

Rev. FCA UNCuyo. Tomo XXXVIII. N° 1. Año 2006. 77-86.



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES DE VID (*Vitis vinifera* L.) DE CALIDAD ENOLÓGICA POR MARCADORES MICROSATÉLITES

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GRAPE VARIETIES (*Vitis vinifera* L.)
OF ENOLOGICAL VALUE USING MICROSATELLITES MARKERS

Liliana Martínez ¹
Pablo Cavagnaro ²
Ricardo Masuelli ^{1,2}

Originales
Recepción: 15/12/2005
Aceptación: 05/04/2006

RESUMEN

Siete variedades de vid empleadas en Argentina para la elaboración de vinos de alta gama fueron caracterizadas molecularmente a través del empleo de microsatélites. Seis de los 8 pares de cebadores usados amplificaron patrones de bandas reproducibles. El número de alelos detectados por locus varió entre 5 y 10, con un total de 42 alelos, registrándose desde 1 a 7 alelos únicos. El número de genotipos microsatélites encontrados para cada locus osciló entre 3 y 7, con un total de 28. Las variedades Tempranillo y Chenin mostraron 6 y 5 genotipos «únicos», respectivamente, con los 6 loci analizados. La heterocigosidad observada varió entre 42,9 y 100 %, mientras que la heterocigosidad esperada osciló entre 64,3 y 87,8 %. El locus más informativo fue VrZAG79 (con un contenido de información polimórfica de 84,9 % y un número de alelos efectivos de 8,17) mientras que el menos informativo fue VrZAG62. La probabilidad acumulada de obtener genotipos idénticos fue de $7,68 \times 10^{-05}$ indicando que, mediante el uso combinado de estos 6 cebadores microsatélites se pueden discriminar todas las variedades ensayadas, con alto grado de certeza. El análisis de agrupamiento por el método UPGMA separó claramente las variedades francesas (Merlot, Pinot Noir y Cabernet Sauvignon) y Syrah de

ABSTRACT

SSR markers characterized seven grapevine varieties used for high quality wines in Argentina. Six of the 8 primers used gave reproducible band profiles. The number of alleles per locus varied from 5 to 10, with a total of 42 and 1 to 7 unique alleles. Three to 7 SSR genotypes per locus were found, with a total of 28. Tempranillo and Chenin showed 6 and 5 unique alleles, respectively, taking in account all the primers assessed. The observed heterozygosity varied between 42.9 and 100 %, while the expected heterozygosity ranged from 64.3 to 87.8 %. VrZAG79 was the most informative locus (PIC 84.9 % and n_e 8.17), while VrZAG62 was the least informative. Combining the use of 6 primers, the accumulative probability of missidentifying two random different genotypes as the same, was very low: 7.68×10^{-05} . The UPGMA cluster analysis separated the French varieties (Merlot, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon), and Syrah from Tempranillo and Bonarda. This technique can provide a service to grapevine nurseries and farmers interested in certifying the genetic identity of the materials commercialized by them.

Key words

grapevine • *Vitis vinifera* L. • microsatellites • varieties identification • PCR

- 1 Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown 500. Mendoza. Argentina. M5528AHB. lmartinez@fca.uncu.edu.ar
- 2 CONICET. Estación Experimental Agropecuaria La Consulta, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Ruta Nacional 40, km 96. (5567) La Consulta. Mendoza. Argentina.

los cepajes Tempranillo y Bonarda. Esta técnica podría ofrecerse como servicio a viveristas y productores vitícolas interesados en garantizar la identidad genética de sus materiales comercializados.

Palabras clave

vid • *Vitis vinifera* L. • microsátélites • identificación variedades • PCR

INTRODUCCIÓN

La vid europea (*Vitis vinifera* L.) es una especie de importancia económica, cultivada para su consumo en forma de uva de mesa, mosto y vino. Actualmente existirían entre 5000 y 8000 variedades en todo el mundo (10). Sin embargo, el número de cepajes con aptitud enológica superior y reconocidos mundialmente es sensiblemente inferior: no alcanza el centenar de variedades.

En las últimas décadas, el encepado argentino ha sufrido cambios cuali-cuantitativos. Si bien la superficie total cultivada disminuyó más del 30 % respecto de la década del 60 y del 70, paralelamente se incrementó significativamente la proporción de variedades europeas tradicionales de alta calidad enológica. El aumento más evidente fue de las variedades Cabernet Sauvignon, Syrah y Merlot, entre las tintas, y Chardonnay, entre las blancas. Actualmente, Argentina es el mayor productor de vinos en Sudamérica y el sexto a nivel mundial (8). Los cepajes de aptitud enológica con mayor superficie cultivada son Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon, Syrah y Merlot (11).

La identificación inequívoca de estos materiales ha sido, y es, un objetivo recurrente de la viticultura (9), debido a su implicancia en la certificación y protección del material vegetal liberado al mercado, puesto que una correcta identificación y designación de las variedades y clones es de gran relevancia para la industria del vino y su legislación.

El primer método que se empleó para clasificar las variedades de vid fue la ampelografía, basada en el estudio de caracteres morfológicos de la planta. Estos marcadores fenotípicos son de fácil y rápida evaluación pero muchos de ellos se encuentran fuertemente influenciados por el ambiente. Factores como el clima, las características del suelo y la presencia de enfermedades y plagas pueden afectar el desarrollo de hojas, brotes y otros órganos distintivos para la identificación ampelográfica, generando confusión en la identificación de plantas que crecen en distintos ambientes. Por otro lado, para la evaluación de algunos caracteres morfológicos (por ejemplo, frutos y racimos) se requiere de plantas adultas que estén en un momento fisiológico definido. Esto dificulta la identificación en plantas jóvenes en las que los caracteres morfológicos no están completamente desarrollados, o en períodos del ciclo vegetativo donde no se encuentran los órganos a ser examinados. Por último, la cantidad de caracteres morfológicos que se pueden analizar es limitada y muchos de ellos se evalúan bajo una escala nominal u ordinal que también limita su poder discriminatorio. Por ello, la discriminación entre plantas cercanamente relacionadas desde el punto de vista genético (por ejemplo, variedades muy emparentadas o clones dentro de una misma variedad) es muy difícil a través de métodos tradicionales ampelográficos (24).

Comparados con los caracteres morfológicos, los marcadores moleculares que detectan polimorfismos a nivel del ADN tienen la ventaja de ser neutros frente al ambiente, poseen un mayor poder discriminatorio y son altamente reproducibles. Los análisis pueden realizarse a partir de cualquier órgano de la planta sin importar la edad ni el estado fenológico de la misma, permitiendo la identificación temprana de las plantas. Esto último y la posibilidad de discriminar entre materiales genéticamente muy cercanos es de particular interés en establecimientos dedicados a la propagación, multiplicación y comercialización de material certificado de vid.

Entre los marcadores moleculares disponibles, los microsatélites o Simple Sequence Repeat (SSR) han sido exitosamente utilizados en vid para la identificación y discriminación de diferentes cultivares (1, 2, 5, 20, 23) debido a su alto nivel de polimorfismo, herencia mendeliana codominante y alta reproducibilidad. Localmente, variedades criollas argentinas fueron caracterizadas empleando marcadores AFLP (13), mientras que variedades criollas sudamericanas se analizaron por SSR (14).

El uso de marcadores moleculares microsatélites en la identificación de cepas de calidad enológica reconocida permitirá a viveros y productores locales asegurar la identidad genética de sus materiales.

Objetivo

- Desarrollar patrones de marcadores microsatélites que puedan ser utilizados para la identificación de variedades de alta calidad enológica, de importancia en la vitivinicultura argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se realizaron ensayos con plantas de las siguientes variedades de la colección de vid de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Luján de Cuyo: Merlot, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Syrah, Bonarda, Tempranillo y Chenin.

Extracción de ADN

Se extrajeron hojas jóvenes de cada uno de los materiales para aislar el ADN, siguiendo el protocolo descrito por Bowers et al. (4). La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría y por el método del minigel (12). Se realizaron dos extracciones de ADN independientes por muestra.

Condiciones de PCR

Para la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) se emplearon 8 pares de cebadores previamente descritos para *Vitis vinifera* L.: VVMD5 y VVMD7 (5), VVMD27, VVMD31 y VVMD32 (7), VVMS2 (23), VrZAG62 y VrZAG79 (19). La reacción de PCR se realizó en un termociclador PTC-100 MJ Research Inc. Los programas utilizados fueron los mismos empleados por los autores originales para cada par de cebadores. Los productos de PCR fueron mezclados con iguales volúme-

nes de una solución desnaturalizante y colorante (formamida desionizada al 98 %, 10 mM EDTA, 10 mg bromophenol blue y 10 mg xylene cyanol) y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 %.

La visualización de las bandas se realizó por tinción con nitrato de plata. El tamaño de las bandas se estimó por comparación con un patrón comercial y se usó una variedad con patrones de bandas de peso molecular conocido. Los alelos fueron registrados como presentes o ausentes. Para el cálculo de los parámetros genéticos, las muestras con patrones de una sola banda fueron consideradas homocigotas para ese locus, en lugar de heterocigotas con alelos nulos.

Análisis de los datos

- ♦ Se emplearon los patrones de microsatélites obtenidos para determinar los distintos genotipos SSRs y se calculó la frecuencia alélica y genotípica.
- ♦ Se evaluaron los siguientes parámetros genéticos:
 - heterocigosidad observada (H_o), calculada como la relación entre el número de los genotipos heterocigotas y el número total de genotipos analizados para cada locus;
 - heterocigosidad esperada (H_e), calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

- contenido de información polimórfica (CIP), a partir de la fórmula:

$$CIP = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum 2p_i^2 \cdot \sum p_j^2$$

donde: p_i = frecuencia del alelo i para el locus estudiado
 p_j = frecuencia del alelo ($i+1$)

- probabilidad de identidad (PI) según:

$$PI = \sum p_i^4 - \sum \sum (2p_i \cdot p_j)^2$$

que representa la probabilidad de que dos individuos dentro de una población compartan el mismo genotipo.

- ♦ Se registró el número de alelos obtenidos por cada par de iniciadores microsatélites (n) y el número efectivo de alelos (n_e) de acuerdo con $n_e = 1 / \sum p_i^2$
- ♦ El poder discriminatorio para cada locus (D) fue calculado de acuerdo con la siguiente fórmula: $D = 1 - C$
- ♦ Se determinó la probabilidad de coincidencia (C) de acuerdo con $C = \sum p_i^2$ donde: p_i = frecuencia genotípica observada para cada locus.
- ♦ Se calculó la probabilidad total de identidad para los 6 loci microsatélites combinados.

- ♦ Con los patrones alélicos de cada variedad y para cada loci se generó una matriz de similitud empleando el coeficiente de Simple Matching (21). Luego se realizó un análisis UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) empleando el software NTSYS-pc (22) y se construyó un dendrograma que representó las similitudes estimadas entre las variedades ensayadas, empleando el programa TREE del software NTSYS-pc (17).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 8 pares de primers microsatélites empleados, sólo 6 amplificaron patrones de bandas reproducibles; ellos fueron: VVMD5, VVMD7, VVMD31, VVMD32, VrZAG62 y VrZAG79.

La tabla 1 muestra los alelos y frecuencias alélicas obtenidos para cada locus microsatélite estudiado. El número de alelos detectados por locus varió entre 5 (VrZAG62 y VVMD32) y 10 (VrZAG79), con un total de 42 alelos en los 6 loci y un promedio de 7 alelos por locus. Este valor fue superior al obtenido por Sefc et al. (20) (5,8 alelos por locus) en una colección de variedades francesas.

Tabla 1. Alelos (en pares de bases) y frecuencias alélicas para 6 loci de microsatélites ensayados en 7 variedades de vid de alta calidad enológica.

Locus	Alelos	Frecuencias alélicas	Locus	Alelos	Frecuencias alélicas
VVMD31	205	0,0714	VrZAG79	238	0,0714
	206	0,0714		246	0,0714
	209	0,0714		247	0,0714
	210	0,2143		248	0,1429
	212	0,2143		250	0,2143
	213	0,0714		251	0,0714
	214	0,2857		252	0,0714
VrZAG62	181	0,0714	253	0,0714	
	189	0,2857	259	0,1429	
	198	0,4286	260	0,0714	
	200	0,0714	VVMD7	239	0,5714
	203	0,1429		243	0,0714
VVMD5	226	0,0714		247	0,0714
	227	0,0714		248	0,0714
	228	0,2143		251	0,0714
	232	0,1429	255	0,0714	
	233	0,0714	261	0,0714	
	236	0,2143	VVMD32	243	0,3571
	238	0,1429		248	0,1429
240	0,0714	256		0,1429	
		260		0,0714	
		277		0,2857	

Los alelos con mayor frecuencia se indican en negrita.

Es posible que el mayor número de alelos/locus encontrado en el presente trabajo se deba a la inclusión de variedades provenientes de diferentes «pools» genéticos, de origen francés, español y probablemente también italiano -tal es el caso de la variedad Bonarda cultivada en Mendoza-, mientras que en el trabajo de Sefc et al. (20) solamente se ensayaron variedades provenientes de Francia. Avalan esta hipótesis los resultados de Bowers et al. (6) sobre un gran número de variedades de Francia evaluadas también por marcadores microsatélites. Estos autores observaron escasa variabilidad y una alta proporción de cultivares cercanamente emparentados, indicando una estrecha base genética para los genotipos franceses. Once alelos mostraron una frecuencia mayor al 20 %, mientras que 24 alelos fueron relativamente poco frecuentes (< 7,2 %). El alelo con mayor frecuencia fue de 239 pb, que se obtuvo con el cebador VVMD7, representando el 57 % de los alelos encontrados para este locus.

En la tabla 2 se puede observar que los loci microsatélites empleados mostraron desde 1 (VVMD32) a 7 (VrZAG79) alelos únicos (diferentes al resto); hubo diferencias respecto del comportamiento hipervariable de los distintos loci.

Tabla 2. Tamaño de alelos (en pares de bases), por variedad, para los 6 loci microsatélites (VVMD31, VrZAG62, VVMD5, VrZAG79, VVMD7 y VVMD32).

Variedad	VVMD31	VrZAG62	VVMD5	VrZAG79	VVMD7	VVMD32
Merlot	210-214	181-198	226-236	259-259	239-247	243-243
Pinot Noir	214-214	189-198	228-238	238-248	239-243	243-277
Cabernet Sauvignon	206-210	189-198	232-240	250-250	239-239	243-243
Syrah	210-214	189-198	227-233	246-252	239-239	248-277
Bonarda	205-212	198-203	228-238	251-260	248-261	248-277
Tempranillo	212-212	200-203	236-236	248-253	239-251	256-256
Chenin	209-213	189-198	228-232	247-250	239-255	260-277

Tabla 3. Genotipos observados y frecuencias genotípicas (FG) obtenidos con 6 cebadores microsatélites en 7 variedades de vid de calidad enológica.

VVMD31		VrZAG62		VVMD5	
GENOTIPOS	FG	GENOTIPOS	FG	GENOTIPOS	FG
AE	0,1429	AC	0,1429	AF	0,1429
BD	0,2857	BC	0,5714	BE	0,1429
CF	0,1429	CE	0,1429	CD	0,1429
DG	0,1429	DE	0,1429	CG	0,2857
EE	0,1429			DH	0,1429
GG	0,1429			FF	0,1429

VrZAG79		VVMD7		VVMD32	
GENOTIPOS	FG	GENOTIPOS	FG	GENOTIPOS	FG
AD	0,1429	AA	0,2857	AA	0,2857
BF	0,1429	AB	0,1429	AE	0,1429
CE	0,1429	AD	0,1429	BE	0,2857
DH	0,1429	AE	0,1429	CC	0,1429
EE	0,1429	AF	0,1429	DE	0,1429
GJ	0,1429	CG	0,1429		
II	0,1429				

El número de genotipos diferentes encontrados para cada locus varió desde 3 (VrZAG62 y VVMD32) a 7 (VrZAG79), con un total de 34, considerando los 6 loci analizados. La distribución por frecuencias para los distintos genotipos obtenidos fue bastante homogénea, excepto para el microsatélite VrZAG62, en el cual un solo genotipo representó el 57 % del total para ese locus (tabla 3, pág. 82).

La variedad Tempranillo mostró un genotipo «único» (no presente en ninguna otra variedad), en cada uno de los 6 loci analizados, mientras que la variedad Chenin mostró también un genotipo «único» en 5 de los 6 microsatélites (datos no presentados).

La heterocigosidad observada (H_o) varió entre 42,9 % (para VVMD32) y 100 % (para VrZAG62), con un valor medio de 76 %, mientras que la heterocigosidad esperada (H_e) lo hizo en menor medida, con valores desde 64,3 % (para VVMD7) hasta 87,8 % (para VrZAG79) (tabla 4). Sin embargo, el exceso o déficit de los heterocigotas de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg no fue significativo para ningún loci. Los valores de CIP (contenido de información polimórfica) fueron menores que los valores de H_e . El número de alelos efectivos (n_e) se correlacionó positivamente con el CIP. Por ejemplo, el locus más informativo fue VrZAG79 con un CIP de 84,9 % y n_e de 8,17, mientras que el menos informativo fue VrZAG62 con CIP de 53,2 % y n_e de 3,37.

La tabla 4 muestra, además, la probabilidad de coincidencia (C) y el poder de discriminación (D) para cada locus microsatélite. El locus VrZAG79 presentó el mayor poder discriminatorio (0,857) mientras que el locus VrZAG62, el menor (0,612).

Tabla 4. Parámetros genéticos calculados a partir del análisis de 6 loci microsatélites en 7 variedades de vid.

Locus	H_e	H_o	n	n_e	CIP	PI	C	D
VVMD31	0,806	0,714	7	5,150	0,733	0,157	0,184	0,816
VrZAG62	0,704	1,000	5	3,370	0,532	0,385	0,388	0,612
VVMD5	0,847	0,857	8	6,530	0,802	0,096	0,184	0,816
VrZAG79	0,878	0,857	10	8,170	0,849	0,061	0,143	0,857
VVMD7	0,643	0,714	7	2,800	0,621	0,151	0,184	0,816
VVMD32	0,745	0,429	5	3,920	0,680	0,154	0,224	0,776
Promedio	0,770	0,762	7	4,990	0,703	0,167		

H_e	heterocigosis esperada	CIP	contenido de información polimórfica
H_o	heterocigosis observada	PI	probabilidad de identidad
n	número de alelos	C	probabilidad de coincidencia
n_e	número efectivo de alelos	D	poder discriminatorio

En conjunto, los 6 SSRs ensayados mostraron una probabilidad acumulada de obtener genotipos idénticos de 7.68×10^{-05} . Este valor es un estimador del poder discriminatorio de los 6 cebadores microsatélites, evaluados en forma conjunta, para diferenciar las siete variedades de vid incluidas en el trabajo. Concretamente, indica la probabilidad de que dos de las siete variedades ensayadas puedan no ser discriminadas mediante el uso conjunto de estos 6 cebadores microsatélites. El bajo valor obtenido indica que, mediante el uso combinado de estos 6 cebadores microsatélites, se pueden discriminar, con un alto grado de certeza, las principales variedades de vid de calidad enológica superior utilizadas en Argentina.

La figura 1 muestra los patrones de bandas de las 7 variedades ensayadas, obtenidos con el iniciador microsatélite VVMD5. Se puede observar que el tamaño de los alelos varió entre 226 y 240 pb. La presencia de dos bandas (alelos) en todas las variedades, excepto Tempranillo, demuestra el comportamiento predominantemente heterocigoto para este locus.



Figura 1. Patrones de bandas microsatélites de variedades de vid de alta calidad enológica, obtenidos con el iniciador VVMD5.

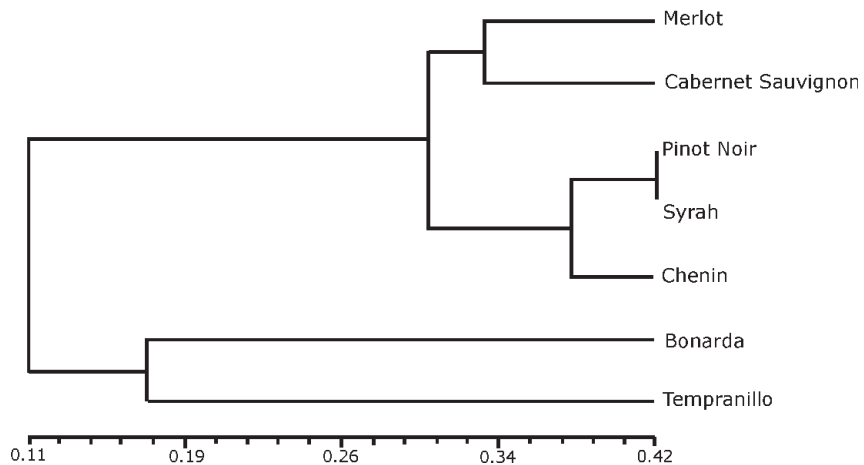


Figura 2. Dendrograma de 7 variedades de vid obtenido por el método de UPGMA empleando el coeficiente de similitud de «Simple Matching».

En la figura 2 se puede observar que el análisis de agrupamiento por el método UPGMA separó claramente las variedades francesas (Merlot, Cabernet-Sauvignon, Pinor Noir y Chenin) y Syrah, esta última de origen aún incierto, de los cepajes

Tempranillo y Bonarda. La Bonarda cultivada en Argentina presenta similitud morfológica con las Bonardas del norte de Italia (Bonarda Piemontese) (3) y el Corbeau de Francia (16). Este agrupamiento de la Bonarda Argentina fuera del grupo varietal francés sugeriría que su origen estaría más asociado con la Bonarda Piemontese. Para corroborar esta hipótesis será necesario recurrir a un análisis comparativo de ADN de estos materiales, de acuerdo con lo sugerido por Rodríguez y Matus (16).

La comparación de los patrones generados en este trabajo con los obtenidos en otros laboratorios, utilizando los mismos cebadores y materiales (15, 18, 20), mostró, en la mayoría de los casos, que los patrones de bandas eran consistentes. En el presente trabajo se observaron escasas diferencias en la estimación del peso molecular de las bandas amplificadas, en comparación con las realizadas por otros laboratorios. Ello puede obedecer a que la determinación del tamaño de las bandas es subjetiva y depende de quien realice la lectura de las mismas.

La puesta a punto de esta técnica, junto con el desarrollo de patrones de variedades de importancia en la provincia de Mendoza, permitirá expandir su uso a viveristas y productores de la región que buscan asegurar la identidad genética de los materiales que comercializan. En Argentina, además de las variedades tradicionales europeas, de alta calidad enológica, se cultivan variedades locales llamadas «criollas» que, en su conjunto, conforman más del 60 % del encepado nacional. Patrones de microsatélites para 9 variedades criollas argentinas y para Malbec fueron generados previamente con los mismos cebadores utilizados en este trabajo (14), completando así la caracterización molecular por microsatélites de las variedades más importantes, en términos productivos, que conforman el encepado argentino.

CONCLUSIÓN

Se puso a punto la técnica de marcadores moleculares microsatélites. Nuestros resultados demuestran que 6 de los 8 iniciadores ensayados fueron suficientes para la identificación inequívoca de 7 variedades de vid de alta calidad enológica, de importancia en Argentina. De esta manera, la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo podría ofrecer este servicio a viveristas y productores vitícolas interesados en garantizar la identidad genética de sus materiales comercializados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agüero, C.; Martínez, L.; Rodríguez, J. et al. 2001. Microsatellite DNA Analysis of Argentinean Torrontés. 52nd American Society for Enology and Viticulture. Annual Meeting. San Diego, California, USA.
2. Agüero, C.; Rodríguez, J.; Martínez, L. et al. 2003. Identity and Parentage of Torrontés cultivars in Argentina. *Am. J. Enol. Vitic.* 54. p. 318-321.
3. Alcalde, A. J. 1989. Cultivares vitícolas argentinas. Asociación Cooperadora de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza INTA. 133 p.
4. Bowers, J. E.; Bandman, E. B. and Meredith, C. P. 1993. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 44. p. 266-274.

5. Bowers, J. E.; Dangl, G. S.; Vignani, R. et al. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39, p. 628-633.
6. Bowers, J. E.; Siret, R. and Meredith, C. P. 2000. A single pair of parents proposed for a group of varieties in Northeastern France. *Acta Horticulturae* 528(1): 129-132.
7. Bowers, J. E.; Dangl, G. S. and Meredith, C. P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.* 50. p. 243-246.
8. *Bulletin de l'OIV. Revue Internationale.* 2003. 76, 172 p.
9. Cervera, M. T.; Cabezas, J. A.; Sancha, J. C. et al. 1998. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.* 97. p. 51-59.
10. Hocquigny, S.; Pelsy, F.; Dumas, V. et al. 2004. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome* 47. p. 579-589.
11. Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). 2001. Anuario estadístico, Argentina.
12. Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y. p. 6.14-6.15.
13. Martínez, L.; Cavagnaro, P.; Masuelli, R. and Rodríguez, J. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 6, N° 3: 244-253.
14. Martínez, L.; Cavagnaro, P. F.; Masuelli, R. W. et al. 2006. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Science* (en prensa).
15. Narváez, C.; Castro, M. H.; Valenzuela, J. et al. 2001. Patrones genéticos de los cultivares de vides de vinificación más comúnmente usados en Chile basados en marcadores de microsatélites. *Agric. Técnica (Chile)* 61. p. 249-261.
16. Rodríguez, J. G. y Matus, M. S. 2002. Bonarda. Gran cepaje tinto revalorizado. *Vitifera - Revista del Instituto Nacional de Vitivinicultura (Argentina)*. Número extraordinario, p. 48-55.
17. Rohlf, F. J. 1993. *NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system.* Version 1.8. Exeter Publications Setauket, New York.
18. Sefc, K. M.; Steinkellner, H.; Wagner, H. W. et al. 1997. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. *Vitis* 36 (4): 179-183.
19. Sefc, K. M.; Regner, F.; Turetschek, E. et al. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42. p. 1-7.
20. Sefc, K. M.; López, M. S.; Lefort, F. et al. 2000. Microsatellites variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 100. p. 498-505.
21. Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy.* Freeman, San Francisco. 573 p.
22. Sokal, R. R. and Michener, C. D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships, *University of Kansas Science Bulletin.* 38. p. 1409-1438.
23. Thomas, M. R. and Scott, N. S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86. p. 985-990.
24. Ye, G. N., Soylemeezoglu, G., Weeden, N.F., et al. 1998. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis* 37. p. 33-38.