	TINTORERA DE LONGARES	22D49	V	ESP	365	ROJAL BLANCO	22H51	V	ESP
316	GABRIELA	22B18	V	ESP	341	NEGRA BLASCO	22D56	V	ESP	366	FORCALLAT TINTO	22I04	V	ESP
317	PALOMINO FINO	22B21	V	ESP	342	GARRUT	22D61	V	ESP	367	TARDANA	22I06	V	ESP
318	PEDRO XIMENEZ	22B31	V	ESP	343	NEGRA COMÚN	22F07	V	ESP	368	COLORAILLO	22I07	V	ESP
319	VIJIRIEGA COMÚN	22B35	V	ESP	344	MOSCATEL NEGRA MENUDA	22F19	V	ESP	369	MORAVIA AGRIA	22I10	V	ESP
320	LAIRÉN	22B37	V	ESP	345	ONDARRABI BELTZA	22F23	V	ESP	370	LEGIRUELA	22I19	V	ESP
321	PLATEADO	22B45	V	ESP	346	ONDARRABI ZURI	22F24	V	ESP	371	VERDONCHO	22I30	V	ESP
322	PERRUNO	22B51	V	ESP	347	CARRASQUÍN	22F27	V	ESP	372	CHELVA	22I31	V	ESP
323	MANTUO	22C09	V	ESP	348	ALBARÍN NEGRO	22F29	V	ESP	373	ROJAL	22I34	V	ESP
324	ROCIA	22C14	V	ESP	349	PARDUCA	22F45	V	ESP	374	MALVAR	22I37	V	ESP
325	PEDRO LUIS	22C15	V	ESP	350	GASCÓN	22F47	V	ESP	375	AIRÉN	22I42	V	ESP

Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN
376	GARNACHA	22J17	V	ESP	401	ALBILLO REAL	22M35	V	ESP	426	VERDOSILLA	22O63	V	ESP
377	RAYADA MELONERA	22J25	V	ESP	402	MARFAL	22M38	V	ESP	427	SEIBEL 15062	22P11	V	EXT
378	GARNACHA	22J34	V	ESP	403	ROIBAL	22M39	V	ESP	428	SEYVE VILLARD 12-309	22P12	V	EXT
379	BRUJIDERA	22J45	V	ESP	404	AGUDELO	22M46	V	ESP	429	SEYVE VILLARD 12-327	22P13	V	EXT
380	TINTO NAVALCARNERO	22J50	V	ESP	405	MOSCATEL	22M47	V	ESP	430	SEYVE VILLARD 12-347	22P14	V	EXT
381	PRIETO PICUDO	22K12	V	ESP	406	TREIXADURA	22N02	V	ESP	431	SEYVE VILLARD 12-426	22P15	V	EXT
382	PRIETO PICUDO BLANCO	22K13	V	ESP	407	ALVARELLO	22N03	V	ESP	432	SEYVE VILLARD 18-402	22P18	V	EXT
383	BLANQUILIÑA	22K15	V	ESP	408	SOUSÓN	22N06	V	ESP	433	SEYVE VILLARD 12-401	22P20	V	EXT
384	ALLARÉN	22K19	V	ESP	409	FERRÓN	22N08	V	ESP	434	BURDIN 7705	22P21	V	EXT
385	PRIETO PICUDO BLANCO	22K20	V	ESP	410	DONA BLANCA	22N09	V	ESP	435	LANDOT 244	22P23	V	EXT
386	VERDEJO BLANCO	22K25	V	ESP	411	TORRONTÉS	22N14	V	ESP	436	MIGUEL DE ARCO	22E02	V	ESP
387	BLANCO RECIO	22K36	V	ESP	412	LOUREIRO BLANCO	22N15	V	ESP	437	CABELIS	22E20	V	ESP
388	TINTO ARAGONÉS	22K37	V	ESP	413	GODELLO	22N23	V	ESP	438	FERNANDELLA	22E22	V	ESP
389	VERDEJO BLANCO	22K41	V	ESP	414	TORRONTÉS	22N31	V	ESP	439	BATISTA	22E23	V	ESP
390	RUFETA	22K46	V	ESP	415	CAIÑO	22N33	V	ESP	440	GORGOLLASA	22E25	V	ESP
391	MENCIA	22K52	V	ESP	416	ALBARIÑO	22N34	V	ESP	441	CALLET	22E26	V	ESP
392	CASTELLANA BLANCA	22K56	V	ESP	417	CAGARRIZO	22N39	V	ESP	442	EXCURSACH	22E27	V	ESP
393	TINTO MADRID	22L18	V	ESP	418	CATALÁN BLANCO	22N40	V	ESP	443	SINSÓ	22E28	V	ESP
394	CLAIRETO	22L28	V	ESP	419	NEGRÓN DE ALDÁN	22N45	V	ESP	444	MANSÉS DE TIBBUS	22E30	V	ESP
395	GARNACHO	22L30	V	ESP	420	MONDRAGÓN	22O22	V	ESP	445	QUIGAT	22E33	V	ESP
396	SALVADOR	22L43	V	ESP	421	BOBAL	22O36	V	ESP	446	SABATÉ	22E35	V	ESP
397	VERDEJO NEGRO	22L52	V	ESP	422	FORCALLAT	22O48	V	ESP	447	GIRÓ	22E36	V	ESP
398	FERNAN PIRIZ	22M12	V	ESP	423	MORENILLO	22O52	V	ESP	448	EPERÓ DE GALL	22E37	V	ESP
399	BORBA	22M19	V	ESP	424	PAMPOLAT DE SAGUNTO	22O53	V	ESP	449	VINATÉ	22E45	V	ESP
400	ALARJE	22M34	V	ESP	425	VERDIL	22O55	V	ESP	450	PEDRO XIMENEZ	22E49	V	ESP

Resultados y Discusión

Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN	Nº FIGURA R5	NOMBRE VARIEDAD	CÓDIGO PARCELA	USO	ORIGEN
451	AGIORGITIKO		V	EXT	476	PLAVAC MALI		V	EXT
452	BONARDA		V	EXT	477	ISABELLA		V	EXT
453	PINOTAGE		V	EXT	478	DIMYAT		V	EXT
454	TANNAT		V	EXT	479	TINTA BARROCA		V	EXT
455	KERNER		V	EXT	480	SILVANER		V	EXT
456	CABERNET SAUVIGNON		V	EXT	481	FURMINT		V	EXT
457	FETEASCA REGALA		V	EXT	482	SEMILLON		V	EXT
458	RIESLING		V	EXT	483	MÜLLER-THURGAU		V	EXT
459	BABIC		V	EXT	484	RABO DE OVELLA		V	EXT
460	SAPERAVI		V	EXT	485	MERLOT		V	EXT
461	VELTLINER GRUEN		V	EXT	486	SANGIOVESE		V	EXT
462	TOCAI FRIULANO		V	EXT	487	MONTEPULCIANO		V	EXT
463	UGNI BLANC		V	EXT	488	GEWÜRZTRAMINER		V	EXT
464	SAUVIGNON BLANC		V	EXT	489	CHARDONNAY		V	EXT
465	MELON		V	EXT	490	MANCIN		V	EXT
466	BAGA		V	EXT	491	MAUZAC		V	EXT
467	SEYVAL		V	EXT	492	MAVRODAPHNI		V	EXT
468	FETEASCA NEAGRA		V	EXT	493	ROMORANTIN		V	EXT
469	KRATOSIJA		V	EXT	494	RONDINELLA		V	EXT
470	ARVINE PETITE		V	EXT	495	VELTLINER ROT		V	EXT
471	MALBEC		V	EXT					
472	PETIT VERDOT		V	EXT					
473	PINOT BLANC		V	EXT					
474	SYRAH		V	EXT					
475	BARBERA		V	EXT					

Una vez obtenida la estructura de la colección, se estudió la información disponible acerca del uso y el origen de cada una de las variedades que formaban la “Colección de genotipos únicos” (**Tabla R10**), para así estudiar si estas características guardaban alguna relación con los agrupamientos detectados con el software Structure. Los resultados obtenidos se resumen en las **Tablas R11 y R12**.

Tabla R11. *Uso de las variedades que componen las 4 poblaciones detectadas con el software Structure. (Grupo EHP, corresponde a Especies del Género Vitis no vinifera, Híbridos productores directos y Portainjertos)*

	POBLACIÓN 1	POBLACIÓN 2	POBLACIÓN 3	POBLACIÓN 4	TOTAL
MESA	2,94%	39,01%	30,15%	98,69%	261
VINO	11,76%	60,44%	67,46%	1,31%	201
GRUPO EHP	85,30%	0,55%	2,39%	0	33
TOTAL VARIEDADES	34	182	126	153	495

Tabla R12. *Porcentaje de variedades de origen extranjero y español que se recogen en las 4 poblaciones detectadas con el software Structure.*

	POBLACIÓN 1	POBLACIÓN 2	POBLACIÓN 3	POBLACIÓN 4	TOTAL
VARIEDADES ESPAÑOLAS	26,47%	76,37%	31,75%	7,84%	201
VARIEDADES EXTRANJERAS	73,53%	23,63%	68,25%	92,16%	294
TOTAL VARIEDADES	34	182	126	153	495

Estudiando en detalle los resultados mostrados en las **Tablas R11 y R12** se puede destacar que en la población 1 (representada en rojo en las **Figuras R5 y R6**), la más pequeña de las 4, más del 85% de las variedades que la forman pertenecen al grupo EHP. En esta población predominan las variedades de origen extranjero alcanzando casi el 74% del total de individuos que la componen. La población 2 (representada en verde en las **Figuras R5 y R6**), es la que incluye mayor número de individuos, el 60% de las variedades que la componen son de vino y casi el 40% de mesa. Del total de variedades que forman esta población, el 77% de ellas presentan origen español. La siguiente población detectada, fue la denominada población 3 (representada en azul en las **Figuras R5 y R6**), en la que el 67% de las variedades que la forman son de vino y el 30% de mesa. En esta población, al contrario que en la población 2, el 68% de sus variedades presentan origen extranjero. Finalmente, la población 4 (representada en amarillo en las **Figuras R5 y R6**) está compuesta por 153 variedades, de las cuales casi el 99% son de mesa. En cuanto a su origen, más del 92% son extranjeras.

Resultados y Discusión

Una vez analizados estos resultados, realmente se puede observar cierta relación en los cuatro agrupamientos con respecto al uso, de forma mayoritaria, y al origen de estas variedades, sobre todo para diferenciar las que componen las poblaciones 2 y 3, respectivamente.

Resumiendo, prácticamente la totalidad de las variedades de la población 1 pertenecen al grupo EHP. Este agrupamiento es lógico, debido a que las variedades pertenecientes a este grupo son muy heterogéneas, y en general, presentan origen extranjero. En cuanto a las poblaciones 2 y 3 no existe mucha diferencia en cuanto a los porcentajes presentados en variedades de vino, mesa y grupo EHP, respectivamente, presentando ambas un mayor porcentaje en variedades de vino. Lo que resultó muy interesante fue determinar que del total de variedades que formaban estas 2 poblaciones, el 77 % de las correspondientes a la población 2 presentaban origen español, mientras que casi el 70% de las pertenecientes a la población 3 eran de origen extranjero. Una explicación a esto, podría ser la de que las variedades que componen estas dos poblaciones proceden de diferentes centros de domesticación. Finalmente, en cuanto a la población 4 no cabe duda que sus integrantes casi exclusivos, con un porcentaje casi del 99%, corresponden a variedades de uva de mesa extranjeras. Esto es esperable, debido a que la mayoría de las variedades de uva de mesa presentes en la actualidad son de origen extranjero.

Con el fin de determinar el grado de divergencia entre las 4 poblaciones detectadas anteriormente con el software Structure, se realizó un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) (**Tabla R13**), y un test de diferenciación con el software Arlequín 3.11.

Tabla R13. Diseño y resultados del Análisis Molecular de la Varianza llevado a cabo con los datos de los 9 loci microsatélite de las 4 poblaciones detectadas en la "Colección de genotipos únicos" con el software Structure.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE LA VARIANZA	PORCENTAJE DE VARIACIÓN
Entre poblaciones	3	178,730	0,24345	6,76
Dentro de poblaciones	986	3.312,392	3,35942	93,24
Total	989	3.491,122	3,60287	100
Índice de Fijación	Fst : 0,06757			

Se aprecia que el 93,24% de la variación proviene de la variabilidad intrínseca de las variedades dentro de las poblaciones, mientras que, solamente el 6,76% de la variación se debió a la variabilidad en las frecuencias alélicas encontrada entre las poblaciones. Con esto, se puede decir que la variabilidad encontrada entre las poblaciones establecidas con el software Structure no es muy elevada. Además, el valor medio del índice de fijación (Fst) es de 0,07, lo que indica una débil estructuración genética entre las 4 poblaciones.

En el mismo sentido, el resultado obtenido con el test exacto de diferenciación realizado entre poblaciones con el software Arlequín, no fue significativo, por lo que se acepta la hipótesis de no diferenciación entre las poblaciones analizadas. Esto es debido a que el software Arlequín no tiene en cuenta la presencia de variedades con elevado grado de mezcla genética.

A pesar de que el software Arlequín llega a la conclusión de que, si existe estructura entre las 4 poblaciones detectadas con el software Structure, su significación es muy pequeña, para los análisis posteriores se tendrá en cuenta este agrupamiento, ya que en principio presenta una estructura lógica.

4.3.3. Análisis matemático de la coincidencia genotípica

Se llevó a cabo un análisis matemático en el que se calculó la probabilidad de que, por azar, una planta de vid presente el mismo genotipo para los 9 loci STMS que alguna de las variedades pertenecientes a las poblaciones tomadas como referencia en este estudio. Se calculó el cociente de probabilidades, de

manera análoga al “likelihood ratio” (LR) o razón de verosimilitudes utilizado para casos forenses humanos (Carracedo y Barros, 1996).

Para realizar el análisis matemático de la coincidencia, se eligieron de la **Figura R5**, página 122, dos variedades de cada una de las 4 poblaciones detectadas con el software Structure. Estas variedades se encuentran señaladas con una flecha en la citada figura. Una de las dos variedades seleccionadas de cada población presentaba un grado de mezcla genética muy alto, y la otra muy bajo. En total se seleccionaron 8 variedades:

- Variedades de la población 1 (roja):
12 (con 1,3% de mezcla) y 19 (con 32,5% de mezcla).
- Variedades de la población 2 (verde):
401 (con 1,7% de mezcla) y 94 (con 23,5% de mezcla).
- Variedades de la población 3 (azul):
471 (con 2,5% de mezcla) y 460 (con 41,8% de mezcla).
- Variedades de la población 4 (amarilla):
54 (con 1,4% de mezcla) y 110 (con 40,3% de mezcla).

Para cada una de estas variedades, consideradas aquí como muestras problema, se calculó la probabilidad de obtener al azar sus genotipos para los distintos loci microsatélite a partir de sus frecuencias alélicas observadas en la colección global y en las distintas poblaciones detectadas $[P(R/NV)]$, asumiendo que las mismas están en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Los test empleados para comprobar la existencia de EHW informan acerca de si la combinación de los distintos alelos para constituir los genotipos de los individuos es casual, pero no acerca de la realidad de la población. Es un hecho que la población de variedades utilizada aquí no es panmíctica, en el sentido de que muchas proceden de cruces diseñados o seleccionados por el hombre. Pero también es fácilmente aceptable que esos cruces no se han llevado a cabo teniendo en cuenta los genotipos de los progenitores para los distintos loci microsatélite, y en ese sentido, para estos loci, si existiría una “panmixia”. Por ello se puede aceptar en general que, a efectos de esos loci, “neutros” para la selección artificial, la población esté en EHW.

En cualquier caso, utilizando el software Arlequín 3.11 (Excoffier et al., 2005), se evaluó el EHW en la “Colección de genotipos únicos” y en las 4 poblaciones detectadas en ella con el software Structure.

Al evaluar el EHW en la “Colección de genotipos únicos”, se puede decir que la colección en su conjunto no cumple con el EHW en los 9 loci analizados. Este hecho no es de extrañar debido a la gran diversidad del material que compone esta colección, ya que incluye variedades de uva de mesa, de vinificación, portainjertos, híbridos productores directos, especies del género *Vitis* no *vinifera* y géneros de la familia Vitáceas. Ese origen diverso hace muy difícil que la composición genotípica se obtenga a partir de la composición alélica de acuerdo al EHW.

Al evaluar el EHW en las cuatro poblaciones detectadas con el software Structure, se obtuvo que la población 1 para 5 loci (ZAG67, VVMD27, VVMD5, ZAG62 y ZAG83), y la población 3 para 4 loci (ZAG67, VVMD5, ZAG29 y ZAG62), no estaban en EHW, ya que estaban por debajo del nivel de significación ($\alpha = 0,05$). Sin embargo, las poblaciones 2 y 4, estaban en EHW para todos los loci.

No es de extrañar que en las poblaciones 1 y 3, donde la mayoría de sus variedades presentan origen extranjero, algunos loci no estén en EHW, ya que sobre todo en la población 1, el bajo número de individuos que la componen presentan un origen muy diverso.

El hecho de que en la población 4, compuesta en un 99% por variedades de mesa extranjeras, todos sus loci se encuentren en EHW, podría deberse a que en muchos centros de mejora se han utilizado las mismas variedades de mesa para obtener nuevas variedades. Esta población, al estar en EHW para todos sus loci, indica que podría utilizarse como referencia en el análisis matemático para la identificación de variedades de uva de mesa, ya que en la actualidad la mayoría de las variedades que se protegen legalmente presentan este uso.

Como se aprecia en los resultados, asumir que los microsatélites están en EHW puede ser erróneo. Es cierto que para algunos análisis, como los que se presentan a continuación, es necesario asumir que los microsatélites están en EHW en cada una de las poblaciones consideradas, pero hay que ser consciente de las limitaciones existentes y de que los valores obtenidos en esos cálculos pueden no ser muy reales.

Resultados y Discusión

A partir de la probabilidad de coincidencia casual $[P(R/NV)]$ de cada una de las muestras problema en las diferentes poblaciones, se calculó la razón de verosimilitud (LR) o poder de discriminar estas variedades seleccionadas, en las distintas poblaciones consideradas. Las **Tablas R14** y **R15** muestran para cada variedad seleccionada, la LR conjunta para los 9 loci STMS en estudio, en las 5 posibles poblaciones tenidas en cuenta (las cuatro detectadas al analizar la “Colección de genotipos únicos” con el software Structure y la citada colección sin considerar ningún tipo de estructura). En la **Tabla R14** se recogen los resultados obtenidos para las variedades con menor grado de mezcla genética procedente de distintas poblaciones, mientras que la **Tabla R15** muestra los resultados obtenidos para las variedades con mayor grado de mezcla genética proveniente de distintas poblaciones.

Tabla R14. Razones de verosimilitudes (LR) obtenidas para las variedades con menor grado de mezcla para los 9 loci STMS, en las 5 poblaciones tenidas en cuenta.

	POBLACIÓN 1	POBLACIÓN 2	POBLACIÓN 3	POBLACIÓN 4	POBLACIÓN 495
ACCESIONES MENOR MEZCLA	LR	LR	LR	LR	LR
12	$4,28 \cdot 10^{+18}$	0	0	0	$1,69 \cdot 10^{+32}$
401	0	$3,33 \cdot 10^{+11}$	$7,21 \cdot 10^{+17}$	0	$8,41 \cdot 10^{+13}$
471	0	0	$2,29 \cdot 10^{+13}$	0	$2,14 \cdot 10^{+15}$
54	0	0	0	$5,86 \cdot 10^{+12}$	$3,09 \cdot 10^{+16}$

Tabla R15. Razones de verosimilitudes (LR) obtenidas para las variedades con mayor grado de mezcla para los 9 loci STMS, en las 5 poblaciones tenidas en cuenta.

	POBLACIÓN 1	POBLACIÓN 2	POBLACIÓN 3	POBLACIÓN 4	POBLACIÓN 495
ACCESIONES MAYOR MEZCLA	LR	LR	LR	LR	LR
19	$8,29 \cdot 10^{+20}$	0	0	0	$1,74 \cdot 10^{+24}$
94	0	$7,34 \cdot 10^{+15}$	$3,52 \cdot 10^{+17}$	$1,19 \cdot 10^{+19}$	$2,19 \cdot 10^{+16}$
460	0	0	$5,42 \cdot 10^{+17}$	0	$1,61 \cdot 10^{+18}$
110	0	0	0	$1,75 \cdot 10^{+15}$	$5,17 \cdot 10^{+15}$

Los valores “0” que aparecen en las **Tablas R14** y **R15**, se deben a que los individuos seleccionados presentan alelos exclusivos no representados en todas las poblaciones tomadas como referencia.

Con los resultados obtenidos en la **Tablas R14 y R15**, se puede destacar lo siguiente:

1. Los valores (LR) para el poder de identificar cada una de las 8 variedades seleccionadas, tanto en la población a la que pertenece como en la global, son muy elevados, presentando el más pequeño un valor de $3,33 \cdot 10^{+11}$.
2. La influencia de estructura se manifiesta en que dependiendo de la colección que tomemos como referencia, cada una de ellas presentará unas determinadas frecuencias alélicas para los alelos de los 9 loci en estudio. Teniendo en cuenta esto, si se desconoce a priori a qué población de las 4 puede pertenecer el individuo que queremos identificar, y se compara con una población no adecuada, el valor que se obtendría para la LR sería mayor que si se compara con la población a la que pertenece, por lo que este valor sería erróneo. Por ejemplo, en la **Tabla R15**, cuando el individuo 94 de la población 2 se compara con esta población, el valor obtenido de LR es menor que si se compara este individuo con las demás poblaciones tomadas como referencia. Esto se debe a que las frecuencias alélicas del individuo 94 son más comunes en la población 2 que en las demás. Lo ideal sería conocer a priori a qué población pertenece la variedad que se quiere identificar, de este modo se estaría comparando con otras variedades con las que compartiría un mayor parentesco genético, y los resultados serían mucho más precisos. Esto en ocasiones puede resultar difícil de conocer, por lo que un análisis conservador sería calcular las LR de la variedad que se quiere identificar en las distintas poblaciones, y seleccionar el valor más bajo.

Los resultados obtenidos en el análisis matemático llevado a cabo en este estudio utilizando los 9 loci microsatélites, proporcionan una buena base para la identificación legal, incluida la valoración de las infracciones sobre los derechos de los obtentores.

En el trabajo de Ibáñez y Eeuwijk (2003), se partió de una colección de referencia formada por 45 accesiones apirenas distintas, analizadas con 9 loci microsatélite. Incluso eliminando 4 microsatélites del análisis, las probabilidades de

coincidencia fueron tan bajas que se concluyó que el procedimiento forense utilizando microsatélites era óptimo para la identificación legal, incluida la valoración de las infracciones sobre los derechos de los obtentores.

Con los resultados obtenidos tanto con el software Arlequín como con el software Structure, se abre la posibilidad de utilizar como colección de referencia para la identificación de variedades de uva de mesa, la población 4, formada por 153 individuos, de los cuales casi el 99% pertenecen a variedades de uva de mesa extranjeras. Sin embargo, dado que también hay variedades de uva de mesa en las otras poblaciones detectadas en el análisis, lo mejor sería bien utilizar como colección de referencia la “Colección de genotipos únicos”, o bien utilizarlas todas y elegir aquella donde la LR de la variedad que se quiere identificar presente un valor más bajo. La población 1, debido a que las variedades que la componen son muy heterogéneas, no se utilizaría como colección de referencia.

4.3.4. Utilidad del sistema de 9 loci microsatélite y de la colección de referencia, para el estudio de Identificación

Los 9 loci microsatélite empleados en este estudio han demostrado ser una herramienta muy útil para la identificación molecular de variedades de vid:

1. Únicamente fueron necesarios 5 de los 9 STMS para identificar las 495 variedades que formaban la “Colección de genotipos únicos”. Al emplear cuatro microsatélites más en los análisis, se estaría incrementando el grado de certeza de la identificación.
2. Tanto la “Colección de genotipos únicos”, por la gran cantidad y diversidad de individuos que la componen, como las poblaciones de variedades 2, 3 y 4 detectadas al analizar la colección global con el software Structure, resultarían unas colecciones de referencia adecuadas.
3. Los elevados valores obtenidos de LR para poder discriminar las variedades seleccionadas en las distintas colecciones tomadas como referencia, indican que estos resultados se podrían considerar concluyentes en la identificación legal de variedades de vid, incluida la valoración de las infracciones sobre los derechos de los obtentores.

4.4. ESTUDIO DE HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD

Para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad fueron analizadas aproximadamente 3.700 plantas pertenecientes a 19 variedades distintas de vid (**Tablas M5 - M23** en Materiales y Métodos, páginas 52 - 70). Para evaluar la homogeneidad se estudiaron 50 plantas de cada variedad de 3 plantaciones distintas. Y, para evaluar la estabilidad se estudiaron 5 plantas de cada variedad de 7 plantaciones adicionales.

Se analizaron plantas de la misma variedad con distintos orígenes para estudiar principalmente la estabilidad (mantenimiento de las características esenciales de la variedad a lo largo de distintos ciclos de multiplicación vegetativa). Por ello se comparó material antiguo con cepas más jóvenes de la misma variedad. Además, se dispuso de material de plantaciones con distintas localizaciones, para así poder evaluar si un distinto emplazamiento (clima, suelo etc), influye en la estabilidad de los microsatélites en estudio. Por otro lado, la lejanía geográfica en la plantación probablemente refleja una lejanía temporal en cuanto al número de generaciones de reproducción vegetativa, que en definitiva es lo que se trata de comparar en este estudio. También se dispuso de material con distintas características agronómicas (blancas/tintas; mesa/vinificación, etc.).

En el estudio de Homogeneidad (se considerará homogénea la variedad si es suficientemente uniforme en sus caracteres específicos), hubo que estudiar un número elevado de plantas de cada variedad en cuestión para constatar si los genotipos de los microsatélites se mantenían inalterables en todas ellas. Como en el caso de la estabilidad, se estudiaron distintas variedades comerciales con distintas localizaciones geográficas.

Las 19 variedades de vid empleadas se encuentran incluidas en el Registro de Variedades Comerciales. De ellas, 14 han demostrado ser homogéneas y estables, ya que se recogen en la inscripción definitiva. Las 5 restantes (Crimson SDL, Napoleón, Ohanes, Red globe y Sugraone), se encuentran todavía en proceso de caracterización. Si los microsatélites utilizados son también homogéneos y estables en dichas variedades, se espera encontrar el mismo genotipo para cada microsatélite en cada una de las plantas que pertenezcan a la misma variedad, independientemente de su origen, lugar de plantación, etc. En caso contrario, habría que determinar dónde se ha producido la mutación, y la frecuencia con que tiene lugar el suceso.

4.4.1. Evaluación de la selección varietal

Hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos con una variedad pueden no ser aplicables a otras, por lo que se hizo necesario extender el estudio en un cierto número de variedades (19 en este caso), de manera que resultara representativo de la variabilidad genética existente.

Para determinar si la selección de las 19 variedades elegidas para este trabajo era representativa o no, se evaluó si en la “Colección de genotipos únicos” derivada del estudio de Distinción, los alelos más frecuentes para cada locus microsatélite estaban representados en estas 19 variedades. La **Tabla R16** recoge el recuento en valores absolutos de cada uno de los alelos correspondientes a los 9 loci microsatélite que aparecieron en las 495 variedades de la “Colección de genotipos únicos”, y las frecuencias alélicas por locus para todas las variedades presentes en la misma. En esta tabla aparecen resaltados en amarillo los alelos representados en las 19 variedades de vid que ocupan el estudio de Homogeneidad y Estabilidad. Como se puede observar, los alelos más frecuentes para cada locus microsatélite en las 495 variedades (todos los alelos con frecuencia mayor o igual al 4%), estaban presentes en las 19 variedades elegidas.

Tabla R16. Alelos detectados en la “Colección de genotipos únicos” (A), junto con sus frecuencias absolutas (B) y relativas (C). Se destacan en color amarillo los alelos representados en las 19 variedades del estudio de Homogeneidad y Estabilidad.

Alelos	ZAG67			VVMD27			VVMD5			ZAG29			ZAG62			ZAG112			VVS2			ZAG83			VVMD28			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
1	120	1	0,10	166	1	0,10	219	16	1,62	107	1	0,10	173	1	0,10	227	285	28,79	120	2	0,20	159	3	0,30	214	4	0,40	
2	123	249	25,15	173	9	0,91	221	1	0,10	109	775	78,28	175	2	0,20	229	28	2,83	122	6	0,61	161	5	0,51	216	39	3,94	
3	129	139	14,04	176	173	17,48	222	156	15,76	111	91	9,19	181	11	1,11	232	248	25,05	124	1	0,10	166	3	0,30	218	5	0,51	
4	131	3	0,30	178	155	15,66	224	110	11,11	113	74	7,48	183	1	0,10	234	18	1,82	126	2	0,20	172	1	0,10	224	7	0,71	
5	135	3	0,30	180	68	6,87	226	3	0,30	115	8	0,81	185	115	11,62	236	75	7,58	128	3	0,30	174	5	0,51	226	34	3,43	
6	137	243	24,55	182	187	18,89	227	126	12,73	117	7	0,71	187	325	32,83	238	126	12,73	130	257	25,96	176	1	0,10	228	4	0,40	
7	139	10	1,01	184	7	0,71	231	111	11,21	119	11	1,11	189	9	0,91	240	112	11,31	132	115	11,62	184	2	0,20	230	1	0,10	
8	141	11	1,11	186	130	13,13	233	171	17,27	121	1	0,10	191	50	5,05	243	1	0,10	134	86	8,69	185	9	0,91	232	138	13,94	
9	143	4	0,40	188	12	1,21	235	140	14,14	123	3	0,30	193	116	11,72	245	59	5,96	136	17	1,72	188	22	2,22	234	107	10,81	
10	145	8	0,81	191	209	21,11	237	98	9,90	125	2	0,20	195	71	7,17	247	9	0,91	138	11	1,11	190	249	25,15	237	9	0,91	
11	147	85	8,59	192	1	0,10	241	3	0,30	129	8	0,81	197	4	0,40	249	5	0,51	140	139	14,04	192	188	18,99	240	7	0,71	
12	149	51	5,15	194	1	0,10	243	18	1,82	131	1	0,10	199	48	4,85	251	1	0,10	142	118	11,92	195	318	32,12	242	217	21,92	
13	151	33	3,33	196	2	0,20	246	5	0,51	133	5	0,51	201	29	2,93	253	5	0,51	145	14	1,41	201	179	18,08	244	38	3,84	
14	153	94	9,50	198	3	0,30	248	6	0,61	135	1	0,10	203	192	19,39	255	1	0,10	147	55	5,56	207	1	0,10	246	93	9,39	
15	155	17	1,72	200	5	0,51	252	1	0,10	139	2	0,20	205	4	0,40	259	16	1,62	149	113	11,41	217	4	0,40	248	4	0,40	
16	158	18	1,82	202	5	0,51	258	1	0,10				209	2	0,20	277	1	0,10	151	7	0,71				250	9	0,91	
17	160	3	0,30	204	7	0,71	260	9	0,91				213	6	0,61				153	25	2,53				252	11	1,11	
18	162	9	0,91	206	4	0,40	262	9	0,91				219	4	0,40				156	15	1,52				256	171	17,27	
19	166	1	0,10	208	6	0,61	264	6	0,61										158	2	0,20				258	30	3,03	
20	170	3	0,30	211	1	0,10													160	2	0,20				260	2	0,20	
21	176	5	0,51	213	3	0,30																			262	7	0,71	
22				215	1	0,10																			266	52	5,25	
23																										282	1	0,10

Resultados y Discusión

En la **Tabla R17** se pueden observar las sumas de las frecuencias alélicas por locus que corresponden a los alelos representados en las 19 variedades de vid con respecto al total de alelos que aparecieron en la “Colección de genotipos únicos”.

Tabla R17. Sumas de las frecuencias alélicas por locus que corresponden a los alelos representados en amarillo en la **Tabla R16**.

ZAG67	VVMD27	VVMD5	ZAG29	ZAG62	ZAG112	VVS2	ZAG83	VVMD28	PROMEDIO
86,98%	95,26%	92,12%	94,95%	92,63%	93,04%	90,92%	94,34%	85,95%	91,80%

En la **Tabla R18** se detalla para cada locus, el porcentaje de alelos presentes en las 19 variedades con respecto al total de alelos presentes en la “Colección de genotipos únicos”.

Tabla R18. Porcentaje de alelos presentes en las 19 variedades con respecto al total de alelos detectados en cada locus.

ZAG67	VVMD27	VVMD5	ZAG29	ZAG62	ZAG112	VVS2	ZAG83	VVMD28	PROMEDIO
28,57%	36,36%	36,84%	20,00%	38,88%	43,75%	40,00%	26,66%	34,78%	33,98%

Así por ejemplo, los 6 alelos encontrados en las 19 variedades para el locus ZAG67, suponen un 28,57% del total de alelos (21), y la suma de sus frecuencias en los 495 genotipos, es del 86,98%. Como se puede observar en la **Tabla R18**, el promedio del número de alelos encontrados en las 19 variedades de vid con respecto al total de alelos presentes en la “Colección de genotipos únicos”, es del 33,98%. Lo más importante, es que de los 169 alelos detectados en la “Colección de genotipos únicos”, 58 han aparecido representados en el estudio de Homogeneidad y Estabilidad con una frecuencia global casi del 92%. Es decir, que representan la mayoría de alelos existentes en la “Colección de genotipos únicos”.

Aunque en un principio las 19 variedades seleccionadas para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad se eligieron con otros criterios (Materiales y Métodos, página 44), este análisis demuestra que resultaron representativas en función de sus frecuencias alélicas, por lo que se puede concluir que la selección de las 19

variedades de vid elegidas para llevar a cabo el estudio de Homogeneidad y Estabilidad ha sido adecuada.

4.4.2. Muestreo para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad

El proceso de muestreo se realizó durante los tres años de duración del proyecto VIN01-025-C2-1. La obtención de todo el material recolectado resultó complicada. Gran parte del material se recogió personalmente por diferentes miembros del laboratorio de Biología Molecular de la Finca El Encín. Además, se solicitó ayuda de un gran número de Consejos Reguladores de Denominaciones de Origen, así como Centros de Investigación y empresas tanto españolas como extranjeras, que ayudaron, e incluso recolectaron y enviaron material para su estudio.

El número final de plantaciones en las cuales se recogió material vegetal fue 229, en 7 países diferentes, recolectándose un total de 4.137 plantas.

Los rangos que se manejaron en cuanto al año de plantación para cada una de las 19 variedades vienen representados en la **Tabla R19**. Son rangos aproximados porque en muchos casos, los propietarios o encargados de las fincas no conocían este dato con exactitud. Un caso especial lo constituyeron las muestras centenarias de las variedades Garnacha (14 plantas), Napoleón (2 plantas), Monastrell (1 planta) y Thompson SDL (1 planta), las cuales proceden del Real Jardín Botánico de Madrid y cuya fecha de plantación está en torno a 1.800.

Tabla R19. Rangos del año de plantación y los años que comprenden, para las 19 variedades del estudio de Homogeneidad y Estabilidad.

VARIEDAD	RANGO AÑO PLANTACIÓN	AÑOS
Airén	1.944-1.990	46
Cabernet sauvignon	1.954-2.001	47
Cardinal	1.949-2.005	56
Chardonnay	1.952-2.000	48
Crimson SDL	1.994-2.004	10
Flame SDL	1.976-1.998	22
Garnacha	1.800-1.999	199
Italia	1.990-2.000	10
Merlot	1.956-2.000	44
Monastrell	1.800-1.998	198
Moscatel de Málaga	1.949-2.001	52
Napoleón	1.800-1.997	197
Ohanes	1.942-1.995	53
Palomino fino	1.914-1.995	81
Red globe	1.994-2.003	9
Sauvignon blanc	1.954-2.002	48
Sugraone	1.987-2.000	13
Tempranillo	1.944-2.000	56
Thompson SDL	1.800-2.003	203

En cuanto al origen geográfico que presentaron las muestras recogidas, la **Tabla R20** presenta el total de fincas muestreadas y la cantidad de plantas recolectadas en cada una de ellas por cada uno de los 7 países donde se muestreó. La gran variabilidad de procedencia existente en cuanto al origen geográfico de las muestras, garantizaba de algún modo que se disponía de un material adecuado para evaluar la estabilidad de los marcadores microsatélites en estudio.

Tabla R20. Plantas totales muestreadas por país.

PAÍS	TOTAL FINCAS MUESTREADAS	PLANTAS MUESTREADAS
Alemania	4	28
Chile	9	107
España	170	3.580
Francia	8	40
Hungría	5	34
Sudáfrica	15	258
USA	18	90
TOTAL	229	4.137

Aunque la mayor cantidad de material muestreado procede de España, se trató de diversificar lo máximo posible las zonas de recogida de material dentro del país.

Toda la información derivada del estudio de Homogeneidad y Estabilidad se recogió en la base de datos relacional creada en Microsoft Access, citada anteriormente. Las **Figuras R7** y **R8** recogen dos imágenes obtenidas de la citada base de datos. Concretamente, la **Figura R7** muestra la pantalla a través de la cuál se puede acceder a diferentes puntos de interés de la base de datos. Y la **Figura R8** muestra una de las 19 pantallas a las que se puede acceder marcando el icono, “Ver Muestreo por Variedades” de la **Figura R7**, concretamente se recoge el resumen del muestreo de la variedad Garnacha. En ella se observan los siguientes datos: número de fincas de las que se recogió material (el nombre de las fincas se ha ocultado para mantener su confidencialidad), número de plantas recolectadas en cada finca, recolector, fecha de recolección, año y origen de plantación, pertenencia de las fincas a alguna Denominación de Origen y posibles observaciones.



Figura R7. Pantalla de acceso a los diferentes puntos de interés dentro de la base de datos de Access.

Resultados y Discusión

Variedad		← →		GAR		N° Variedad	
Garnacha						13	
N° FINCA	N° Plantas	Recolector	Fecha	Plantación Año	Origen	DOs	Observaciones
1	52	PF / JIM	09/06/2003	1995	Vivero de Valencia	La Mancha	Vaso. 8-9 años. ERROR: f
2	52	JB	10/07/2002		Autóctono (1825-1900)	Rioja	Año de plantación 2000/20
3	52	MLV / JB	25/06/2003	1999	Francia	Costers del segre	Espaldera
4	7	JB / JIM	24/06/2002	1998		Ribera del Guadiana	Espaldera. Goteo
5	7	JB / JIM	26/06/2002	1995	Francia	Sierra de Malaga	Espaldera. Goteo. Experir
6	7	JB / JIM	19/06/2002		Rioja	Ribera de Duero	Espaldera y vaso. Experir
7	7	MLV / JB	24/06/2003	1943		Cariñena	Vaso
8	7	MLV/C	08/07/2003	1963	Autóctona	Vinos de Madrid	Espaldera
9	7	JB	10/07/2002	1994	Viveros (clones comerciales)	Navarra	Año de plantación dudoso
10	7	PF / JIM	11/07/2002	1974	Llamar	Utiel-Requena	Vaso
11	14	Gregorio Muñoz	01/04/2001	1800	Preguntar		Fecha muestreo aproxima
12	4	JIM/MLV	13/07/2004	1942	Madrid		22J17 de El Encín. En vas

Número de muestras **13** Promedio año plantación **1959** Rango **1800 - 1999**

Busca Variedad

Figura R8. Resumen del muestreo de la variedad Garnacha.

4.4.2.1. Errores de muestreo

Tras el análisis genético del material vegetal muestreado, se detectó que algunas o todas las plantas recolectadas en alguna finca no se correspondían con la variedad esperada (**Tabla R21**), ya que diferían en varios microsatélites. Estos errores pueden deberse a los siguientes motivos:

- Errores en el muestreo
- Errores en las plantaciones
- Existencia de homonimias, como es el caso de denominar Garnacha a la Garnacha tintorera, o el de denominar Moscatel, o Moscatel blanco tanto a la variedad Moscatel de Málaga (o de Alejandría) como a la Moscatel de grano menudo (Ibáñez et al., 2006b).

En total no se correspondían con la variedad esperada 355 plantas de 4.137, pertenecientes a 20 plantaciones distintas. Representaron casi el 10% del material recolectado.

El 95% de las plantas erróneas correspondía a variedades de vinificación, y el 5% restante a variedades de uva de mesa. Dentro de las plantas erróneas detectadas, la mayoría pertenecían a muestras recolectadas en plantaciones españolas. En las **Tablas R22** y **R23**, página 149, se muestra el porcentaje de plantaciones y plantas erróneas de origen español respecto al total de errores, distinguiendo entre variedades de uva de mesa y de vino, así como entre variedades tintas y blancas. De la **Tabla R22** se puede destacar que el 90% de las plantaciones que presentaron errores eran españolas. De ellas, el 75% correspondían a variedades de vinificación. Asimismo, en la **Tabla R23** se observa que el 98,04% del total de plantas erróneas mostraban origen español. Dentro de ellas, casi el 94% pertenecían a variedades de vinificación. El hecho de que la mayoría de los errores se hayan detectado en variedades de vinificación, puede ser debido a que en general, algunas de las variedades de uva de mesa seleccionadas en este estudio llevan cultivándose durante mucho menos tiempo que las variedades de vinificación, y su cultivo está más controlado, por lo que prácticamente no se han encontrado errores en el material vegetal correspondiente a uva de mesa.

Resultados y Discusión

En cualquier caso más del 90% del material recolectado era correcto y constituía una colección de gran interés para el presente estudio y para otros futuros.

Tabla R21. Resumen del muestreo junto con los errores detectados para cada variedad (M: mesa, V: vino, B: blanca, T: tinta).

VARIEDAD	Nº PLANTACIONES MUESTREADAS	Nº PLANTAS MUESTREADAS	Nº PLANTACIONES ERRÓNEAS *		Nº PLANTAS ERRÓNEAS
			H	E	
Airén (V/B)	10	205	(2)		14
Cabernet sauvignon (V/T)	13	215			0
Cardinal (M/T)	13	213		1	5
Chardonnay (V/B)	12	213			0
Crimson SDL (M/T)	15	233			0
Flame SDL (M/T)	11	131			0
Garnacha (V/T)	13	275	1		50
Italia (M/B)	11	209			0
Merlot (V/T)	13	266	1		50
Monastrell (V/T)	10	192	(1)	(1)	46
Moscatel de Málaga (M-V/B)	15	312	2+(1)	1+(1)	108
Napoleón (M/T)	12	216			0
Ohanes (M/B)	11	210			0
Palomino fino (V/B)	13	263	(2)+1	1	64
Red globe (M/T)	10	206	(1)		6
Sauvignon blanc (V/B)	10	198			0
Sugraone (M/B)	13	219			0
Tempranillo (V/T)	10	205	(1)		2
Thompson SDL (M/B)	14	156		2	10
TOTAL	229	4.137	20 Fincas		355

*H: plantaciones para el estudio de Homogeneidad (muestreadas 52 plantas; analizadas 50)

E: plantaciones para el estudio de Estabilidad (muestreadas 7 plantas; analizadas 5)

(x) Error sólo en parte de las plantas muestreadas de x plantaciones

Tabla R22. Errores detectados en plantaciones españolas respecto al total de errores.

PLANTACIONES ESPAÑOLAS ERRÓNEAS	VINO	MESA	TOTAL
BLANCAS	50%	10%	60%
TINTAS	25%	5%	30%
TOTAL	75%	15%	90%

Tabla R23. Errores detectados en plantas recolectadas en fincas españolas respecto al total de errores.

PLANTAS ESPAÑOLAS ERRÓNEAS	VINO	MESA	TOTAL
BLANCAS	51,83%	2,82%	54,65%
TINTAS	41,70%	1,69%	43,39%
TOTAL	93,53%	4,51%	98,04%

4.4.3. Evaluación de los datos microsatélite obtenidos

Una vez obtenidos los datos microsatélite de las muestras en estudio, se incorporaron a la base de datos citada anteriormente. Así, en ella se recogieron todos los valores obtenidos para los 9 microsatélites en cada una de las variedades elegidas para este estudio. Un ejemplo se muestra en la **Figura R9** para la variedad Napoleón.

La **Tabla R24**, página 152, muestra un resumen de los datos microsatélite obtenidos. En ella se detalla para cada una de las 19 variedades en estudio, el número de fincas de las cuales se recolectó material, número de muestras extraídas, amplificadas e incorporadas a la base de datos, y el número de datos recogidos en cada uno de los 9 microsatélites.

En esta tabla se puede observar que para todas las variedades se recogió material de al menos 10 plantaciones. Sin embargo, las variedades Flame seedless y Thompson seedless presentan un número de muestras recolectadas inferior al que se había planeado obtener para llevar a cabo el estudio de Homogeneidad y Estabilidad (185). Éstas fueron difíciles de conseguir, ya que su cultivo en España está muy limitado, y no se pudieron obtener más del exterior. Asimismo, se pueden apreciar diferencias entre el número de muestras extraídas, amplificadas e incorporadas a la base de datos, debido a los errores presentados en algunas o todas las plantas muestreadas de varias fincas y que se han detallado previamente en la **Tabla R21**, página 148.

Resultados y Discusión

Variedad: Aptitud: Color: Apirena

Finca	Planta	ZAG 67	MD27	MD5	ZAG 29	ZAG 62	ZAG 112	VS2	ZAG 83	MD28									
11	4	129,65	136,84	180,85	191,65	231,43	235,49	109,42	0,00	188,20	203,45	227,70	236,35	130,35	132,47	201,36	0,00	242,90	246,99
11	2	129,55	136,84	180,90	191,68	231,43	235,49	109,42	0,00	188,24	203,55	227,70	236,35	130,35	132,47	201,36	0,00	242,90	247,00
4	2	129,68	136,80	180,82	191,55	231,43	235,48	109,38	0,00	188,33	203,31	227,61	236,36	130,39	132,45	201,39	0,00	242,85	246,82
10	1	129,57	136,83	180,92	191,59	231,34	235,44	109,39	0,00	188,22	203,38	227,57	236,31	130,28	132,42	201,26	0,00	242,93	246,85
9	3	129,51	136,81	180,86	191,57	231,32	235,32	109,42	0,00	188,19	203,48	227,56	236,29	130,32	132,37	201,37	0,00	242,91	246,94
11	5	129,53	136,74	180,86	191,65	231,40	235,56	109,36	0,00	188,20	203,44	227,67	236,42	130,33	132,35	201,35	0,00	243,06	246,94
11	3	129,52	136,73	180,90	191,58	231,43	235,49	109,39	0,00	188,24	203,55	227,59	236,35	130,32	132,35	201,36	0,00	242,90	247,00
1	46	129,32	136,69	180,78	191,55	231,43	235,51	109,40	0,00	188,28	203,49	227,68	236,45	130,36	132,35	201,43	0,00	243,06	247,16
7	5	129,53	136,87	180,83	191,57	231,24	235,22	109,33	0,00	188,11	203,44	227,50	236,21	130,26	132,35	201,29	0,00	242,76	246,77
9	2	129,48	136,80	180,80	191,54	231,40	235,40	109,35	0,00	188,25	203,49	227,62	236,27	130,30	132,35	201,27	0,00	242,90	246,94
10	4	129,51	136,83	180,84	191,54	231,34	235,31	109,42	0,00	188,10	203,46	227,49	236,28	130,31	132,34	201,26	0,00	242,86	246,87
8	4	129,57	136,80	180,84	191,51	231,32	235,35	109,38	0,00	188,21	203,40	227,63	236,33	130,29	132,34	201,27	0,00	242,77	246,83
8	5	129,57	136,80	180,75	191,50	231,39	235,41	109,38	0,00	188,10	203,39	227,60	236,39	130,29	132,34	201,27	0,00	242,93	246,99
9	1	129,57	136,80	180,84	191,51	231,30	235,43	109,37	0,00	187,80	203,40	227,62	236,30	130,28	132,34	201,27	0,00	242,96	246,90
Máximo:		129,68	136,92	181,42	191,72	231,45	235,56	109,89	0	188,58	203,55	227,7	236,45	130,39	132,47	201,43	0	243,06	247,16
Mínimo:		129,19	136,49	180,44	191,13	230,76	234,82	108,9	0	187,73	203,12	227,18	235,87	129,77	131,81	201,11	0	242,33	246,32
Diferencia:		0,49	0,43	0,98	0,59	0,69	0,74	0,99	0,00	0,85	0,43	0,52	0,58	0,62	0,66	0,32	0,00	0,73	0,84
Promedio:		129,45	136,73	180,68	191,36	231,11	235,16	109,16	0	188,01	203,30	227,46	236,18	130,05	132,09	201,28	0	242,69	246,70
Desv. Est.:		0,1227	0,1081	0,1208	0,1141	0,1289	0,1325	0,1539	0	0,1272	0,0892	0,0836	0,0847	0,1404	0,1396	0,0553	0	0,1421	0,1469

Nº Plantas:

Busca Variedad:

Figura R9. Pantalla de la base de datos de Access, con una pequeña parte de los datos correspondientes a la variedad Napoleón.

Pese a las limitaciones mencionadas, se consideró que se disponía de datos suficientes para llevar a cabo el estudio de Homogeneidad y Estabilidad.

En las **Tablas R25 - R43**, páginas 153 - 162, se detallan los valores máximos, mínimos, la diferencia entre ellos, promedio y desviación estándar para cada uno de los 9 microsatélites, en cada una de las 19 variedades. Se incluye el análisis conjunto de todos los datos obtenidos para los ADN de todas las plantaciones, tanto para el estudio de Estabilidad como para el de Homogeneidad.

Los fragmentos de ADN amplificados tienen, lógicamente, un número entero de nucleótidos. Sin embargo, los valores obtenidos con GeneScan son números reales con dos decimales (**Figura R3**, página 100, columna Size). Para un mismo alelo se obtiene un rango de valores ligeramente diferentes en GeneScan, que depende tanto del microsatélite como del alelo en cuestión. Así por ejemplo, en la **Figura R9**, página 150, para el alelo 1 del locus ZAG67 en la variedad Napoleón, se observan los siguientes los valores GeneScan: 129,65; 129,55; 129,68, 129,57, etc.

Debido a que los microsatélites utilizados tienen como unidad de repetición 2 nucleótidos, para el análisis se consideró 1 nucleótido como valor umbral de comienzo para comprobar si existe cambio en el tamaño del alelo entre distintas plantas de la misma variedad. En definitiva, se aceptó que todos aquellos valores que diferían en menos de 1 nucleótido correspondían al mismo alelo.

Lo más destacable en este estudio de Homogeneidad y Estabilidad es que, contando con un número elevado de datos (unas 185 plantas de cada una de las 19 variedades seleccionadas), casi el 98% de todos los valores alélicos GeneScan obtenidos para los 9 loci microsatélite en las 19 variedades estudiadas, presentaron unas diferencias menores o iguales a 1 nucleótido entre sus valores extremos.

No obstante, se presentaron algunas excepciones que se analizaron con especial cuidado y se detallarán a continuación.

Resultados y Discusión

Tabla R24. Resumen de datos de microsatélites. Se detalla el nº de fincas de las cuales se extrajo material, nº de muestras extraídas y amplificadas, nº de muestras incorporadas a la base de datos para cada una de las 19 variedades y nº de datos recogidos en cada uno de los nueve microsatélites para cada una de las variedades en estudio.

VARIEDAD	Nº FINCAS	Nº MUESTRAS EXTRAÍDAS Y AMPLIFICADAS	Nº MUESTRAS EN BASE DE DATOS	ZAG67	VVMD27	VVMD5	ZAG29	ZAG62	ZAG112	VVS2	ZAG83	VVMD28
Airén	10	185	171	165	158	161	168	162	163	167	166	130
Cabernet sauvignon	10	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185
Cardinal	12	196	191	185	180	188	191	191	191	191	191	180
Chardonnay	10	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185
Crimson SDL	13	200	200	198	200	200	200	200	200	200	200	200
Flame SDL	11	112	112	110	112	110	112	111	112	110	112	111
Garnacha	11	247	197	197	197	197	197	197	197	197	197	196
Italia	10	184	184	175	173	160	179	175	176	176	179	155
Merlot	11	239	189	187	138	187	187	187	187	187	187	187
Monastrell	10	177	131	131	131	131	131	131	131	131	131	131
Moscatel de Málaga	11	243	135	133	133	133	133	133	133	133	133	133
Napoleón	12	192	192	192	192	192	192	192	192	192	192	192
Ohanes	11	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188
Palomino fino	11	240	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176
Red globe	10	187	181	181	181	181	181	181	181	181	181	181
Sauvignon blanc	10	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182	182
Sugraone	10	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185
Tempranillo	10	185	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183
Thompson SDL	13	142	132	132	132	132	132	132	131	132	132	132
TOTAL	206	3.654	3.299	3.270	3.211	3.256	3.287	3.276	3.278	3.281	3.285	3.212
PROMEDIO	10,84	192,32	173,63									

Tabla R25. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 171 plantas de la variedad Airén.

AIRÉN	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	129,92	147,30	179,03	191,70	222,95	231,46	109,68	0	188,21	199,59	227,63	232,45	140,68	142,84	191,89	195,61	232,97	242,82
VALOR MÍNIMO	129,22	146,92	178,62	191,07	222,45	230,76	108,77	0	187,41	199,19	227,16	232	140,14	142,31	191,38	195,18	232,23	242,07
DIFERENCIA	0,70	0,38	0,41	0,63	0,50	0,70	0,91	0	0,80	0,40	0,47	0,45	0,54	0,53	0,51	0,43	0,74	0,75
PROMEDIO	129,55	147,13	178,84	191,33	222,72	231,01	109,07	0	187,88	199,36	227,44	232,24	140,38	142,63	191,67	195,43	232,58	242,41
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,1171	0,0828	0,0822	0,0898	0,0905	0,1031	0,1414	0	0,1096	0,0683	0,0754	0,0794	0,1002	0,0959	0,0730	0,0744	0,1385	0,1226

Tabla R26. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 185 plantas de la variedad Cabernet sauvignon. Se remarcan las diferencias entre los valores extremos de un mismo alelo, superiores a 1 nucleótido.

CABERNET SAUVIGNON	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	123,70	137,01	173,15	186,77	228,90	237,15	109,21	0	188,16	193,85	227,61	232,47	136,53	149,76	201,55	0	232,98	234,96
VALOR MÍNIMO	123,05	136,53	172,16	185,92	227,28	235,41	108,23	0	187,24	193,05	227,05	231,91	135,47	148,57	201,17	0	232,00	234,03
DIFERENCIA	0,65	0,48	0,99	0,85	1,62	1,74	0,98	0	0,92	0,80	0,56	0,56	1,06	1,19	0,38	0	0,98	0,93
PROMEDIO	123,36	136,72	172,55	186,24	228,17	236,26	108,64	0	187,67	193,45	227,37	232,14	135,78	148,96	201,33	0	232,45	234,44
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,1206	0,1074	0,2490	0,2057	0,4694	0,5282	0,2504	0	0,2290	0,1753	0,0951	0,1082	0,2134	0,2470	0,0573	0	0,2467	0,2435

Tabla R27. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 191 plantas de la variedad Cardinal.

CARDINAL	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	123,75	136,97	177,20	183,37	223,16	233,59	109,56	0	186,23	0	232,59	240,36	132,55	0	189,97	195,64	242,95	266,66
VALOR MÍNIMO	123,21	136,57	176,49	182,38	222,37	232,76	108,68	0	185,24	0	231,89	239,69	131,70	0	189,50	195,14	241,97	265,67
DIFERENCIA	0,54	0,40	0,71	0,99	0,79	0,83	0,88	0	0,99	0	0,70	0,67	0,85	0	0,47	0,50	0,98	0,99
PROMEDIO	123,42	136,71	176,83	182,88	222,74	233,10	109,09	0	185,78	0	232,19	240,06	132,07	0	189,70	195,41	242,46	266,15
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0842	0,0564	0,1985	0,2492	0,1983	0,2079	0,2383	0	0,1834	0	0,1198	0,1161	0,2262	0	0,1037	0,0830	0,2189	0,2225

Tabla R28. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 185 plantas de la variedad Chardonnay.

CHARDONNAY	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	136,92	150,74	178,94	186,70	231,32	235,26	109,16	0	188,12	195,63	238,21	0	134,25	140,55	189,85	201,67	216,78	226,83
VALOR MÍNIMO	136,36	150,12	178,37	186,13	230,64	234,68	108,59	0	187,49	195,05	237,70	0	133,62	139,88	189,49	201,16	216,10	226,06
DIFERENCIA	0,56	0,62	0,57	0,57	0,68	0,58	0,57	0	0,63	0,58	0,51	0	0,63	0,67	0,36	0,51	0,68	0,77
PROMEDIO	136,68	150,49	178,64	186,37	230,92	234,94	108,81	0	187,84	195,32	238,04	0	133,87	140,17	189,66	201,36	216,40	226,50
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0910	0,0945	0,1055	0,0969	0,1148	0,1152	0,1109	0	0,1257	0,1051	0,0716	0	0,1184	0,1180	0,0701	0,0612	0,1314	0,1249

Tabla R29. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 200 plantas de la variedad Crimson SDL.

CRIMSON SDL	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	129,68	136,93	191,80	0	225,06	233,19	109,55	0	188,20	203,54	232,37	238,32	132,52	149,89	195,71	0	242,73	256,51
VALOR MÍNIMO	129,15	136,51	191,03	0	224,15	232,31	108,66	0	187,58	202,90	231,89	237,69	131,58	148,99	195,24	0	242,10	255,88
DIFERENCIA	0,53	0,42	0,77	0	0,91	0,88	0,89	0	0,62	0,64	0,48	0,63	0,94	0,90	0,47	0	0,63	0,63
PROMEDIO	129,38	136,69	191,35	0	224,64	232,80	109,04	0	187,86	203,19	232,16	238,06	132	149,36	195,41	0	242,46	256,22
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,1025	0,0844	0,1622	0	0,1306	0,1339	0,1407	0	0,1191	0,1016	0,0795	0,0848	0,2007	0,2167	0,0899	0	0,1129	0,1168

Tabla R30. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 112 plantas de la variedad Flame SDL.

FLAME SDL	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	123,63	136,82	179,33	183,24	231,36	233,57	109,48	111,39	188,28	0	240,42	0	130,29	149,77	189,96	0	242,98	0
VALOR MÍNIMO	123,21	136,39	178,57	182,45	230,47	232,70	108,68	110,60	187,57	0	239,87	0	129,69	149,01	189,54	0	241,99	0
DIFERENCIA	0,42	0,43	0,76	0,79	0,89	0,87	0,80	0,79	0,71	0	0,55	0	0,60	0,76	0,42	0	0,99	0
PROMEDIO	123,43	136,69	178,98	182,88	231,06	233,23	109,15	111,10	188,02	0	240,15	0	130,07	149,52	189,74	0	242,58	0
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0697	0,0686	0,2046	0,1972	0,2066	0,2123	0,1700	0,1776	0,1781	0	0,1075	0	0,1599	0,2039	0,0984	0	0,2161	0

Tabla R31. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 197 plantas de la variedad Garnacha.

GARNACHA	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	129,62	147,23	191,92	0	223,28	237,46	109,57	0	188,68	0	227,87	0	134,46	143,03	189,98	191,97	242,96	0
VALOR MÍNIMO	129,06	146,66	190,94	0	222,34	236,50	108,63	0	187,74	0	227,16	0	133,72	142,26	189,28	191,25	242,08	0
DIFERENCIA	0,56	0,57	0,98	0	0,94	0,96	0,94	0	0,94	0	0,71	0	0,74	0,77	0,70	0,72	0,88	0
PROMEDIO	129,36	146,99	191,38	0	222,79	236,98	109,02	0	188,13	0	227,51	0	134,15	142,71	189,71	191,71	242,58	0
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,1033	0,0975	0,1749	0	0,1272	0,1351	0,1666	0	0,2228	0	0,1280	0	0,1280	0,1331	0,1021	0,0934	0,1546	0

Tabla R32. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 184 plantas de la variedad Italia.

ITALIA	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	136,98	153,02	177,02	191,84	229,06	235,38	109,56	111,56	192,05	203,71	227,95	245,85	130,28	147,51	190,07	195,97	232,95	242,98
VALOR MÍNIMO	136,46	152,06	176,17	190,88	228,16	234,54	108,64	110,66	191,28	202,89	227,17	244,86	129,42	146,53	189,46	194,99	232,01	242,01
DIFERENCIA	0,52	0,96	0,85	0,96	0,90	0,84	0,92	0,90	0,77	0,82	0,78	0,99	0,86	0,98	0,61	0,98	0,94	0,97
PROMEDIO	136,70	152,67	176,74	191,33	228,58	234,93	109,07	111,10	191,69	203,20	227,47	245,24	129,98	147,14	189,77	195,46	232,55	242,50
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0794	0,1226	0,1230	0,1496	0,2027	0,2062	0,1358	0,1406	0,1517	0,1291	0,1076	0,1313	0,1391	0,1770	0,1097	0,1102	0,1901	0,1941

Tabla R33. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 189 plantas de la variedad Merlot.

MERLOT	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	129,48	136,83	186,81	188,69	222,97	233,34	109,22	0	193,92	0	227,81	240,34	136,37	149,64	195,48	201,41	226,90	232,76
VALOR MÍNIMO	129,05	136,38	186,18	188,09	222,03	232,69	108,46	0	193,32	0	227,12	239,58	135,88	148,97	195,20	201,19	226,12	231,96
DIFERENCIA	0,43	0,45	0,63	0,60	0,94	0,65	0,76	0	0,60	0	0,69	0,76	0,49	0,67	0,28	0,22	0,78	0,80
PROMEDIO	129,27	136,59	186,50	188,42	222,65	232,99	108,89	0	193,58	0	227,39	240,03	136,07	149,29	195,36	201,30	226,52	232,37
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,1054	0,1097	0,1280	0,1311	0,1405	0,1391	0,1497	0	0,1054	0	0,1036	0,1036	0,1259	0,1525	0,0578	0,0510	0,1585	0,1675

Tabla R34. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 131 plantas de la variedad Monastrell.

MONASTRELL	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	136,98	0	176,86	186,76	223,05	237,30	109,44	0	188,25	203,55	227,67	232,45	130,29	149,77	191,83	201,62	242,90	256,78
VALOR MÍNIMO	136,49	0	176,20	186,17	222,31	236,49	108,66	0	187,58	202,85	227,17	231,97	129,64	148,97	191,49	201,25	242,04	255,95
DIFERENCIA	0,49	0	0,66	0,59	0,74	0,81	0,78	0	0,67	0,70	0,50	0,48	0,65	0,80	0,34	0,37	0,86	0,83
PROMEDIO	136,76	0	176,52	186,49	222,76	236,95	109,05	0	187,93	203,32	227,45	232,23	130,02	149,44	191,68	201,37	242,50	256,42
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0908	0	0,1428	0,1438	0,1705	0,1985	0,1864	0	0,1620	0,1147	0,1025	0,1089	0,1836	0,2031	0,0803	0,0673	0,2005	0,1985

Tabla R35. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 135 plantas de la variedad Moscatel de Málaga.

MOSCA TEL DE MÁLAGA	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	123,68	0	176,99	191,66	224,92	228,92	109,31	0	186,14	203,33	232,32	245,44	130,33	147,33	188,89	0	242,61	266,30
VALOR MÍNIMO	123,26	0	176,31	190,89	224,24	228,29	108,51	0	185,26	202,77	231,91	244,91	129,35	146,59	189,33	0	241,97	265,59
DIFERENCIA	0,42	0	0,68	0,77	0,68	0,63	0,80	0	0,88	0,56	0,41	0,53	0,98	0,74	0,56	0	0,64	0,71
PROMEDIO	123,45	0	176,63	191,22	224,58	228,58	108,91	0	185,63	203,01	232,15	245,12	129,88	146,98	189,63	0	242,28	266
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0751	0	0,1620	0,1602	0,1455	0,1371	0,2136	0	0,1982	0,0959	0,0783	0,0714	0,2083	0,2049	0,1062	0	0,1701	0,1618

Tabla R36. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 192 plantas de la variedad Napoleón.

NAPOLEÓN	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	129,68	136,92	181,42	191,72	231,45	235,56	109,89	0	188,58	203,55	227,70	236,45	130,39	132,47	201,43	0	243,06	247,16
VALOR MÍNIMO	129,19	136,49	180,44	191,13	230,76	234,82	108,90	0	187,73	203,12	227,18	235,87	129,77	131,81	201,11	0	242,33	246,32
DIFERENCIA	0,49	0,43	0,98	0,59	0,69	0,74	0,99	0	0,85	0,43	0,52	0,58	0,62	0,66	0,32	0	0,73	0,84
PROMEDIO	129,45	136,73	180,68	191,36	231,11	235,16	109,16	0	188,01	203,30	227,46	236,18	130,05	132,09	201,28	0	242,69	246,70
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,1227	0,1081	0,1208	0,1141	0,1289	0,1325	0,1539	0	0,1272	0,0892	0,0836	0,0847	0,1404	0,1396	0,0553	0	0,1421	0,1469

Tabla R37. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 188 plantas de la variedad Ohanes.

OHANES	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	129,63	136,90	180,97	191,62	231,20	233,21	109,25	0	199,49	203,35	236,28	238,23	130,16	134,28	189,93	201,33	242,73	246,97
VALOR MÍNIMO	129,24	136,63	180,19	190,86	230,66	232,73	108,52	0	199,06	202,74	235,88	237,88	129,44	133,60	189,37	200,80	242,03	246,07
DIFERENCIA	0,39	0,27	0,78	0,76	0,54	0,48	0,73	0	0,43	0,61	0,40	0,35	0,72	0,68	0,56	0,53	0,70	0,90
PROMEDIO	129,44	136,75	180,64	191,30	230,92	232,96	109	0	199,31	203,04	236,10	238,05	129,94	134,03	189,60	201,12	242,44	246,48
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0822	0,0564	0,2082	0,2065	0,1125	0,1086	0,1376	0	0,0843	0,0921	0,0726	0,0660	0,1366	0,1317	0,0967	0,0666	0,1254	0,1206

Tabla R38. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 176 plantas de la variedad Palomino fino.

PALOMINO FINO	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	129,91	149,49	183,18	191,80	225,16	237,40	109,45	0	188,25	193,91	227,98	232,86	130,38	143,06	191,85	195,57	234,82	247
VALOR MÍNIMO	129,08	149	182,31	190,94	224,32	236,44	108,67	0	187,62	193,38	227,22	231,98	129,56	142,27	191,47	195,26	234,18	246,01
DIFERENCIA	0,83	0,49	0,87	0,86	0,84	0,96	0,78	0	0,63	0,53	0,76	0,88	0,82	0,79	0,38	0,31	0,64	0,99
PROMEDIO	129,39	149,22	182,64	191,19	224,62	236,83	108,96	0	187,83	193,57	227,40	232,17	129,86	142,50	191,61	195,37	234,40	246,49
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,1227	0,0990	0,1430	0,1391	0,1367	0,1503	0,1554	0	0,1139	0,0936	0,1130	0,1199	0,1544	0,1571	0,0648	0,0628	0,1174	0,1351

Resultados y Discusión

Tabla R39. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 181 plantas de la variedad Red globe. Se remarcan las diferencias entre los valores extremos de un mismo alelo, superiores a 1 nucleótido.

RED GLOBE	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	136,90	149,56	179,45	0	233,87	236,20	109,65	0	186,47	188,56	228,10	232,89	132,62	150,19	192,01	201,46	257,42	0
VALOR MÍNIMO	136,12	149,12	178,46	0	232,62	234,80	108,66	0	185,50	187,61	227,28	232,06	131,74	149,12	191,32	201	256,07	0
DIFERENCIA	0,78	0,44	0,99	0	1,25	1,40	0,99	0	0,97	0,95	0,82	0,83	0,88	1,07	0,69	0,46	1,35	0
PROMEDIO	136,71	149,25	178,95	0	233,28	235,50	109,27	0	185,99	188,11	227,60	232,38	132,21	149,62	191,75	201,19	256,62	0
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0749	0,0603	0,2453	0	0,2660	0,2897	0,2000	0	0,2239	0,2131	0,1906	0,1918	0,1856	0,2562	0,1180	0,0947	0,3063	0

Tabla R40. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 182 plantas de la variedad Sauvignon blanc.

SAUVIGNON BLANC	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	123,61	147,27	173,17	186,76	225,16	229,19	109,60	113,39	188,26	193,96	232,55	238,45	130,45	149,89	191,86	201,49	233,03	235,16
VALOR MÍNIMO	123,07	146,86	172,43	186,12	224,33	228,39	108,62	112,64	187,63	193,38	231,99	237,84	129,64	148,98	191,45	201,17	232,15	234,20
DIFERENCIA	0,54	0,41	0,74	0,64	0,83	0,80	0,98	0,75	0,63	0,58	0,56	0,61	0,81	0,91	0,41	0,32	0,88	0,96
PROMEDIO	123,45	147,10	172,80	186,46	224,68	228,70	109,06	112,98	187,88	193,62	232,20	238,10	130	149,37	191,64	201,34	232,51	234,59
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0834	0,0681	0,1655	0,1275	0,1642	0,1638	0,1803	0,1763	0,1206	0,1122	0,1118	0,1225	0,1800	0,1853	0,0706	0,0536	0,1888	0,1804

Tabla R41. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 185 plantas de la variedad Sugraone.

SUGRAONE	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	123,71	136,97	176,92	178,98	222,95	232,93	109,41	111,37	185,93	188,05	232,84	0	132,21	0	189,80	195,48	246,86	0
VALOR MÍNIMO	123,41	136,67	176,45	178,47	222,48	232,03	108,74	110,76	185,45	187,55	232,02	0	131,75	0	189,39	195,20	245,90	0
DIFERENCIA	0,30	0,30	0,47	0,51	0,47	0,90	0,67	0,61	0,48	0,50	0,82	0	0,46	0	0,41	0,28	0,96	0
PROMEDIO	123,55	136,81	176,69	178,77	222,68	232,74	109,09	111,04	185,69	187,81	232,18	0	131,99	0	189,59	195,33	246,45	0
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,0664	0,0632	0,0940	0,1154	0,0800	0,1813	0,1438	0,1369	0,1093	0,1149	0,0770	0	0,0863	0	0,0720	0,0518	0,1703	0

Tabla R42. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 183 plantas de la variedad Tempranillo.

TEMPRANILLO	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	123,73	147,29	180,89	0	233,34	0	109,42	0	195,52	199,48	227,55	236,40	140,69	142,84	195,50	0	256,58	0
VALOR MÍNIMO	123,09	146,76	180,30	0	232,50	0	108,44	0	194,80	199,01	227,16	235,87	139,80	142,07	195,17	0	255,83	0
DIFERENCIA	0,64	0,53	0,59	0	0,84	0	0,98	0	0,72	0,47	0,39	0,53	0,89	0,77	0,33	0	0,75	0
PROMEDIO	123,42	147,02	180,62	0	232,81	0	108,82	0	195,18	199,26	227,38	236,12	140,19	142,41	195,33	0	256,14	0
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,1235	0,0985	0,1471	0	0,1488	0	0,2168	0	0,2117	0,1051	0,0745	0,0847	0,1997	0,1977	0,0749	0	0,1687	0

Resultados y Discusión

Tabla R43. Resumen de los datos GeneScan obtenidos para 132 plantas de la variedad Thompson SDL. Se remarca la diferencia entre los valores extremos del alelo 1 del locus VVMD28, el cual presentó un valor superior a 1 nucleótido.

THOMPSON SDL	ZAG67		VVMD27		VVMD5		ZAG29		ZAG62		ZAG112		VVS2		ZAG83		VVMD28	
VALOR MÁXIMO	123,72	136,94	179,30	191,74	231,47	0	109,54	111,49	188,36	0	227,78	259,79	143,20	150	189,96	195,63	217,49	243,02
VALOR MÍNIMO	123,17	136,43	178,36	190,90	230,49	0	108,74	110,73	187,38	0	227,10	258,90	142,31	149	189,36	195,08	216,38	242,05
DIFERENCIA	0,55	0,51	0,94	0,84	0,98	0	0,80	0,76	0,98	0	0,68	0,89	0,89	1,00	0,60	0,55	1,11	0,97
PROMEDIO	123,48	136,76	178,86	191,32	231,01	0	109,15	111,10	187,93	0	227,47	259,26	142,76	149,50	189,71	195,42	216,95	242,55
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,1638	0,1086	0,2606	0,2334	0,2865	0	0,2292	0,2339	0,2485	0	0,1647	0,1608	0,2624	0,2936	0,1462	0,1165	0,3084	0,2787

4.4.3.1. Análisis de las diferencias superiores a 1 nucleótido

En las 3.299 muestras analizadas en este estudio con los 9 loci microsatélite, las únicas diferencias mayores de 1 nucleótido para un alelo, se detectaron en las variedades: Cabernet sauvignon, Red globe y Thompson SDL; **Tablas R44, R45 y R46**, respectivamente.

Tabla R44. Diferencias superiores a 1 nucleótido detectadas en la variedad Cabernet sauvignon.

CABERNET SAUVIGNON			
VVMD5	Alelo 1	Valor	Diferencia
	Máximo	228,90	
	Mínimo	227,28	1,62
VVMD5	Alelo 2	Valor	Diferencia
	Máximo	237,15	
	Mínimo	235,41	1,74
VVS2	Alelo 1	Valor	Diferencia
	Máximo	136,53	
	Mínimo	135,47	1,06
VVS2	Alelo 2	Valor	Diferencia
	Máximo	149,76	
	Mínimo	148,57	1,19

Tabla R45. Diferencias superiores a 1 nucleótido detectadas en la variedad Red globe.

RED GLOBE			
VVMD5	Alelo 1	Valor	Diferencia
	Máximo	233,87	
	Mínimo	232,62	1,25
VVMD5	Alelo 2	Valor	Diferencia
	Máximo	236,20	
	Mínimo	234,80	1,40
VVS2	Alelo 2	Valor	Diferencia
	Máximo	150,19	
	Mínimo	149,12	1,07
VVMD28	Alelo 1	Valor	Diferencia
	Máximo	257,42	
	Mínimo	256,07	1,35

Tabla R46. Diferencias superiores a 1 nucleótido detectadas en la variedad Thompson SDL.

THOMPSON SDL			
VVMD5	Alelo 1	Valor	Diferencia
	Máximo	217,49	1,11
	Mínimo	216,38	

Estas diferencias entre valores máximos y mínimos podrían deberse a diferentes motivos:

1. A una mutación, es decir, se trataría de nuevos alelos.
2. A un artefacto técnico:
 - 2.1 A un artefacto producido durante la PCR. Por ejemplo, la aparición de picos “+A” citados anteriormente, y no resueltos convenientemente en el análisis. Estos picos se producen por la actividad Nucleotidil Terminal Transferasa que posee la Taq polimerasa utilizada, que añade al final del fragmento de ADN amplificado una Adenina. El programa de PCR utilizado se diseñó para favorecer esta actividad (ciclo final de una hora a 72°C), con el fin de que todos los fragmentos detectados tuvieran el nucleótido añadido. Sin embargo, la actividad no siempre tiene un comportamiento reproducible y en ocasiones se presentaron problemas de este tipo.
 - 2.2 A un artefacto producido durante la electroforesis, incluyendo falta de resolución del analizador genético. Normalmente, se obtienen valores ligeramente diferentes en un mismo alelo, pero podía ocurrir que las diferencias fueran algo mayores. En Grandó y Frisinghelli (1998), se utilizó el secuenciador ABI PRISM 310 para el genotipado de variedades de vid con algunos microsatélites de los empleados en este estudio y los mismos fluorocromos. Observaron que para datos obtenidos con el mismo capilar las desviaciones estándar encontradas eran menores de 0,2 pb, mientras que algunas veces, utilizando distintos capilares, llegaron a apreciar diferencias de hasta 1 pb.

En este contexto (homogeneidad y estabilidad) resultaba fundamental esclarecer si las diferencias encontradas eran debidas a una mutación o a un artefacto técnico, pues esto podía afectar a las conclusiones finales sobre homogeneidad y estabilidad de los microsatélites/variedades. Por ello, estas diferencias se estudiaron al detalle y de forma individual en cada una de las tres variedades citadas. Para ello, se seleccionaron los ADN de las muestras a las que pertenecían los valores extremos de cada uno de los alelos correspondientes a los loci representados en las **Tablas R44, R45 y R46**, y se repitieron las PCR de forma individual para cada uno de ellos. En todos los casos se repitieron las PCR utilizando la misma enzima con la que se llevó a cabo todo el estudio, empleando además en el caso de Cabernet sauvignon otra polimerasa distinta, Pyrobest DNA polimerasa (Takara), utilizando un programa de PCR específico para ella (**Tabla R47**). La enzima Pyrobest DNA polimerasa (Takara) posee actividad exonucleasa 3' – 5', es decir, correctora de pruebas, y no presenta la Nucleotidil Terminal Transferasa, por lo que su fidelidad es mayor y no añade "+A".

Tabla R47. Programa de PCR para la enzima Pyrobest DNA polimerasa.

Nº CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	94°C	5 min
30	94°C	10 seg
	59°C	30 seg
	72°C	1 min
1	4°C	ilimitado

A continuación se detallan los resultados obtenidos tras el estudio minucioso de las diferencias superiores a 1 nucleótido encontradas en Cabernet sauvignon, Red globe y Thompson seedless.

Cabernet sauvignon

En esta variedad se detectaron las mayores diferencias entre los valores máximo y mínimo (**Tabla R44**, página 163), para los dos alelos correspondientes a los microsatélites VVMD5 y VVS2.

Los perfiles electroforéticos y los resultados obtenidos al repetir la reacción de amplificación nuevamente con la Taq polimerasa y con la Pyrobest DNA polimerasa (Takara) se muestran, para el locus VVMD5, en la **Figura R10** y en la **Tabla R48**, respectivamente; y para el locus VVS2, en la **Figura R11** y en la **Tabla R49**, respectivamente.

VVMD5- Cabernet sauvignon

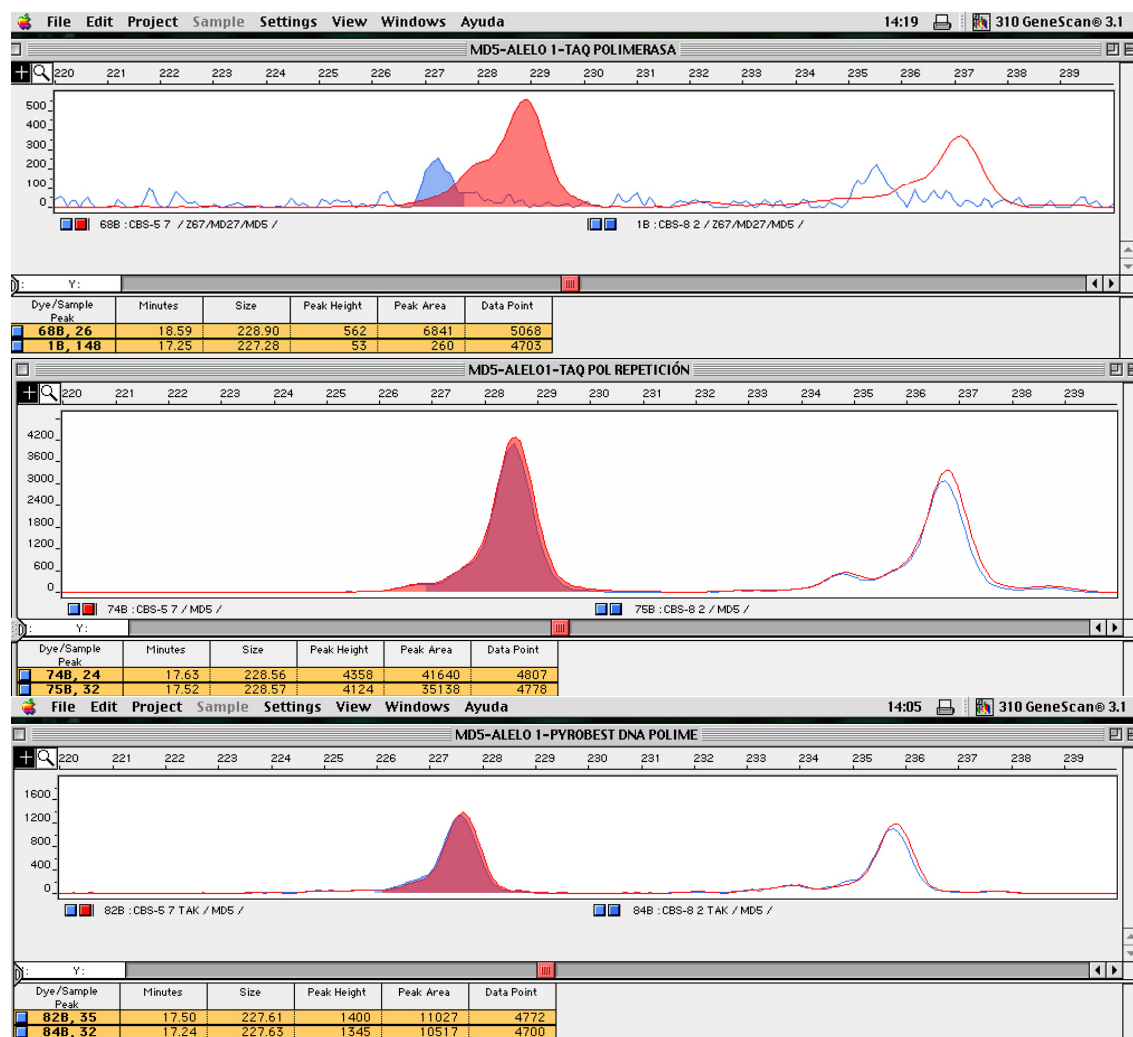


Figura R10. Gráficos GeneScan obtenidos para el locus VVMD5 amplificado con Taq polimerasa (1ª y 2ª amplificación, en las dos ventanas superiores), y Pyrobrest DNA polimerasa (ventana inferior). Sombreados los valores correspondientes al alelo 1.

Tabla R48. Resultados obtenidos para el locus VVMD5 con las enzimas Taq polimerasa (1ª y 2ª amplificación), y Pyrobrest DNA polimerasa. Los valores remarcados son los representados en la Figura R10.

VVMD5	TAQ POLIMERASA 1ª AMPLIFICACIÓN		TAQ POLIMERASA 2ª AMPLIFICACIÓN		PYROBEST DNA POLIMERASA	
Alelo 1	Valor	Diferencia	Valor	Diferencia	Valor	Diferencia
Máximo	228,90	1,62	228,56	0,01	227,61	0,02
Mínimo	227,28		228,57		227,63	
Alelo 2	Valor	Diferencia	Valor	Diferencia	Valor	Diferencia
Máximo	237,15	1,74	236,78	0,04	235,85	0,03
Mínimo	235,41		236,82		235,88	

VVS2- Cabernet sauvignon



Figura R11. Gráficos GeneScan obtenidos para el locus VVS2 amplificado con Taq polimerasa (1ª y 2ª amplificación, en las dos ventanas superiores), y Pyrobest DNA polimerasa (ventana inferior). Sombreados los valores correspondientes al alelo 2.

Tabla R49. Resultados obtenidos para el locus VVS2 con las enzimas Taq polimerasa (1ª y 2ª amplificación), y Pyrobest DNA polimerasa. Los valores remarcados son los representados en la Figura R11.

VVS2	TAQ POLIMERASA 1ª AMPLIFICACIÓN		TAQ POLIMERASA 2ª AMPLIFICACIÓN		PYROBEST DNA POLIMERASA	
Alelo 1	Valor	Diferencia	Valor	Diferencia	Valor	Diferencia
Máximo	136,53	1,06	135,73	0,09	134,75	0,01
Mínimo	135,47		135,64		134,76	
Alelo 2	Valor	Diferencia	Valor	Diferencia	Valor	Diferencia
Máximo	149,76	1,19	148,98	0,15	147,81	0,14
Mínimo	148,57		149,13		147,95	

Se puede observar que las diferencias apreciadas entre las muestras a las que pertenecían los valores extremos del alelo 1 del locus VVMD5 (**Figura R10**, y **Tabla R48**), y del alelo 2 del locus VVS2 (**Figura R11** y **Tabla R49**), eran mucho menores, despreciables a los efectos de considerar si eran el mismo alelo o no. Los valores representados gráficamente han sido los correspondientes al alelo 1 del locus VVMD5, y al alelo 2 del locus VVS2; el alelo 2 del locus VVMD5, y el alelo 1 del locus VVS2 presentaron un perfil electroforético análogo.

Los valores obtenidos tras la amplificación con la Pyrobest DNA polimerasa corresponden a alelos sin “efecto +A”, y los obtenidos tras la 2ª amplificación con la Taq polimerasa pertenecen a alelos con “efecto +A”, ya que entre estos valores se observa una diferencia de aproximadamente 1 nucleótido. Teniendo en cuenta esto, se puede obtener información acerca de la causa de las diferencias superiores a 1 nucleótido entre los valores máximos y mínimos detectadas en los loci VVMD5 y VVS2, en la 1ª amplificación con la Taq polimerasa.

En la **Tabla R48**, para los dos alelos del locus VVMD5 obtenidos tras la 1ª amplificación con la Taq polimerasa, se observa que los valores máximos muestran un “efecto +A”, mientras que los valores mínimos no muestran ese “efecto +A”. Según estos datos, se puede intuir que las diferencias apreciadas en el locus VVMD5 se debían probablemente a la presencia/ausencia del “efecto +A”. En lo que respecta a la **Tabla R49**, para los dos alelos del locus VVS2 obtenidos tras la 1ª amplificación con la Taq polimerasa, se observa que los valores mínimos muestran un valor 1 nucleótido superior al obtenido con la Pyrobest DNA polimerasa, y coinciden con los valores obtenidos tras la 2ª amplificación con la Taq polimerasa. En cambio, los valores máximos presentan 1 nucleótido adicional a los valores obtenidos tras la 2ª amplificación con la Taq polimerasa. Con ello, se puede intuir que las diferencias apreciadas en el locus VVS2 podrían deberse a una falta de resolución durante la electroforesis en el ABI PRISM 310.

Otra manera de analizarlo se muestra en la **Figura R12**, donde se representan gráficamente las frecuencias absolutas obtenidas para los valores detectados para el alelo 2 del locus VVMD5 y para el alelo 2 del locus VVS2. Los valores correspondientes a los alelos 1 de los loci VVMD5 y VVS2, no se han representado debido a que presentan un perfil muy similar al de sus respectivas parejas alélicas. Se observa que los distintos valores del alelo 2 del locus VVMD5

obtenidos en el total de muestras analizadas, aparecen repartidos en dos distribuciones con forma de campana (o distribuciones normales), lo que indica que estos datos estarían agrupados en dos bloques diferentes. Los dos valores medios de cada distribución presentan prácticamente 1 nucleótido de diferencia entre ellos, lo que sugiere que un grupo de valores obtenidos para el alelo 2 del locus VVMD5 presentaron el “efecto +A”, mientras que otro grupo no lo presentó. En cambio, la representación gráfica obtenida para los valores del alelo 2 del locus VVS2 es totalmente distinta a la anterior, parece indicar que de haber ocurrido la presencia/ausencia del “efecto +A”, únicamente habría afectado a los valores extremos (149,8), aunque también falte resolución en esas electroforesis.

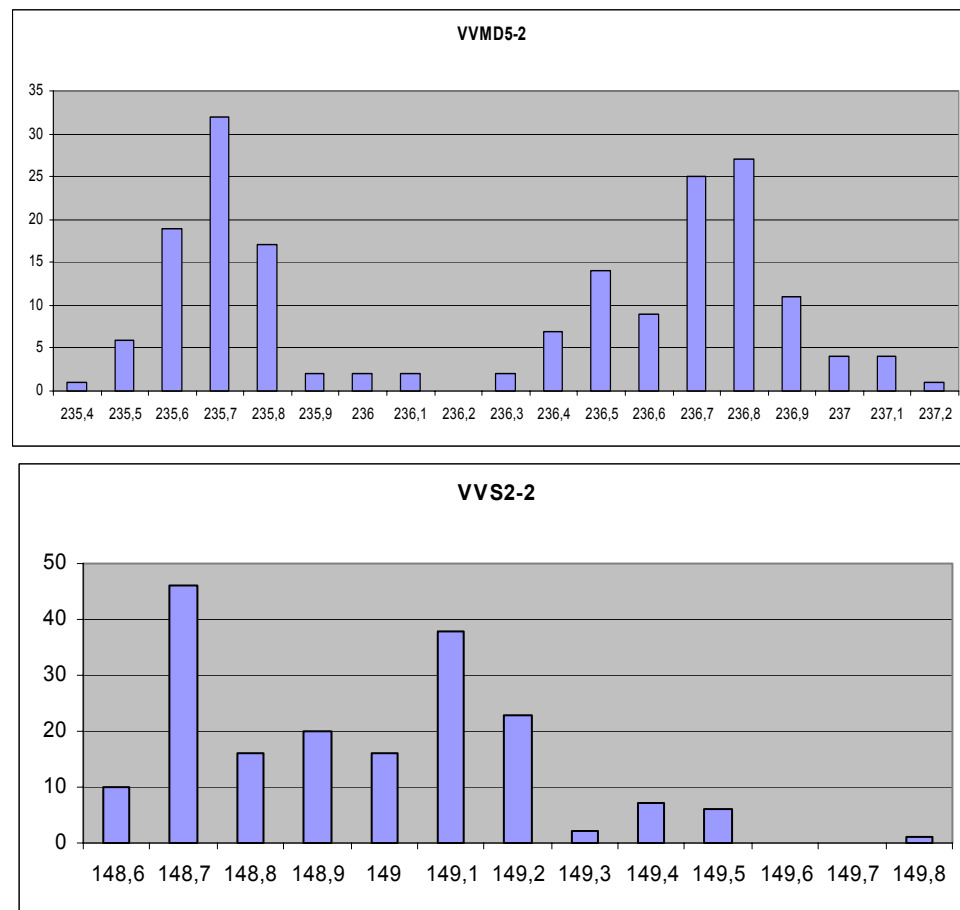


Figura R12. Representación gráfica de las frecuencias absolutas obtenidas para los valores observados para el alelo 2 del locus VVMD5 (ventana superior), y para el alelo 2 del locus VVS2 (ventana inferior).

Resultados y Discusión

En base a los gráficos de la **Figura R12**, y a los resultados obtenidos después de amplificar individualmente los ADN de las muestras a las que pertenecían los valores extremos, se puede llegar a la conclusión de que las diferencias apreciadas en el locus VVMD5 se debían probablemente a la presencia/ausencia del “efecto +A”, mientras que las apreciadas en el locus VVS2 no nos permite diferenciar si realmente se debe a la presencia/ausencia del “efecto +A” o a un artefacto técnico originado durante la electroforesis en el ABI PRISM 310. Lo que sí parece claro es que no había ocurrido mutación alguna en los alelos de estos loci para estas muestras de Cabernet sauvignon.

Obviamente, de aquí se podría deducir la conveniencia de utilizar una enzima como la Pyrobest DNA polimerasa para todo el proyecto. Sin embargo, ello lo hubiera encarecido notablemente, en tiempo y dinero, ya que su coste era mucho mayor, y resultaba muy complicado optimizar una PCR múltiple.

Red globe

En esta variedad se detectaron diferencias superiores a 1 nucleótido entre los valores máximo y mínimo, en tres loci: VVMD5 (en los 2 alelos), VVS2 (en 1 alelo) y VVMD28 (en 1 alelo), **Tabla R45**, página 163.

Debido a que los resultados obtenidos en Cabernet sauvignon con la enzima Pyrobest DNA polimerasa (Takara) hicieron llegar a la misma conclusión que cuando se realizó una segunda amplificación con la Taq polimerasa utilizada durante todo el proyecto, no se consideró necesario en este caso la repetición de la amplificación con esta segunda enzima.

Los resultados obtenidos con la enzima Taq polimerasa (1ª y 2ª amplificación), se muestran en **Tabla R50**. En ella se puede observar que aquellas diferencias apreciadas en la 1ª amplificación entre las muestras a las que pertenecían los valores extremos obtenidos para los alelos 1 y 2 del locus VVMD5, el alelo 2 del locus VVS2 y el alelo 1 del locus VVMD28, eran mucho menores en la repetición, despreciables a los efectos de considerar si eran el mismo alelo o no. Considerando que los valores obtenidos en la 2ª amplificación con la Taq polimerasa corresponderían a alelos con “efecto +A” (ver Cabernet sauvignon), se observa que los valores mínimos muestran ese “efecto +A”. Por el contrario, los valores máximos presentan 1 nucleótido adicional a los valores obtenidos tras la 2ª

amplificación con la Taq polimerasa. Según estos datos se puede intuir que las diferencias apreciadas en los loci VVMD5, VVS2 y VVMD28, se debían probablemente a una falta de resolución durante la electroforesis en el ABI PRISM 310.

Tabla R50. Resultados obtenidos para los loci VVMD5 (alelos 1 y 2), VVS2 (alelo 2) y VVMD28 (alelo 1) con la enzima Taq polimerasa (1ª y 2ª amplificación).

LOCI	ALELOS	TAQ POLIMERASA 1ª AMPLIFICACIÓN		TAQ POLIMERASA 2ª AMPLIFICACIÓN	
		Valor	Diferencia	Valor	Diferencia
VVMD5	Alelo 1				
	Máximo	233,87	1,25	232,75	0,15
	Mínimo	232,62		232,60	
VVMD5	Alelo 2				
	Máximo	236,20	1,40	234,89	0,08
	Mínimo	234,80		234,81	
VVS2	Alelo 2				
	Máximo	150,19	1,07	149,12	0,17
	Mínimo	149,12		148,95	
VVMD28	Alelo 1				
	Máximo	257,42	1,35	256,19	0,13
	Mínimo	256,07		256,06	

En la **Figura R13** se muestra una representación gráfica de las frecuencias absolutas obtenidas para los valores detectados para los alelos 1 y 2 del locus VVMD5, para el alelo 2 del locus VVS2 y, para el alelo 1 del locus VVMD28, respectivamente. Se observa que la distribución de los valores alélicos obtenidos en el total de muestras analizadas para esos loci, responde a una distribución prácticamente normal, aunque no nos permite diferenciar si realmente las diferencias superiores a 1 nucleótido entre los valores máximo y mínimo encontradas en estos tres loci se deben realmente a la presencia/ausencia del “efecto +A” o a un artefacto técnico originado durante la electroforesis en el ABI PRISM 310.

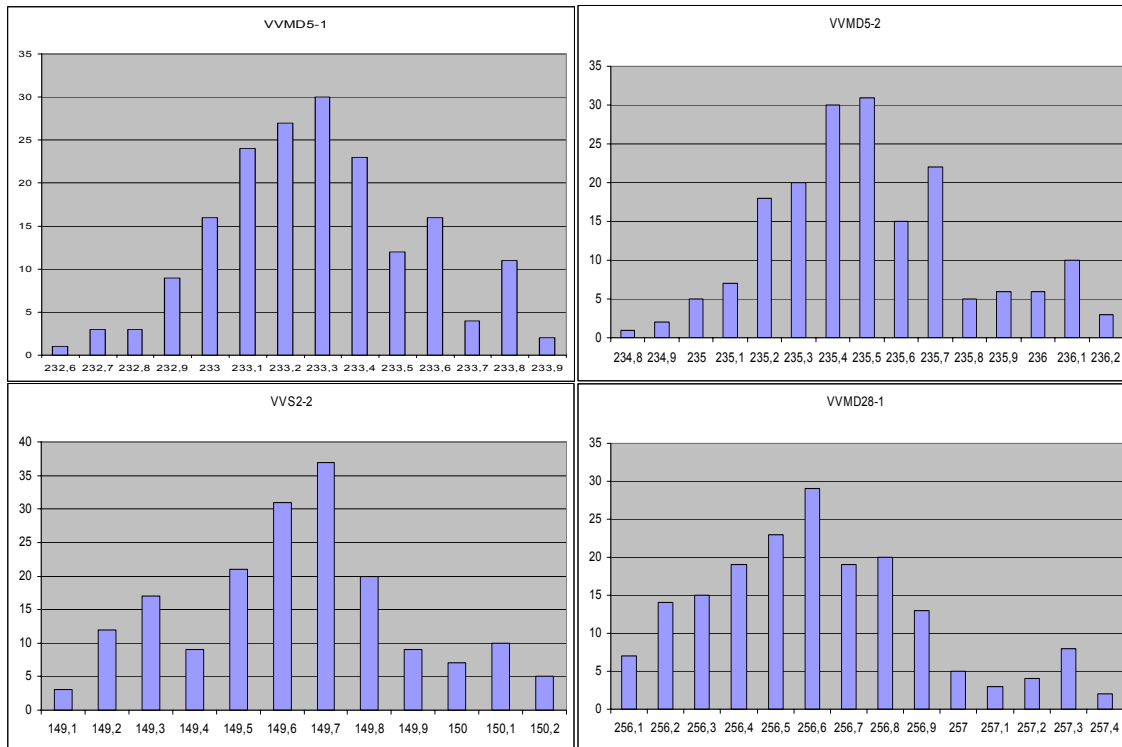


Figura R13. Representación gráfica de las frecuencias absolutas obtenidas para los valores detectados para los alelos 1 y 2 del locus VVMD5 (2 ventanas superiores), para el alelo 2 del locus VVS2 (ventana inferior izquierda), y para el alelo 1 del locus VVMD28 (ventana inferior derecha).

En base a los gráficos de la **Figura R13**, y a los resultados obtenidos después de amplificar individualmente los ADN de las muestras a las que pertenecían los valores extremos, se puede llegar a la conclusión de que las diferencias apreciadas en estos tres loci pueden deberse, bien a la presencia/ausencia del “efecto +A”, bien a un artefacto técnico originado durante la electroforesis en el ABI PRISM 310. Lo que si parece claro es que no había ocurrido mutación alguna en los alelos de estos loci para estas muestras de Red globe.

Thompson seedless

En esta variedad únicamente se detectaron diferencias superiores a 1 nucleótido entre los valores máximo y mínimo, en el alelo 1 del locus VVMD28.

Tabla R46, página 164.

Para tratar de averiguar la causa de la variación, se procedió de igual forma que en los casos descritos anteriormente para las variedades Cabernet sauvignon y Red globe.

Los resultados obtenidos para el locus VVMD28 con la enzima Taq polimerasa (1ª y 2ª amplificación) se resumen en la **Tabla R51**. Se observa que las diferencias, cuando se amplificaron nuevamente con la Taq polimerasa, eran despreciables a los efectos de considerar si eran el mismo alelo o no. Al igual que en Cabernet sauvignon para el locus VVS2, y en Red globe para los loci VVMD5, VVS2 y VVMD28, el valor mínimo presenta el “efecto +A”. Por el contrario, el valor máximo presenta un valor 1 nucleótido superior al valor obtenido tras la 2ª amplificación con la Taq polimerasa. Como en los casos anteriores, se puede intuir que las diferencias apreciadas en el alelo 1 del locus VVMD28, podrían ser debidas a una falta de resolución durante la electroforesis en el ABI PRISM 310.

Tabla R51. Resultados obtenidos para el alelo 1 del locus VVMD28 con la enzima Taq polimerasa (1ª y 2ª amplificación).

VVMD28	TAQ POLIMERASA 1ª AMPLIFICACIÓN		TAQ POLIMERASA 2ª AMPLIFICACIÓN	
	Valor	Diferencia	Valor	Diferencia
Máximo	217,49	1,11	216,45	0,12
Mínimo	216,38		216,33	

En la **Figura R14** se muestra una representación gráfica de las frecuencias absolutas obtenidas para los valores detectados para el alelo 1 del locus VVMD28. Se observa que la distribución de los valores alélicos obtenidos en el total de muestras analizadas para ese locus responde a una distribución distinta de la normal, que no permite diferenciar si realmente las diferencias superiores a 1 nucleótido entre los valores máximo y mínimo encontradas en este locus se deben realmente a la presencia/ausencia del “efecto +A” o a un artefacto técnico originado durante la electroforesis en el ABI PRISM 310.

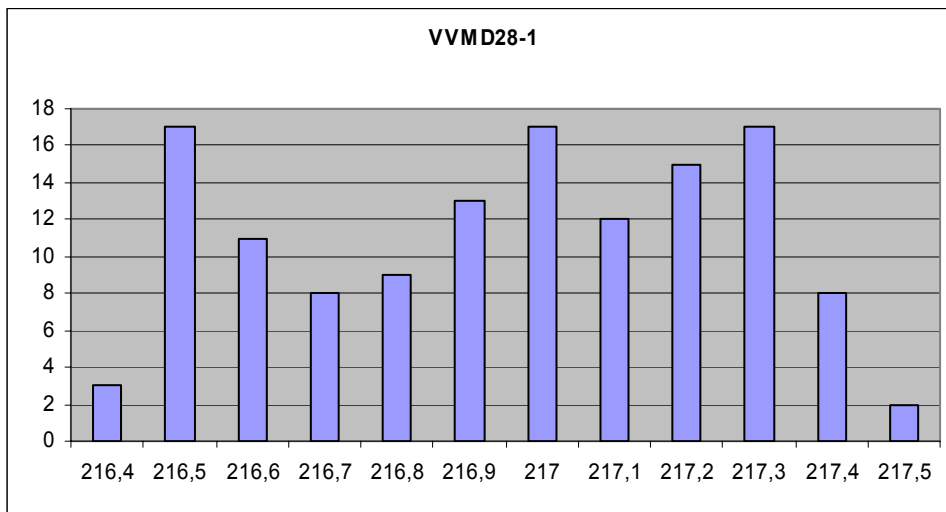


Figura R14. Representación gráfica de las frecuencias absolutas obtenidas para los valores detectados para el alelo 1 del locus VVMD28.

En base al gráfico de la **Figura R14**, y a los resultados obtenidos después de amplificar individualmente los ADN de las muestras a las que pertenecían los valores extremos, se puede llegar a la conclusión de que las diferencias apreciadas se debían a la presencia/ausencia del “efecto +A”, o a un artefacto técnico originado durante la electroforesis en el ABI PRISM 310, y no a que hubiera ocurrido alguna mutación en el alelo 1 del locus VVMD28 para estas muestras de Thompson seedless.

En resumen, se ha podido demostrar que las diferencias por encima de 1 nucleótido que aparecieron entre valores GeneScan en las tres variedades detalladas anteriormente (Cabernet sauvignon, Red globe y Thompson seedless), no correspondían a diferencias en el genotipo causadas por alguna mutación en los alelos de estas muestras, sino que se debían a variaciones provocadas por un artefacto técnico producido durante la PCR o durante la electroforesis en el ABI PRISM 310.

De cualquier modo conviene puntualizar:

1. Las diferencias encontradas en la práctica totalidad de los casos están muy cerca de 1 nucleótido y no habrían ocasionado una categorización errónea de los genotipos en cuestión.
2. Dichas variaciones afectaron a muy pocas muestras.
3. Las dudas planteadas son fácilmente subsanables llevando a cabo una repetición del proceso completo de genotipado con la misma enzima.

En el estudio mostrado se han analizado las diferencias entre valores para alelos dentro de cada variedad. Existían alelos coincidentes entre distintas variedades y se han estudiado las diferencias dentro de un alelo, considerando todos los valores disponibles, independientemente de la variedad. Se han encontrado diferencias superiores a las del estudio presentado (lógicamente, al incluir más datos), pero se ha podido comprobar, de manera análoga a la presentada, que las variaciones no correspondían a mutaciones genéticas, sino a artefactos técnicos.

4.4.4. Identificación de posibles quimeras en las variedades Merlot y Cardinal

En el análisis de las 3.299 muestras distintas que abarcan el estudio de Homogeneidad y Estabilidad, se encontraron 49 muestras de la variedad Merlot con tres alelos para el locus VVMD27, y 2 muestras de la variedad Cardinal con tres alelos para el locus VVMD5.

En el análisis genético de vid mediante marcadores microsatélite se han observado ocasionalmente más de dos alelos en algún locus en determinados tejidos de la planta, entre ellos la hoja, el cual es el material vegetal con el que se trabajó en este estudio. Esto no es un fenómeno esperado en especies diploides, como es el caso de la vid, en el cual se esperan dos alelos para un determinado locus microsatélite. Se ha identificado como una fuente de tales anomalías el fenómeno que lleva por nombre quimerismo periclinal: tejidos distintos citoplasmática o genotípicamente, dispuestos en capas concéntricas. Este fenómeno puede afectar a la identificación varietal y a los análisis de pedigríes en vid.

En la vid existen diferentes partes de la planta que presentan dos capas celulares denominadas L1 y L2 (Einset y Pratt, 1954), (Thompson y H.P., 1963), entre ellas podemos citar las anteras, las hojas etc. La interpretación más factible para la aparición de más de dos alelos por locus, es que uno de ellos ha mutado en una de las dos capas celulares citadas anteriormente y mediante reproducción vegetativa esta mutación se ha mantenido en el tiempo, mientras que el genotipo original se ha mantenido en la otra capa. Al extraer el ADN procedente de la hoja, el genotipo resultante es una mezcla de los genotipos de las dos capas, L1 y L2. Mientras uno de los alelos está presente en las dos capas, el alelo mutado sólo se encontrará en una de ellas, con lo que existirán efectivamente tres alelos del locus microsatélite mutado dentro del tejido foliar. El que la hoja presente este fenómeno no quiere decir que todos los órganos de la planta lo tengan ya que no todas las partes de la vid presentan las dos capas celulares.

Esto se ha confirmado en estudios en los que mediante embriogénesis somática se han obtenido individuos procedentes de una sola célula, bien perteneciente a la capa celular L1 o a la L2, consiguiendo con ello estudiar el perfil genético correspondiente a cada una de ellas y su fenotipo (Franks et al., 2002); (Hocquigny et al., 2004); (Bertsch et al., 2005); (Moncada et al., 2006).

Posibles quimeras en Merlot

De las 189 muestras estudiadas de Merlot, 49 presentaron tres alelos para el locus VVMD27. Esas mismas plantas presentaron un genotipo igual al esperado para los otros ocho microsatélites.

Una vez observado este posible fenómeno de quimerismo en el locus VVMD27, se procedió a la amplificación individual del citado locus, obteniendo exactamente el mismo perfil genético, tal y como se recoge en la **Figura R15**. Se comprobó que esta presencia de tres alelos no fuera debida a una posible contaminación de los cebadores, o a una contaminación del ADN genómico, ya que para este último caso, se extrajo nuevamente ADN de algunas muestras que presentaron tres alelos en el locus VVMD27. Además, se amplificaron algunas de las muestras que presentaron estos tres alelos con el locus microsatélite *ssrVrZAG47* (Sefc et al., 1999) (abreviado ZAG47). Los loci ZAG47 y VVMD27 amplifican la misma región microsatélite (Dalbó et al., 2000), pero debido al diferente diseño de los cebadores, los alelos del ZAG47 son aproximadamente 20

nucleótidos más cortos que los correspondientes alelos del VVMD27. En la **Tabla R52** se detallan las características del locus ZAG47.

Tabla R52. Características del locus *ssrVrZAG47*.

RANGO (pb)	SECUENCIA	Tm	FLUOROCROMO	TIPO DE REPETICIÓN
149-172	Cebador up Cebador lw 5'-GGTCTGAATACATCCGTAAGTATAT-3' 5'-ACGGTGTGCTCTCATTGTCATTGAC-3'	52,6°C 57,5°C	6-FAM (Azul)	Imperfecta (GA) ₁₅ (AA) ₅ (GA) ₅

Los resultados que se obtuvieron con la amplificación del locus ZAG47 se muestran en la **Figura R16**, página 178. Se puede observar que seguían apareciendo tres alelos para ese locus.

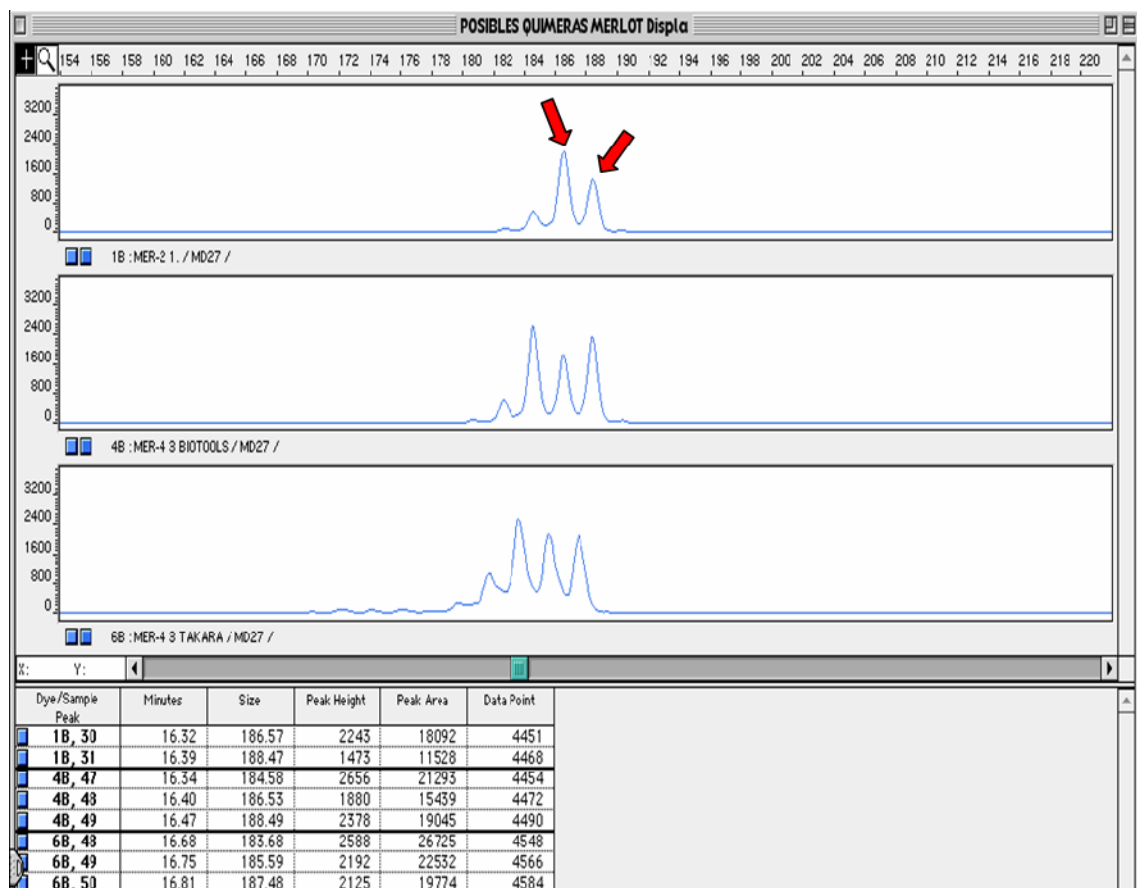


Figura R15. En la figura se muestran tres ventanas pertenecientes a la amplificación del locus VVMD27 para tres muestras de la variedad Merlot. La ventana superior corresponde a una muestra que no presentó el posible fenómeno de quimerismo para el microsatélite VVMD27 (las flechas apuntan a los dos alelos esperados), mientras que las dos ventanas inferiores corresponden a dos muestras que presentaron tres alelos para este locus.

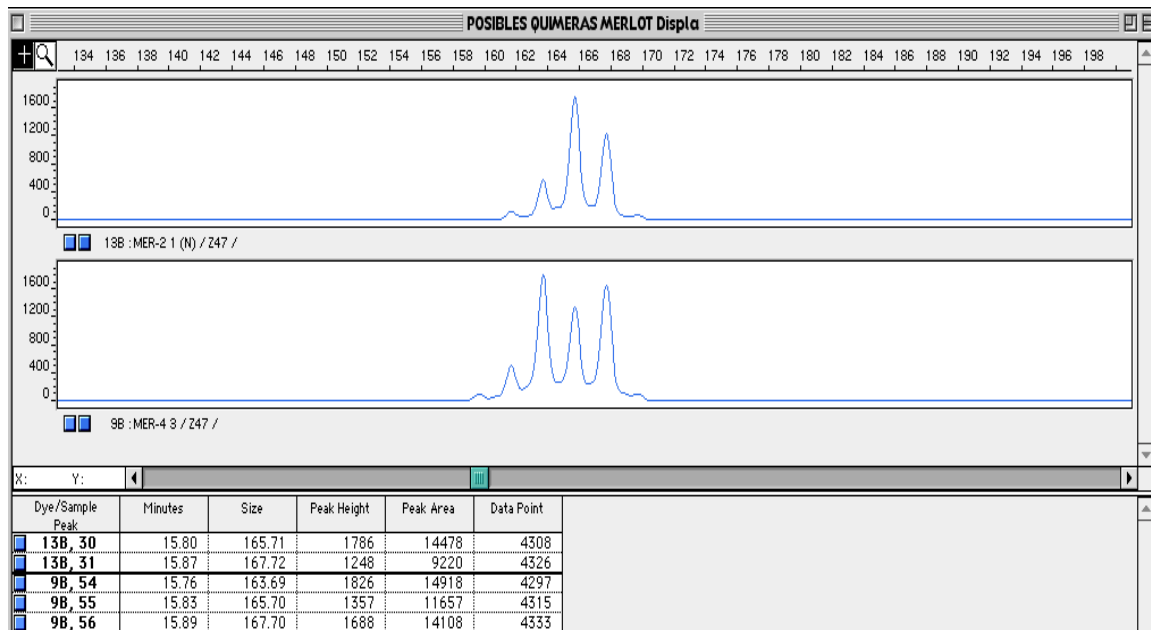


Figura R16. En la figura se muestran dos ventanas pertenecientes a la amplificación del locus ZAG47 para dos muestras de la variedad Merlot. La ventana superior corresponde a una muestra con 2 alelos para el microsatélite ZAG47 y la ventana inferior corresponde a una muestra que presentó tres alelos para este locus.

Puesto que durante la recolección de las muestras no se etiquetaron las plantas individualmente, no fue posible realizar un estudio morfológico de aquellas plantas de Merlot que presentaron 3 alelos en el locus VVMD27. Con esto se hubiera podido realizar una comparación morfológica entre las plantas que presentaron posibles quimeras y las que no, para ver si este fenómeno podía afectar de algún modo a la expresión del fenotipo de algunos caracteres en la planta.

En la finca de El Encín existe una plantación de Merlot, por ello, se decidió coger material de la misma, con el fin de que si se encontraba este fenómeno de posible quimerismo en el locus VVMD27, se pudiera hacer un estudio morfológico, como se ha citado anteriormente. Se cogió material de 50 plantas, etiquetando cada una de ellas. Sin embargo, ninguna planta presentó este fenómeno para el locus VVMD27, todas presentaron un genotipo igual al esperado, es decir bialélico.

Hay que destacar que este fenómeno de quimerismo presentado en este estudio en la variedad Merlot, afectó a plantaciones de origen muy diverso. En algunos casos afectó a todas las plantas de una misma plantación y en otros sólo a parte de ellas, como se detalla en la **Tabla R53**. Las muestras implicadas presentaron un rango en cuanto al año de plantación comprendido entre 1.994 y 2.000.

Tabla R53. Origen de las plantas de la variedad Merlot que presentaron tres alelos en el locus VVMD27. Se detalla el número de plantas analizadas por plantación y el número de posibles quimeras que aparecieron. En la última columna se recoge el año de plantación de las muestras que presentaron el posible quimerismo.

ORIGEN	PLANTAS ANALIZADAS	POSIBLES QUIMERAS	AÑO DE PLANTACIÓN
Olite-Navarra	50	25	1.994
Utiel-Requena	50	4	1.996
Chile	5	4	-
Alemania	5	1	2.000
Cenicientos- Madrid	5	5	1.999
Alanje-Badajoz	5	5	2.000
Antequera-Málaga	5	5	1.995

Posibles quimeras en Cardinal

De las 191 muestras estudiadas en la variedad Cardinal, sólo 2 de ellas presentaron tres alelos para el locus VVMD5 y ambas pertenecían a la finca número 11 detallada en la **Tabla M7** de Materiales y Métodos, página 54 (procede de la provincia de Sevilla, el año de plantación es el 2.005, y su origen es un vivero comercial).

Una vez observado este posible fenómeno de quimerismo en el locus VVMD5 de estas 2 muestras cuando se amplificaron con los 9 loci microsatélite, se procedió a la amplificación individual del citado locus, obteniendo un perfil genético análogo, tal y como se recoge en la **Figura R17**.

En este caso, también se descartó la idea de que esta presencia de tres alelos fuera debida tanto a una posible contaminación de los cebadores, como a una contaminación del ADN genómico.

Resultados y Discusión

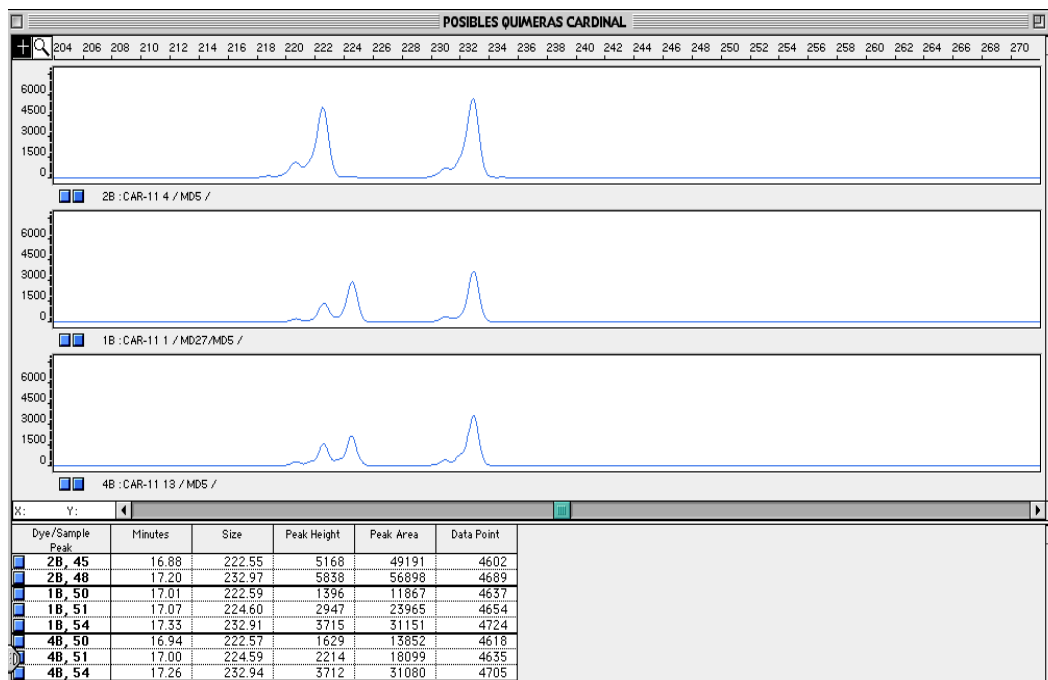


Figura R17. En la figura se muestran tres ventanas pertenecientes a la amplificación del locus VVMD5 para tres muestras de la variedad Cardinal. La ventana superior corresponde a una muestra que no presentó el posible fenómeno de quimerismo para el microsatélite VVMD5. Las dos ventanas inferiores corresponden a las dos muestras que presentaron tres alelos para este locus.

Para este caso en particular, no está muy claro si se trata de un fenómeno de posible quimerismo para el locus VVMD5 o de una mutación en el alelo 1 de ese locus.

Se pensó que podía tratarse de un fenómeno de posible quimerismo por la altura que presentan los picos “tartamudos” con respecto al alelo “esperado”. Ya que como se explicó anteriormente los picos “tartamudos” son picos de menor tamaño y altura que los alelos en sí, y que normalmente tenían 2, 4, y hasta 6 nucleótidos menos que ellos, y además, su altura disminuía a medida que se alejaba del alelo “esperado”.

En las dos muestras que presentaron este fenómeno de posible quimerismo en la variedad Cardinal, representadas en las dos ventanas inferiores de la **Figura R17**, los picos que se presentan a la izquierda del pico más alto en la zona del alelo 1, no tienen una altura lo suficientemente reducida con respecto a éste como para considerarlos claramente picos “tartamudos”. Si se comparan estos picos con los

representados en la ventana superior de la **Figura R17**, se observa que tienen un tamaño relativo mucho más alto.

4.4.4.1. Consecuencias del quimerismo en los exámenes de Homogeneidad y Estabilidad

Hay que tener en cuenta que si fuera encontrado un cambio en el genotipo de algunas plantas de una muestra de 5 o 50 plantas, ello podría afectar a la conclusión sobre la homogeneidad del o de los marcadores microsatélites implicados en el cambio. Mientras que, si fuera encontrado un cambio en el genotipo de todas las plantas de una muestra de 5 o 50 plantas, ello podría afectar a la conclusión sobre la estabilidad del o de los marcadores microsatélites implicados en el cambio.

Concretamente, la UPOV establece en las directrices para llevar a cabo los tests para el estudio de la Distinción, Homogeneidad y Estabilidad en vid (*Vitis* L.) (TG/50/8) lo siguiente: “Para la valoración de la Homogeneidad (...). En el caso de una muestra compuesta por 10 plantas, el máximo número de plantas distintas u “off-types” permitidas sería 1”.

En base a esto, en Merlot, el máximo número de plantas distintas u “off-types” permitidas según las directrices de la UPOV, sería 19, habiéndose presentado 49 distintas para el locus VVMD27. Con los datos mostrados en la **Tabla R53**, página 179, y teniendo en cuenta lo explicado en el párrafo anterior, se observa una falta de homogeneidad y estabilidad del locus VVMD27 en la variedad Merlot. Como no se han podido evaluar morfológicamente las plantas que presentaron el fenómeno de posible quimerismo, no se ha podido establecer la existencia de cualquier relación entre el estudio de Homogeneidad y Estabilidad para los microsatélites y para los caracteres morfológicos.

Con estos datos obtenidos, si se siguieran las directrices de la UPOV estrictamente, podría no concederse un título de protección legal para la variedad Merlot, o incluso podría no incluirse en el Registro de Variedades Comerciales. Aunque hay que remarcar que estamos ante un caso fácilmente detectable (3 alelos) y por tanto no supondría un riesgo de error en el genotipado.

En el caso de Cardinal, ya sea mediante quimerismo o mediante la mutación del propio alelo, el número de “off-types” permitidos siguiendo las directrices de la

UPOV, sería 19, pero sólo han aparecido 2 plantas distintas para el locus VVMD5, por lo que no se ve afectada la homogeneidad de este microsatélite para la variedad Cardinal.

Las dos variedades que han presentado este fenómeno de posible quimerismo, Cardinal y Merlot, son bastante antiguas, siendo la edad un factor que contribuye a la probabilidad de encontrar mutaciones en regiones microsatélites.

Dado que este tipo de quimeras se producen en vid de manera recurrente, aunque con una frecuencia muy baja, en otras variedades podría afectar a otro microsatélite, o a cualquier otro marcador de ADN. También podría afectar a caracteres morfológicos, en cuyo caso el examen técnico probablemente concluiría que la variedad no es homogénea (en función del número de plantas “fuera de tipo” encontradas). Lo más conveniente sería excluir del examen técnico el microsatélite que da como resultado un genotipo con 3 alelos en aquellos casos en que se produce (se entiende para variedades diploides), dada su baja frecuencia. De esta manera no se obligaría a los mejoradores a seleccionar también teniendo en cuenta los genotipos de los microsatélites, sino solamente, como ocurre en la actualidad, los caracteres morfológicos.

Hay que tener en cuenta que no en todos los microsatélites aparecen fenómenos de posible quimerismo con la misma frecuencia, ya que hay loci más inestables que otros. Por ejemplo, los recogidos en los trabajos de Riaz et al. (2002) y Moncada et al. (2006), donde llegaron a presentarse hasta 4 genotipos distintos para un mismo locus en clones de Pinot y Cabernet sauvignon, respectivamente. En general, los 9 loci testados en este estudio no han presentado de forma importante este tipo de variabilidad.

4.4.5. Utilidad del sistema de 9 loci microsatélite para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad

De las 3.299 muestras distintas analizadas en el estudio de Homogeneidad y Estabilidad, muy pocas (2%), pertenecientes a 3 variedades de las 19 que componen este estudio, mostraron diferencias superiores a 1 nucleótido para un mismo alelo. Se ha demostrado que estas discrepancias no correspondían a mutaciones en los alelos de estas muestras, sino que se debían a variaciones provocadas por un artefacto técnico producido durante la PCR o durante la

electroforesis en el ABI PRISM 310. Únicamente la variedad Merlot presentó una falta de homogeneidad y estabilidad en el locus VVMD27, debido a la presencia de tres alelos para este microsatélite en 49 muestras de las 189 analizadas en esa variedad. Por tanto, de 171 combinaciones microsatélite/variedad, en 170 se ha encontrado el genotipo esperado.

En definitiva, estos resultados indican que en general, los 9 microsatélites utilizados para llevar a cabo este análisis son unos marcadores moleculares que presentan una marcada homogeneidad y estabilidad.

4.5. PROPUESTA DE UTILIZACIÓN DEL SISTEMA Y TOMA DE DECISIONES

4.5.1. Defensa legal

4.5.1.1. Identificación de variedades de vid

La Identificación consiste básicamente, en buscar conformidad entre la planta analizada y alguna de las variedades que componen la colección de referencia. Por ello se podría utilizar cualquier tipo de marcador distinto a los oficiales morfológicos, al no utilizarse en ningún procedimiento oficial, en concreto para obtener un título de obtención vegetal. La identificación no es un sustituto de la distinción, y por ello la identificación de “nuevas” variedades que puedan ser iguales a una preexistente es responsabilidad del obtentor de la misma. Hoy en día existe una gran preocupación por parte de los obtentores para conseguir la aplicación de sus derechos lo más simple y rápido posible. A este respecto, la OCVV (Oficina Comunitaria de las Variedades Vegetales), en estrecha cooperación con las organizaciones de productores y la Comisión Europea, decidió organizar seminarios sobre la aplicación de los derechos de los obtentores. Estos seminarios se llevan celebrando anualmente desde el 2005, y el último tuvo lugar en Madrid en febrero del 2007.

A partir de la experiencia de muchos años en el laboratorio de Biología Molecular de la Finca El Encín, y del trabajo aquí presentado, se propone un procedimiento general para la identificación de una determinada variedad de vid. Este consistiría en tres etapas: 1) análisis de la muestra problema con los 9 loci microsatélite, 2) comparación de la misma con una completa base de datos y 3) toma de decisiones.

Las dos primeras etapas no requieren de explicaciones adicionales. En cuanto a la tercera, si se analizan los 9 loci en dos plantas diferentes, se pueden encontrar tres tipos alternativos de resultados, representados en la **Figura R18**:

1. Coincidencia total de los alelos: concluiremos inicialmente sin ninguna duda que las dos plantas pertenecen al mismo sortogrupo: o bien las dos plantas pertenecen a la misma variedad, o una es una EDV o un “sport” de la otra, o son clones de la misma variedad, o son sinónimas. La decisión final de cual de esos casos es el correcto dependerá de otras características (ej. morfológicas, etc.), pero la ventaja que esto supone contrastando con la situación actual es clara: únicamente 2 o unas pocas variedades tienen que ser comparadas con descriptores morfológicos para llegar a una conclusión final.

Si se encontrara una coincidencia entre la muestra problema y una determinada variedad de la base de datos, se emplearía un análisis matemático que permitiría establecer la probabilidad de que se presentase tal coincidencia. Se elegiría una colección de referencia, que podría ser la “Colección de genotipos únicos” derivada del estudio de Distinción llevado a cabo en este trabajo, y las probabilidades de coincidencia en los genotipos de los microsatélites para la vid serían calculadas bajo la asunción de programas de mejora independientes. Podría ser conveniente utilizar colecciones específicas como una opción conservadora.

2. Un alelo diferente: dado que puede tratarse de variedades muy próximas, se propone estudiar un número mayor de microsatélites, como podría ser el set de 16 microsatélites adicionales empleados en este trabajo en el estudio de Distinción. Si existe una coincidencia total en los nuevos microsatélites, la conclusión debería ser como el primer caso. De lo contrario, si apareciesen 1 o más alelos diferentes en los nuevos microsatélites, pertenecería al tercer caso, que las dos plantas pertenecen a sortogrupos diferentes.
3. Dos o más alelos diferentes: la conclusión será que las dos plantas pertenecen a sortogrupos diferentes.

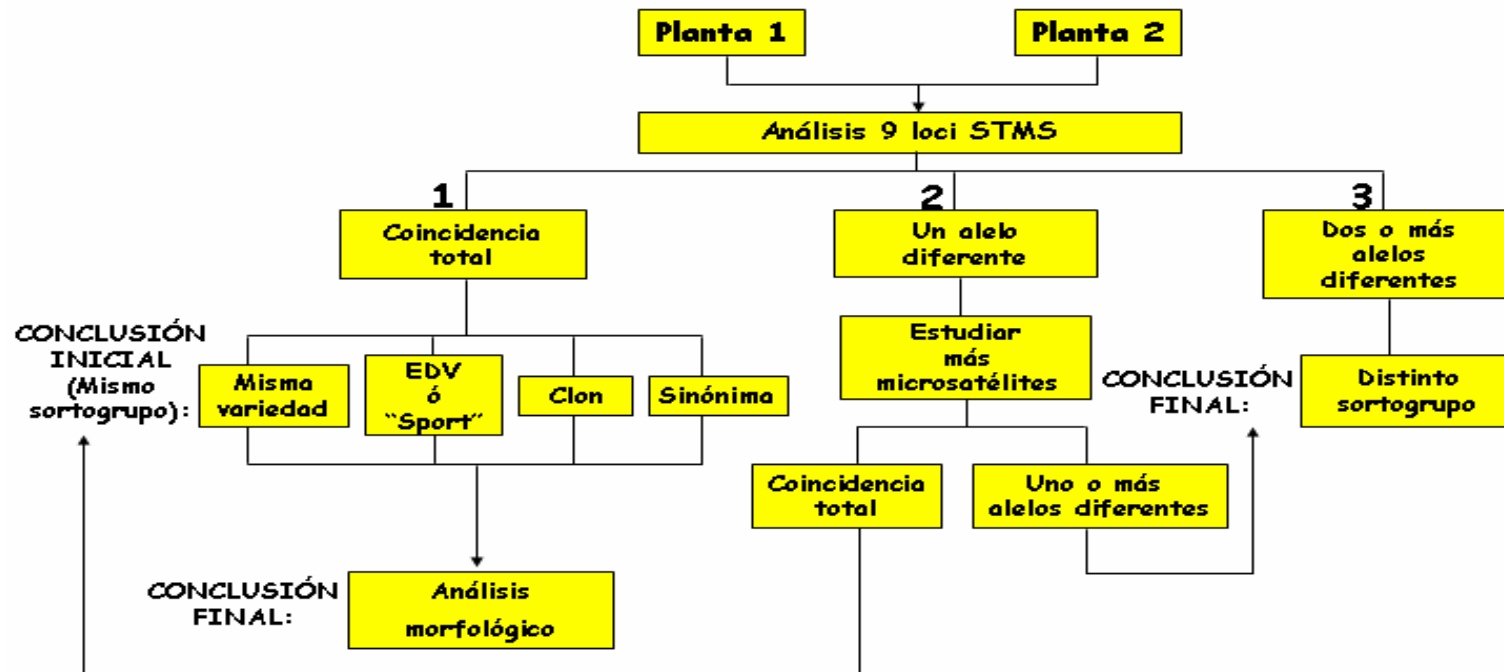


Figura R18. Gráfico de toma de decisiones en función de los tres tipos de resultados que se pueden encontrar si se analizan los 9 loci microsatélite en dos plantas diferentes.

4.5.1.2. Establecimiento de la derivación esencial

Una variedad es esencialmente derivada de otra variedad inicial si:

- a) Se deriva principalmente de la variedad inicial, o de una variedad que a su vez deriva principalmente de la variedad inicial.
- b) Se distingue claramente de la variedad inicial.
- c) Es conforme a la variedad inicial en la expresión de los caracteres esenciales.

El establecimiento de la derivación esencial corresponde al obtentor. Si un obtentor considera que una variedad ha sido obtenida a partir de la suya, debe demostrarlo. Para ello, como en la identificación, también cabe la utilización de métodos alternativos a los usados en la distinción, que puedan probar de manera clara que existe tal derivación esencial. Si finalmente el propietario de la variedad inicial aporta indicios suficientes de que la otra variedad ha sido obtenida a partir de la suya, entonces debería revertirse el peso de la prueba, y el segundo obtentor tendría que probar que en su variedad no predomina la derivación, o que él no ha usado la variedad inicial, o una EDV de esa variedad inicial.

Generalmente, en cuanto a los marcadores moleculares microsatélites, las variedades de vid que se pueden considerar como sports o EDV muestran genotipos idénticos a los de sus variedades iniciales.

El procedimiento general que se propone en este estudio para el establecimiento de la derivación esencial, sería el análisis de la muestra problema con los 9 loci microsatélite, y la comparación de la misma con una completa base de datos, al igual que en el estudio de Identificación. En función de los estudios llevados a cabo usando este sistema en una colección de referencia de casi 500 genotipos distintos, existen dos tipos alternativos de resultados donde podría aceptarse que una determinada variedad es una EDV de otra variedad. Estos dos tipos de resultados corresponderían a los casos 1 y 2 representados en la **Figura R18**, página 185, puesto que el caso 3 excluye generalmente la posibilidad de EDV en vid. Normalmente podrían surgir dudas en el caso de EDV obtenidas por cruces recurrentes con la inicial, ya que hay variedades no derivadas esencialmente que muestran un alto porcentaje de alelos compartidos. Por supuesto, ello depende en

gran medida de la frecuencia de los alelos en cuestión. Una posible solución sería obligar a los solicitantes del nuevo título a aportar en la solicitud, o al menos en caso de duda, el pedigrí de la nueva variedad. Así se podría estudiar la probabilidad de obtener el genotipo de la nueva variedad a partir de ese pedigrí, y compararlo con la probabilidad de obtenerlo tras un uso recurrente de la variedad inicial, estableciendo una razón de verosimilitud. El punto de partida por supuesto, sería establecer por parte de la UPOV (no se ha hecho) qué se considera un uso recurrente de una variedad. No obstante, en vid, por tratarse de una especie leñosa de ciclo anual y alto nivel de heterocigosis, este tipo de mejora genética no es una práctica común.

Puesto que por definición una EDV es distinta de la variedad inicial, si al analizar la variedad inicial y la EDV putativa con los 9 microsatélites evaluados en este trabajo, mostrasen para ellos una identidad total, como se indica en el caso 1 de la **Figura R18**, la única conclusión sería considerar que una de las variedades es una EDV de la otra. Estos resultados deberían ser suficientes como para revertir el peso de la prueba y, como se ha mencionado anteriormente, el segundo obtentor tendría que probar que en su variedad no predomina la derivación, o que él no ha usado la variedad inicial, o una EDV de esa variedad inicial.

El otro posible resultado sería el representado en el caso 2 de la **Figura R18**, cuando al analizarse la variedad inicial y la EDV putativa con los 9 loci, mostrasen entre ellas una diferencia en 1 alelo. Al igual que en el estudio de Identificación, dado que puede tratarse de variedades muy próximas, se propone estudiar un número mayor de microsatélites, como podría ser el set de 16 microsatélites adicionales empleados en este trabajo en el estudio de Distinción. Si existe una coincidencia total en los nuevos microsatélites, la conclusión debería ser como el primer caso. De lo contrario, se propone que si existe una diferencia de 1 o más alelos en los nuevos microsatélites, se considere que la variedad en cuestión no es una EDV.

4.5.2. Protección legal

4.5.2.1. Exámenes DHE

Para incorporar un nuevo tipo de marcador a los exámenes DHE, no sólo tendría que demostrar su utilidad para la distinción, sino que, dado que una variedad debe ser estable y homogénea para los caracteres usados en la distinción, estos marcadores deben ser también estables y homogéneos. De lo contrario, obligaría a los obtentores a un trabajo de selección adicional para mantener estas características estables.

En este trabajo, con respecto al estudio de Distinción, empleando el sistema de 9 loci microsatélite y una colección de casi 500 genotipos, se calculó la distancia mínima. Para ello se determinó: la menor diferencia intersortogrupo y la mayor diferencia intrasortogrupo, ambas medidas en número de alelos diferentes. Dos casos fueron encontrados donde el menor número de alelos diferentes entre plantas pertenecientes a diferentes sortogrupos fue 2. Y, el mayor número de alelos diferentes dentro de plantas pertenecientes al mismo sortogrupo fue 1. Por lo tanto, con los resultados obtenidos en este estudio, la distancia mínima entre dos plantas para considerarlas pertenecientes a diferentes sortogrupos mediante el uso de estos 9 loci sería de 2 alelos.

Con respecto a la homogeneidad y estabilidad del sistema de 9 loci, los resultados mostrados en este trabajo indican que en general, estos microsatélites son muy homogéneos y estables, haciendo innecesario para los obtentores cualquier esfuerzo adicional para mantener la homogeneidad y estabilidad de los mismos en el desarrollo de nuevas variedades. En el caso de las posibles quimeras encontradas en este estudio, los microsatélites implicados en este fenómeno deberían ser descartados para la variedad en concreto donde se detectaron, y reemplazarlos por otros microsatélites, si el resto de los del sistema no fuera suficiente para distinguir una variedad de vid.

Al igual que para el estudio de Identificación, partiendo de la experiencia de muchos años en el laboratorio de Biología Molecular de la Finca El Encín, y del trabajo aquí presentado, se propone un procedimiento general sobre cómo utilizar el sistema de 9 loci microsatélite en los exámenes DHE. El procedimiento es en esencia idéntico al explicado para la identificación, pero las conclusiones pueden

ser diferentes. Consistiría en tres etapas: 1) análisis de la variedad que se quiere proteger con los 9 loci microsatélite, 2) comparación de la misma con una completa base de datos, que corresponderá a la colección de referencia analizada también con los 9 loci, con la que después se comparará morfológicamente, y 3) toma de decisiones. Los tres resultados que se pueden obtener son los mismos que los recogidos en la **Figura R18**, página 185, pero en este caso, el resultado más importante es el 3:

1. Coincidencia total de los alelos: cuando exista una coincidencia en los 9 loci microsatélite, la conclusión inicial será que las dos plantas pertenecen al mismo sortogrupo: o bien las dos plantas pertenecen a la misma variedad, o una es una EDV o un “sport” de la otra, o son clones de la misma variedad, o son sinónimas (**Figura R18**). La decisión final de si se puede establecer la distinción dependerá de otras características (ej. morfológicas, etc.), pero la ventaja que esto supone contrastando con la situación actual es: que se ha reducido el número de plantas a comparar con descriptores morfológicos para llegar a una conclusión final.
2. Un alelo diferente: dadas las implicaciones económicas que podrían existir, y que puede tratarse de variedades muy próximas, se propone estudiar un número mayor de microsatélites, como podría ser el set de 16 microsatélites adicionales mencionado en varias ocasiones. Si existe una coincidencia total en los nuevos microsatélites, la conclusión debería ser como el primer caso. De lo contrario, se propone que si existe una diferencia de 1 o más alelos en los nuevos microsatélites analizados, pertenecería al tercer caso, que las dos plantas corresponden a sortogrupos diferentes, por lo que a la variedad analizada se le podría otorgar un nuevo título de obtención vegetal, con el consiguiente ahorro de tiempo que ello supondría.
3. Dos alelos diferentes: la conclusión será que las dos plantas pertenecen a sortogrupos diferentes. Es decir, se da por probada la distinción. En este caso se podría otorgar el título de obtención vegetal a la variedad analizada sin necesidad de recurrir a los caracteres morfológicos, aunque en la actualidad, la descripción morfológica es obligatoria.

4.5.2.2. Manejo de una colección de referencia

La UPOV establece en sus directrices para la ejecución del examen de la Distinción, la Homogeneidad y la Estabilidad en vid (*Vitis* L.) (TG/50/8), que el modo de agrupar las variedades en las colecciones de referencia, será el siguiente:

1. La colección de las variedades que vayan a cultivarse se deberá dividir en grupos para facilitar la evaluación de la distinción. Para empezar, se deberá dividir la colección en variedades para la producción de frutos y en variedades no utilizadas para la producción de frutos.
2. Además, los caracteres que deberán utilizarse para definir los grupos serán los que la experiencia haya demostrado que no varían, o que varían poco dentro de una variedad, y cuyos diferentes niveles de expresión están repartidos con suficiente uniformidad en la colección. Se recomienda a las autoridades competentes que utilicen el color de la epidermis de la baya para agrupar las variedades.

Una forma mucho más práctica de agrupar las variedades que componen las colecciones de referencia sería plantar juntas las variedades que tuvieran mayor similitud genética, es decir, en el caso de microsatélites, aquellas que presentaran entre sí un menor número de alelos diferentes. De este modo, una vez analizada la variedad aspirante al título de obtención vegetal con los 9 loci microsatélite, si se generase algún tipo de duda en cuanto a su identidad y fuese necesario analizarla con un mayor número de microsatélites o compararla morfológicamente con las variedades más cercanas genéticamente a ella, este agrupamiento sería de gran utilidad, ya que las variedades más próximas estarían más cerca, y únicamente 2 o unas pocas variedades tendrían que ser contrastadas morfológicamente para llegar a una conclusión final.

4.5.3. Análisis crítico individualizado de los 9 loci microsatélite

Para evaluar de forma individualizada el comportamiento de los 9 loci microsatélite en este trabajo, se valoró la capacidad de amplificación conjunta de los mismos en PCR múltiple, y su comportamiento en los diferentes estudios realizados.

En cuanto a su comportamiento en las amplificaciones, de las casi 3.800 PCR múltiples realizadas, únicamente en el 14% amplificaron conjuntamente los 9 microsatélites. Aún a pesar de esto, es importante remarcar que en esas múltiples se amplificaron entre 6 y 7 microsatélites a la vez, con el consiguiente ahorro de tiempo y costes que ello supone. En aquellas muestras donde la PCR múltiple no funcionó al 100%, hubo que recurrir a la amplificación individual o múltiple de los microsatélites no amplificados. Los loci con un comportamiento menos adecuado en las PCR múltiples fueron el ZAG67 y el VVMD27, que requirieron repetición de la PCR en un 52% y en un 66%, respectivamente. Los restantes loci, en función de su adecuado comportamiento en las amplificaciones conjuntas, se ordenan del siguiente modo: ZAG83, ZAG112, ZAG62, ZAG29, VVS2, VVMD28 y VVMD5, atendiendo a los datos presentados en la **Tabla R4**, página 97.

No se ha podido determinar la causa de la irregular amplificación conjunta de los 9 loci. Posiblemente puede ser debida a la inestabilidad de algunos cebadores con el paso del tiempo, a cambios en la producción de la enzima, a modificaciones en la pureza de los cebadores, a posibles impurezas presentes la solución de ADN, etc.

Hay que destacar el alto poder de resolución que ha presentado el sistema de 9 loci en los diferentes estudios llevados a cabo en este trabajo. Como en la valoración anterior, hubo loci más informativos que otros. Así por ejemplo, mientras 8 microsatélites del conjunto presentaron un valor medio de Heterocigosidad observada de 0,82, el locus ZAG29 mostró un valor de 0,33, siendo por ello el locus menos revelador del sistema. Debido a esto, el locus ZAG29 podría ser sustituido por otro locus más resolutivo.

Otro posible candidato a ser sustituido por otro locus sería el microsatélite VVMD27, para el cual la variedad Merlot presentó una falta de homogeneidad y estabilidad debido a la presencia de tres alelos en ese locus. Aunque hay que remarcar que estamos ante un caso fácilmente detectable (3 alelos), y por tanto no supondría un riesgo de error en el genotipado.

Teniendo en cuenta los 3 microsatélites del sistema que en las valoraciones anteriores han presentado alguna limitación (ZAG29, ZAG67 y VVMD27), los 6 loci restantes han mostrado un comportamiento adecuado en todos los estudios recogidos en esta tesis doctoral. Siguiendo un orden de preferencia en base a los

valores de Heterocigosidad observada y al comportamiento en PCR múltiple, estos loci se ordenarían del siguiente modo: VVS2, ZAG62, ZAG112, ZAG83, VVMD5 y VVMD28.

4.6. PROPUESTA DE 5 NUEVOS DESCRIPTORES MICROSATÉLITE

De los 9 loci microsatélite evaluados en esta tesis doctoral, hay descriptores para 4 de ellos (VVS2, VVMD5, VVMD27 y ZAG62) (This et al., 2004). En este estudio se han elaborado descriptores para los 5 loci restantes.

Las 45 muestras procedentes del proyecto GENRES081 detalladas en la **Tabla M24** de Materiales y Métodos, página 72, y amplificadas con los microsatélites: ZAG29, ZAG67, ZAG83, ZAG112 y VVMD28, dieron lugar a los genotipos detallados en la **Tabla R54**.

Se amplificaron conjuntamente los loci: ZAG29, ZAG83, ZAG112 y VVMD28. El locus ZAG67 se amplificó individualmente debido a los problemas que presentó en las amplificaciones conjuntas, como ya se comentó anteriormente.

Tabla R54. Genotipos obtenidos para los 45 cultivares utilizados en el proyecto GENRES081 con los microsatélites: ZAG29, ZAG67, ZAG83, ZAG112 y VVMD28.

VARIEDAD	ZAG29		ZAG67		ZAG83		ZAG112		VVMD28	
Admirable de Courtiller	109	109	137	151	201	201	227	240	232	266
Alvarelhao	109	113	129	137	201	201	238	238	232	256
Agiorgitiko	111	111	147	147	190	192	232	232	256	256
Cabernet franc	109	109	137	137	195	201	227	240	226	234
Cabernet sauvignon	109	109	123	137	201	201	227	232	232	234
Carignan	109	109	123	137	195	195	227	236	246	256
Castel 216-3	129	133	155	155	188	188	240	253	218	240
Chardonnay	109	109	137	149	190	201	238	238	216	226
Couderc 1616	117	133	155	160	188	188	245	253	240	248
Couderc 3309	111	135	158	170	188	188	245	247	237	244
Fercal	115	121	143	143	190	217	227	255	218	242
Furmint	109	111	137	147	190	190	238	240	226	246
Goethe 9	111	139	155	155	217	217	240	245	234	237
Hans	109	109	123	147	190	195	232	232	234	266
Jacquez	109	111	123	135	192	201	227	245	228	234
Kober 5 BB	117	123	141	162	166	185	227	240	214	250
Madeleine royale	109	113	137	151	190	201	227	238	216	242
Malegue 44-53	117	129	155	155	185	188	238	247	226	250
Mancin	109	113	151	151	195	201	232	240	246	246
Mauzac	109	111	123	137	201	201	227	232	226	232
Mavrodaphni	109	109	129	153	192	192	227	232	234	242
Merlot	109	109	129	137	195	201	227	240	226	232
Millardet et Grasset 101-14	111	119	155	166	188	188	240	240	240	248
Millardet et Grasset 420A	115	133	149	158	188	190	227	240	242	244
Mourvedre	109	109	137	137	192	201	227	232	242	256
Muscat a petits grains blancs	109	109	123	137	190	190	232	232	244	266
Muscat of Alexandria	109	109	123	123	190	190	232	245	242	266
Paulsen 1103	113	117	147	176	166	188	227	240	240	250
Pinot noir	109	113	123	151	190	201	238	240	216	234
Portugieser blau	111	113	123	129	192	195	227	238	226	258
Richter 110	125	129	139	139	174	217	247	249	218	232

Resultados y Discusión

VARIEDAD	ZAG29		ZAG67		ZAG83		ZAG112		VVMD28	
Richter 99	117	129	141	176	174	188	227	247	218	234
Romorantin	109	109	137	151	190	195	240	240	226	234
Rondinella	109	109	137	147	190	201	227	227	244	256
Ruggeri 140	113	125	139	155	188	195	227	247	232	240
Salvador (= Seibel 128)	111	119	129	143	176	190	227	247	244	246
Schwarzmann	113	129	155	176	185	188	240	240	214	242
Silvaner	109	113	123	158	190	192	236	238	226	234
Sultanina gigas	109	111	123	137	190	195	227	259	216	242
Teleki 5 C	117	129	141	162	159	166	227	240	214	250
Traminer rot	109	113	123	129	190	201	232	238	232	234
Trebbiano toscano	109	109	129	147	190	195	227	236	242	246
Veltliner rot	109	109	147	147	190	192	232	232	244	266
Vialla	113	139	145	162	161	185	240	277	224	234
Vital	109	109	123	137	192	195	227	227	232	246

A partir de estos datos, y de los recogidos en la **Tabla R16**, página 141, en la cual se representa el recuento de cada uno de los alelos correspondientes a los 9 loci microsatélite presentes en las 495 variedades que forman la “Colección de genotipos únicos”, se elaboró la **Tabla R55**.

Tabla R55. En esta tabla están representados todos los alelos de los 5 microsatélites para los que se quieren elaborar descriptores. Todos ellos se encuentran en la “Colección de genotipos únicos”. Sombreados en azul aparecen destacados los alelos que no aparecían en los 45 cultivares del proyecto GENRES081. Y sombreados en amarillo y en negrita, aquellos alelos que eran exclusivos del análisis de estos 45 cultivares.

ALELOS	ZAG29	ZAG67	ZAG83	ZAG112	VVMD28
1	107	120	159	227	214
2	109	123	161	229	216
3	111	129	166	232	218
4	113	131	172	234	224
5	115	135	174	236	226
6	117	137	176	238	228
7	119	139	184	240	230
8	121	141	185	243	232
9	123	143	188	245	234
10	125	145	190	247	237
11	129	147	192	249	240
12	131	149	195	251	242
13	133	151	201	253	244
14	135	153	207	255	246
15	139	155	217	259	248
16		158		277	250
17		160			252
18		162			256
19		166			258
20		170			260
21		176			262
22					266
23					282

El siguiente paso, de forma análoga a This et al. (2004), fue codificar cada uno de los alelos obtenidos con los códigos correspondientes a los cultivares que se tomaron como referencia. Cuando fue posible, para facilitar su uso, se emplearon los cultivares ya utilizados como referencia en los descriptores anteriores, y que se

muestran en la **Tabla M24** de Materiales y Métodos, página 72. Del total de estos 33 cultivares de referencia, 31 coincidían con los de This et al. (2004). Los cultivares Kober 5 BB y Mavrodaphni, presentes en la **Tabla M24**, fueron incluidos adicionalmente como cultivares de referencia, debido a que presentaron alelos exclusivos en 2 de los 5 loci sobre los que se elaboraron descriptores.

Los alelos destacados en azul en la **Tabla R55**, que no aparecían en los 45 cultivares del proyecto GENRES081, y que pertenecían a variedades incluidas en la “Colección de genotipos únicos”, fueron codificados en función del nombre de la variedad que presentó ese alelo en particular. Fueron necesarias 15 variedades como referencia para estos alelos. Sus nombres aparecen detallados en el **Anexo II**, página 223.

En total se han empleado en los 5 descriptores 48 variedades de referencia, entre las que se encuentran incluidas 10 variedades bien conocidas: Cabernet sauvignon, Cabernet franc, Chardonnay, Merlot, Muscat a petits grains blancs, Pedro Ximenez, Pinot noir, Sultanina (o Thompson seedless), Silvaner y Traminer rot (o Gewürztraminer); 9 portainjertos bien conocidos: Couderc 1616, Couderc 3309, Millardet et Grasset 41B, Millardet et Grasset 101-14, Millardet et Grasset 420A, Oberlin 595, Richter 99, Richter 110 y Teleki 5C (su inclusión era importante no solo por su importancia general en el cultivo de vid, sino por el alto número de alelos exclusivos que aportan, los cuales no se encuentran en los cultivares de *Vitis vinifera*), 3 especies del género *Vitis* no *vinifera* presentes en la “Colección de genotipos únicos”: *Vitis aestivalis*, *Vitis arizonica* y *Vitis cinerea* (mostraron alelos exclusivos, no representados en los cultivares de *Vitis vinifera*); y algunos cultivares menos conocidos, para contar con la mayor cantidad de alelos posibles por locus.

Para llevar a cabo la asignación de los alelos de referencia, se dio preferencia a los cultivares de referencia bien conocidos, excepto para aquellos alelos que fueron detectados sólo en cultivares raros. Por ejemplo, el alelo 123 del locus ZAG67 corresponde al alelo 1 de este locus para la variedad Cabernet sauvignon (**Tabla R54**, página 193), por lo que le asignamos el código CS1. Todos los valores de los alelos con sus códigos correspondientes aparecen representados en la **Tabla R56**.

Tabla R56. Valores de los alelos presentes en la **Tabla R55**, página 195, con sus códigos de referencia correspondientes.

ZAG29		ZAG67		ZAG83		ZAG112		VVMD28	
Valor	Código	Valor	Código	Valor	Código	Valor	Código	Valor	Código
107	41BM1	120	AB1	159	5C1	227	ME1	214	5C1
109	ME1	123	CS1	161	VIA1	229	MA1	216	CH1
111	PO1	129	ME1	166	5C2	232	CS2	218	99R1
113	PO2	131	PE1	172	AP1	234	AM2	224	VIA1
115	FE1	135	JA2	174	11R1	236	SI1	226	ME1
117	16C1	137	ME2	176	SAL1	238	PO2	228	JA1
119	1MG2	139	11R1	184	CIN1	240	ME2	230	AR1
121	FE2	141	99R1	185	VIA2	243	AE2	232	ME2
123	5BK2	143	FE1	188	33C1	245	JA2	234	CS2
125	11R1	145	VIA1	190	SU1	247	33C2	237	33C1
129	11R2	147	VE1	192	SI2	249	11R2	240	16C1
131	595O2	149	CH2	195	ME1	251	VR2	242	SU2
133	16C2	151	PI2	201	ME2	253	16C2	244	MU1
135	33C2	153	MAV 2	207	AE2	255	FE2	246	MAN1
139	VIA2	155	16C1	217	FE2	259	SU2	248	16C2
		158	33C1			277	VIA2	250	5C2
		160	16C2					252	MB2
		162	5C2					256	AL2
		166	1MG2					258	PO2
		170	33C2					260	MD2
		176	99R2					262	PX2
								266	MU2
								282	CIN2

En This et al. (2004), se obtuvo un total de 107 alelos con los 6 marcadores empleados (desde 13 a 23 alelos cada uno) con un valor medio de 17,8 alelos por locus.

En esta tesis, han sido detectados 90 alelos con los 5 marcadores empleados (desde 15 a 23 alelos cada uno) con un valor medio de 18 alelos por locus. Este valor es muy alto comparado con otros datos publicados en vid. En Bowers et al. (1999a) detectaron una media de 11 alelos por locus con 350 cultivares franceses, y en Sefc et al. (2000) detectaron una media de 9,8 alelos por locus con un set de 164 cultivares. No se puede excluir que aparezcan nuevos alelos especialmente en especies diferentes de *Vitis vinifera*.

En el **Anexo II**, página 223, se muestran 5 descriptores adicionales a los elaborados durante el proyecto GENRES081; corresponden a los siguientes microsatélites: ZAG29, ZAG67, ZAG83, ZAG112 y VVMD28. Estos descriptores se han elaborado de forma análoga a la OIV. En cada uno de ellos se detalla la secuencia del cebador en cuestión y los distintos tamaños de alelos presentados durante el análisis para ese locus. Además, para cada uno de los alelos, se exponen ejemplos de variedades que también presentaron ese mismo valor alélico.

La propuesta incluye variedades cuya homogeneidad y estabilidad para estos microsatélites no ha sido evaluada, por lo que sería necesario analizar muchas más muestras de cada cultivar. Ya que, por ejemplo en This et al. (2004), Merlot fue uno de los cultivares empleados para codificar el locus VVMD27, y en el estudio de Homogeneidad y Estabilidad llevado a cabo en esta tesis doctoral, se ha demostrado que este locus no es ni homogéneo ni estable en la variedad Merlot. Además, también sería conveniente realizar un “ring test”, igual que se hizo en This et al. (2004), para analizar en distintos laboratorios las mismas muestras y ver si obtienen resultados análogos. En cualquier caso, estos 5 nuevos descriptores microsatélite resultan de gran utilidad, ya que los 9 microsatélites empleados actualmente por la Oficina Española de Variedades Vegetales para ayudar a caracterizar su colección de referencia (los utilizados en este estudio), tienen ya, todos ellos, descriptores para facilitar su uso al resto de la comunidad vitícola.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Se han seleccionado los siguientes 9 microsatélites: ZAG29, ZAG62, ZAG67, ZAG83, ZAG112, VVMD5, VVMD27, VVMD28 y VVS2. Para la amplificación conjunta de estos loci, se ha desarrollado una mezcla múltiple. En el 100% de las reacciones de PCR realizadas con esta mezcla, se amplificaron a la vez un mínimo de 6 loci microsatélite.
2. En el estudio de Distinción, una colección formada por 1.023 accesiones de vid ha sido analizada con el sistema de 9 loci, pudiendo determinar en la misma las diferencias intra e intersortogrupo en número de alelos. El menor número de alelos diferentes entre plantas pertenecientes a diferentes sortogrupos fue 2. Y, el mayor número de alelos diferentes dentro de plantas pertenecientes al mismo sortogrupo fue 1.
3. En base a las diferencias obtenidas en el punto 2 y a la bibliografía consultada, se ha establecido la distancia mínima en 2 alelos.
4. A partir del estudio de Distinción se ha obtenido una “Colección de genotipos únicos” compuesta por 495 variedades.
5. Únicamente fueron necesarios 5 de los 9 loci, para identificar las 495 variedades de la colección citada en el punto 4. Al emplear 4 microsatélites más en los análisis, se incrementa el grado de certeza de la identificación, disminuyendo la PI hasta $6,87 \times 10^{-12}$.
6. El análisis de estructura aplicado a la colección de 495 variedades, ha detectado 4 poblaciones diferentes. Éstas se han formado atendiendo al uso y al origen de sus variedades.
7. Usando como referencia tanto la “Colección de genotipos únicos” como las 4 poblaciones detectadas en el análisis de estructura, se han obtenido valores elevados de LR para poder identificar las variedades seleccionadas como muestras problema. Estos resultados se podrían considerar concluyentes en la identificación

Conclusiones

legal de variedades de vid, incluida la valoración de las infracciones sobre los derechos de los obtentores.

8. Las 19 variedades seleccionadas para el estudio de Homogeneidad y Estabilidad, resultaron representativas en función de sus frecuencias alélicas. Los alelos detectados en estas 19 variedades, estuvieron representados con una frecuencia casi del 92% en la colección formada por 495 variedades de genotipo distinto.

9. En el estudio de Homogeneidad y Estabilidad, contando con un número elevado de datos (unas 185 plantas de cada una de las 19 variedades seleccionadas), casi el 98% de todos los valores alélicos GeneScan obtenidos para los 9 loci microsatélite en las 19 variedades estudiadas, presentaron unas diferencias menores o iguales a 1 nucleótido entre sus valores extremos.

10. En un destacable número de plantas de la variedad Merlot, se detectó la presencia de tres alelos en el locus VVMD27.

11. No se ha detectado ninguna mutación fijada de cambio de genotipo en el gran número de plantas analizadas en el estudio de Homogeneidad y Estabilidad, por lo que los 9 loci microsatélite han demostrado ser muy homogéneos y estables, haciendo innecesario para el obtentor cualquier esfuerzo adicional para mantener estas cualidades en el desarrollo de nuevas variedades.

12. Se ha elaborado una propuesta de utilización del sistema y toma de decisiones para la protección legal de variedades de vid, incluyendo en ella los exámenes DHE. Si al analizar dos plantas con el sistema propuesto, presentan entre sí una diferencia de 2 o más alelos, se daría por probada la distinción.

13. Se ha elaborado una propuesta de utilización del sistema y toma de decisiones para la defensa legal de variedades de vid, incluyendo en ella la identificación, y el establecimiento de la derivación esencial, donde si en el análisis se encuentran 0 ó 1 alelos de diferencia entre las dos plantas analizadas, en el primer caso se concluiría que las dos plantas pertenecen a la misma variedad o una

es una EDV de la otra, mientras que en el segundo, se propone estudiar un número mayor de microsatélites para confirmar esta conclusión.

14. Se ha propuesto una forma más práctica de agrupar las variedades que componen las colecciones de referencia, que la establecida por la UPOV para la ejecución del examen DHE. En esta propuesta se plantarían juntas aquellas variedades con mayor similitud genética.

15. Seis loci del sistema han mostrado un comportamiento más adecuado en los estudios recogidos en esta tesis doctoral. Estos loci, según sus valores de Heterocigosidad observada y su comportamiento en PCR múltiple, se ordenan del siguiente modo: VVS2, ZAG62, ZAG112, ZAG83, VVMD5 y VVMD28. ZAG67 y VVMD27, fueron los microsatélites que presentaron un comportamiento menos adecuado en las PCR múltiples, y el locus ZAG29 resultó ser el menos polimórfico.

16. De forma análoga a la OIV, en este trabajo se han elaborado 5 nuevos descriptores microsatélite: ZAG29, ZAG67, ZAG83, ZAG112 y VVMD28. De esta manera, los 9 microsatélites estudiados aquí tienen sus descriptores.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alleweldt G. y J.V. Possingham. 1988. *Progress in grapevine breeding*. Theoretical and Applied Genetics 75: 669-673.
- Arroyo-García R., L. Ruiz-García, L. Bolling, R. Ocete, M.A. López, C. Arnold, A. Ergul, G. Soylemezoglu, H.I. Uzun, F. Cabello, J. Ibanez, M.K. Aradhya, A. Atanassov, I. Atanassov, S. Balint, J.L. Cenis, L. Costantini, S. Gorislavets, M.S. Grando, B.Y. Klein, P.E. McGovern, D. Merdinoglu, I. Pejic, F. Pelsy, N. Primikiriou, V. Risovannaya, K.A. Roubelakis-Angelakis, H. Snoussi, P. Sotiri, S. Tamhankar, P. This, L. Troshin, M. Malpica, F. Lefort y J.M. Martínez Zapater. 2006. *Multiple origins of cultivated grapevine (Vitis vinifera L. ssp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms*. Molecular Ecology 15: 3707-3714.
- Bertsch C., F. Kieffer, P. Maillot, S. Farine, G. Butterlin, D. Merdinoglu y B. Walter. 2005. *Genetic chimerism of Vitis vinifera cv. Chardonnay 96 is maintained through organogenesis but not somatic embryogenesis*. BMC Plant Biology 5:20.
- Borrego J., J.F. Gallego, L. Serrano, J.L. Gómez e I. Martínez. 1990. *Descripciones ampelográficas nacionales*. Madrid.
- Borrego J., M.T. de Andrés y J. Ibáñez. 2000. *Análisis de ADN para identificación de variedades de vid*. Variedades de la vid en la Comunidad de Madrid. Págs.115-132. Comunidad de Madrid. Consejería de Medio Ambiente. Dirección General de Educación y Promoción Ambiental, Madrid.
- Botta R., N.S. Scott, I. Eynard y M.R. Thomas. 1995. *Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing Vitis vinifera cultivars*. Vitis 34 (2): 99-102.
- Bould A. 1996. *Current procedures for DUS*. Vienna, DGXII Biotechnology. Commission of the European Communities. Págs.76-81.
- Bourquin J.C., A. Sonko, L. Otten y B. Walter. 1993. *Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in Vitis vinifera L.* Theoretical and Applied Genetics 87: 431-438.
- Bowers J.E., G.S. Danyl, R. Vignani y C.P. Meredith. 1996. *Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (Vitis vinifera L.)*. Genome 39: 628-633.
- Bowers J.E. y C.P. Meredith. 1996. *Genetic similarities among wine grape cultivars revealed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis*. Journal of the American Society for Horticultural Science 121 (4): 620-624.
- Bowers J.E., J.M. Boursiquot, P. This, K. Chu, H. Johansson y C.P. Meredith. 1999a. *Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France*. Science 285: 1562-1565.

Bibliografía

- Bowers J.E., G.S. Dangl y C.P. Meredith. 1999b. *Development and characterization of additional microsatellite DNAMarkers for grape*. American Journal of Enology and Viticulture 50 (3): 243-246.
- Bredemeijer G.M.M., R. Cooke, M. Ganal, R. Peeters, P. Isaac, Y. Norordijk, S. Rendell, J. Jackson, M.S. Röder, K. Wendehake, M. Dijcks, M. Amelaine, V. Wickaert, L. Bertrand y B. Vosman. 2002. *Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties*. Theoretical and Applied Genetics 105: 1019-1026.
- Cabello F. 1995. *La colección de vides de "El Encín"*. I.S.B.N.: 84-451-1045-4. Imprenta de la Comunidad de Madrid.
- Cabello F., M.T. de Andrés, T. Arroyo, J. Borrego, J.M. Cabellos, J. Chávez, K. Fernández, J.F. Gallego, E. García-Beneytez, P. Hidalgo, J. Ibáñez, G. Muñoz, J.M. Ortiz, E. Revilla e I. Rodríguez-Torres. 2000. *Variedades de la vid en la Comunidad de Madrid*. Consejería de Medio Ambiente. Dirección General de Educación y Promoción Ambiental.
- Cabello F. 2004. *Situación del patrimonio varietal de la especie Vitis vinifera L.* En: ACE Revista de Enología. Editorial Rubes. Nº 47.
- Carracedo A. y F. Barros. 1996. *Problemas bioestadísticos en genética forense*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Carreño J., A. Martínez-Cutillas, E. García, M. Ortiz, M.F. Pinilla y M.G. García. 1997. *Cultivo de embriones de vid (Vitis vinifera L.) para la obtención de nuevas variedades de uva de mesa sin semillas*. Viticultura/Enología Profesional 52 (Octubre/Diciembre): 37-45.
- Cervera M.T., J.A. Cabezas, C. Gomez y J.M. Martinez Zapater. 2001. *Análisis de la variabilidad intravarietal de la vid mediante el empleo de marcadores de alta eficacia*. En: ACE Revista de Enología. Editorial Rubes. Nº 14
- Cipriani G., G. Frazza, E. Peterlunger y R. Testolin. 1994. *Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats*. Vitis 33: 211-215.
- Crespan M., R. Botta y N. Milani. 1999. *Molecular characterization of twenty seeded and seedless table grape cultivars (Vitis vinifera L.)*. Vitis 38 (3): 87-92.
- Crespan M. 2004. *Evidence on the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of Vitis vinifera L.* Theoretical and Applied Genetics 108: 231-237.
- Chomé P., V. Sotés, F. Benayas, M. Cayuela, M. Hernández, F. Cabello, J. Ortiz, I. Rodríguez-Torres y J. Chaves. 2003. *Variedades de vid. Registro de variedades comerciales*. Centro de Publicaciones. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Dalbó M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden, H. Steinkellner, K.M. Sefc y B.I. Reisch. 2000. *A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map*. Genome 43: 333-340.

- Di Gaspero G., E. Peterlunger, R. Testolin, K.J. Edwards y G. Cipriani. 2000. *Conservation of microsatellite loci within the genus Vitis*. Theoretical and Applied Genetics 101: 301-308.
- Einset J. y C. Pratt. 1954. *"Giant" sports of grapes*. American Society for Horticultural Science 63: 251-256.
- Evanno G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. *Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study*. Molecular Ecology 14: 2611-2620.
- Excoffier L., G. Laval y A. Schneider. 2005. *Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis*.
- Falush D., M. Stephens y J.K. Pritchard. 2003. *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies*. Genetics 164: 1567-1587.
- Franks T.R., R. Botta, M.R. Thomas y J. Franks. 2002. *Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement*. Theoretical and Applied Genetics 104: 192-199.
- Frei A., D. Baumgartner, J.E. Frey y J. Gafner. 2004. *Optimized identification of grapevine cultivars using multiplex microsatellite markers*. Botanica Helvetica 114: 169-179.
- Galet P. 1956-1964. *Cépages et Vignobles de France*. Le Paysan du Midi. Montpellier.
- Galet, P. 1967. *Recherches sur les méthodes d'identification et de classification des Vitacées des zones tempérées*. Montpellier, Francia.
- Galet P. 2000. *Dictionnaire Encyclopédique des Cépages*. Hachette.
- Ghosh S., Z.E. Karanjawala, E.R. Hauser, D.S. Ally, J.I. Knapp, J.B. Rayman, A. Musick, J. Tannenbaum, C. Te, S. Shapiro, W. Eldridge, T. Musick, C. Martin, J.R. Smith, J.D. Carpten, M.J. Brownstein, J.I. Powell, R. Whiten, P. Chines, S.J. Nylund, V.L. Magnuson, M. Boehnke, F.S. Collins y F.F.-U.S.I.o.N.G.S. Group. 1997. *Methods for precise sizing, automated binning of alleles, and reduction of error rates in large-scale genotyping using fluorescently labeled dinucleotide markers*. Genome Research 7: 165-178.
- Grando M.S. y C. Frisinghelli. 1998. *Grape microsatellite markers: sizing of DNA alleles and genotype analysis of some grapevine cultivars*. Vitis 37(2): 79-82.
- Guo S. y E. Thompson. 1992. *Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles*. Biometrics 48: 361-372.
- Hidalgo L. 1999. *Tratado de Viticultura General*. 2ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid.
- Hidalgo L. 2002. *Tratado de Viticultura General*. 3ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid.

Bibliografía

- Hocquigny S., F. Pelsy, V. Dumas, S. Kindt, M.C. Heloir y D. Merdinoglu. 2004. *Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states*. *Genome* 47: 579-589.
- Ibáñez J. 1998. *Los microsatélites en identificación del material vegetal*. En: *Identificación molecular de Germoplasma de vid*. Ed. J.M. Ortiz. Fundación Premio Arce. IMIA, Madrid. Págs. 113-127.
- Ibáñez J. 2000. *Estudio genético de variedades de uva de mesa sin semillas (Vitis vinifera L.) mediante marcadores moleculares y su aplicación a la protección legal*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Ibáñez J., M.T. de Andrés y J. Borrego. 2000. *Allelic variation observed at one microsatellite locus between the two synonym grape cultivars Black Currant and Mavri Corinthiaki*. *Vitis* 39: 173-174.
- Ibáñez J., M.T. de Andrés, A. Molino y J. Borrego. 2003. *Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellite analysis*. *American Journal of Enology and Viticulture* 54: 22-30.
- Ibáñez J. y F.A. van Eeuwijk. 2003. *Microsatellite Profiles as a Basis for Intellectual Property Protection in Grape*. En: *Acta Horticulturae*. Número 603. Ed. E. Hajdu y É. Borbás. Págs. 41-47. ISHS, Leiden (The Netherlands).
- Ibáñez J., M.T. de Andrés, M.C. Fajardo, M.P. Fernández, E. García-Abad, C. González-Guillén, S. Hernaiz, O. Sierra, A.M. Vargas, M.D. Vélez y J. Borrego. 2006a. *"Sinonimias y homonimias de las variedades de la D.O. Vinos de Madrid. (I) Variedades Tintas"*. XXVII Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros. I.S.B.N.: 84-7930-089-2. Págs. 111-121.
- Ibáñez J., M.T. de Andrés, M.C. Fajardo, M.P. Fernández, E. García-Abad, C. González-Guillén, S. Hernaiz, O. Sierra, A.M. Vargas, M.D. Vélez y J. Borrego. 2006b. *"Sinonimias y homonimias de las variedades de la D.O. Vinos de Madrid. (II) Variedades Blancas"*. XXVII Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros. I.S.B.N.: 84-7930-089-2. Págs. 123-135.
- Imazio S., M. Labra, F. Grassi, A. Scienza y O. Failla. 2006. *Chloroplast microsatellites to investigate the origin of grapevine*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53 (5): 1003-1011.
- IPGRI, UPOV y OIV. 1997. *Descriptores para la vid (Vitis spp.)*. Unión Internacional para la protección de las obtenciones vegetales, Ginebra (Suiza) / Oficina Internacional de la viña y el vino, París (Francia) / Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma (Italia).
- ISF Position Papers. 2000. *Declaración sobre las pruebas DHE: Fenotipo vs. Genotipo*. Statements and Motions adopted by FIS, ASSINSEL and ISF.
- ISF Position Papers. 2003. *ISF View on Intellectual Property*. Position Papers, Statements and Motions adopted by FIS, ASSINSEL and ISF.

- ISF Position Papers. 2006. *Use of DNA markers for DUS testing, Essential Derivation and Identification*. Statements and Motions adopted by FIS, ASSINSEL and ISF.
- Kozjak P., Z. Korosec Koruza, I. Tomazic, J. Jakse y B. Javornik. 2001. *Evaluation of clonal variability of cv. Refosk (Vitis vinifera L.) by ampelographic parameters and microsatellite analysis*. Zbornik Biotehniske Fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo 77: 19-26.
- Kozjak P., Z. Kovosek-Koruza y B. Javornik. 2003. *Characterisation of cv. Refošk (Vitis vinifera L.) by SSR markers*. Vitis 42 (2) 83-86.
- Le Buanec B. 2000. *DUS testing: Phenotype vs Genotype*. Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA Profiling in particular. UPOV, Angers (France). Documento BMT/6/6. 5pp.
- Lefort F. y K.A. Roubelakis-Angelakis. 2001. *Genetic comparison of Greek cultivars of Vitis vinifera L. by nuclear microsatellite profiling*. American Journal of Enology and Viticulture 52: 101-108.
- Levinson G. y G.A. Gutman. 1987. *Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution*. Molecular Biology and Evolution 4: 203-221.
- Lodhi M.A. y B.I. Reisch. 1995. *Nuclear content of Vitis species, cultivars and other genera of the Vitaceae*. Theoretical and Applied Genetics 90: 11-16.
- Lopes M.S., K.M. Sefc, E. Eiras Dias, H. Steinkellner, M. Laimer da Câmara Machado y A. de Câmara Machado. 1999. *The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection*. Theoretical and Applied Genetics 99: 733-739.
- Maletic E., K.M. Sefc, H. Steinkellner, J.K. Kontic e I. Pejic. 1999. *Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and detection of synonymous cultivars in neighboring regions*. Vitis 38: 79-83.
- Martín J.P., J. Borrego, F. Cabello y J.M. Ortiz. 2003. *Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers*. Genome 46: 10-18.
- Merdinoglu D., G. Butterlin, L. Bevilacqua, V. Chiquet, A.F. Adam-Blondon y S. Decroocq. 2005. *Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (Vitis vinifera L.) suitable for multiplex PCR*. Molecular Breeding 15: 349-366.
- Meredith C.P., G.S. Dangi y J.E. Bowers. 1996. *Clarifying the identity of some California winegrapes by DNA profiling*. Rivista di Viticoltura e di Enologia 49: 65-68.
- Moncada X., F. Pelsy, D. Merdinoglu y P. Hinrichsen. 2006. *Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers*. Genome 49: 1459-1472.

Bibliografía

- Ortiz J.M. 1998. *Identificación molecular de Germoplasma de vid*. En: Jornadas de Agronomía. Ed. J. L. Sainz. Fundación Premio Arce. IMIA, Madrid.
- Park S. 2001. *Microsatellite Toolkit for Excel*. Smurfit Institute of Genetics, Trinity College, Dublin 2, Ireland.
- Pritchard J.K., Stephens M. y Donnelly P. 2000. *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data*. Genetics 155: 945-959.
- Pritchard J.K. y W. Wen. 2003. *Documentation for structure software: Version 2*. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu>.
- Regner F., A. Stadlbauer, C. Eisenheld y H. Kaserer. 2000a. *Genetic relationships among Pinots and related cultivars*. American Journal of Enology and Viticulture 51: 7-14.
- Regner F., E. Wiedeck y A. Stadlbauer. 2000b. *Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers*. Vitis 39: 103-107.
- Represa D. 1998 *La protección de resultados de la investigación*. En: Los derechos de propiedad de las obtenciones vegetales. Ed. F. Nuez, G. Llácer y J. Cuartero. INIA, Madrid. Págs.19-45.
- Riaz S., K.E. Garrison, G.S. Dangl, J.M. Boursiquot y C.P. Meredith. 2002. *Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars*. Journal of the American Society for Horticultural Science 127: 508-514.
- Riaz S., G.S. Dangl, K.J. Edwards y C.P. Meredith. 2004. *A microsatellite marker based framework linkage map of Vitis vinifera L.* Theoretical and Applied Genetics 108: 864-872.
- Röder M.S., K. Wendehake, G.M.M. Bredemeijer, D. Laborie, L. Bertrand, P. Isaac, S. Rendell, J. Jackson, R.J. Cooke, B. Vosman y M. Ganal. 2002. *Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties*. Theoretical and Applied Genetics 106: 67-73.
- Rodríguez Torres I. 2001. *Caracterización de variedades de vid por métodos ampelográficos y bioquímicos. Resolución de homonimias y sinonimias*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Sanchez-Escribano E.M., J.P. Martin, J. Carreño y J.L. Cenis. 1999. *Use of sequence-tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars*. Genome 42: 87-93.
- Sefc K.M., F. Regner, J. Glossl y H. Steinkellner. 1998. *Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers*. Vitis 37 (1): 15-20.
- Sefc K.M., F. Regner, E. Turetschek, J. Glössl y H. Steinkellner. 1999. *Identification of microsatellite sequences in Vitis riparia and their applicability for genotyping of different Vitis species*. Genome 42: 367-373.

- Sefc K.M., M.S. Lopes, F. Lefort, R. Botta, K.A. Roubelakis-Angelakis, J. Ibáñez, I. Pejic, H.W. Wagner, J. Glössl y H. Steinkellner. 2000. *Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars*. Theoretical and Applied Genetics 100: 498-505.
- Srinivasan C. y M. Mullins. 1976. *Reproductive anatomy of the grapevine (Vitis vinifera L.): Origin and development of the Anlage and its derivatives*. Annals of Botany 38: 1079-1084.
- Tautz D. 1989. *Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers*. Nucleic Acids Research 17: 6463-6471.
- This P., A. Jung, P. Boccacci, J. Borrego, R. Botta, L. Costantini, M. Crespan, G.S. Dangl, C. Eisenheld, F. Ferreira-Monteiro, S. Grando, J. Ibáñez, T. Lacombe, V. Laucou, R. Magalhaes, C.P. Meredith, N. Milani, E. Peterlunger, F. Regner, L. Zulini y E. Maul. 2004. *Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars*. Theoretical and Applied Genetics 109: 1448-1458.
- This P., T. Lacombe y M.R. Thomas. 2006. *Historical origins and genetic diversity of wine grapes*. Trends in Genetics Vol.22 No.9.
- Thomas M.R. y N.S. Scott. 1993. *Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs)*. Theoretical and Applied Genetics 86: 985-990.
- Thomas M.R., P. Cain y N.S. Scott. 1994. *DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness*. Plant Molecular Biology 25: 939-949.
- Thompson M.M. y H.P. Olmo. 1963. *Cytohological studies of cytochimeric and tetraploid grapes*. American Journal of Botany 50: 901-906.
- Viala P. y V. Vermorel. 1901. *Ampélographie II*. Masson. Paris.
- Vos P., R. Hogers y et al. 1995. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research 23 (21): 4407-4414.
- Wagner H.W. y K.M. Sefc. 1999. *Identity*. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna.
- Welsh J. y M. McClelland. 1990. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. Nucleic Acids Research 18: 7213-7218.
- Williams J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski y S.V. Tingey. 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.
- Wolff R.K., R. Plaetke, A.J. Jeffreys y R. White. 1989. *Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci*. Genomics 5: 382-384.

Bibliografía

Zyprian E. y R. Topfer. No publicado, 2005. *Development of microsatellite-derived markers for Grapevine genotyping and genetic mapping.*

7. ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. ANEXO I. *Datos correspondientes a las 1.023 accesiones que formaron la colección global sobre la que se realizó el estudio de Distinción. Aparecen marcadas con un asterisco las 495 variedades que constituyeron la “Colección de genotipos únicos”, derivada del estudio anterior. Las muestras que no presentan código de parcela, son las muestras de Briones, las seleccionadas del estudio de establecimiento de descriptores microsatélite y las obtenidas del estudio de Homogeneidad y Estabilidad; y las que no muestran el país de origen, es debido a que en la bibliografía consultada no se especificaba con claridad este dato. Abreviaturas: Uso (EGV-especies del género *Vitis* no vinífera, HPD-híbridos productores directos, M-mesa, MV-mesa/vino, PTI-portainjerto, V-vino); Color (B-blanca, T-tinta).*

Anexos

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
1*	01-F12-15	MILLARDET ET GRASSET 101-14	PTI		FRANCIA	53*	22B01	NEGRA TARDÍA	M	T	ESPAÑA
2*	01-F12-21	MALEGUE 44-53	PTI		FRANCIA	54*	22B02	RAGOL	MV	T	ESPAÑA
3*	01-F12-27	COUDERC 1616	PTI		FRANCIA	55*	22B03	CIRUELA ROJA	M	T	ESPAÑA
4*	01-F13-15	TELEKI 5 BB	PTI		HUNGRÍA	56	22B04	DOMINGA	M	B	ESPAÑA
5*	01-F14-33	RICHTER 99	PTI		FRANCIA	57*	22B05	MOLINERA	M	T	ESPAÑA
6*	01-F16-18	CASTEL 216-3	PTI		FRANCIA	58	22B06	OHANES	M	B	ESPAÑA
7	22A03	CALAGRAÑO	V	B	ESPAÑA	59	22B07	DE CUERNO	M	B	ESPAÑA
8	22A04	GARNACHA	V	T	ESPAÑA	60*	22B08	DE CILINDRO	M	B	ESPAÑA
9*	22A05	GRACIANO	V	T	ESPAÑA	61*	22B09	IMPERIAL ROJA	M	T	ESPAÑA
10*	22A07	MAZUELO	V	T	ESPAÑA	62	22B10	PALOMINO DE JEREZ	V	B	ESPAÑA
11	22A08	GARNACHO BLANCO	V	B	ESPAÑA	63	22B12	PALOMINO 84	V	B	ESPAÑA
12	22A09	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	64*	22B13	BEBA	MV	B	ESPAÑA
13	22A10	CAGAZAL	V	B	ESPAÑA	65*	22B14	FERRAL	MV	T	ESPAÑA
14	22A11	GARNACHA BLANCA	V	B	ESPAÑA	66*	22B15	LISTÁN	V	B	ESPAÑA
15	22A13	MAZUELO	V	T	ESPAÑA	67*	22B16	GARRIDO FINO DE VILLANUEVA	V	B	ESPAÑA
16	22A15	MONASTRELL	V	T	ESPAÑA	68	22B17	HIGONZAL	V	B	ESPAÑA
17	22A16	ROJAL	V	B	ESPAÑA	69*	22B18	GABRIELA	V	B	ESPAÑA
18	22A17	TEMPRANILLO TEMPRANO	V	T	ESPAÑA	70	22B19	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA
19*	22A18	MOSCATEL GRANO MENUDO	V	B	ESPAÑA	71	22B20	UVA REY	M	B	ESPAÑA
20*	22A19	MORISCA	V	T	ESPAÑA	72*	22B21	PALOMINO FINO	V	B	ESPAÑA
21*	22A20	TURRUNTÉS	V	B	ESPAÑA	73*	22B22	MOSCATEL	MV	B	ESPAÑA
22*	22A21	MATURANA	V	B	ESPAÑA	74	22B23	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA
23	22A22	MALVASÍA	V	B	ESPAÑA	75	22B25	MOSCATEL	M	B	ESPAÑA
24	22A23	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	76	22B26	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA
25	22A24	GRACIANO	V	T	ESPAÑA	77	22B27	AIRÉN	V	B	ESPAÑA
26*	22A25	VIURA	V	B	ESPAÑA	78	22B28	LAIRÉN	V	B	ESPAÑA
27*	22A26	CALAGRAÑO	V	B	ESPAÑA	79	22B29	BALAY	V	B	ESPAÑA
28*	22A27	MATURANA TINTA	V	T	ESPAÑA	80	22B30	ARIN	V	B	ESPAÑA
29	22A28	TURRUNTÉS	V	B	ESPAÑA	81*	22B31	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA
30	22A29	CAGAZAL	V	B	ESPAÑA	82*	22B32	TORRONTÉS	MV	B	ESPAÑA
31	22A30	UVA DE OLAZ	MV	T	ESPAÑA	83	22B33	ALARJE	V	B	ESPAÑA
32*	22A31	RIBOTE	V	T	ESPAÑA	84	22B34	BALADÍ	V	B	ESPAÑA
33*	22A32	VERUÉS DE HUARTE	V	T	ESPAÑA	85*	22B35	VIJIRIEGA COMÚN	V	B	ESPAÑA
34*	22A33	BENITILLO	V	T	ESPAÑA	86	22B36	DON BUENO	M	B	ESPAÑA
35*	22A34	MORATE	V	T	ESPAÑA	87*	22B37	LAIRÉN	V	B	ESPAÑA
36	22A35	NAVÉS DE FITERO	V	T	ESPAÑA	88	22B38	ROLLALES TINTA	M	T	ESPAÑA
37*	22A36	VERDEJO NEGRO	V	T	ESPAÑA	89	22B39	MURCIANA NEGRA	M	T	ESPAÑA
38	22A37	JERÓNIMO DE TUDELA	M	T	ESPAÑA	90	22B40	MURCIANA BLANCA	M	B	ESPAÑA
39*	22A38	REDONDAL	V	B	ESPAÑA	91	22B41	IMPERIAL	M	T	ESPAÑA
40	22A39	GARNACHA TINTA	V	T	ESPAÑA	92	22B42	TINTA DE ORÁN	M	T	
41*	22A40	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	93	22B43	MANTUO JEREZANO	V	B	ESPAÑA
42	22A41	VIURA	V	B	ESPAÑA	94	22B44	BLANCA SUPERIOR PARA PARRAL	M	B	ESPAÑA
43	22A42	MALVASÍA	V	B	ESPAÑA	95*	22B45	PLATEADO	V	B	ESPAÑA
44	22A43	GRACIANO	V	T	ESPAÑA	96	22B46	JEREZ FINO	V	B	ESPAÑA
45	22A44	MAZUELO	V	T	ESPAÑA	97	22B47	MANTUO DE GRANADA	MV	B	ESPAÑA
46*	22A45	JAÉN NEGRO	V	T	ESPAÑA	98	22B48	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA
47	22A46	MOSCATEL NEGRO DE VALENCIA	M	B	ESPAÑA	99	22B49	TEMPRANILLO DE GRANADA	M	B	ESPAÑA
48*	22A47	NAPOLEÓN	M	T	ESPAÑA	100*	22B50	FONDO DE ORZA	M	B	ESPAÑA
49*	22A48	DE CUERNO	M	B	ESPAÑA	101*	22B51	PERRUÑO	V	B	ESPAÑA
50*	22A49	DOMINGA	M	B	ESPAÑA	102	22B52	JAÉN NEGRO	V	T	ESPAÑA
51*	22A50	OHANES	M	B	ESPAÑA	103	22B53	LANJARÓN CLARO	V	B	ESPAÑA
52	22A51	ROYAL	M	T	ESPAÑA	104	22C01	NEGRA RAYADA	M	T	ESPAÑA

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
105	22C02	ROMÉ	MV	B	ESPAÑA	155	22C56	MOSCATEL MORISCO	M	B	ESPAÑA
106	22C03	JAÉN TINTO	V	T	ESPAÑA	156	22C57	CASTELLANO	V	B	ESPAÑA
107	22C04	YAQUI	V	T	ESPAÑA	157	22D01	LAIRÉN	V	B	ESPAÑA
108*	22C05	IMPERIAL	M	T	ESPAÑA	158	22D06	GARNACHA NEGRA	V	T	ESPAÑA
109	22C06	JAÉN BLANCO	V	B	ESPAÑA	159*	22D07	GARNACHA BASTA	V	T	ESPAÑA
110	22C07	PERRUNO	V	B	ESPAÑA	160*	22D08	MORISTELL	V	T	ESPAÑA
111	22C08	JAÉN NEGRO	V	T	ESPAÑA	161*	22D10	MOSCATEL	M	B	ESPAÑA
112*	22C09	MANTUO	V	B	ESPAÑA	162*	22D11	GREG	M	B	ESPAÑA
113	22C10	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA	163	22D12	BOMOGASTRO	V	T	ESPAÑA
114	22C11	ZALEMA	V	B	ESPAÑA	164*	22D13	PANSERA	V	B	ESPAÑA
115	22C12	PALOMINO	V	B	ESPAÑA	165	22D14	PARRALETA	V	T	ESPAÑA
116	22C13	BEBA	MV	B	ESPAÑA	166*	22D15	ALCAÑON BLANCO	V	B	ESPAÑA
117*	22C14	ROCIA	V	T	ESPAÑA	167	22D16	GREQUE	V	B	ESPAÑA
118*	22C15	PEDRO LUIS	V	B	ESPAÑA	168	22D17	MAZUELA	V	T	ESPAÑA
119*	22C17	MOLLAR	V	T	ESPAÑA	169	22D18	RIBOTE	V	T	ESPAÑA
120*	22C18	GARRIDO MACHO	V	B	ESPAÑA	170	22D19	VITADILLO	V	T	ESPAÑA
121	22C19	GARRIDO FINO	V	B	ESPAÑA	171	22D20	VIZACA	MV	B	ESPAÑA
122	22C20	ZALEMA	V	B	ESPAÑA	172	22D21	GARNACHA GORDA	V	T	ESPAÑA
123	22C21	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA	173*	22D22	SALCEÑO BLANCO	V	B	ESPAÑA
124*	22C23	PALOMINO	V	B	ESPAÑA	174*	22D23	PARREL	V	T	ESPAÑA
125	22C24	BEBA	MV	B	ESPAÑA	175	22D24	SALCEÑO NEGRO	V	T	ESPAÑA
126*	22C25	MANTUA	M	B	ESPAÑA	176	22D25	MACABEO BASTO	V	B	ESPAÑA
127	22C26	GARRIDO FINO	V	B	ESPAÑA	177	22D26	BERNACHA BLANCA	V	B	ESPAÑA
128	22C27	PERRUNA	V	B	ESPAÑA	178	22D27	BLANCO FINO	V	B	ESPAÑA
129*	22C28	ALBARRAZ	MV	B	ESPAÑA	179	22D28	BLASCO	V	T	ESPAÑA
130	22C29	CIRIAL	V	B	ESPAÑA	180*	22D29	MIGUEL DE ARCO	V	T	ESPAÑA
131*	22C30	JAÉN EMPINADILLO	V	B	ESPAÑA	181	22D30	GARNACHA FINA	V	T	ESPAÑA
132	22C31	PORTUARTO	V	B	ESPAÑA	182	22D31	NEGRALEJO	V	T	ESPAÑA
133	22C32	MANCHEGA	V	B	ESPAÑA	183	22D32	POBRETÓN	V	T	ESPAÑA
134	22C33	JAÉN COLORADO	V	B	ESPAÑA	184	22D33	VIDADILLO	V	T	ESPAÑA
135*	22C34	MALAGUEÑA MOSCATEL	MV	B	ESPAÑA	185	22D34	GARNACHA NEGRA	V	T	ESPAÑA
136	22C35	MALAGUEÑA	MV	B	ESPAÑA	186	22D35	MACABÁN	V	B	ESPAÑA
137	22C37	SANTA PAULA	V	B	ESPAÑA	187	22D36	GARNACHA PELUDA	V	T	ESPAÑA
138	22C39	MOSCATEL	M	B	ESPAÑA	188	22D37	GARNACHA BLANCA	V	B	ESPAÑA
139	22C40	PERRUNO TINTA	V	B	ESPAÑA	189	22D39	ARIÑO	V	T	ESPAÑA
140	22C41	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA	190	22D41	CONCEJÓN	V	T	ESPAÑA
141*	22C42	CARDINAL	M	T	EESTADOS UNIDOS	191*	22D42	BENEDICTO	V	T	ESPAÑA
142*	22C43	COJONATA	MV	B	ESPAÑA	192*	22D43	MORENILLO	V	T	ESPAÑA
143	22C44	MOSCATEL NEGRO	M	T	ESPAÑA	193	22D44	ALLOZA	V	T	ESPAÑA
144	22C45	MOSCATEL MÁLAGA	MV	B	ESPAÑA	194	22D45	REQUENO	V	T	ESPAÑA
145	22C46	SIN HUESO	M	B	ESPAÑA	195	22D46	MESSEGUERA	V	B	ESPAÑA
146	22C47	MOSCATEL MÁLAGA	M	B	ESPAÑA	196	22D47	MONTONEC	V	B	ESPAÑA
147	22C48	MOSCATEL MÁLAGA	M	B	ESPAÑA	197*	22D48	GARNACHA FRANCESA	V	T	ESPAÑA
148	22C49	BALADÍ VERDEJO	V	B	ESPAÑA	198*	22D49	TINTORERA DE LONGARES	V	T	ESPAÑA
149	22C50	DE REY	V	B	ESPAÑA	199	22D50	GARNACHA NEGRA	V	T	ESPAÑA
150	22C51	LOJA	V	B	ESPAÑA	200	22D51	MAZUELA	V	T	ESPAÑA
151	22C52	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA	201	22D52	CONCEJÓN	V	T	ESPAÑA
152	22C53	BEVAN	V	B	ESPAÑA	202	22D53	ROBAL	V	B	ESPAÑA
153	22C54	VIDUEÑO BLANCO	V	B	ESPAÑA	203	22D54	COLGADERO	M	T	ESPAÑA
154	22C55	VIDUEÑO NEGRO	V	T	ESPAÑA	204	22D55	PROVECHÓN	V	T	ESPAÑA

Anexos

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
205*	22D56	NEGRA BLASCO	V	B	ESPAÑA	253	22E53	DIEGO	M	T	ESPAÑA
206	22D57	LACO BLANCO	V	B	ESPAÑA	254*	22E54	MALVASIA BLANCA	MV	B	ESPAÑA
207	22D58	NIEVES TEMPRANO	V	B	ESPAÑA	255	22E55	MULATA	M	B	ESPAÑA
208	22D59	ARGELINA	M	T	ESPAÑA	256	22E57	LISTÁN GACHO	V	B	ESPAÑA
209	22D60	JUAN IBAÑEZ	V	T	ESPAÑA	257	22E58	PEREJIL	V	B	ESPAÑA
210*	22D61	GARRUT	V	T	ESPAÑA	258	22E59	UVALLÓN	V	T	ESPAÑA
211*	22E02	MIGUEL DE ARCO	V	T	ESPAÑA	259*	22E60	MOSCATEL NEGRO	M	T	ESPAÑA
212*	22E04	CRUJILLÓN	M	T	ESPAÑA	260	22F01	FORASTERA BLANCA	M	B	ESPAÑA
213	22E07	PROVECHÓN	V	T	ESPAÑA	261*	22F02	MALVASIA BLANCA	MV	B	ESPAÑA
214	22E09	MORENILLO	V	T	ESPAÑA	262	22F03	BURRA BLANCA	M	B	ESPAÑA
215	22E10	QUIEBRATINAJAS	MV	T	ESPAÑA	263	22F05	DIEGO	M	B	ESPAÑA
216	22E11	VINATÉ	V	T	ESPAÑA	264	22F06	BREVAL	V	B	ESPAÑA
217	22E12	PEPITA DE ORO	M	B	ESPAÑA	265*	22F07	NEGRA COMÚN	V	T	ESPAÑA
218	22E13	MANDÓ	V	T	ESPAÑA	266	22F08	NEGRAMOLL	V	T	ESPAÑA
219	22E14	JAUMES	V	B	ESPAÑA	267	22F09	LISTÁN NEGRO	V	T	ESPAÑA
220	22E15	GALMETE	V	T	ESPAÑA	268	22F10	DIEGO	M	T	ESPAÑA
221*	22E16	FOGONEU FRANCÉS	MV	T	ESPAÑA	269	22F11	MUÑECA	M	T	ESPAÑA
222	22E17	FALSO CARDINAL	M	T	ESPAÑA	270	22F12	LISTÁN	V	B	ESPAÑA
223*	22E18	CALOP NEGRO	MV	T	ESPAÑA	271*	22F19	MOSCATEL NEGRA MENUDA	V	T	ESPAÑA
224*	22E20	CABELIS	V	T	ESPAÑA	272	22F20	MOSCATEL	MV	B	ESPAÑA
225	22E21	BOAL	V	T	ESPAÑA	273	22F22	ONDARRABI ZURIA	HPD-V	B	ESPAÑA
226*	22E22	FERNANDELLA	V	T	ESPAÑA	274*	22F23	ONDARRABI BELTZA	V	T	ESPAÑA
227*	22E23	BATISTA	V	T	ESPAÑA	275*	22F24	ONDARRABI ZURI	HPD-V	B	ESPAÑA
228*	22E25	GORGOLLASA	V	T	ESPAÑA	276*	22F27	CARRASQUÍN	V	T	ESPAÑA
229*	22E26	CALLET	V	T	ESPAÑA	277*	22F29	ALBARÍN NEGRO	V	T	ESPAÑA
230*	22E27	EXCURSACH	V	T	ESPAÑA	278	22F30	ALBARÍN BLANCO	V	B	ESPAÑA
231*	22E28	SINSÓ	V	T	ESPAÑA	279	22F32	GARNACHA	V	T	ESPAÑA
232	22E29	MANTO NEGRO	V	T	ESPAÑA	280	22F44	NERUCA	V	B	ESPAÑA
233*	22E30	MANSÉS DE TIBBUS	V	T	ESPAÑA	281*	22F45	PARDUCA	V	T	ESPAÑA
234	22E31	MANSÉS DE CAPDELL	V	T	ESPAÑA	282*	22F47	GASCÓN	V	T	ESPAÑA
235	22E32	CALOP	V	B	ESPAÑA	283*	22F48	SEÑÁ TINTO	V	T	ESPAÑA
236*	22E33	QUIGAT	V	B	ESPAÑA	284*	22F50	DE JOSÉ BLANCO	HPD-V	B	ESPAÑA
237	22E34	ARGAMUSA	V	B	ESPAÑA	285	22F51	MOSCATEL BLANCO	V	B	ESPAÑA
238*	22E35	SABATÉ	V	T	ESPAÑA	286*	22F53	MOSCATEL BLANCO	V	B	ESPAÑA
239*	22E36	GIRÓ	V	T	ESPAÑA	287*	22F55	VERDEJILLA TINTO	V	T	ESPAÑA
240*	22E37	EPERÓ DE GALL	V	T	ESPAÑA	288	22F56	VERDE MATZA	V	T	ESPAÑA
241	22E38	MASACAMPS	V	B	ESPAÑA	289	22G06	ALBILLO BLANCO	V	B	ESPAÑA
242	22E39	MATEU	V	B	ESPAÑA	290	22G17	CARIÑENA	V	T	ESPAÑA
243	22E40	MOSCATEL	M	B	ESPAÑA	291*	22G19	PANSA ROSA	V	T	ESPAÑA
244	22E41	PENSAL BLANCO	V	B	ESPAÑA	292	22G22	CHERTA	V	B	ESPAÑA
245	22E43	CALOP BLANCO	M	B	ESPAÑA	293	22G24	CARREGA SOMERA	V	B	ESPAÑA
246	22E44	MAGDALENA	M	B	ESPAÑA	294	22G33	GARNACHA DORADA	V	B	ESPAÑA
247*	22E45	VINATÉ	V	B	ESPAÑA	295*	22G34	PARELLADA	V	B	ESPAÑA
248	22E48	PALOMINO	V	B	ESPAÑA	296	22G37	CARIÑENA BLANCA	V	B	ESPAÑA
249*	22E49	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA	297	22G41	GARNACHA BLANCA	V	B	ESPAÑA
250	22E50	MOSCATEL	MV	B	ESPAÑA	298	22G42	CARIÑENA NEGRA	V	T	ESPAÑA
251	22E51	NEGRA	M	T	ESPAÑA	299	22G43	LLADONER NEGRE	V	T	ESPAÑA
252	22E52	BLANCA	MV	B	ESPAÑA	300	22G44	MACABEO	V	B	ESPAÑA

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
301	22G45	CINSAUT	M	T	FRANCIA	354	22I20	VERDEJO	V	B	ESPAÑA
302	22G47	MACABEO	V	B	ESPAÑA	355	22I21	ESCLAFACHERRI	V	B	ESPAÑA
303	22G48	PARELLADA	V	B	ESPAÑA	356	22I22	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA
304	22G49	GARNACHA TINTA	V	T	ESPAÑA	357	22I23	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA
305*	22G50	SUMOLL NEGRA	V	T	ESPAÑA	358	22I24	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA
306*	22G51	PANSA D'ALACANT	V	B	ESPAÑA	359	22I25	CENCIBEL	V	T	ESPAÑA
307	22G52	BOBAL	V	T	ESPAÑA	360	22I27	AIRÉN	V	B	ESPAÑA
308	22G53	TETA DE VACA	M	B	ESPAÑA	361	22I28	PARDILLO	V	B	ESPAÑA
309*	22G54	ROYAL	V	T	ESPAÑA	362	22I29	CENCIBEL	V	T	ESPAÑA
310*	22G55	CUATENDRÁ	V	T	ESPAÑA	363*	22I30	VERDONCHO	V	B	ESPAÑA
311	22H01	MONASTRELL	V	T	ESPAÑA	364*	22I31	CHELVA	V	B	ESPAÑA
312*	22H02	TROBAT	V	T	ESPAÑA	365	22I32	MAIZANCHO	V	B	ESPAÑA
313	22H04	TREPAT	V	T	ESPAÑA	366	22I33	PARRAS DE LA CASA	M	T	ESPAÑA
314	22H05	SAN JAIME	M	B	ESPAÑA	367*	22I34	ROJAL	V	T	ESPAÑA
315	22H07	GARNACHA NEGRA DEL PAIS	V	T	ESPAÑA	368	22I35	MOSCA TEL ALMIZCLERO	M	B	ESPAÑA
316*	22H08	FUMAT	M	T	ESPAÑA	369	22I36	TORRONTÉS	V	B	ESPAÑA
317	22H09	FUMAT	M	T	ESPAÑA	370*	22I37	MALVAR	V	B	ESPAÑA
318	22H10	RAJENO	V	T	ESPAÑA	371	22I38	BOBAL	V	T	ESPAÑA
319	22H13	PANSÁ BLANCA	V	B	ESPAÑA	372	22I39	MORAVIA	V	T	ESPAÑA
320	22H36	AIRÉN	V	B	ESPAÑA	373	22I40	MARISANCHO	V	B	ESPAÑA
321	22H37	TINTO FINO	V	T	ESPAÑA	374	22I41	CENCIBEL	V	T	ESPAÑA
322	22H38	GARNACHA	V	T	ESPAÑA	375*	22I42	AIRÉN	V	B	ESPAÑA
323*	22H39	MORAVIA	V	T	ESPAÑA	376	22I43	GARNACHA	V	T	ESPAÑA
324	22H41	MACABEO	V	B	ESPAÑA	377	22I44	PARDILLO	V	B	ESPAÑA
325*	22H42	GARNACHA TINTORERA	V	T	ESPAÑA	378	22I45	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA
326	22H44	ALCAYATA	V	T	ESPAÑA	379	22I46	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA
327	22H45	TINTORERA	V	T	ESPAÑA	380	22I47	ALBILLA	M	B	ESPAÑA
328	22H46	MESSEGUERA COMÚN	V	B	ESPAÑA	381	22I48	PARDILLA	V	B	ESPAÑA
329	22H47	VALENCI BLANCO	M	B	ESPAÑA	382	22I49	YGRIEGA	M	T	ESPAÑA
330	22H48	ROYAL	V	T	ESPAÑA	383	22I50	CARIÑENA	V	B	ESPAÑA
331*	22H49	ALBILLO	V	B	ESPAÑA	384	22I52	COLORADA	M	T	ESPAÑA
332	22H50	VALENCI BLANCO	M	B	ESPAÑA	385	22I53	SAN DIEGO	V	B	ESPAÑA
333*	22H51	ROJAL BLANCO	V	B	ESPAÑA	386	22I54	ARIS	V	B	ESPAÑA
334	22H52	VALENCI TINTO	V	T	ESPAÑA	387	22I55	CENCIBEL	V	T	ESPAÑA
335	22H53	TETA DE VACA	V	T	ESPAÑA	388	22I56	MALVAR	V	B	ESPAÑA
336	22H54	ROSAKI	M	B	ESPAÑA	389	22J01	TINTA CORRIENTE	V	T	ESPAÑA
337	22H55	TETA DE VACA	M	T	ESPAÑA	390	22J02	TINTO MADRID	V	T	ESPAÑA
338	22I01	TORTOSINA	V	B	ESPAÑA	391	22J03	JAÉN	V	B	ESPAÑA
339	22I02	BONICAIRE	V	T	ESPAÑA	392	22J04	JAÉN	V	B	ESPAÑA
340	22I03	MANCHEGA	V	B	ESPAÑA	393	22J05	JAÉN	V	B	ESPAÑA
341*	22I04	FORCALLAT TINTO	V	T	ESPAÑA	394	22J06	AIRÉN	V	B	ESPAÑA
342*	22I06	TARDANA	V	B	ESPAÑA	395	22J09	ALARIJE	V	B	ESPAÑA
343*	22I07	COLORAILLO	V	T	ESPAÑA	396	22J10	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA
344	22I08	GARNACHA TINTORERA	V	T	ESPAÑA	397	22J12	BEBA	V	B	ESPAÑA
345	22I09	COLORAILLO	V	B	ESPAÑA	398	22J15	ALBILLO	MV	B	ESPAÑA
346*	22I10	MORAVIA AGRIA	V	T	ESPAÑA	399	22J16	PARDILLO	V	B	ESPAÑA
347	22I11	ROJAL	V	T	ESPAÑA	400*	22J17	GARNACHA	V	T	ESPAÑA
348	22I12	TINTO NAVALCARNERO	V	T	ESPAÑA	401	22J18	CENCIBEL	V	T	ESPAÑA
349	22I13	TINTO ARAGÓN	V	T	ESPAÑA	402	22J19	NEGRA	V	T	ESPAÑA
350	22I15	CHELVA	M	B	ESPAÑA	403	22J20	ROYAL GORDO	M	T	ESPAÑA
351*	22I16	ALBILLO	MV	B	ESPAÑA	404	22J22	TORRALBA	MV	T	ESPAÑA
352	22I17	GARNACHA	V	T	ESPAÑA	405*	22J24	BOCALILLA	MV	T	ESPAÑA
353*	22I19	LEGIRUELA	V	B	ESPAÑA	406*	22J25	RAYADA MELONERA	V	T	ESPAÑA

Anexos

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
407	22J26	ZALEMA COLCHICINA	V	B	ESPAÑA	455	22K21	MOSCATEL BLANCO	MV	B	ESPAÑA
408	22J27	ALARIFE COLCHICINA	V	B	ESPAÑA	456*	22K25	VERDEJO BLANCO	V	B	ESPAÑA
409	22J28	PEDRO XIMENEZ COLCHICINA	V	B	ESPAÑA	457	22K29	MOSCATEL ENCARNADO	MV	B	ESPAÑA
410	22J29	MALVAR COLCHICINA	V	B	ESPAÑA	458	22K31	MALVASÍA	MV	B	ESPAÑA
411	22J30	NEGRAL	V	T	ESPAÑA	459*	22K36	BLANCO RECIO	V	B	ESPAÑA
412	22J31	GARNACHA	V	T	ESPAÑA	460*	22K37	TINTO ARAGONÉS	V	T	ESPAÑA
413	22J32	PIÑUELA	V	T	ESPAÑA	461	22K38	ALBILLO MAYOR	V	B	ESPAÑA
414	22J33	GARNACHA TINTORERA	V	T	ESPAÑA	462	22K40	BLANCO DE MESA	M	T	ESPAÑA
415*	22J34	GARNACHA	V	T	ESPAÑA	463*	22K41	VERDEJO BLANCO	V	B	ESPAÑA
416	22J35	HEBÉN	V	B	ESPAÑA	464	22K42	PUESTO MAYOR	V	T	ESPAÑA
417	22J36	TINTA	V	T	ESPAÑA	465	22K43	BLANCO JEREZ	V	B	ESPAÑA
418	22J37	TINTA DE MADRID	V	T	ESPAÑA	466	22K44	MALVASIA	V	B	ESPAÑA
419	22J38	CAÑONA	V	T	ESPAÑA	467	22K45	VERDEJO	V	B	ESPAÑA
420	22J39	ALBILLO	V	T	ESPAÑA	468*	22K46	RUFETA	V	T	ESPAÑA
421	22J40	DE POR ACA	V	T	ESPAÑA	469	22K47	TINTO MADRID	V	T	ESPAÑA
422	22J41	COLORINA	V	T	ESPAÑA	470	22K48	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA
423	22J42	ALARIFE	V	B	ESPAÑA	471	22K49	ALBILLO	V	B	ESPAÑA
424	22J43	TEMPRANO DE MORA	V	B	ESPAÑA	472	22K50	MOSCATEL DEL PAÍS	V	B	ESPAÑA
425	22J44	JAÉN	V	B	ESPAÑA	473	22K51	MOSCATEL DORADO	V	B	ESPAÑA
426*	22J45	BRUJIDERA	V	T	ESPAÑA	474*	22K52	MENCÍA	V	T	ESPAÑA
427	22J46	BLANCO GORDAL	M	B	ESPAÑA	475	22K53	MOSCATEL GORDO	M	B	ESPAÑA
428	22J47	AIRÉN	V	B	ESPAÑA	476	22K54	MOSCATEL MENUDO	V	B	ESPAÑA
429	22J48	TINTO BASTO	V	T	ESPAÑA	477	22K55	DORADILLA	V	B	ESPAÑA
430	22J49	TINTO MADRID	V	T	ESPAÑA	478*	22K56	CASTELLANA BLANCA	V	B	ESPAÑA
431*	22J50	TINTO NAVALCARNERO	V	T	ESPAÑA	479	22K57	VERDEJO	V	B	ESPAÑA
432	22J51	TINTO ARAGONÉS	V	T	ESPAÑA	480	22L11	JUAN GARCÍA	V	T	ESPAÑA
433	22J52	TEMPRANILLO RIOJA	V	T	ESPAÑA	481	22L12	TINTO DEL PAÍS	V	T	ESPAÑA
434	22J53	TINTO DEL PAIS	V	T	ESPAÑA	482	22L17	TINTO MOLLAR	V	T	ESPAÑA
435	22J54	PICADILLO	V	B	ESPAÑA	483*	22L18	TINTO MADRID	V	T	ESPAÑA
436	22J55	ARAGÓN	V	T	ESPAÑA	484	22L19	JEREZ	V	B	ESPAÑA
437	22J56	GARNACHA	V	T	ESPAÑA	485	22L20	HUERTA DEL REY	V	B	ESPAÑA
438	22J57	BLANCO JAEN	V	B	ESPAÑA	486	22L21	GARNACHA	V	T	ESPAÑA
439	22K03	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	487	22L22	CLAIRETO	V	B	ESPAÑA
440	22K04	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	488	22L23	ALBILLO	MV	B	ESPAÑA
441	22K05	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	489	22L24	TINTO MENCÍA	V	T	ESPAÑA
442	22K06	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	490	22L26	GARNACHO NEGRO	V	T	ESPAÑA
443	22K07	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	491	22L27	TEMPRANO BLANCO	V	B	ESPAÑA
444	22K08	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	492*	22L28	CLAIRETO	V	B	ESPAÑA
445	22K09	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	493	22L29	TINTO DEL PAÍS	V	T	ESPAÑA
446	22K10	TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA	494*	22L30	GARNACHO	V	T	ESPAÑA
447*	22K12	PRIETO PICUDO	V	T	ESPAÑA	495	22L31	TEMPRANO	V	B	ESPAÑA
448*	22K13	PRIETO PICUDO BLANCO	V	B	ESPAÑA	496	22L32	COLGADERAS	M	B	ESPAÑA
449	22K14	MOLLAR	V	T	ESPAÑA	497	22L33	TINTORERO	V	T	ESPAÑA
450*	22K15	BLANQUILIÑA	V	B	ESPAÑA	498	22L34	VERDEGUDILLO	V	B	ESPAÑA
451	22K16	CLARETE DE BURDEOS	V	B	ESPAÑA	499	22L35	TEMPRANO COLORADO	V	T	ESPAÑA
452	22K17	GUALARIDO	V	B	ESPAÑA	500	22L36	HUERTA DEL REY	V	B	ESPAÑA
453*	22K19	ALLARÉN	V	B	ESPAÑA	501	22L37	JEREZ	V	B	ESPAÑA
454*	22K20	PRIETO PICUDO BLANCO	V	B	ESPAÑA	502	22L38	ALBILLO	V	B	ESPAÑA

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
503	22L39	GARNACHO ROJO	M	T	ESPAÑA	552*	22N14	TORRONTÉS	V	B	ESPAÑA
504	22L40	VERDEJO	V	B	ESPAÑA	553*	22N15	LOUREIRO BLANCO	V	B	ESPAÑA
505	22L42	HUERTA DEL REY	V	B	ESPAÑA	554	22N17	SOUZÓN RETINTO	V	T	ESPAÑA
506*	22L43	SALVADOR	V	B	ESPAÑA	555*	22N23	GODELLO	V	B	ESPAÑA
507	22L44	CAÑORROYO	V	B	ESPAÑA	556*	22N31	TORRONTÉS	V	B	ESPAÑA
508	22L45	VERDEJO BLANCO	V	B	ESPAÑA	557*	22N33	CAIÑO	V	T	ESPAÑA
509	22L46	BURDEOS TINTO	V	T	ESPAÑA	558*	22N34	ALBARIÑO	V	B	ESPAÑA
510	22L47	BURDEOS BLANCO	V	B	ESPAÑA	559	22N37	CAIÑO DEL PAIS	V	T	ESPAÑA
511	22L49	VIURA	V	B	ESPAÑA	560	22N38	ESPADEIRO	V	T	ESPAÑA
512	22L50	JEREZ	V	B	ESPAÑA	561*	22N39	CAGARRIZO	V	B	ESPAÑA
513	22L51	VERDEJO	V	B	ESPAÑA	562*	22N40	CATALÁN BLANCO	HPD-V	T	ESPAÑA
514*	22L52	VERDEJO NEGRO	V	T	ESPAÑA	563	22N42	COLLÓN DE GALO	V	T	ESPAÑA
515*	22L53	MOSCATEL	MV	B	ESPAÑA	564	22N44	NEGRÓN DE ALDÁN	V	T	ESPAÑA
516	22L54	CAÑORROYO	V	B	ESPAÑA	565*	22N45	NEGRÓN DE ALDÁN	V	T	ESPAÑA
517	22L59	BLANCÓN	V	B	ESPAÑA	566	22N46	TARANTEY DE NERGA	V	B	ESPAÑA
518	22L60	GARNACHA TINTA	V	T	ESPAÑA	567	22N47	TINTA FEMIA DE ALDÁN	V	T	ESPAÑA
519	22M06	PARDINA	V	B	ESPAÑA	568	22N48	ALBARIÑO	V	B	ESPAÑA
520	22M07	MORISCA	V	T	ESPAÑA	569	22N49	CAIÑO PORTUGUÉS	HPD-V	T	ESPAÑA
521*	22M12	FERNAN PIRIZ	V	B	ESPAÑA	570	22N50	BOTO DE GALL	M	T	ESPAÑA
522	22M14	CUELGA	V	B	ESPAÑA	571	22N51	BONICAIRE	V	T	ESPAÑA
523	22M15	CIGÜENTE	V	B	ESPAÑA	572	22N52	CHIRONÉS	V	B	ESPAÑA
524	22M16	ALARJE	V	B	ESPAÑA	573	22N56	ALEDO	M	B	ESPAÑA
525	22M17	EVA	M	B	ESPAÑA	574	22N62	MOSCATEL ROMANO	M	B	ESPAÑA
526	22M18	CIGÜENTE	V	B	ESPAÑA	575	22O14	BLANCO CASTELLANO	V	B	ESPAÑA
527*	22M19	BORBA	V	B	ESPAÑA	576	22O19	PANSÉS	V	B	ESPAÑA
528	22M20	MANTUO	M	B	ESPAÑA	577	22O20	VERDIGELL	V	B	ESPAÑA
529	22M21	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA	578*	22O22	MONDRAGÓN	V	T	ESPAÑA
530	22M22	PALOMINO	V	B	ESPAÑA	579	22O24	EMBOLICAIRE	V	T	ESPAÑA
531*	22M23	CARDINAL	M	T		580	22O25	ESCAÑAVELLA	V	B	ESPAÑA
532*	22M25	ALFONSO LAVALLE	M	T	FRANCIA	581	22O26	DEL REYNO	V	T	ESPAÑA
533	22M27	PEDRO XIMENEZ	V	B	ESPAÑA	582	22O31	MONASTRELL	V	T	ESPAÑA
534*	22M34	ALARJE	V	B	ESPAÑA	583*	22O36	BOBAL	V	T	ESPAÑA
535*	22M35	ALBILLO REAL	V	B	ESPAÑA	584	22O39	MOSCATEL	MV	B	ESPAÑA
536	22M37	ALFONSARRO	V	B	ESPAÑA	585*	22O48	FORCALLAT	V	B	ESPAÑA
537*	22M38	MARFAL	V	B	ESPAÑA	586	22O50	MERSEGUERA	V	B	ESPAÑA
538*	22M39	ROIBAL	V	T	ESPAÑA	587*	22O52	MORENILLO	V	T	ESPAÑA
539	22M40	BLANCO LEGITIMO	V	B	ESPAÑA	588*	22O53	PAMPOLAT DE SAGUNTO	V	T	ESPAÑA
540*	22M46	AGUDELO	V	B	ESPAÑA	589*	22O55	VERDIL	V	B	ESPAÑA
541*	22M47	MOSCATEL	V	B	ESPAÑA	590	22O59	PLANTA FINA	V	B	ESPAÑA
542	22M48	AGUDILLO	V	B	ESPAÑA	591*	22O63	VERDOSILLA	V	B	ESPAÑA
543	22N01	LOUREIRO	V	B	ESPAÑA	592	22O64	TORTOSINA	V	B	ESPAÑA
544*	22N02	TREIXADURA	V	B	ESPAÑA	593	22O65	JAÉN	V	B	ESPAÑA
545*	22N03	ALVARELLO	V	T	ESPAÑA	594*	22P11	SEIBEL 15062	HPD-V	T	FRANCIA
546	22N05	MOURATÓN	V	T	ESPAÑA	595*	22P12	SEYVE VILLARD 12-309	HPD-V	T	FRANCIA
547*	22N06	SOUSÓN	V	T	ESPAÑA	596*	22P13	SEYVE VILLARD 12-327	HPD-V	T	FRANCIA
548*	22N08	FERRÓN	V	T	ESPAÑA	597*	22P14	SEYVE VILLARD 12-347	HPD-V	T	FRANCIA
549*	22N09	DONA BLANCA	V	B	ESPAÑA	598*	22P15	SEYVE VILLARD 12-426	HPD-V	T	FRANCIA
550*	22N10	NÁPARO	M	T	ESPAÑA	599*	22P18	SEYVE VILLARD 18-402	HPD-V	T	FRANCIA
551	22N11	MOZA FRESCA	V	B	ESPAÑA	600*	22P20	SEYVE VILLARD 12-401	HPD-V	T	FRANCIA

Anexos

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
601*	22P21	BURDIN 7705	HPD-V	T	FRANCIA	642*	25IB19	ATTILIO RAGGIONERI	M	B	ITALIA
602*	22P22	SEIBEL 11803	HPD-MV	B	FRANCIA	643*	25IB20	BRUNI 041	M	B	ITALIA
603*	22P23	LANDOT 244	HPD-V	T	FRANCIA	644*	25IIA01	PANSE PRECOCE	M	B	FRANCIA
604*	25IA01	PERLA DE CSABA	M	B	HUNGRÍA	645	25IIA02	TCHAOUTC	M	B	
605*	25IA02	MADELEINE ANGEVINE	M	B	FRANCIA	646	25IIA03	CORNEILLE	M	B	FRANCIA
606*	25IA03	BRUNI 012	M	B	ITALIA	647*	25IIA04	MALVASÍA DE SITGES	MV	B	ESPAÑA
607*	25IA04	BRUNI 036	M	B	ITALIA	648*	25IIA05	ADMIRABLE DE COURTILLER	M	B	FRANCIA
608*	25IA05	MADELEINE ROYALE	M	B	FRANCIA	649*	25IIA06	BRUNI 100	M	B	ITALIA
609*	25IA06	LUGLIENGA BIANCA	M	B	ITALIA	650*	25IIA07	ALBA MAGNA	M	B	ITALIA
610	25IA07	CHASSELAS GROS COULARD	M	B	REINO UNIDO	651*	25IIA08	DELIZIA DI VAPRIO	M	B	ITALIA
611*	25IA08	GOLD	M	B	EEUU	652	25IIA09	MALVASÍA BLANCA	MV	B	ESPAÑA
612*	25IA09	PRIMUS	M	B	ITALIA	653*	25IIA10	ANGIOLA BIANCA	M	B	ITALIA
613	25IA10	JOUANENC	M	B		654*	25IIA11	SULIVAN	M	B	FRANCIA
614*	25IA11	AGOSTENGA	M	B	ITALIA	655*	25IIA12	CHASSELAS MICHEL TOMPA	M	B	HUNGRÍA
615*	25IA12	DONA MARIA	M	B	PORTUGAL	656	25IIA13	CHASSELAS DE MONTAUBAN	M	B	FRANCIA
616*	25IA13	PIROVANO 315	M	B	ITALIA	657*	25IIA14	PALESTINA	M	B	ALEMANIA
617*	25IA14	REGINA DEI VIGNETI	M	B	HUNGRÍA	658*	25IIA15	MATHIASZ LANOS DIADALA MUSKOTALY	M	B	HUNGRÍA
618*	25IA15	PRECOCE DE MALINGRE	M	B	FRANCIA	659*	25IIA16	PIROVANO 235	M	B	ITALIA
619*	25IA16	PRECOCE DI ROMA	M	B	ITALIA	660*	25IIA17	DALMASSO VI-06	M	B	ITALIA
620*	25IA17	JAOMET	M	B		661*	25IIA18	BOGNI 17	M	B	ITALIA
621	25IA18	JAUMIN	M	B	ESPAÑA	662*	25IIA19	PRINCEPS	M	B	ITALIA
622	25IA19	TEMPRANILLO DE GRANADA	M	B	ESPAÑA	663*	25IIA20	PROSPERI 285	M	B	ITALIA
623*	25IA20	JULY MUSCAT	M	B	EEUU	664*	25IIB01	FOSTER'S EHTE SEEDLING	M	B	REINO UNIDO
624*	25IB01	EARLY MUSCAT	M	B	EEUU	665*	25IIB02	TRIESTE	M	B	ITALIA
625	25IB02	CHASSELAS MUSQUÉ	M	B	FRANCIA	666*	25IIB03	DORONA DI VENEZIA	M	B	ITALIA
626*	25IB03	CHASSELAS DORÉ	MV	B		667	25IIB04	PRINCIPESA DI PIAMONTE	M	B	ITALIA
627*	25IB04	MUSCAT SAINT LAURENT	M	B	FRANCIA	668*	25IIB05	ALBERTA	M	B	ITALIA
628*	25IB05	ANNA MARIA	M	B	ITALIA	669*	25IIB06	FORASTERA BLANCA	M	B	ESPAÑA
629*	25IB06	PRIMIERA	M	B	ITALIA	670*	25IIB07	THALLOCYZ LAJOS	M	B	HUNGRÍA
630*	25IB07	FERDINAND DE LESSEPS	M	B	REINO UNIDO	671*	25IIB08	CATALANESCA BIANCA	M	B	ITALIA
631	25IB08	BOGNI 15	M	B	ITALIA	672*	25IIB09	SCHIRADZOULI BIANCO	M	B	IRÁN
632	25IB09	ALBILLO	MV	B	ESPAÑA	673*	25IIB10	GENERAL DE LA MARMORA	M	B	FRANCIA
633*	25IB10	FONDO DE ORZA	M	B	ESPAÑA	674*	25IIB11	DUCHESS OF BUCCLEUGH	M	B	REINO UNIDO
634*	25IB11	VILLARDIEL	M	B	ESPAÑA	675*	25IIB12	MESLIER HÁTIF	M	B	FRANCIA
635*	25IB12	AUGUSTA	M	B	ITALIA	676*	25IIB13	DIAMANT TRAUBE	M	B	ALEMANIA
636*	25IB13	CIRCA	M	B	ALEMANIA	677	25IIB14	ENVERROUS TRAUBE	M	B	HUNGRÍA
637*	25IB14	BRUNI 415	M	B	ITALIA	678*	25IIB15	SUPERZIBIBBO	M	B	ITALIA
638*	25IB15	EL GOUZ	M	B	MARRUECOS	679	25IIB16	JAPINKAY	M	B	
639	25IB16	PROFESSOR ABERSON	M	B	HOLANDA	680*	25IIB17	SAUVIGNON	M	B	FRANCIA
640*	25IB17	GRADISKA	M	B		681*	25IIB18	PIROVANO 18	M	B	ITALIA
641*	25IB18	PROSPERI 008	M	B	ITALIA	682*	25IIB19	MOSCATO GUSTAV SZAUTER	M	B	HUNGRÍA

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
683	25IIB20	ACTONI MACERON	M	B		727	25IVA04	MOSCATO DI CANELLI	M	B	ITALIA
684	25IIIA01	BLANCA SUPERIOR PARA PARRAL	M	B	ESPAÑA	728*	25IVA05	DABOUKI	M	B	ISRAEL
685*	25IIIA02	FAVORITA DI CONEGLIANO	M	B	ITALIA	729	25IVA06	MONARCA DEL VESUBIO	M	B	
686*	25IIIA03	INZOLIA BIANCA	M	B	ITALIA	730*	25IVA07	OLIVETTE BARTHELET	M	B	FRANCIA
687*	25IIIA04	WRATCHANSKI MISKET	M	B		731	25IVA08	OLIVETTE BLANCHE	M	B	
688*	25IIIA05	BICANE	M	B		732*	25IVA09	CORNIOLA DI MILAZZO	M	B	ITALIA
689*	25IIIA06	MOSCATO DI TERRACINA	M	B	ITALIA	733*	25IVA10	AURATA	M	B	ITALIA
690	25IIIA07	MOSCATEL MÁLAGA	MV	B	ESPAÑA	734*	25IVA11	PERLONA	M	B	ITALIA
691*	25IIIA08	MARENGO	M	B	ITALIA	735*	25IVA12	LOCAL EHITE XYNISTERI	M	B	GRECIA
692*	25IIIA09	COARNA BIANCA	M	B	ITALIA	736*	25IVA13	PIROVANO 575	M	B	ITALIA
693	25IIIA10	DAVID	M	B	ITALIA	737	25IVA14	DOMINGA	M	B	ESPAÑA
694*	25IIIA11	SIDERITIS	M	T	GRECIA	738	25IVA15	TENERON DE VAUCLUSE	M	B	
695*	25IIIA12	AURORA	M	B	ITALIA	739	25IVA16	GALLETTA ROSA	M	B	ITALIA
696*	25IIIA13	ZARIZA NA LOSIATA X BOLGAR 19-2	M	B		740*	25IVA17	ALEDO REAL	M	B	ESPAÑA
697*	25IIIA14	LACRIMA DI MARIA	M	B	ITALIA	741	25IVA18	GROS VERT	M	B	
698	25IIIA15	MUSCAT DE LUNELL	M	B		742*	25IVA19	CIMINNITA	M	B	ITALIA
699	25IIIA16	CANNON HALL	M	B		743	25IVA20	OPALE	M	B	
700*	25IIIA17	REGINA ELISABETTA	M	B		744	25IVB01	PIZZUTELLO BIANCO	M	B	
701*	25IIIA18	CICLÓPICA	M	B	ITALIA	745	25IVB02	DE CUERNO	M	B	ESPAÑA
702	25IIIA19	VALENCI BLANCO	MV	B	ESPAÑA	746*	25IVB03	PIZZUTELLO MOSCATO BIONDO	M	B	ITALIA
703	25IIIA20	DON BUENO	M	B	ESPAÑA	747*	25IVB04	AUSONIA	M	B	ITALIA
704	25IIB01	BLANCO GORDAL	M	B	ESPAÑA	748*	25IVB05	SERVANT	M	B	FRANCIA
705*	25IIB02	IMPERO	M	B	ITALIA	749*	25IVB06	RODITIS	M	B	GRECIA
706*	25IIB03	BARESANA	M	B	ITALIA	750*	25IVB07	PROSPERI 037	M	B	ITALIA
707*	25IIB04	ZIBIBBO	M	B	ITALIA	751*	25IVB08	TALISMANO	M	B	
708	25IIB05	ROMÉ	MV	B	ESPAÑA	752	25IVB09	PLANTA NOVA	MV	B	ESPAÑA
709	25IIB06	TURCHESCA	M	B		753*	25IVB10	SANTA MAGDALENA	MV	B	ESPAÑA
710*	25IIB07	ITALIA	M	B	ITALIA	754	25IVB11	LUISA BLANCA	M	B	ESPAÑA
711*	25IIB08	VERDEA	M	B	ITALIA	755	25IVB12	TORRONTÉS	MV	B	ESPAÑA
712*	25IIB09	ROSETI	M	B	LÍBANO	756*	25IVB13	LATINA	M	B	ITALIA
713*	25IIB10	PROSPERI 102	M	B	ITALIA	757	25IVB14	PROSPERI 262	M	B	ITALIA
714*	25IIB11	CLOTILDE PROSPERI	M	B	ITALIA	758*	25IVB15	ALEDO	M	B	ESPAÑA
715	25IIB12	SMEDEREVKA	MV	B	YUGOSLAVIA	759	25IVB17	TETA DE VACA	M	B	ESPAÑA
716	25IIB13	RAZAKI ISLA DE CRETA	M	B	GRECIA	760	25IVB18	UVA DE ALMERIA	M	B	ITALIA
717	25IIB14	KÉRINO	M	B		761*	25IVB19	HIMONIATICO	M	B	CHIPRE
718	25IIB15	BENEDICTION DE PECS	M	B	HUNGRÍA	762*	25IVB20	CALMERIA	M	B	EEUU
719	25IIB16	MOSCATEL BLANCO	MV	B	ESPAÑA	763*	25VA01	VOLTA	M	T	ITALIA
720*	25IIB17	NEHELESCOL	M	B	ISRAEL	764*	25VA02	NOIR HÂTIF DE MARSEILLE	M	T	FRANCIA
721*	25IIB18	GALLURA ZENNI DE DAMASCO	M	B	ITALIA	765*	25VA03	ROI DES PRECOCES	M	T	
722	25IIB19	MANTUO DE GRANADA	MV	B	ESPAÑA	766*	25VA04	CHAOUCH ROSE	M	T	TURQUÍA
723	25IIB20	CHELVA	M	B	ESPAÑA	767	25VA05	LORD ROTHERMERE	M	T	HUNGRÍA
724*	25IVA01	UVA JIJONA	M	B	ESPAÑA	768	25VA06	CARDINAL	M	T	EEUU
725*	25IVA02	VIVONA 378	M	B	ITALIA	769*	25VA07	PERLE DE CSABA ROUGE	M	T	HUNGRÍA
726*	25IVA03	PIROVANO 093	M	B	ITALIA	770*	25VA08	AGOSTENGA ROSA	M	T	ITALIA

Anexos

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
771*	25VA09	GATETA	M	T	ESPAÑA	818*	25VIA18	PERLA NERA	M	T	ITALIA
772	25VA10	CHASSELAS VIOLET	M	T	FRANCIA	819*	25VIA19	BRUNI 090	M	T	ITALIA
773	25VA11	CHASSELAS ROSE	M	T	FRANCIA	820*	25VIA20	ELETTRA	M	T	
774*	25VA12	CHASSELAS ROUGE	M	T		821*	25VIB01	DALMASSO XI-08	M	T	ITALIA
775*	25VA13	PORTUGÜES AZUL	M	T		822*	25VIB02	GEMRE	M	T	TURQUÍA
776*	25VA14	SCHIRAZ	M	T	FRANCIA	823*	25VIB03	BOGNI 08	M	T	ITALIA
777	25VA15	QUEEN KEARNEY	M	T	EEUU	824*	25VIB04	ARTURO MARESCALCHI	M	T	ITALIA
778*	25VA16	BRUNI 074	M	T	ITALIA	825	25VIB05	VALENCÍ TINTO	M	T	ESPAÑA
779*	25VA17	COARNA NEAGRA	M	T	RUMANÍA	826*	25VIB06	PLANTA MULA	M	T	ESPAÑA
780	25VA18	MUSCAT MADAME MATHIASZ	M	T	HUNGRÍA	827	25VIB07	ROSSO GROSSO PRECOZ	M	T	ITALIA
781*	25VA19	SCARLET	M	T	EEUU	828*	25VIB08	BARBABLEU	M	T	ITALIA
782*	25VA20	BRUNI 102	M	T	ITALIA	829*	25VIB09	NYMRANG	M	T	RUSIA
783*	25VB01	DUC DE MAGENTA	M	T	FRANCIA	830	25VIB10	MOLINERA	M	T	ESPAÑA
784*	25VB02	LOMBARDIA	M	T	ITALIA	831*	25VIB11	DALMASSO XVIII-03	M	T	ITALIA
785*	25VB03	BRUNI 707	M	T	ITALIA	832*	25VIB12	DALMASSO XI-20	M	T	ITALIA
786*	25VB04	FRANKENTHAL	M	T	AUSTRIA	833*	25VIB13	GROS COLMAN	M	T	RUSIA
787	25VB05	LEOPOLD III	M	T		834*	25VIB14	PIROVANO 771	M	T	ITALIA
788*	25VB06	CORNICHON VIOLET	M	T		835*	25VIB15	MARIA ROSA	M	T	ITALIA
789*	25VB09	PRUNE DE CAZOULS	M	T	ORIENTAL	836*	25VIB16	MAERUD	M	T	GRECIA
790	25VB10	ROYAL TERHEYDEN	M	T		837*	25VIB17	INZOLIA NERA	M	T	ITALIA
791	25VB11	ALPHONSE LAVALLÉ	M	T	FRANCIA	838*	25VIB18	DARKAIA NERA	M	T	SIRIA
792	25VB12	RIBIER	M	T	FRANCIA	839	25VIB19	ROYAL	M	T	ESPAÑA
793*	25VB13	PIROVANO 188	M	T	ITALIA	840	25VIB20	QUEEN	M	T	EEUU
794*	25VB14	APESORGIA NERA	M	T	ITALIA	841*	25VIA01	SUPERFRANKENTHAL	M	T	ITALIA
795	25VB15	DIMITIS	MV	T	GRECIA	842	25VIA02	ARGELINA	M	T	ESPAÑA
796*	25VB16	PLOVDINA	MV	T	YUGOSLAVIA	843*	25VIA03	TORRALBA	MV	T	ESPAÑA
797*	25VB17	PIROVANO 531	M	T	ITALIA	844*	25VIA04	LASSINA	M	T	YUGOSLAVIA
798*	25VB18	CEREZA	M	T		845*	25VIA05	AHMEUR BOU AHMEUR	M	T	MARRUECOS
799*	25VB19	MOSCATEL NEGRO	M	T	ESPAÑA	846*	25VIA06	620 PIROVANO	M		ITALIA
800	25VB20	MOSCATEL NEGRO	M	T	ESPAÑA	847*	25VIA07	ROSAKI NOIR DES SEMIS	M	T	ÁFRICA
801*	25VIA01	OILLADE NOIR	M	T	FRANCIA	848*	25VIA09	FRAULA KAKINI	M	T	GRECIA
802*	25VIA02	PIRIQUITA	MV	T	PORTUGAL	849	25VIA10	FERRAL	MV	T	ESPAÑA
803*	25VIA03	NINCUSA	M	T	YUGOSLAVIA	850*	25VIA11	EL FARRYALI	M	T	MARRUECOS
804*	25VIA04	MOSCATO DEL ADDA	M	T	ITALIA	851*	25VIA12	GROS MAROC	M	T	BELGICA
805*	25VIA05	MOSCATEL DE HAMBURGO	M	T		852*	25VIA13	DANUGUE	M	T	FRANCIA
806	25VIA06	MOSCATO DI MADRESFIELD	M	T	REINO UNIDO	853*	25VIA14	MISTRESS HALL	M	T	REINO UNIDO
807	25VIA07	CINSAUT	M	T	FRANCIA	854*	25VIA15	DALMASSO III-33	M	T	ITALIA
808*	25VIA08	TERESA PIROVANO	M	T	ITALIA	855*	25VIA16	BLACK ROSE	M	T	EEUU
809	25VIA09	ANGELO	M	T		856	25VIA17	DON MARIANO	M	T	ESPAÑA
810*	25VIA10	CILIEGUIOLO NERO	M	T	ITALIA	857	25VIA18	CIRUELA ROJA	M	T	ESPAÑA
811	25VIA11	CRIOILLA	M	T		858*	25VIA19	BLACK ALICANTE	M	T	HOLANDA
812*	25VIA12	IGNEA	M	T	ITALIA	859*	25VIA20	JERÓNIMO DE TUDELA	M	T	ESPAÑA
813*	25VIA13	TRENTHAM BLACK	M	T		860*	25VIB01	DATTIER NOIR	M	T	ORIENTAL
814*	25VIA14	SUPERBA	M	T	ITALIA	861*	25VIB02	LATTUARIO NERO	M	T	ITALIA
815*	25VIA15	PIROVANO 159	M	T	ITALIA	862*	25VIB03	NORE	M	T	ESPAÑA
816*	25VIA16	FUSCA	M	T	ITALIA	863*	25VIB04	OPHTALMO	M	T	CHIPRE
817*	25VIA17	VERNACCIA NERA	M	T	ITALIA	864*	25VIB05	BARLINKA	M	T	SUDÁFRICA

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
865*	25VIIB06	MARSIGLIANA	M	T	ITALIA	910	25VIIB20	KISCHMISCH ALI BLANC	M	B	
866	25VIIB07	HELVANY ROUGE	M	T	LÍBANO	911*		PAULSEN 1103	PTI		ITALIA
867*	25VIIB08	GLACIÈRE	M	T	FRANCIA	912		ARINTO	V	B	PORTUGAL
868*	25VIIB09	PRUNESTA NERA	M	T	ITALIA	913*		BONARDA	V	T	ARGENTINA
869*	25VIIB10	COLGAR ROJA	M	T	EEUU	914*		PINOTAGE	V	T	SUDÁFRICA
870*	25VIIB11	PERGOLESE	M	T	ITALIA	915*		TANNAT	V	T	FRANCIA
871*	25VIIB12	PIZZUTELLO NERO	M	T	ITALIA	916*		KERNER	V	B	ALEMANIA
872	25VIIB13	CRUJILLÓN	M	T	ESPAÑA	917*		CABERNET SAUVIGNON	V	T	FRANCIA
873*	25VIIB14	ALMERIA NERA	M	T	ESPAÑA	918*		FETEASCA REGALA	V	B	RUMANÍA
874	25VIIB15	RAGOL	MV	T	ESPAÑA	919*		RUGGERI 140	PTI		ITALIA
875	25VIIB16	NEGRA RAYADA	M	T	ESPAÑA	920		QUEBRANTA	V	T	PERÚ
876*	25VIIB17	LOCAL BLACK	M	T	CHIPRE	921*		VITIS CALIFORNICA	EGV		FRANCIA
877	25VIIB18	NEGRA TARDÍA	M	T	ESPAÑA	922*		RIESLING	V	B	ALEMANIA
878*	25VIIB19	EMPEROR	M	T	ORIENTAL	923*		JACQUEZ	HPD		ESPAÑA
879*	25VIIB20	OLIVETTA NERA	M	T	ITALIA	924*		SO4	PTI		HUNGRÍA
880*	25VIIIA01	DELIGHT	M	B	EEUU	925*		VITIS RIPARIA	EGV		EEUU
881*	25VIIIA03	LOOSE PERLETTE	M	B	EEUU	926*		VITIS SILVESTRIS (MACHO)	EGV		ESPAÑA
882	25VIIIA04	CHASSELAS APYRENE	M	B	FRANCIA	927*		FERCAL	PTI		FRANCIA
883	25VIIIA05	CORINTHE BLANC	M	B	GRECIA	928*		COUDERC 3309	PTI		FRANCIA
884*	25VIIIA06	GRAZIELLA I	M	B	ITALIA	929*		MILLARDET 19-62	PTI		FRANCIA
885*	25VIIIA07	SULTANINA	M	B	GRECIA	930*		BABIC	V	T	CROACIA
886*	25VIIIA08	MARIA PIROVANO	M	B	ITALIA	931*		SAPERAVI	V	T	RUSIA
887*	25VIIIA09	PIROVANO 166A	M	B	ITALIA	932*		COUDERC 1616	PTI		FRANCIA
888*	25VIIIA10	SULTANA MOSCATA	M	B	ITALIA	933*		VELTLINER GRUEN	V	B	AUSTRIA
889	25VIIIA11	GRAZIELLA II	M	B	ITALIA	934*		TOCAI FRIULANO	V	B	ITALIA
890*	25VIIIA12	BASILE LOGOTHETIS	M	B	ITALIA	935*		UGNI BLANC	V	B	FRANCIA
891*	25VIIIA13	RODI	M	B	ITALIA	936*		MILLARDET 420A	PTI		FRANCIA
892*	25VIIIA14	CANNER SEEDLESS	M	B	EEUU	937		XYNOMAVRO	V	T	GRECIA
893*	25VIIIA15	BRUNI 045	M	B	ITALIA	938*		SAUVIGNON BLANC	V	B	FRANCIA
894*	25VIIIA16	ITALIA X SULTANINA V-6	M	B	BULGARIA	939*		MELON	V	B	FRANCIA
895*	25VIIIA17	ITALIA X SULTANINA VI-4	M	B	BULGARIA	940*		BAGA	V	T	PORTUGAL
896	25VIIIA18	SULTALHAMA	M	B		941*		SEYVAL	HPD		CANADÁ
897*	25VIIIA19	BRUNI 116	M	B	ITALIA	942*		FETEASCA NEAGRA	V	T	RUMANÍA
898*	25VIIIA20	SELECCION BRUNI 1	M	B	ITALIA	943*		VITIS SILVESTRIS (MACHO)	EGV		ESPAÑA
899*	25VIIB01	BEAUTY SEEDLESS	M	T	EEUU	944		CHENIN	V	B	FRANCIA
900	25VIIB02	CAPE CURRANT	M	T	SUDÁFRICA	945*		KRATOSIJA	V	T	YUGOSLAVIA
901*	25VIIB03	BLACK CURRANT	M	T	GRECIA	946*		ARVINE PETITE	V	B	SUIZA
902	25VIIB04	MAVRI KORINZIAKI	M	T	GRECIA	947*		MALBEC	V	T	FRANCIA
903*	25VIIB07	BLACK MONUCCA	M	T	EEUU	948*		VILLARD BLANC	HPD		FRANCIA
904	25VIIB08	SULTANINA ROJA	M	T	GRECIA	949		EMERALD RIESLING	V	B	EEUU
905	25VIIB09	SULTANINA ROSADA	M	T	GRECIA	950		PROKUPAC	V	T	YUGOSLAVIA
906*	25VIIB11	EMERALD SEEDLESS	M	B	EEUU	951*		PETIT VERDOT	V	T	FRANCIA
907*	25VIIB17	APIRENA DI VELLETRI	M	B	AFGANISTÁN	952*		41 B M	PTI		ESPAÑA
908*	25VIIB18	SLAVJANKA	M	B	BULGARIA	953*		PINOT BLANC	V	B	FRANCIA
909*	25VIIB19	BAYAD	M	B	YEMEN	954*		RUPESTRIS DE LOT	PTI		EEUU

Anexos

Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN	Nº	CÓDIGO PARCELA	NOMBRE ACCESIÓN	USO	COLOR	PAÍS ORIGEN
955*		SYRAH	V	T	FRANCIA	990		FERNAO PIRES	V	B	PORTUGAL
956*		BARBERA	V	T	ITALIA	991*		AGIORGITIKO	V	T	GRECIA
957		PAMID	V	T	BULGARIA	992		AIRÉN	V	B	ESPAÑA
958		PETT BOUSCHET	V	T		993		CABERNET SAUVIGNON	V	T	FRANCIA
959*		PLAVAC MALI	V	T	CROACIA	994		CARDINAL	M	T	EEUU
960*		VITIS CINEREA	EGV		ESPAÑA	995*		CHARDONNAY	V	B	FRANCIA
961*		ISABELLA	V	T	BRASIL	996*		CRIMSON SDL	M	T	EEUU
962*		COUDERC 161-49	PTI		FRANCIA	997*		FLAME SDL	M	T	EEUU
963		RICHTER 110	PTI			998		GARNACHA	V	T	ESPAÑA
964*		VITIS LABRUSCA	EGV		ALEMANIA	999*		GOETHE 9	PTI		EEUU
965*		DIMYAT	M	B	BULGARIA	1000*		HANS	V	T	ALEMANIA
966		PINOT GRIS	V	GRIS	FRANCIA	1001		ITALIA	M	B	ITALIA
967*		TINTA BARROCA	V	T	PORTUGAL	1002*		MANCIN	V	T	FRANCIA
968*		SILVANER	V	B	ALEMANIA	1003*		MAUZAC	V	B	FRANCIA
969		MISSION	MV	T	EEUU	1004*		MAVRODAPHNI	V	T	GRECIA
970*		RUBY CABERNET	MV	T	EEUU	1005		MERLOT	V	T	FRANCIA
971		SMEREDEVKA	MV	B	YUGOSLAVIA	1006		MONASTRELL	V	T	ESPAÑA
972*		FURMINT	V	B	HUNGRÍA	1007		MOSCATEL DE MÁLAGA	MV	B	ESPAÑA
973		PORTUGAIS BLEU	M	T	ALEMANIA	1008		NAPOLEÓN	M	T	ESPAÑA
974*		SEMILLON	V	B	FRANCIA	1009		OHANES	M	B	ESPAÑA
975		CABERNET FRANC	V	T	FRANCIA	1010		PALOMINO FINO	V	B	ESPAÑA
976		PINOT NOIR	V	T	FRANCIA	1011*		RED GLOBE	M	T	EEUU
977*		VITIS AESTIVALIS	EGV		ESPAÑA	1012*		ROMORANTIN	V	B	FRANCIA
978		GAMAY	V	T	FRANCIA	1013*		RONDINELLA	V	T	ITALIA
979		GARGANEGA	V	B	ITALIA	1014*		SALVADOR (=SEIBEL 128)	HPD		FRANCIA
980*		MÜLLER-THURGAU	V	B	ALEMANIA	1015		SAUVIGNON BLANC	V	B	FRANCIA
981*		RABO DE OVELLA	V	B	PORTUGAL	1016*		SCHWARZMANN	PTI		FRANCIA
982*		VITIS ARIZONICA	EGV		ESPAÑA	1017*		SUGRAONE	M	B	EEUU
983*		MERLOT	V	T	FRANCIA	1018*		TELEKI 5C	PTI		HUNGRÍA
984*		SANGIOVESE	V	T	ITALIA	1019		TEMPRANILLO	V	T	ESPAÑA
985		DABOUKI	M	B	ISRAEL	1020		THOMPSON SDL	M	B	GRECIA
986*		MONTEPULCIA NO	V	T	ITALIA	1021*		VELTLINER ROT	V	T	ITALIA
987		CINSAUT	M	T	FRANCIA	1022*		VIALLA	PTI		FRANCIA
988*		OBERLIN 595	HPD		FRANCIA	1023*		VITAL	V	B	PORTUGAL
989*		GEWÜRZTRAM INER	V	B	FRANCIA						

7.2. ANEXO II. Propuesta de 5 descriptores microsatélite, adicionales a los elaborados durante el proyecto GENRES081.

Carácter: Marcador SSR ssrVrZAG29	Nº de código
-----------------------------------	--------------

Secuencia del cebador: ssrVrZAG29a: ATAACCAGGACAAGTTATTCAAGCC
 ssrVrZAG29b: ACCCAATTGACCATCTTTTATGCTG

Distancia relativa en pares de bases al alelo de tamaño n	Ejemplos de variedades		Otros ejemplos de variedades
	Notación (Código de variedad)		
107 n	41BM1	Millardet et Grasset 41B: 1	
109 n+2	ME1	Merlot N: 1/2	Cabernet sauvignon N: 1/2, Chardonnay B: 1/2, Muscat of Alexandria B: 1/2, Sultanina gigas B:1
111 n+4	PO1	Portugieser blau N: 1	Sultanina gigas B: 2
113 n+6	PO2	Portugieser blau N: 2	Pinot noir N: 2, Traminer rot RG: 2
115 n+8	FE1	Fercal: 1	Millardet et Grasset 420A: 1
117 n+10	16C1	Couderc 1616: 1	Malegue 44-53: 1, Paulsen 1103: 2, Teleki 5C: 1
119 n+12	1MG2	Millardet et Grasset 101-14 N: 2	Salvador: 2
121 n+14	FE2	Fercal: 2	
123 n+16	5BK2	Kober 5 BB: 2	
125 n+18	11R1	Richter 110: 1	Ruggeri 140: 2
129 n+22	11R2	Richter 110: 2	Malegue 44-53: 2, Teleki 5C: 2
131 n+24	595O2	Oberlin 595: 2	
133 n+26	16C2	Couderc 1616: 2	Castel 216-3: 2, Millardet et Grasset 420A: 2
135 n+28	33C2	Couderc 3309: 2	
139 n+32	VIA2	Vialla N: 2	Goethe: 2

Carácter: Marcador SSR ssrVrZAG67	Nº de código
-----------------------------------	--------------

Secuencia del cebador: ssrVrZAG67a: ACCTGGCCCGACTCCTCTTGTATGC
 ssrVrZAG67b: TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG

Distancia relativa en pares de bases al alelo de tamaño n	Ejemplos de variedades		Otros ejemplos de variedades
	Notación (Código de variedad)		
120 n	AB1	*Albilla B: 1	
123 n+3	CS1	Cabernet sauvignon N: 1	Muscat of Alexandria B: 1/2, Sultanina gigas B: 1
129 n+9	ME1	Merlot N: 1	Portugieser blau N: 2, Traminer rot RG: 2
131 n+11	PE1	Perruno B: 1	Corazón de Cabrito B: 1, Barrados das Moscas B: 2
135 n+15	JA2	Jacquez N: 2	
137 n+17	ME2	Merlot N: 2	Cabernet sauvignon N: 2, Chardonnay B: 1, Sultanina gigas B: 2.
139 n+19	11R1	Richter 110: 1/2	Ruggeri 140: 1
141 n+21	99R1	Richter 99: 1	Kober 5 BB: 1, Teleki 5 C: 1
143 n+23	FE1	Fercal: 1/2	Salvador: 2
145 n+25	VIA1	Vialla N: 1	
147 n+27	VE1	Veltliner rot RG: 1/2	Hans RG: 2, Rondinella N: 2
149 n+29	CH2	Chardonnay B: 2	Millardet et Grasset 420A: 1
151 n+31	PI2	Pinot noir N: 2	Admirable de Courtiller B: 2, Madeleine royale B: 2
153 n+33	MAV 2	Mavrodaphni N: 2	
155 n+35	16C1	Couderc 1616: 1	Millardet et Grasset 101-14 N: 1, Ruggeri 140: 2
158 n+38	33C1	Couderc 3309: 1	Silvaner B: 2, Millardet et Grasset 420A: 2
160 n+40	16C2	Couderc 1616: 2	
162 n+42	5C2	Teleki 5 C: 2	Kober 5 BB: 2, Vialla N: 2
166 n+46	1MG2	Millardet et Grasset 101-14 N: 2	
170 n+50	33C2	Couderc 3309: 2	
176 n+56	99R2	Richter 99: 2	Paulsen 1103: 2, Schwarzmann:2

* Identidad de la variedad dudosa

Carácter: Marcador SSR ssrVrZAG83	Nº de código
-----------------------------------	--------------

Secuencia del cebador: ssrVrZAG83a: GGCGGAGGCGGTAGATGAGAGGGCG
 ssrVrZAG83b: ACGCAACGGCTAGTAAATACAACGG

Distancia relativa en pares de bases al alelo de tamaño n	Ejemplos de variedades		Otros ejemplos de variedades
	Notación (Código de variedad)		
159 n	5C1	Teleki 5 C: 1	
161 n+2	VIA1	Vialla N: 1	
166 n+7	5C2	Teleki 5 C: 2	Kober 5 BB: 1, Paulsen 1103: 1
172 n+13	AP1	Arvine Petite B: 1	
174 n+15	11R1	Richter 110: 1	Richter 99: 1
176 n+17	SAL1	Salvador: 1	
184 n+25	CIN1	Vitis cinerea: 1/2	
185 n+26	VIA2	Vialla N: 2	Kober 5 BB: 2, Schwarzmann: 1
188 n+29	33C1	Couderc 3309: 1/2	Millardet et Grasset 101-14 N: 1/2, Richter 99: 2
190 n+31	SU1	Sultanina gigas B: 1	Chardonnay B: 1, Muscat a petits grains blancs B: 1/2, Pinot noir N: 1, Muscat of Alexandria B: 1/2
192 n+33	SI2	Silvaner B: 2	Portugieser blau N: 1, Mavrodaphni N: 1/2
195 n+36	ME1	Merlot N: 1	Portugieser blau N: 2, Sultanina gigas N: 2
201 n+42	ME2	Merlot N: 2	Cabernet sauvignon N: 1/2, Chardonnay B: 2, Pinot noir N: 2
207 n+48	AE2	Vitis aestivalis: 2	
217 n+58	FE2	Fercal: 2	Goethe 9: 1/2, Richter 110: 2

Carácter: Marcador SSR ssrVrZAG112	Nº de código
------------------------------------	--------------

Secuencia del cebador: ssrVrZAG112a: CGTTTAAAGCCAGCTGAATCTTGGG
 ssrVrZAG112b: TGGCTCCATACTGCTTCACGTAGGC

Distancia relativa en pares de bases al alelo de tamaño n	Ejemplos de variedades		Otros ejemplos de variedades
	Notación (Código de variedad)		
227 n	ME1	Merlot N: 1	Cabernet sauvignon N:1, Sultanina gigas B: 1
229 n+2	MA1	Madeleine Angevine B: 1	Teresa Pirovano N: 1, Servant B: 2
232 n+5	CS2	Cabernet sauvignon N: 2	Muscat a petits grains blancs B: 1/2, Muscat of Alexandria B: 1
234 n+7	AM2	Albillo Mayor B: 2	Sousón N: 1, Manto negro N: 2
236 n+9	SI1	Silvaner B: 1	Trebbiano toscano B: 2, Carignan N: 2
238 n+11	PO2	Portugieser blau N: 2	Chardonnay B: 1/2, Pinot noir N: 1
240 n+13	ME2	Merlot N: 2	Pinot noir N: 2, Millardet et Grasset 101-14 N: 1/2
243 n+16	AE2	Vitis aestivalis: 2	
245 n+18	JA2	Jacquez N: 2	Muscat of Alexandria B: 2, Couderc 1616: 1
247 n+20	33C2	Couderc 3309: 2	Malegue 44-53: 2, Richter 99: 2, Salvador: 2
249 n+22	11R2	Richter 110: 2	
251 n+24	VR2	Valenciana Rosada RG: 2	
253 n+26	16C2	Couderc 1616: 2	Castel 216-3: 2
255 n+28	FE2	Fercal: 2	
259 n+32	SU2	Sultanina gigas B: 2	
277 n+50	VIA2	Violla N: 2	

Carácter: Marcador SSR VVMD28	Nº de código
-------------------------------	--------------

Secuencia del cebador: VVMD28a: AACAAATTC AATGAAAAGAGAGAGAGAGA
VVMD28b: TCATCAATTTTCGTATCTCTATTTGCT

Distancia relativa en pares de bases al alelo de tamaño n	Ejemplos de variedades		Otros ejemplos de variedades
	Notación (Código de variedad)		
214 n	5C1	Teleki 5 C: 1	Kober 5 BB: 1, Schwarzmann: 1
216 n+2	CH1	Chardonnay B: 1	Pinot noir N: 1, Sultanina gigas N: 1
218 n+4	99R1	Richter 99: 1	Castel 216-3: 1, Fercal: 1
224 n+10	VIA1	Vialla N: 1	
226 n+12	ME1	Merlot N: 1	Chardonnay B: 2, Portugieser blau N: 1
228 n+14	JA1	Jacquez N: 1	
230 n+16	AR1	Vitis arizonica: 1	
232 n+18	ME2	Merlot N: 2	Cabernet sauvignon N: 1, Traminer rot RG: 1
234 n+20	CS2	Cabernet sauvignon N: 2	Pinot noir N: 2, Traminer rot RG: 2
237 n+23	33C1	Couderc 3309: 1	Goethe 9: 2
240 n+26	16C1	Couderc 1616: 1	Castel 216-3: 2, Millardet et Grasset 101-14 N: 1, Paulsen 1103: 1
242 n+28	SU2	Sultanina gigas B: 2	Muscat of Alexandria B: 1, Mourvedre N: 1
244 n+30	MU1	Muscat a petits grains blancs B: 1	Couderc 3309: 2, Veltliner rot RG: 1
246 n+32	MAN1	Mancin N: 1/2	Carignan N: 1, Salvador: 2, Vital B: 2
248 n+34	16C2	Couderc 1616: 2	Millardet et Grasset 101-14 N: 2
250 n+36	5C2	Teleki 5 C: 2	Kober 5 BB: 2, Malegue 44-53: 2, Paulsen 1103: 2
252 n+38	MB2	Malvasía blanca B: 2	Coloraillo RG:1, Brujidera N:2
256 n+42	AL2	Alvarelhao N: 2	Carignan N: 2, Mourvedre N: 2, Rondinella N: 2
258 n+44	PO2	Portugieser blau N: 2	
260 n+46	MD2	Mandón N: 2	Uva del Rey B: 2
262 n+48	PX2	Pedro Ximenez B: 2	Malvasía de Lanzarote B :2
266 n+52	MU2	Muscat a petits grains blancs B: 2	Muscat of Alexandria B: 2, Hans RG: 2, Veltliner rot RG: 2
282 n+68	CIN2	Vitis cinerea: 2	

8.SUMMARY

8. SUMMARY

8.1. INTRODUCTION

Grapevine is one of the oldest cultures in the world. Their plants are woody, and asexually multiplied through cuttings. There are a lot of varieties in the world (between 5,000 and 10,000) and many of them have been cultured several centuries ago. Most are local varieties, and there are numerous synonyms (one variety having different names) and homonyms (different varieties having the same name) within and between countries.

There are two clearly distinguishable markets for grapevine: wine and table. The first one is much more important economically, and stable, regarding the varieties used, because in many cases the wine producers of a given place have to use certain varieties to get a “quality” label. So, breeding efforts are mainly focused on clone selection. The table market is much more dynamic and most of the varieties being cultivated now are different from those cultured 30 years ago. Crossbreeding is much more active for table grapes, and new interesting varieties are quickly spread to other producer countries. As a consequence, the issue of variety legal protection (similar to a patent or to intellectual property) in grapevines affects mainly to these table varieties.

In the grapevine species, a new variety can come from a sexual cross, where an embryo is produced, or from an established variety through a somatic mutation, and then the new variety is called ‘sport’ (or Essentially-Derived Variety, EDV, within a legal scope). This, in addition to the already mentioned existence of synonyms and homonyms, has made of the identification of grapevine varieties a difficult issue along the time. Competent organisms, and especially OIV, have been working to improve the system, which is based mainly on morphological characteristics. In 1997, the book “Descriptors of grapevine” was published jointly by IPGRI, UPOV, and OIV. Besides the ‘characterization descriptors’, based on the study of morphological characteristics, there were ‘evaluation descriptors’, of lesser importance, which included microsatellites among the molecular markers. The situation today, ten years later, has changed considerably: many grapevine institutes use microsatellite markers to identify their varieties, in addition to, or instead of, the morphological descriptions.

Summary

The plant variety legal protection requires keeping certain conditions. That requirement is evaluated by means of an exam that determines if the variety, besides new, is distinct, uniform and stable (DUS). 'The variety shall be deemed to be distinct if it is clearly distinguishable from any other variety whose existence is a matter of common knowledge at the time of the filing of the application'. 'The variety shall be deemed to be uniform if, subject to the variation that may be expected from the particular features of its propagation, it is sufficiently uniform in its relevant characteristics'. 'The variety shall be deemed to be stable if its relevant characteristics remain unchanged after repeated propagation or, in the case of a particular cycle of propagation, at the end of each such cycle'. Generally, DUS test is based exclusively on morphological markers and, sometimes, biochemical markers. In *Vitis vinifera* L., exists a scientific discipline, the Ampelography, which comprises the grapevine plant morphologic description; in spite of being essential, the Ampelography suffers from some characteristics that limit its effectiveness with regard to others more recent techniques. Among them, DNA markers show numerous advantages against morphologic markers and could complement them in many situations, making DUS exams faster and more objective. Their incorporation into the official system as characterization descriptors must be seriously considered in a next, close, future, but it is necessary a previous, thorough study to evaluate their usefulness for that specific purposes.

The main purpose of this study is to show the evaluation of 9 microsatellites through the study of a huge number of plants, and how the conclusions reached allow establishing rules that could be useful for different issues related to grapevine varieties: from legal protection, in the DUS test, including both studies of Distinctness, and of the Uniformity and Stability, to legal defence, including identification of varieties and essential derivation establishment.

8.2. MATERIALS AND METHODS

8.2.1. DNA extraction and STMS analysis

In this study, DNA was extracted from nearly 3,800 grapevine plants. DNA was purified from young leaves conserved at -80°C using the "DNeasy Plant mini Kit" or "DNeasy 96 Plant Kit" (Qiagen, Hilden, Germany).

A microsatellite selection was carried out following the next criteria: availability (public), map position (genetically independent), polymorphism (high), size of alleles (that allow multiplexing), and “quality” (ease of amplification, absence of known null alleles, absence of alleles differing only in 1 bp). On the basis of the previous criteria, 9 microsatellites were selected: *ssrVrZAG29*, *ssrVrZAG62*, *ssrVrZAG67*, *ssrVrZAG83*, *ssrVrZAG112*, *VVMD5*, *VVMD27*, *VVMD28* and *VVS2*. A system was optimized, including the design of a multiplex PCR with the 9 markers. Amplified SSR fragments were analyzed using capillary electrophoresis and fluorescence analysis in an automatic sequencer. Simplex PCRs were done when necessary.

During the study of Distinctness, several samples were amplified with 20 microsatellites (16 different to the previously used), when their identity was not clear enough after they were analysed with the initial nine microsatellites.

8.2.2. Legal protection (test DUS)

8.2.2.1. Study of Distinctness

The key point when analyzing distinctness is to establish the minimum distance that should exist between two (grapevine) plants so that they were considered distinct. Nowadays, there is not exist a defined criterion using molecular markers. In this study, a criterion to establish distinctness was suggested that consists in determining:

- 1 The lowest number of different alleles between plants originated from different embryos. ‘Intervarietal’ variability (excluding clones, synonyms varieties, EDV or sports).
- 2 The highest number of different alleles within plants originated from the same embryo. ‘Intravarietal’ variability (including sports, etc.).

If there is a clear border between those two numbers, an acceptable minimum distance using molecular microsatellite markers could be established.

In this study, the set of 9 markers was used to characterize 1,023 accessions of *Vitis vinifera* L. The vast majority of them come from the collection of grapevine varieties of “El Encín”. This set of accessions was pair-wise compared. All those accessions that presented the same genotype for the 9 microsatellite loci were

Summary

further studied to determine if they were morphologically identical and/or well-known synonymies. In the case that was true, one representative accession was kept within the set and the others were discarded. Those that could not be discarded in this way were analyzed with 16 additional microsatellites. The next steps were to compare full-matches-but-1-allele and full-matches-but-2-alleles. Also, the 16 additional microsatellites were amplified when necessary to clarify samples identity.

The data obtained was used to establish a minimum distance.

Besides, in this study, a collection with unique genotypes was obtained, which was used as a reference database in the study of Identification.

8.2.2.2. Study of Uniformity and Stability

In the study of Uniformity and Stability, almost 3,700 plants were analysed of 19 different grapevine varieties: Cardinal, Crimson seedless, Flame seedless, Italia, Napoleon, Ohanes, Red globe, Sugraone, Thompson seedless (table), Airen, Cabernet sauvignon, Chardonnay, Garnacha, Merlot, Monastrell, Muscat d'Alexandria, Palomino fino, Sauvignon blanc and Tempranillo (wine). The varieties were carefully selected, considering different uses of the grapes (wine and table), colour of the skin of the berry (recommended by the UPOV for grouping grapevine varieties), the presence or absence of seeds (very important trait in the new table varieties), origin in time (ancient and more recent), geographical origin (from different continents) and varieties in culture.

To evaluate uniformity the 9 microsatellites were studied in 50 plants of 3 different plantations of each of the 19 varieties (2,850 plants). The plant material used in all the cases was young leaves, and came mainly from Spain, but also was sent from South Africa (Cabernet sauvignon, Chardonnay, Sugraone, and Thompson seedless), and Chile (Cabernet sauvignon). In principle, it is assumed that plants of each plantation are found in the same vegetative reproduction cycle.

To evaluate stability the 9 microsatellites were studied in 5 plants of 10 different plantations (including the 3 studied for uniformity) of each of the 19 varieties (950 plants). The plant material used in all the cases was young leaves,

and came mainly from Spain, but also was sent from Chile, France, Germany, Hungary, South Africa, and USA.

Because grapevine is a woody plant, a controlled study of stability, through multiplying plants of all the varieties, would be difficult and unpractical, and would allow studying only one, or a very limited number of cycles of multiplication. For this reason, and considering that the same varieties are multiplied in different places, producing plants that for sure are in very different cycles of multiplication, it was decided to study stability looking at plants of plantations from different origins, and when possible, of different age.

In fact, uniformity and stability are being tested in both studies: if a change in one plant was found in a sample of 5 or of 50 plants, it could affect the conclusion on uniformity, while if it was found a change in all the plants of a sample of 5 or of 50 plants it could affect the conclusion on stability.

The plants were not evaluated morphologically, as to establish any relationship between microsatellite and morphological uniformity or stability.

Summarizing, for each allele of each microsatellite of each variety about 185 individual values were studied. The analyses were carried out in an automatic sequencer, using the software GeneScan that calculates the sizes of the amplified DNA fragments using an internal standard and a lineal regression. For that reason, there is an experimental variation for the values obtained for a given allele. It is necessary to determinate if two allelic values belong or not to the same allele. So, analyses of the differences between allelic values obtained in different plants in every variety were made.

Grapevine varieties are clonally propagated. So, if microsatellites used are uniform and stable in the 19 varieties, irrespective of their origin, the same allelic values for each microsatellite in every plant of the same variety are expected. Otherwise, it would be necessary to determine where the mutation has been produced, and its frequency.

8.2.3. Legal defence

8.2.3.1. Study of Identification

A study of Identification tries to find conformity between a analyzed plant and a variety, using an appropriate reference collection. The general process established here was to apply a forensic procedure: first, analysis of the 9 microsatellites in a sample, second, comparison of its genotype with a reference collection, and third, establishing a likelihood ratio for the matching, if such a matching occurred.

The “Unique Genotypes Collection” obtained during the study of Distinctness was used as reference collection. A structure analysis was done to study if this collection was composed of different subpopulations, what could affect the likelihood ratio determination.

8.2.3.2. Essential derivation establishment

Normally, in grapevine EDV are obtained through somatic mutations, or other ways that produce plants that show the same genotype for the microsatellites. So, the Essential Derivation could be established based on both a clear morphological distinctness and a full matching in microsatellites.

To test that proposal, the information obtained during the Distinctness study, was used, where accession pairs matching for 18, 17 or 16 alleles, out of 18, were carefully analyzed.

8.2.4. Development of microsatellite descriptors

Standard sets of microsatellite reference alleles were already available for 4 of the 9 microsatellite used. Here, additional sets of reference alleles were developed for the remaining 5 microsatellites: *ssrVrZAG29*, *ssrVrZAG67*, *ssrVrZAG83*, *ssrVrZAG112*, and *VVMD28*.

Mainly, the material used in this study was DNA from the collection of grapevine varieties at the “El Encín”. Amplified microsatellites were analyzed in an automatic sequencer. Afterwards, a method for codifying alleles was followed. Preference was given to well-known cultivars, except for a few alleles that were detected only in rare cultivars.

8.3. RESULTS AND CONCLUSIONS

About 5,000 plants have been analysed for different purposes, with a system of 9 microsatellites, including a multiplex PCR. The system has proved to be suitable for different issues related to grapevine varieties: from legal protection to legal defence. Based on their suitability in the multiplex PCR, and on their observed heterozygosity, the best microsatellites were ordered as follows (starting with the best): VVS2, *ssrVrZAG62*, *ssrVrZAG112*, *ssrVrZAG83*, VVMD5, VVMD28. The loci *ssrVrZAG67*, and VVMD27 were less suitable in the multiplex PCR, while *ssrVrZAG29* was the less polymorphic.

In the study of Distinctness, the key point was to establish the minimum distance. So, using molecular markers a criterion was suggested that consisted in determining:

- 1 The lowest intervarietal variability
- 2 The highest intravarietal variability

Both measured in number of different alleles. With respect to the point 1, using a large collection of 495 unique genotypes, two cases were found where the number of different alleles was 2. On the other hand, within plants from the same original embryo, and considering the 9 microsatellites used here and 1,023 accessions, the highest number of different alleles found was 1 (1 case).

In conclusion, considering the two extreme values obtained (2 and 1 alleles); a minimum distance of 2 alleles should be considered as an acceptable fixed criterion to establish distinctness.

In the study of Uniformity and Stability, material from 4,137 plants was collected, and, of that, 3,654 plants were studied (DNA extracted and microsatellite analysed). Errors in the variety denomination/sampling were detected in almost 10% of the material studied.

Summary

The alleles presented in the 19 varieties accounted for the 92% of the total frequencies found on the collection of 495 unique genotypes, showing that this set of varieties is representative of the total.

No changing-genotype mutations were detected in all the material. All the differences could be explained as technical variations, with the exception of several putative chimeras. This chimerism phenomenon was detected in Merlot (VVMD27) and Cardinal (VVMD5) varieties. Only in the case of Merlot it affected to more than 10% of off-types allowed by UPOV in the DUS test.

Although we have not evaluated the plants morphologically, the results showed that the use of this system of microsatellite analysis would not suppose any additional effort to the breeder to keep uniformity and stability in the process of developing new varieties. In case chimeras were found, the microsatellite should be discarded for that variety in question, and replaced by another microsatellite, if the remaining were not discriminating enough.

In the study of Identification, the set of 9 microsatellites demonstrated to be powerful enough, as only 5 of the 9 microsatellites were necessary to identify the 495 different varieties that composed the “Unique genotype collection”.

The structure analysis showed a possible structuration in 4 different subpopulations. These subpopulations seemed to have been composed according to their use (wine/table/rootstocks) and to their place of origin (Spanish/foreigners). Two appropriate reference collections suitable for the study of Identification were obtained. One of them, the “Unique genotype collection”, it would be apt for any grapevine variety, and the other one would exclusive be useful for table grapevine varieties identification.

The effect of the structuration was evaluated in the forensic procedure used to establish the probability of matching between different samples (extracted from the collection) and a reference collection. The reference collection was the “Unique Genotypes Collection”, as well as each subpopulation obtained in the structure analysis. The matching probabilities were so low in all the cases that the method

used seemed to provide a sound basis for legal identification, including assessing infringements on plant breeder's rights, even with a less value set of microsatellites.

A proposal for the use of the microsatellite analysis system, including a making decision for legal protection (DUS testing) and legal defence (identification and establishment of essential derivation) of grapevine varieties have been suggested in this doctoral thesis.

Also, a more practical way to arrange varieties in reference collections has been proposed. Currently, UPOV suggests to group grapevine varieties by the colour of the skin of the berry. The new proposal suggests that those varieties genetically more related (those ones with fewer different alleles' number), should be planted together.

Finally, new descriptors have been elaborated for 5 microsatellites. Now, descriptors are available for all the 9 microsatellites used here. The number of different reference alleles found ranged from 23 (VVMD28) to 15 (ssrVrZAG29 and ssrVrZAG83), with an average of 18. When possible, the same reference varieties used in the previously established descriptors have been used here.

