

DE BIOLOGIA MOLECULAR

M. Francesca Fort, Catalina Baig i Fernando Zamora¹

RESUM

Durant els últims vint anys, una intensa renovació varietal ha canviat la realitat vitícola del nostre país i de gran part de la vinya del món, propiciant l'abandonament del conreu de nombroses varietats autòctones per substituir-les per altres de més prestigi internacional presents arreu. Aquesta renovació varietal ha permès revitalitzar el sector, afavorir les noves inversions i obrir nous mercats per als nostres vins, però ha contribuït a fer que les característiques de la major part dels vins s'uniformitzessin, i que el concepte de *tipicitat*, anteriorment atribuït a la zona de producció, es diluís enfront de la creixent homogeneïtat dels vins.

El propòsit d'aquest projecte és estudiar unes quatre-centes varietats viníferes procedents de diversos països del món per identificar-les i tipificar-les.

El desenvolupament de la biologia molecular ha permès l'aparició de me-

todologies que fan possible la identificació i classificació més exacta de diferents varietats analitzant directament el genoma de cada individu (ADN).

La tècnica dels SSR (seqüències simples repetides, *simple sequence repeat*), també coneguts com a *microsatèl·lits*, és perfectament aplicable a la finalitat descrita. D'altra banda, el fet de disposar d'un camp de varietats tan ampli com el que es planteja ofereix també la possibilitat d'estudiar tot el conjunt sota un punt de vista evolutiu, en què s'agrupen les varietats en funció de la seva proximitat genètica.

En el següent article presentem la metodologia triada per dur a terme aquest estudi i les raons que ens han motivat a escollir aquesta tècnica i no cap altra.

RESUMEN

Durante los últimos veinte años, una intensa renovación varietal ha cambiado la realidad vitícola de nuestro país y de gran parte del viñedo mundial, propiciando el abandono del cultivo de numerosas variedades autóctonas

1. Bodegues Sumarroca, SL i Facultat d'Enologia (Universitat Rovira i Virgili) C/ Marcel·lí Domingo, s/n. 43007 Tarragona. Tel. 977 558 799. mariafrancesca.fort@urv.net.

para sustituirlas por otras de más prestigio internacional presentes por todas partes. Esta renovación varietal ha permitido revitalizar el sector, favorecer las nuevas inversiones y abrir nuevos mercados para nuestros vinos, pero ha contribuido a que las características de la mayor parte de los vinos se uniformizarán, consiguiendo que el concepto de tipicidad anteriormente atribuido a la zona de producción, se diluyera frente a la creciente homogeneidad de los vinos.

El propósito de este proyecto, es el de estudiar unas cuatrocientas variedades viníferas procedentes de varios países del mundo por identificarlas y tipificarlas.

El desarrollo de la Biología Molecular, ha permitido la aparición de metodologías que permiten la identificación y clasificación más exacta de diferentes variedades analizando directamente el genoma de cada individuo (ADN).

La técnica de los SSR (*simple sequence repeat*) o también conocida como microsatélites es perfectamente aplicable a la finalidad descrita. Por otra parte, la posibilidad de disponer de un campo de variedades tan amplio, como el que se plantea, ofrece también la posibilidad de estudiar todo el conjunto bajo un punto de vista evolutivo, en el que se agrupan las variedades en función de su proximidad genética.

En el siguiente artículo presentamos la metodología utilizada para la realización de este estudio, así como las razones que nos han motivado a escoger esta técnica de microsatélites.

INTRODUCCIÓ

El cultiu del raïm té el seu origen en la domesticació de *Vitis vinifera* L., ara fa uns quatre mil anys.² A partir de l'aprofitament com a fruita i de la posterior transformació en vi, l'home va començar a interessar-se per aquest cultiu, que s'expandí entre totes les poblacions sense trobar límits en les fronteres culturals, territorials o lingüístiques.

L'aparició de nombroses varietats, producte de la seva adaptació a nous ambients o a les diferents pràctiques vitícoles, ha contribuït a formar una llarga llista de catorze mil noms.³ No obstant això, els millors vins coneguts mundialment són produïts per un petit nombre de varietats clàssiques europees,⁴ fet que ha propiciat l'abandó (en molts casos) de moltes varietats autòctones, que han estat substituïdes per unes altres de més prestigi internacional.

Des de temps remots s'ha fet la identificació de les diferents varietats per aprofundir en el coneixement d'aquesta espècie. Amb aquesta finalitat es van usar sobretot caràcters morfològics⁵ per dur-ne a terme la classificació (ampelografia).

La utilització de l'ampelografia per a la identificació i tipificació de varietats de *Vitis vinifera* pot presentar certs inconvenients:

2. H. P. OLMO (1976), «Grapes», a N. W. SIMMONDS (ed.), *Evolution...*, p. 294-298.
3. G. ALLEWELDT (1988), *The genetic resources of Vitis...*
4. J. E. BOWERS i C. P. MEREDITH (1997), «The parentage...», *Natural Genetics*, p. 84-87.
5. P. GALET (1979), *A practical ampelography-grapevine...*

— La planta ha d'estar finalitzant el període de creixement vegetatiu, ja que és quan els diferents òrgans que cal observar i descriure estan en la seva màxima expressió.

— En el cas que es disposi només de fusta es fa del tot impossible distingir una varietat d'una altra.

— S'utilitza un gran nombre de caràcters fenotípics que al seu torn poden ser modificats per determinants ambientals.

— El fet de treballar amb un gran nombre de varietats fa extremadament difícil la tasca de diferenciar-les a partir de les seves característiques morfològiques, encara que les plantes objecte d'estudi estiguin en òptimes condicions.

Tots aquests factors han ocasionat que en molts casos existeixin genotips mal indexats, especialment quan es tracta de varietats que presenten fenotips molt similars. D'altra banda, la identitat genètica d'una varietat pot modificar-se a causa de mutacions somàtiques produïdes durant la seva reproducció vegetativa,⁶ i encara que conservin el nom original, poden presentar diferències tant fenotípiques com genotípiques (homonímia). Altrament, la dispersió geogràfica d'un mateix genotip o varietat sol conduir a la seva redenominació, fet que fa que un mateix genotip presenti diversos noms (sinonímia).⁷

6. R. VIGNANI, J. E. BOWERS i C. P. MEREDITH (1996), «Microsatellite DNA polymorphism...», *Scientia Hortica*, p. 163-169.

7. R. VIGNANI, J. E. BOWERS i C. P. MEREDITH (1996), «Microsatellite DNA polymorphism...», *Scientia Hortica*, p. 163-169; M. T. CERVERA, J. A. CABEZAS, J. C. SANCHÀ, F. MARTINEZ DE TODA i J. M. MARTINEZ-ZAPATER

Actualment es parla cada vegada més del concepte de *biodiversitat*. La producció actual de vi restringeix el nombre de varietats que s'han d'utilitzar, i provoca d'aquesta manera la pèrdua d'una gran part de la riquesa biològica que ens ofereix l'espècie *Vitis vinifera*. Davant d'aquest fet es fa evident la necessitat de rescatar algunes varietats deixades de banda per diferents raons (modes, baixes produccions, desconeixement, etc.) i buscar nous genotips amb característiques idònies per elaborar vins de qualitat i que a la vegada siguin del tot diferents dels que ja existeixen en el mercat.

L'empresa Bodegues Sumarroca, SL disposa d'una col·lecció ampelogràfica amb varietats portades de diferents regions del món que ha posat al nostre abast per a la realització d'una identificació i un estudi exhausts.

Per aconseguir aquest objectiu utilitzarem una tècnica alternativa a la tradicional (ampelografia) que ens permeti evitar les identificacions incorrectes, a partir dels estudis del genotip. La biologia molecular és una eina útil per analitzar directament el genoma (ADN), que és invariable davant els condicionants del medi extern, i per tant la seva utilització ens permetrà evitar les sinonímies i les homonímies tant intervietals com intravietals.

Dins de les tècniques de biologia molecular, l'ús de marcadors moleculars d'ADN representa una bona eina

(1998), «Application of AFLPs...», *Theoretical and Applied Genetics*, p. 51-59.

per crear mapes del genoma físic i genètic, distingir individus, investigar relacions genètiques i estudiar l'organització genòmica.⁸ Els avantatges dels marcadors es poden resumir en:

— Poder congelar qualsevol mostra fins al moment que es realitzin les anàlisis, i d'aquesta manera no mantenir-los subjectes al cicle biològic de la planta.

— Poder treballar amb qualsevol tipus de mostra: fulles, baia, fusta, etc., ja que la informació genòmica de totes les cèl·lules és la mateixa.

— Poder usar un material (ADN) molt menys influenciable davant les condicions ambientals, l'estat nutricional i l'estat sanitari de la planta.

— Poder processar un gran nombre de mostres en el menor temps possible, ja que tant els protocols d'extracció com els protocols d'anàlisi d'ADN per a la identificació de varietats són molt ràpids.

Entre els tipus de marcadors moleculars tenim: marcadors dominants, com els RAPD (amplificació a l'atzar del polimorfisme de l'ADN, *random amplified polymorphism DNA*) i els AFLP (polimorfisme de fragments llargs amplificats, *amplified fragment length polymorphism*), que permeten l'anàlisi d'un elevat nombre de *loci* per experiment, i els marcadors codominants com els RFLP (polimorfisme de fragments

llargs de restricció, *restriction fragment length polymorphism*) i els microsatèl·lits o SSR, que solament permeten analitzar un *loci* per experiment, però són més informatius.

L'existència de seqüències simples repetides en l'ADN nuclear en plantes va ser demostrada en 1983. En raïm, és possible identificar varietats mitjançant anàlisis amb RFLP,⁹ RADP, AFLP¹⁰ i SSR.¹¹

L'anàlisi mitjançant RFLP és consistent i segura,¹² però és lenta i laboriosa i freqüentment inclou l'ús de radioactivitat. A més, el fet que diferents laboratoris utilitzin els mateixos marcadors requereix l'intercanvi físic de les mostres d'ADN.

D'altra banda, l'anàlisi amb RADP no és gaire més ràpida i simple que l'anàlisi amb RFLP. En aquest cas, els marcadors poden compartir-se al comunicar la seqüència dels *primers*, encara que igualment els resultats presenten diferències entre els laboratoris.

8. M. R. THOMAS i N. S. SCOTT (1993), «Microsatellite repeats in grapevine...», *Theoretical and Applied Genetics*, p. 985-990.

9. J. E. BOWERS, G. S. DANGL, R. VIGNANI i C. P. MEREDITH (1996), «Isolation and characterization of new polymorphic...», *Genome*, p. 628-633.

10. M. T. CERVERA, J. A. CABEZAS, J. C. SANCHA, F. MARTINEZ DE TODA i J. M. MARTINEZ-ZAPATER (1998), «Application of AFLPs...», *Theoretical and Applied Genetics*, p. 51-59.

11. M. R. THOMAS i N. S. SCOTT (1993), «Microsatellite repeats in grapevine...», *Theoretical and Applied Genetics*, p. 985-990; J. E. BOWERS, G. S. DANGL, R. VIGNANI i C. P. MEREDITH (1996), «Isolation and characterization of new polymorphic...», *Genome*, p. 628-633; R. VIGNANI, J. E. BOWERS i C. P. MEREDITH (1996), «Microsatellite DNA polymorphism...», *Scientia Horti*, p. 163-169.

12. J. E. BOWERS, G. S. DANGL, R. VIGNANI i C. P. MEREDITH (1996), «Isolation and characterization of new polymorphic...», *Genome*, p. 628-633.

Les anàlisis amb AFLP són molt eficaços, per aquest motiu es recomanen per a identificacions intravarietals (entre clons d'una mateixa varietat). Entre laboratoris són molt reproduïbles, però es presentaran com a laborioses i complexes.

A diferència dels dos primers, els resultats dels marcadors SSR poden ser comparats internacionalment,¹³ ja que proporcionen dades quantitatives basades en la longitud dels al·lels. Són molt polimòrfics, presenten herència mendeliana simple i són codominants (amb possibilitat de diferenciar els individus homozigots dels heterozigots).

Els microsatèl·lits (SSR) consisteixen en una petita unitat de repetició en tандem de seqüències simples, d'un a sis nucleòtids (p. ex. (GA)_n, (GATA)_n),¹⁴ amb una alta variació en el nombre de repeticions, les quals estan altament distribuïdes a través de tot el genoma eucariòtic.¹⁵ El seu alt nivell de polimorfisme els ha fet marcadors molt apreciats per diferenciar organismes.¹⁶

En el raïm, una de les aplicacions més grans dels marcadors de microsa-

tèl·lits és la identificació de genotips,¹⁷ que facilita el maneig de col·leccions de cultius i permet controlar el comerç de material vegetal. Fins ara, els primers SSR en *Vitis* han estat desenvolupats per quatre grups:¹⁸

— per estudiar el desenvolupament d'una base de dades de perfils d'ADN per usar-la en identificació de varietats;¹⁹

— per estudiar-los com a marcadors en mapes genètics de parentiu en *Vitis vinifera* L.²⁰

El disseny dels SSR per al cultiu del raïm ha anat augmentant gradualment, seleccionant aquells que tenen una alta

13. J. E. BOWERS, G. S. DANGL, R. VIGNANI i C. P. MEREDITH (1996), «Isolation and characterization of new polymorphic...», *Genome*, p. 628-633.

14. K. M. SEFC, F. LEFORT, M. S. GRANDO, K. SCOTT, H. STEINKELLNER i M. R. THOMAS (2001), «Microsatellite markers for grapevine: a state of the art», a K. A. ROUBELAKIS-ANGELAKIS (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*, p. 433-463.

15. M. R. THOMAS, S. MATSUMOTO, P. CAIN i N. S. SCOTT (1993), «Repetitive DNA of grapevine: classes...», *Theoretical and Applied Genetics*, p. 173-180.

16. M. MORGANTE i A. M. OLIVIERI (1993), «PCR-amplified microsatellites...», *Plant J.*, p. 175-182.

17. M. R. THOMAS, P. CAIN i N. S. SCOTT (1994), «DNA typing of grapevines: A universal methodology...», *Plant Molecular Biology*, p. 939-949; K. SEFC, F. REGNER, J. GLÖSSL i H. STEINKELLNER (1998), «Genotyping of grapevine...», *Vitis*, p. 15-20.

18. M. R. THOMAS, S. MATSUMOTO, P. CAIN i N. S. SCOTT (1993), «Repetitive DNA of grapevine: classes...», *Theoretical and Applied Genetics*, p. 173-180; J. E. BOWERS, G. S. DANGL, R. VIGNANI i C. P. MEREDITH (1996), «Isolation and characterization of new polymorphic...», *Genome*, p. 628-633; K. SEFC, F. REGNER, E. TURETSCHKE, J. GLÖSSL i H. STEINKELLNER (1999), «Identification of microsatellite sequence...», *Genome*, p. 367-373.

19. M. R. THOMAS, P. CAIN i N. S. SCOTT (1994), «DNA typing of grapevines: A universal methodology...», *Plant Molecular Biology*, p. 939-949; J. E. BOWERS, G. S. DANGL, R. VIGNANI i C. P. MEREDITH (1996), «Isolation and characterization of new polymorphic...», *Genome*, p. 628-633; W. F. LAMBOY i C. G. ALPHA (1998), «Using simple sequence repeats (SSRs)...», *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, p. 182-188.

20. J. E. BOWERS i C. P. MEREDITH (1997), «The parentage...», *Natural Genetics*, p. 84-87; J. E. BOWERS, G. S. DANGL i C. P. MEREDITH (1999), «Development and Characterization...», *American Journal of Enology and Viticulture*, p. 243-246; S. RIAZ i C. P. MEREDITH (2000), «A microsatellite marker based linkage map of *Vitis vinifera*», a *Abstracts of the International...*, p. 132.

capacitat discriminatòria entre varietats i optimitzant metodologies lliures d'isòtops radioactius. A més, s'han desenvolupat bases de dades electròniques per comparar resultats entre laboratoris en l'àmbit internacional.²¹

MATERIALS I MÈTODES

El material vegetal per a l'extracció de l'ADN l'obtidrem a partir d'una col·lecció de 365 varietats de *Vitis vinifera*, procedents de diferents parts del món i plantades a la zona de l'Alt Penedès per l'empresa Bodegues Sumarroca, SL.

El mostreig es realitzarà a partir de fulles adultes de la part mitjana del sarmenent que es congelaran immediatament en nitrogen líquid.

Homogeneïtzació de la mostra vegetal

Moldre el material vegetal juntament amb el nitrogen líquid en un morter fins a obtenir pols fina, i transferir 100 mg de mostra en pes fresc a un tub de grandària adequada per evaporar el nitrogen líquid.

Extracció de l'ADN

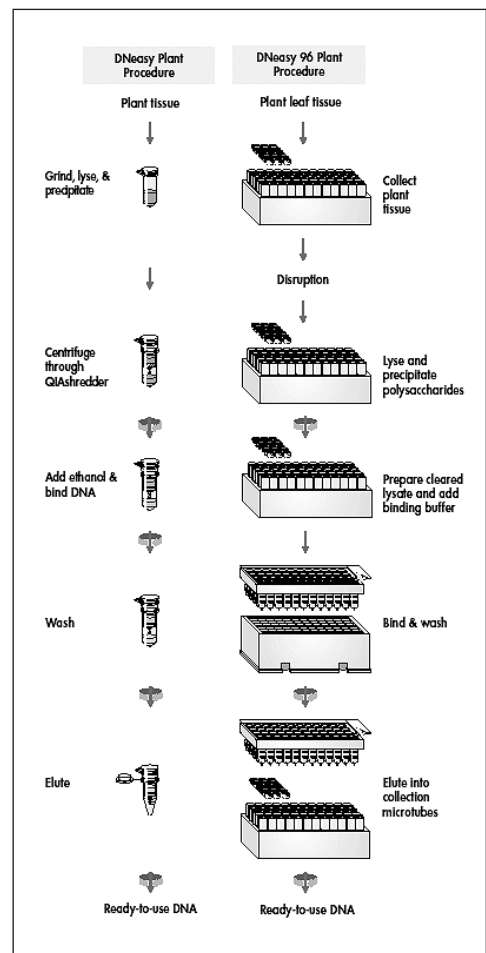
L'extracció de l'ADN es realitzarà segons la metodologia establerta en el *Kit* d'extracció de QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit).

21. C. NARVÁEZ, M. H. CASTRO, J. VALENZUELA i P. HINRICHSEN (2001), «Patrones genéticos de los cultivares...», *Agric. Tec.*, p. 249-261.

Mètode

En primer lloc, les mostres són disgregades mecànicament i posteriorment es trenquen les cèl·lules mitjançant mètodes químics. L'ARN es digereix mitjançant una ribonucleasa durant la lisi de

FIGURA 1. Procediment d'extracció de l'ADN de la mostra (protocol QIAGEN: <http://www1.qiagen.com/Products/GenomicDnaStabilizationPurification/DNeasyPlantSystem/DNeasyPlantMiniKit.aspx?ShowInfo=1>)



les cèl·lules. Se separen les restes cel·lulars i es filtren les mostres. S'homogeneïtzen un altre cop per centrifugació a través d'una columna QIASHredder Spin. Gràcies a l'acció d'un tampó, es precipiten les proteïnes i els polisacàrids. El lisat es carrega dintre de la columna de DNesay Plant Spin. Durant una lleugera centrifugació, l'ADN selectivament es queda en la membrana mentre que els contaminants passen a través d'aquesta. S'extreuen els contaminants i inhibidors d'enzims per mitjà d'un o dos rentats. L'ADN pur es resuspèn en aigua o en un tampó i d'aquesta manera queda llest per ser utilitzat (figura 1).

Controls de puresa i rendiment de la mostra

L'ADN extret es quantifica a partir de la lectura de la seva absorbància a 260 nm. La puresa i integritat de la mostra es comproven per la lectura d'absorbàncies i per electroforesi en gel d'agarosa respectivament.

Mesura de l'absorbància

Amb la mesura de l'absorbància de manera continuada podem conèixer el rendiment i també dos índexs que ens donaran una idea de la puresa de l'àcid nucleic aïllat.

Rendiment

El càlcul del rendiment es basa en la mesura de l'absorbància a 260 nm, que és la longitud d'ona a la qual absorbeixen els àcids nucleics, ja que té lloc la resonància de les bases púriques i pirimidíniques. La relació entre l'absorbància dels àcids nucleics i la seva

concentració es dóna en la fórmula següent:

$$A_{260} = \epsilon_{260} * [N],$$

on ϵ_{260} és el coeficient d'extinció molar, que per a l'ADN és de $0,02\mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Això ens permet calcular la concentració a partir de la fórmula següent:

$$[N] = A_{260} / \epsilon_{260} * \text{dilucions.}$$

Índexs de puresa

Per establir els índexs de puresa s'utilitzen les relacions següents:

$$A_{260} / A_{280} \geq 1,8 \quad A_{260} / A_{230} \geq 2,0,$$

sabent que a 280 nm absorbeixen les proteïnes, i que a 230 nm absorbeixen els polisacàrids i els polifenols. Per tant, si la relació d'absorbàncies indicada supera aquests límits, es considera que la mostra està lliure d'impureses. En aquestes condicions es troben espectres d'absorció com el que il·lustra la imatge següent (figura 2).

FIGURA 2. Espectre d'absorció que s'espera obtenir per a mostres d'ADN o ARN pures (S. Surzycki, 2000)

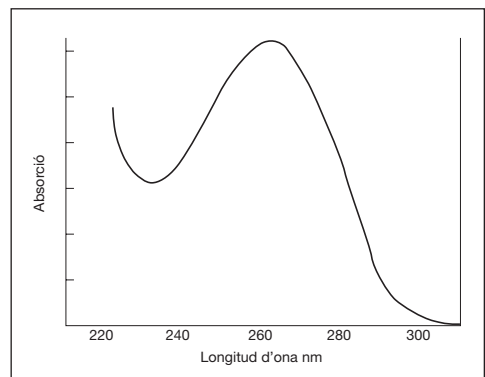
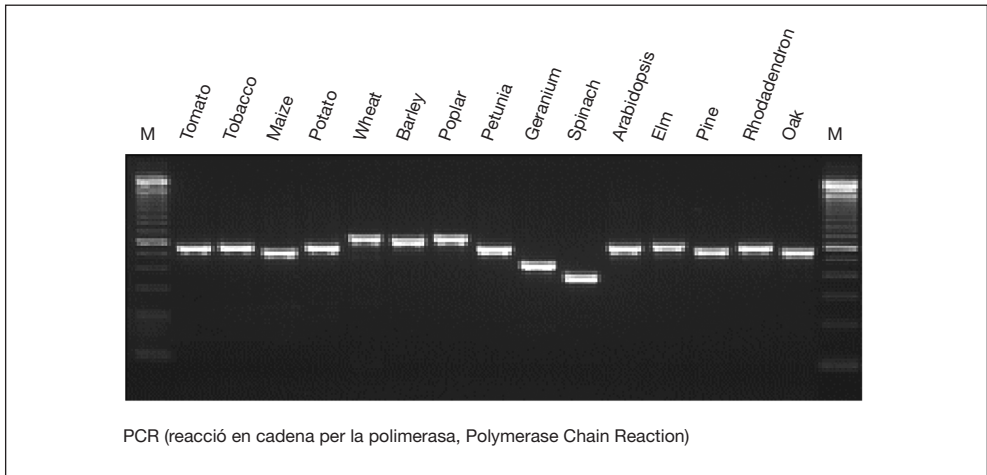


FIGURA 3. Gel d'agarosa al 2 %, on s'observa una banda d'ADN per mostra (protocol *QIAGEN*: <http://www1.qiagen.com/Products/GenomicDnaStabilizationPurification/DNeasyPlantSystem/DNeasyPlantMiniKit.aspx?ShowInfo=1>)



Electroforesi

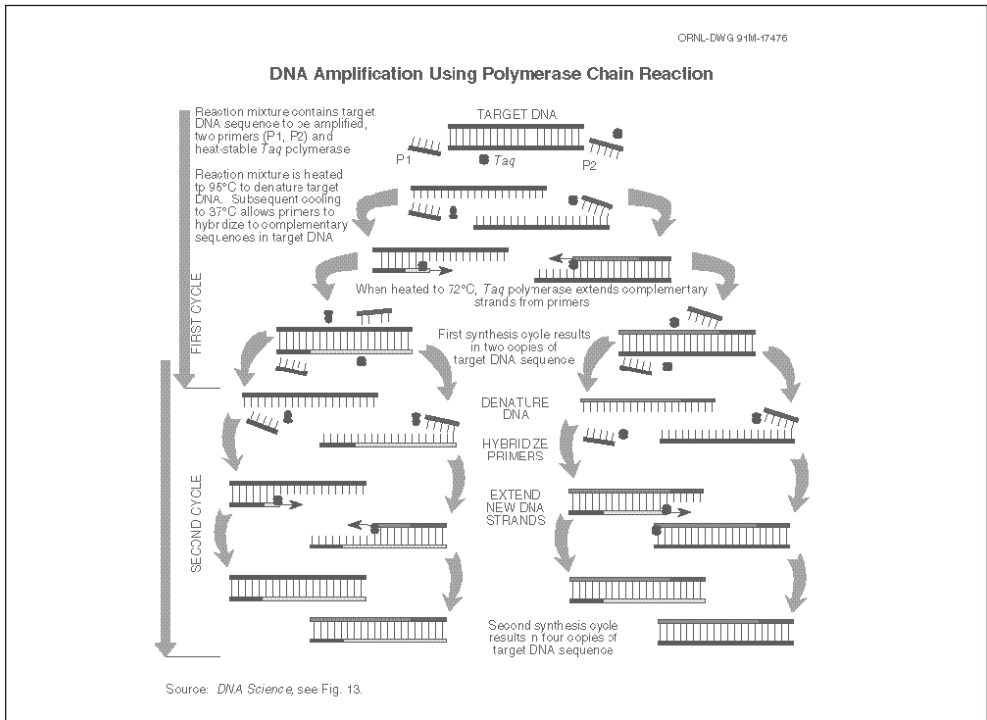
Una estratègia per comprovar la integritat dels àcids nucleics d'una mostra és realitzar una electroforesi en gel d'agarosa a l'1 % per a l'ARN i al 2 % per a l'ADN; en tots dos casos s'utilitza la tinció amb bromur d'etidi. Per a l'ADN s'espera visualitzar una sola banda de pes molecular elevat (figura 3).

La reacció en cadena de la polimerasa (figura 4) és una tècnica que va ser desenvolupada per Kary Mullis a mitjan anys vuitanta. Amb aquesta metodologia es poden produir en el laboratori múltiples còpies d'un fragment d'ADN específic, fins i tot en presència de milions d'altres molècules d'ADN. Com el seu nom indica, es basa en l'activitat de l'enzim ADN polimerasa, que és capaç de fabricar una cadena d'ADN complementària a una altra de ja existent. Els seus únics requeriments són que en el medi existeixin nucleòtids, que són la

matèria base per fabricar l'ADN (els nucleòtids d'adenina, timina, citosina i guanina), i una petita cadena d'ADN que pugui unir-se a la molècula que volem copiar perquè serveixi d'encebadora (l'encebador, en anglès *primer*).

La reacció en cadena de la polimerasa es desenvolupa en tres passos (figura 4). El primer és la separació de les dues cadenes que formen la molècula d'ADN que es vol amplificar; per fer això s'ha d'escalfar l'ADN a altes temperatures que poden ser pròximes a l'ebullició. Cadascuna d'aquestes cadenes actuarà com a motlle per fabricar la seva complementària. A continuació es fa baixar la temperatura per aconseguir que cada encebador s'uneixi a la seva regió específica dintre de la cadena d'ADN. L'últim pas consisteix en la generació de la cadena d'ADN complementària per acció de l'ADN polimerasa. El problema amb el qual es van trobar els científics que van idear aquesta

FIGURA 4. Esquema del desenvolupament de la PCR (<http://aidshistory.nih.gov/imgarchive/pcr.html>)



tècnica és que cal augmentar la temperatura de la barreja de reacció fins a valors per sobre dels 70 °C perquè les dues cadenes d'ADN se separin. A aquestes temperatures tan elevades l'ADN polimerasa s'inactivava i calia afegir-la de nou en cada cicle. Això va ser així fins que es va descobrir el bacteri *Thermus aquaticus*, que viu en aigües termals, i que té una ADN polimerasa (Taq polimerasa) capaç de treballar a temperatures superiors als 70 °C. D'aquesta manera només cal afegir l'enzim a l'inici del procés de reacció i portar a terme tants cicles com sigui necessari. Cadascuna de les molècules d'ADN filles poden tornar a entrar en el procés i servir com a motlle

per fabricar més còpies. Així, després de vint cicles de reacció es pot obtenir fins a un milió de còpies d'una molècula d'ADN.

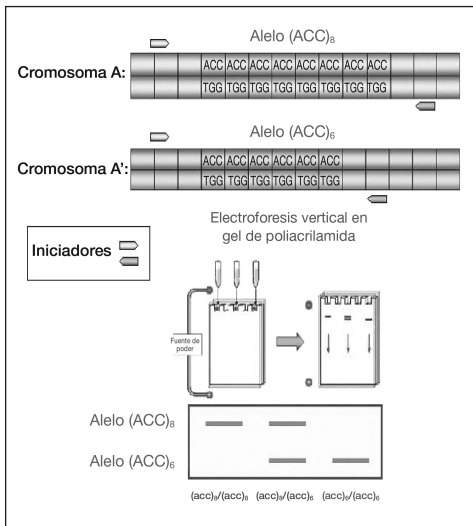
Microsatèl·lits

Els microsatèl·lits o SSR són seqüències curtes d'ADN, d'un a sis nucleòtids, repetides cert nombre de vegades (figura 5), que es troben espargits per tot el genoma dels organismes eucariotes²² i procariotes.²³ Aquestes seqüències re-

22. D. TAUTZ (1989), «Hypervariability of simple...», *Nucleic Acids Res.*, p. 6463-6471.

23. L. ZANE, L. BARGELLONI i T. PATARNELLO (2002), «Strategies...», *Molecular Ecology*, p. 1-16.

FIGURA 5. Diagrama que mostra el polimorfisme dels microsatèl·lits a causa de les diferències en la seva longitud. En un individu diploide, el cromosoma A conté l'al·lel $(ACC)_8$, mentre que el cromosoma A' en el locus homòleg presenta l'al·lel $(ACC)_6$. Mitjançant la PCR, utilitzant primers dissenyats en les regions flanquejants, els al·lells són amplificats, per a després ser separats mitjançant un gel electroforètic (http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/Yañez_A_V/t_completo.pdf)



petides són les causants del polimorfisme intervarietal ja que provoquen l'aparició d'un diferent nombre d'unitats de repetició (motius) i per tant, causen diferències en la longitud del fragment o locus motiu d'estudi.²⁴

Característiques dels microsatèl·lits

La raó principal de l'increment de l'ús dels SSR com una eina molecular és

que proveeixen la més alta incidència de polimorfisme o PIC (contingut d'informació polimòrfica, *polymorphic information content*) en comparació amb altres tècniques com l'RNFLP i l'RAPD.²⁵ Posseeixen, a més, característiques molt valorables com ara:

- Són altament informatius: presenten herència codominant i molts al·lells són oposats entre individus estretament relacionats.

- Són tècnicament simples: la tecnologia de la PCR pot ser utilitzada fàcilment i ràpidament per a l'automatització en l'ús d'aquests marcadors.

- Són una tècnica sensible: només requereixen petites quantitats d'ADN.

- Les dades que proporcionen són fiables i altament reproduïbles.

- Són molt abundants perquè estan uniformement dispersos a través del genoma.

- Són àmpliament aplicables: els *loci* són conservats freqüentment entre espècies relacionades i algunes vegades entre gèneres.

- Les dades que en resulten són fàcilment intercanviables entre laboratoris mitjançant la comunicació dels primers, però sense la necessitat de fer-ne una transferència física.

Classificació dels microsatèl·lits

Chambers i MacAvoy (2000) proposen que els termes *pur* (o *perfecte*), *compost* i *complex* s'utilitzin per especificar que un, dos o més tipus de motius, respectivament, es troben presents al llarg

24. M. MORGANTE i A. M. OLIVER (1993), «PCR-amplified microsatellites...», *Plant J.*, p. 175-182.

25. W. POWEL, M. MORGANTE, C. ANDRE, M. HANAFEY, J. VOGEL, S. TINGEY i A. RAFALSKI (1996), «The comparison of RFLP, RADP...», *Mol. Breed.*, p. 225-238.

d'un *locus* microsatèl·lits donat, i que el terme *interromput* (o *imperfecte*) s'usi com un descriptor jeràrquic addicional que implica una o més unitats no repetitives en l'interior dels microsatèl·lits.

Limitacions dels microsatèl·lits

L'única limitació significativa dels microsatèl·lits pot ser la inversió inicial de recursos econòmics i l'experiència tècnica requerida per al clonatge i seqüenciació dels *loci* SSR. D'altra banda, es donarien limitacions amb menor freqüència o efecte en el cas que mutacions ocorregudes en el lloc d'aparellament dels *primers*, tinguessin com a resultat al·lels nuls. L'altra limitació és la presència de *bandes tartamudes*. Aquestes últimes es troben freqüentment associades amb l'amplificació d'ADN repetitiu, com és el cas dels microsatèl·lits. Les *bandes tartamudes* són productes de l'amplificació per PCR que difereixen en una unitat de repetició pel que fa a la longitud de l'al·lel original. L'ocurrència d'aquests artefactes dificulta la lectura dels gels i, fins i tot, repetidament són confosos com al·lels, fet que complica l'anàlisi genotípica. No obstant això, aquestes consideracions no han descoratjat molts investigadors que han convertit els microsatèl·lits en una eina molt popular.²⁶ Una vegada que les seqüències dels *primers* són dissenyades i publicades, l'anàlisi dels *loci* microsatèl·lits serà pràctica per a qualsevol laboratori capaç de realitzar les tècniques de PCR i electroforesi. El desenvolupament ini-

cial dels microsatèl·lits pot ser simplificat utilitzant tècniques més avançades com l'ús de llibreries enriquides per a un o més motius. L'estalvi en temps i recursos pot ser millorat desenvolupant l'anomenada *PCR multiplex*, que permet l'amplificació i la recollida de dades simultànies de múltiples *loci* SSR amb una sola mostra d'ADN en una simple reacció de PCR en una sola línia del gel d'electroforesi.²⁷

La tècnica dels microsatèl·lits

Un cop tenim l'ADN aïllat, se n'avaluen els índexs de puresa i el rendiment. Si obtenim els valors apropiats, es procedeix a la realització d'una PCR per fer l'amplificació dels fragments objecte del nostre estudi agregant els encebadors o *primers* de les quinze regions de microsatèl·lits seleccionades i marcades amb fluorocroms diferents, considerant en tot moment, els temps i les temperatures de termociclació específics de cada fragment microsatèl·lit. Després de l'amplificació (PCR) s'utilitzarà un seqüenciador monocapil·lar d'ADN ABI 310 (Applied Biosystems) que té capacitat per analitzar quaranta-vuit mostres en vint-i-quatre hores i disposa d'un programa d'aplicació (*software*) que mesurarà la longitud de cada al·lel. L'aparell registra i distingeix cada encebador (*primer*) microsatèl·lit en funció dels diferents colors del fluorocrom. Per a cada microsatèl·lit obtindrem un parell de valors que corresponen a cadascun

26. G. CHAMBERS i E. MACAVOY (2000), «Microsatellite: consensus...», *Comparative Biochemistry and Physiology*, p. 455-476.

27. S. BROWN, A. SZEWC-McFADDEN i S. KRESOVICH (1996), «Development and application of simple sequence repeat (SSR) *loci* for plant genome analysis», a Prem P. JAUHAR (ed.), *Methods of genome analysis in plants*, p. 147-158.

dels al·lels del *locus* estudiat. Amb la totalitat dels valors es farà una taula de dades per analitzar-les i comparar-les amb les varietats descrites en les bases de dades de microsatèl·lits existents en l'àmbit internacional. D'aquesta manera podrem decidir si les varietats en qüestió són les mateixes que les que van ser descrites ampelogràficament, i determinar les homonímies i/o sinonímies presents en el grup estudiat.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEWELDT, G. (1988). *The genetic resources of Vitis. Genetic and geographic origin of grape cultivars; their prime names and synonyms*. 2a ed. Geilweilerhof, Alemanya: Federal Research Center for Grape Breeding.
- BOWERS, J. E.; DANGL, G. S.; MEREDITH, C. P. (1999). «Development and Characterization of Additional Microsatellite DNA Markers for Grape». *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 50, p. 243-246.
- BOWERS, J. E.; DANGL, G. S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C. P. (1996). «Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.)». *Genome*, vol. 39, p. 628-633.
- BOWERS, J. E.; MEREDITH C. P. (1997). «The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon». *Natural Genetics*, vol. 16, p. 84-87.
- BROWN, S.; SZEWC-MCFADDEN, A.; KRESOVICH, S. (1996). «Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci from plant genome analysis». A: JAUHAR, Prem P. [ed.]. *Methods of genome analysis in plants*. CRC Press, Inc., p. 147-158.
- CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, J. C.; MARTINEZ DE TODA, F.; MARTINEZ-ZAPATER J. M. (1998). «Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain)». *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 97, p. 51-59.
- CHAMBERS, G.; MACAVOY, E. (2000). «Microsatellite: consensus and controversies». *Comparative Biochemistry and Physiology*, part B, vol. 126, p. 455-476.
- GALET, P. (1979). «A practical ampelography-grapevine identification». *Comstock Publ. Assoc.*, Ithaca: Cornell University Press.
- JARNE, P.; LAGODA, P. (1996). «Microsatellites from molecules to populations and back». *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 11, núm. 10, p. 424-429.
- LAMBOY, W. F.; ALPHA C. G. (1998). «Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species». *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, vol. 123, núm. 2, p. 182-188.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. (1993). «PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics». *Plant J.*, vol. 3, p. 175-182.
- MOXON, E.; WILLS, C. (1999). «DNA microsatellites: agent of evolution». *Scientific American* (gener), p. 94-99.
- NARVÁEZ, C.; CASTRO, M. H.; VALENZUELA, J.; HINRICHSEN, P. (2001). «Patrones genéticos de los cultivares de vides de vinificación más comúnmente usados en Chile basados en marcadores de microsatélites». *Agric. Tec.*, vol. 61, núm. 3, p. 249-261.

- OLMO, H. P. (1976). «Grapes». A: SIMMONDS N. W. [ed]. *Evolution of crop plants*. Londres: Logman, p. 294-298.
- POWEL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. (1996). «The comparison of RFLP, RADP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis». *Mol. Breed.*, vol. 2, p. 225-238.
- RIAZ, S.; MEREDITH C. P. (2000). «A microsatellite marker based linkage map of *Vitis vinifera*». A: *Abstracts of the International Plant and Animal Genome Conference VIII, held 9-12 January 2000, San Diego, Calif.* Nova York: Scherago International Inc., p. 132.
- SCHLOTTERER, C.; TAUTZ, D. (1992). «Slip-page síntesis of simple séquence DNA». *Nucleic Acids Research*, vol. 20, núm. 2, p. 211-215.
- SEFC, K. M.; LEFORT, F.; GRANDO, M. S.; SCOTT, K.; STEINKELLNER, H.; THOMAS, M. R. (2001). «Microsatellite markers for grapevine: a state of the art». A: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. [ed.]. *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*. Amsterdam: Kluwer Publishers, p. 433-463.
- SEFC, K. M.; REGNER, F.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. (1998). «Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers». *Vitis*, vol. 37, p. 15-20.
- SEFC, K. M.; REGNER, F.; TURETSCHK, E.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. (1999). «Identification of microsatellite sequence in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of diferent *Vitis* species». *Genome*, vol. 42, núm. 3, p. 367-373.
- TAUTZ, D. (1989). «Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers». *Nucleic Acids Res.*, vol. 17, p. 6463-6471.
- THOMAS, M. R.; CAIN P.; SCOTT, N. S. (1994). «DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness». *Plant Molecular Biology*, vol. 25, p. 939-949.
- THOMAS, M. R.; MATSUMOTO, S.; CAIN, P.; SCOTT, N. S. (1993). «Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification». *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 86, p. 173-180.
- THOMAS, M. R.; SCOTT, N. S. (1993). «Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagget site (STSs)». *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 86, p. 985-990.
- VIGNANI, R.; BOWERS J. E.; MEREDITH, C. P. (1996). «Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* "Sangiovese"». *Scientia Hortica*, vol. 65, p. 163-169.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. (2002). «Strategies for microsatellitisation: a reiew». *Molecular Ecology*, vol. 11, p. 1-16.