

DIFERENCIACIÓ DE VINOS ROSADOS MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS MOLECULARES

Anna Puig Pujol; Eva Bertran Casanellas; Carme Domingo Gustems

Secció de Investigació Enològica. Secció de Viticultura y Producció Experimental.
INCAVI (Institut Català de la Vinya i el Vi). Estació de Viticultura y Enologia. Plaça Àgora, 2. Polígon Industrial
Domenys II. 08720 Vilafranca del Penedès (Barcelona). Telf. 938900211. apuigpujol@gencat.cat

1. INTRODUCCIÓ

Determinar la varietat con la que se ha elaborado un vino se presenta como un aspecto interesante desde el punto de vista de la trazabilidad del producto y de la detección de fraudes en el sistema de controles reglamentarios de las diferentes denominaciones de origen. Las variedades seleccionadas ejercen una fuerte influencia en las características específicas y la calidad de los vinos, sobretudo en el caso de los vinos monovarietales o en zonas vitícolas donde se potencia el uso de variedades autóctonas. El desarrollo de un método para identificar o diferenciar las variedades utilizadas para elaborar un vino a partir de una muestra del propio vino es un objetivo perseguido en los últimos años. La autenticidad de los vinos es de principal importancia en relación al control de la calidad y a la información que queda reflejada en la etiqueta del producto y en la cual confía el consumidor.

La caracterización y diferenciación de las variedades de uva presentes en mostos y vinos se ha basado principalmente en el análisis de parámetros químicos y bioquímicos: componentes polifenólicos (Revilla et al, 2001; García-Beneytez et al, 2003), perfiles de amino ácidos y proteínas (Moreno-Arribas et al, 1999; Soufleros et al, 2003) o análisis de elementos traza (Day et al, 1995). Sin embargo, estos métodos no siempre muestran resultados satisfactorios (García-Beneytez et al, 2002). En las últimas décadas varias técnicas basadas en el análisis del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han demostrado su utilidad en la diferenciación de variedades de vid (Thomas y Scott, 1993; Faria et al, 2000). Entre ellas, el uso de marcadores moleculares microsatélites o SSR ("Simple Sequence Repeats") o STMS ("Sequence-Tagged Microsatellites Sites") ha sido el que ha generado mejores resultados en la diferenciación de variedades de *Vitis vinifera* L. ya que ha demostrado un alto grado de polimorfismo genotípico (Sefc et al, 2001).

Pero la diferenciación de la variedad mediante PCR partiendo de una muestra de vino presenta muchas dificultades. Diferentes trabajos que han utilizado los marcadores microsatélite para identificar la o las variedades en mostos y vinos a partir del ADN residual de la uva presente en la muestra, han descrito que el factor limitante y más laborioso es la obtención y amplificación de este ADN (Siret et al, 2000; Siret et al 2002; García-Beneytez et al, 2002; Faria et al, 2000; Baleiras-Couto y Eiras-Dias, 2006; Savazzini y Martinelli, 2006; Rodríguez-Plaza et al, 2006). La escasa cantidad presente en la muestra, su degradación durante el proceso de elaboración del vino y elementos inhibidores de la PCR (taninos, polifenoles o polisacáridos) presentes en los vinos son los principales problemas en la aplicación de esta técnica. Se han conseguido resultados más o menos exitosos en vinos procedentes de variedades tintas donde el contacto

con el hollejo durante la maceración permite obtener mayores cantidades de ADN residual de la uva, pero no han resultado igual de efectivos los análisis de vinos blancos, donde la probabilidad de extraer ADN residual es menor. En vinos rosados, la aplicación de esta técnica ha sido poco probada.

El trabajo que se presenta demuestra la utilidad de una técnica molecular: el análisis del ADN mediante marcadores microsatélites, para la caracterización varietal de vinos de las variedades Tempranillo, Garnacha tinta, Monastrell, Pinot noir y Trepát, variedades autorizadas en distintas denominaciones de origen españolas y destinadas a la elaboración de vino joven o vino base para cava rosado, ambos con un incremento de consumo en los últimos años.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

En una primera fase del estudio se analizaron vinificaciones de las variedades tintas Tempranillo, Garnacha tinta, Monastrell, Pinot noir y Trepát. Las fermentaciones a escala experimental se llevaron a cabo a partir de 200 kg de uva y realizando una fermentación en rosado tradicional, con un período de maceración con los hollejos que osciló entre 8 y 12 horas según la variedad. Se tomaron muestras de las vinificaciones en dos momentos: al inicio de la fermentación alcohólica, justo después del proceso de maceración con los hollejos: 1 L y al final del proceso fermentativo: 2 L.

En una segunda etapa del trabajo y según los resultados obtenidos en el estudio previo (Puig et al, 2007), se consideró analizar vinos una vez finalizada la fermentación alcohólica y después de haber transcurrido un período de almacenamiento en depósito (una media de 7 meses). Para ello, el estudio se centró en el análisis de vinos procedentes de la variedad Trepát, autóctona de la D.O. Conca de Barberà en Cataluña, elaborados a escala industrial en la Cooperativa Vinícola de Sarral (6 vinificaciones) y a escala experimental (4 vinificaciones) en la bodega de INCAVI. Las características principales de elaboración de las vinificaciones industriales, así como el peso del sedimento obtenido después de procesar 4,5 L de vino para iniciar la extracción de ADN presente en la muestra se encuentran resumidas en la Tabla 1. En la Tabla 2 se describen los principales parámetros de elaboración y volumen analizado para las vinificaciones experimentales. Excepto uno de los vinos industriales en el que se había realizado una clarificación con bentonita (ver Tabla 1), el resto se trataba de vinos en rama en los cuales se habían realizado 1 o 2 trasvases (no clarificados, ni estabilizados, ni filtrados).

Los resultados de los análisis de estas muestras mediante marcadores microsatélites se compararon con los mismos análisis realizados a partir del ADN extraído de hojas jóvenes de estas variedades, procedentes de la colección del Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI).

Tabla 1. VINOS TREPAT INDUSTRIALES. Características de las vinificaciones.

MUESTRA	Volumen vinificación (HI)	Horas de maceración	Volumen procesado (L)	Turbidez (NTU)	Peso sedimento (g)
INDUSTRIAL 1	1500	5	4,5	95	4,672
INDUSTRIAL 2	1000	5	4,5	62	3,323
INDUSTRIAL 3	1000	0	4,5	70	3,238
INDUSTRIAL 4	500	8	4,5	34	1,441
INDUSTRIAL 5	3000	6	4,5	87	4,116
INDUSTRIAL 6 (*)	2000	8	4,5	51	3,162

(*) Vino clarificado con bentonita (25 g/HI).

Tabla 2. VINOS TREPAT EXPERIMENTALES. Características de las vinificaciones.

MUESTRA	Volumen vinificación (L)	Horas de maceración	Volumen procesado (L)	Turbidez (NTU)	Peso sedimento (g)
EXPERIMENTAL 1	60	12	3,85	92	6,81
EXPERIMENTAL 2	60	12	3,25	> 1000 (*)	101,1(**)
EXPERIMENTAL 3	65	12	3,85	795	42,78
EXPERIMENTAL 4	60	12	3,85	207	8,72

(*) Fuera de escala de determinación del equipo.

(**) En el sedimento, muchos cristales de bitartrato y depósitos de materia colorante.

Extracción del ADN

La extracción del ADN de los mostos y vinos se efectuó con los sedimentos resultantes de centrifugar 1000 o 2000 mL de muestra según el momento de muestreo en la primera parte del estudio o a partir de los volúmenes indicados en las Tablas 1 y 2 en la segunda fase, a 12520xg durante 20 minutos a 4°C. Para el aislamiento del ADN se utilizó la metodología descrita por Siret et al., 2000. Para mejorar la extracción final se utilizó la técnica de purificación de ADN por columnas "Qiaprep® Spin Miniprep" (Qiagen). Para la extracción y purificación del ADN total a partir de hojas se utilizó el kit de extracción DNeasy™ Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Caracterización mediante microsatélites: amplificación por PCR y análisis

Para las muestras de vinos de las variedades Tempranillo, Garnacha tinta, Monastrell, Pinot noir y Trepát se analizaron 6 *loci* microsatélites que han sido caracterizados por otros autores y utilizados en trabajos previos de identificación varietal a partir de material vegetal o mostos: VVMD5, (Bowers et al, 1996), VVMD27, VVMD32, VVMD36 (Bowers et al., 1999), VrZAG62 (Sefc et al, 1999) y VVS2 (Thomas y Scott, 1993). La selección de estas regiones microsatélite se realizó en base a tres criterios a partir de la información disponible: la facilidad de amplificación, la heterocigosidad observada y el rango de los tamaños de los alelos amplificados. Para la detección de los productos de amplificación de cada *locus* se utilizaron cebadores marcados con fluorocromos en su extremo 5': VVMD5 y VrZAG62 (6-FAM), VVMD27 y VVMD32 (NED), VVS2 (HEX) y VVMD36 (PET) de Applied Biosystems.

Todos los microsatélites para muestras de hojas, mostos y vinos se amplificaron en las mismas condiciones con un volumen final de 5 μ l de ADN (4 ng/ μ L). Las reacciones de amplificación (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), en volumen final de 20 μ l con una concentración final de 1X *Taq* GeneAmp Buffer (Applied Biosystems), 2 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP (New England Biolabs), 0,02 U/ μ l AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) y 0,2 μ M de cada cebador VVMD27, VVMD36, VrZAG62 y VVS2, y 0,4 μ M para VVMD5 y VVMD32 (Applied Biosystems). Las amplificaciones se realizaron según el siguiente programa: un ciclo de 5 minutos a 95 °C, 15 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto 30 segundos a 72 °C, 20 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 30 segundos a 52 °C y 1 minuto 30 segundos a 72 °C y finalmente un ciclo de 7 minutos a 72 °C.

En la segunda fase del estudio, para las vinificaciones de la variedad Trepát, se analizaron 20 *loci* de microsatélites nucleares genéticamente independientes, que en su mayoría se localizan en diferentes grupos de ligamiento: VMC1B11 (C1B11) (Zyprian et al, 2005); VMC4F3-1 (C4F31) (Di Gaspero et al, 2000); VVMD5 (M5), VVMD7 (M7), VVMD21 (M21), VVMD24 (M24), VVMD25 (M25), VVMD27 (M27), VVMD28 (M28), VVMD32 (M32) (Bowers et al, 1996, 1999); VVS2 (S2) (Thomas et al, 1993); VVIB01 (B01), VVIH54 (H54), VVIN16 (N16), VVIN73 (N73), VVIP31 (P31), VVIP60 (P60), VVIQ52 (Q52), VVIV37 (V37), VVIV67 (V67) (Merdinoglu et al, 2005). Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando dos PCR múltiples: MIX A y MIX B, analizando en cada una 11 y 9 *loci* microsatélites respectivamente, en las condiciones establecidas por Ibañez et al (2009).

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis capilar y se analizaron por fluorescencia con el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El tamaño de los fragmentos amplificados expresados en pares de bases (pb) se calculó utilizando el software GeneMapper v. 3.0, usando GeneScan-500 LIZ™ (Applied Biosystems) como patrón interno de tamaño.

Los genotipos de las variedades de las muestras analizadas en este estudio se compararon con las bases de datos de variedades españolas y europeas de vid (Martín et al, 2003; Ibañez et al, 2003; Sefc et al, 2000).

3. RESULTADOS

Los seis microsatélites utilizados en la diferenciación de mostos y vinos monovarietales de Tempranillo, Garnacha tinta, Monastrell, Pinot noir y Trepát amplificaron correctamente en las condiciones descritas anteriormente. Las longitudes de los alelos de cada uno de los microsatélites obtenidas de las muestras analizadas en las vinificaciones para las cinco variedades se presentan en la Tabla 3. Los marcadores VVMD27, VVMD36 y VVS2 fueron los más polimórficos, permitiendo distinguir sólo con estas tres regiones microsatélite las principales variedades que pueden producir problemas de autenticidad en los vinos base rosados para elaborar cava. Las variedades Garnacha tinta y Monastrell no se pudieron discriminar para el marcador VVMD5. Tampoco lo pudieron hacer Pinot noir y Trepát para el marcador VVMD32 y Monastrell y Trepát para el microsatélite VrZAG62.

Tabla 3. Perfil de los microsatélites VVMD5, VVMD27, VVMD32, VVMD36, VrZAG62 y VVS2 para las 5 variedades estudiadas (tamaño de los alelos en pares de bases, pb)

<i>Variedad</i>	<i>VVMD5</i>	<i>VVMD27</i>	<i>VVMD32</i>	<i>VVMD36</i>	<i>VrZAG62</i>	<i>VVS2</i>
Tempranillo	232 / 232	184 / 184	248 / 250	262 / 274	194 / 198	140 / 142
Garnacha t.	222 / 236	194 / 194	238 / 248	264 / 268	186 / 186	133 / 142
Monastrell	222 / 236	180 / 190	238 / 254	262 / 268	186 / 202	129 / 149
Pinot noir	224 / 234	186 / 188	238 / 270	252 / 252	186 / 192	133 / 149
Trepát	222 / 230	180 / 194	238 / 270	262 / 262	186 / 202	129 / 139

Para cada variedad y microsatélite analizado, se obtuvieron 1 ó 2 picos en el electroferograma resultante del análisis con el software GeneMapper (Fig. 1), que se interpretaron como genotipos homocigóticos o heterocigóticos respectivamente. Se asumió que, para un determinado microsatélite, las variedades con un pico único eran homocigóticas para dicho alelo, por lo que no se diferenciaron homocigotos de heterocigotos con un alelo nulo (alelo que no puede ser amplificado por PCR debido a mutaciones existentes en o entre los sitios de hibridación de los cebadores).

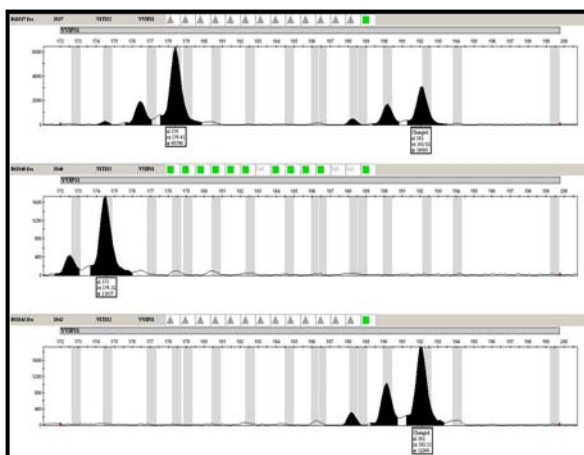


Fig. 1. Ejemplo de electroferogramas obtenidos al analizar diferentes variedades con el microsatélite VVIP31 marcado con el fluorocromo NED. El primer electroferograma muestra una variedad heterocigota (2 alelos) mientras que el segundo y tercero son ejemplos de variedades homocigotas (1 alelo) para este locus.

La Tabla 4 muestra la eficiencia de amplificación de cada uno de los 6 microsatélites en los dos puntos de muestreo analizados: inicio y final de FA.

En cada uno de los distintos marcadores microsatélites fue posible la amplificación el primer día de la fermentación alcohólica, a partir del ADN obtenido de 1 L de muestra, justo después de que el mosto finalizase su contacto con el hollejo en el proceso de maceración corta que tiene lugar en los vinos rosados. El método de extracción utilizado, con un proceso final de purificación a través de columnas permitió eliminar sustancias inhibitoras de la Taq polimerasa: polisacáridos, taninos o polifenoles, presentes en los mostos analizados. Por este motivo este proceso de extracción se consideró útil para analizar los vinos rosados en rama resultantes al final de la fermentación alcohólica.

Tabla 4. Resultados de la amplificación en mostos y vinos rosados (FA: fermentación alcohólica)

<i>Variedad</i>	<i>Muestreo (días de FA*)</i>	<i>VVMD5</i>	<i>VVMD27</i>	<i>VVMD32</i>	<i>VVMD36</i>	<i>VrZAG62</i>	<i>VVS2</i>
Tempranillo	Inicio FA (1)	+	+	+	+	+	+
	Final FA (15)	+	-	-	+	+	+
Garnacha t.	Inicio FA (1)	+	+	+	+	+	+
	Final FA (11)	-	+	-	+	+	+
Monastrell	Inicio FA (1)	+	+	+	+	+	+
	Final FA (9)	+	+	+	+	+	+
Pinot noir	Inicio FA (1)	+	+	+	+	+	+
	Final FA (15)	+	+	+	+	+	+
Trepát	Inicio FA (1)	+	+	+	+	+	+
	Final FA (17)	-	+	-	+	+	+

La eficiencia de amplificación al final de la fermentación alcohólica no resultó igual para todos los microsatélites ni para todas las variedades. Para Monastrell y Pinot noir amplificaron todos los microsatélites a partir del procesado de 2 L de muestra. Los microsatélites VVMD36, VrZAG62 y VVS2 fueron los más efectivos en las cinco variedades analizadas. VVMD27 no amplificó en la vinificación de Tempranillo. VVMD5 no lo hizo en el caso de Garnacha tinta y Trepát y VVMD32 no amplificó en los vinos de Tempranillo, Garnacha tinta y Trepát. La menor amplificación encontrada en el análisis de los vinos al final de la fermentación alcohólica podría deberse a la calidad del ADN. La integridad del ADN de origen vegetal que se encuentra en el mosto puede verse afectada durante el proceso fermentativo y esto puede dar lugar a que determinados microsatélites no amplifiquen correctamente cuando el ADN se extrae del vino (Siret et al, 2002).

Los resultados obtenidos tanto a partir del material vegetal (hojas) como en muestras de mosto y vino, comparados con los publicados en diferentes trabajos para estas variedades y estos microsatélites (Ibáñez et al, 2003; Martín et al, 2003) permitieron confirmar la autenticidad monovarietal de cada fermentación analizada. De todos los trabajos consultados, no encontramos resultados sobre la variedad Trepát. Por lo tanto, este es el primer estudio en el que aparece la caracterización a través de microsatélites de esta variedad, considerada autóctona de la D.O. Conca de Barberà en Cataluña.

Debido al interés de autenticar vinos elaborados con Trepát, se inició una segunda parte del trabajo, analizando muestras procedentes de fermentaciones a escala industrial y experimental de esta variedad, incrementando el estudio a 20 regiones microsatélite y valorando

el uso de este método como técnica analítica para identificar las variedades con las que se han elaborado los vinos en las fases finales de su proceso de vinificación.

Del estudio previo (Puig et al, 2007) con 6 microsatélites de las variedades autorizadas para elaborar cava rosado en la D.O Cava: Trepát, Monastrell, Garnacha tinta y Pinot noir, junto con Tempranillo como variedad mayoritaria en España, se amplió el análisis a 20 *loci*. Los genotipos obtenidos (Tabla 5) se utilizaron como referencia para comparar los resultados de los análisis de los vinos industriales y experimentales de Trepát. Para esta variedad, cuatro de las regiones microsatélite: VMC1B11, VVIB01, VVIN73 y VVMD28 resultaron homocigotas. Los 16 microsatélites restantes dieron alelos heterocigotos.

La Tabla 6 muestra la eficiencia de amplificación y los resultados para los 10 vinos de Trepát analizados, comparándolos con los obtenidos a partir del ADN extraído de hoja. Dos de los vinos elaborados a escala industrial: ind. 2 e ind. 4 y dos a escala experimental: exp. 1 y exp. 4, se pudieron identificar con 19 de los 20 microsatélites. Las muestras exp. 2, ind. 5, ind. 3 y ind.1 dieron resultados positivos con 11, 10, 7 y 3 microsatélites respectivamente. Sólo dos lotes de vino, ind. 6 y exp. 3 no se pudieron caracterizar como Trepát por falta de amplificación. No obstante, incluso en el caso del vino industrial 1 donde sólo amplificaron 3 de los 20 *loci* analizados: VVIP31, VVMD27 y VVMD24, los valores obtenidos podrían ayudar a diferenciar la variedad Trepát del resto de variedades utilizadas en la elaboración de vino base para cava rosado.

En este estudio se ha visto que no existe relación entre el peso del sedimento de partida para la extracción del ADN y la eficiencia de amplificación (ver Tablas 1, 2 y 6). Al contrario, tanto en el caso de los lotes de los vinos experimentales como en los industriales, los mejores resultados, en general, se obtuvieron de las muestras con menor peso de sedimento de partida: se consiguió una buena extracción y amplificación del ADN de restos de material vegetal procedente de la uva en el caso del vino industrial 4 a partir sólo de 1,44 g de sedimento. El hecho de que a más peso de sedimento menor probabilidad de determinar la variedad podría explicarse por la presencia en mayor cantidad de sustancias (materia colorante, polisacáridos, cristales de tartrato, etc) que podrían interferir en el protocolo de obtención del ADN de origen vegetal y posteriormente en su amplificación mediante PCR. Esta hipótesis también se relaciona con el valor de turbidez obtenido en los diferentes lotes de vino (Tablas 1 y 2): en general, a menor turbidez, mejores resultados. Existe, no obstante, la excepción del lote de vino industrial 6. En este caso, no se obtuvieron resultados positivos por el hecho de que este vino había sido clarificado con bentonita. La adición de este clarificante podría haber causado, por acción física, la absorción de restos de material vegetal y, por lo tanto, la no obtención de ADN en suficiente cantidad y calidad para poder ser amplificado.

Del grupo de 20 microsatélites utilizado, los más efectivos fueron VVIP31 y VVMD24, obteniendo resultados satisfactorios en 8 de los 10 vinos analizados, seguidos de VMC4F3-1, VVIN16 y VVIB01 con resultados positivos en 7 de los 10 lotes. El menos eficaz en estas condiciones de amplificación fue VVIV37. Que algunos microsatélites funcionen mejor que otros puede explicarse por el hecho de que la integridad del ADN al final del proceso de producción de un vino puede verse afectada y esto puede dar lugar a que determinados microsatélites no amplifiquen correctamente (Siret et al, 2000).

Tabla 5. Resultados obtenidos al analizar con 20 microsatélites las 4 variedades autorizadas para elaborar cava rosado más la Tempranillo.

	C1b11	C1B11	B01	B01	H54	H54	N73	N73	P31	P31	P60	P60	Q52	Q52	M7	M7	S2	S2	M24	M24
TREPAT	184	184	289	289	164	166	262	262	178	188	318	326	83	87	240	246	129	139	209	217
TEMPRANILLO	172	184	291	293	164	166	256	262	180	180	326	326	83	83	236	250	140	142	209	215
GARNACHA TINTA	188	194	287	289	164	168	254	262	174	182	318	322	81	87	236	240	133	142	209	215
MONASTRELL	172	188	289	289	166	166	262	262	178	190	318	322	ND*	ND	ND	ND	129	149	209	217
PINOT NOIR	166	172	287	293	164	168	262	264	180	180	318	320	87	87	236	240	133	149	211	215
	M25	M25	C4F31	C4F31	N16	N16	V67	V67	M21	M21	M32	M32	M27	M27	M28	M28	M5	M5	V37	V37
TREPAT	238	252	166	172	151	157	354	362	241	247	238	270	180	194	254	254	222	230	159	163
TEMPRANILLO	240	252	178	182	149	151	364	366	247	255	248	250	184	184	256	256	232	232	167	167
GARNACHA TINTA	238	252	186	204	151	157	354	362	241	247	238	248	194	194	240	240	222	236	157	167
MONASTRELL	238	260	178	178	151	157	354	362	241	247	238	254	180	190	242	256	222	236	163	163
PINOT NOIR	236	246	176	176	149	157	362	370	247	247	238	270	186	188	214	232	224	234	147	159

(*) ND: no determinado.

Tabla 6. Genotipos obtenidos en el análisis de vinos industriales y experimentales elaborados con la variedad Trepát.

MUESTRA	C1b11	C1B11	B01	B01	H54	H54	N73	N73	P31	P31	P60	P60	Q52	Q52	M7	M7	S2	S2	M24	M24
TREPAT (hoja)	184	184	289	289	164	166	262	262	178	188	318	326	83	87	240	246	129	139	209	217
VINO IND 1	- (*)	-	-	-	-	-	-	-	178	188	-	-	-	-	240	246	-	-	209	217
VINO IND 2	184	184	289	289	164	166	262	262	178	188	318	326	83	87	240	246	129	139	209	217
VINO IND 3	-	-	289	289	-	-	-	-	178	188	-	-	-	-	240	246	-	-	209	217
VINO IND 4	184	184	289	289	164	166	262	262	178	188	318	326	83	87	240	246	129	139	209	217
VINO IND 5	-	-	289	289	164	166	-	-	178	188	-	-	-	-	240	246	129	139	209	217
VINO IND 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VINO EXP 1	184	184	289	289	164	166	262	262	178	188	318	326	83	87	-	-	129	139	209	217
VINO EXP 2	184	184	289	289	164	166	262	262	178	188	-	-	-	-	-	-	129	139	209	217
VINO EXP 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VINO EXP 4	184	184	289	289	164	166	262	262	178	188	318	326	83	87	240	246	129	139	209	217
MUESTRA	M25	M25	C4F31	C4F31	N16	N16	V67	V67	M21	M21	M32	M32	M27	M27	M28	M28	M5	M5	V37	V37
TREPAT (hoja)	238	252	166	172	151	157	354	362	241	247	238	270	180	194	254	254	222	230	159	163
VINO IND 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VINO IND 2	238	252	166	172	151	157	354	362	241	247	238	270	180	194	254	254	222	230	-	-
VINO IND 3	-	-	166	172	151	157	-	-	-	-	-	-	-	-	254	254	-	-	-	-
VINO IND 4	238	252	166	172	151	157	354	362	241	247	238	270	180	194	254	254	222	230	-	-
VINO IND 5	-	-	166	172	151	157	-	-	-	-	-	-	-	-	254	254	222	230	-	-
VINO IND 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VINO EXP 1	238	252	166	172	151	157	354	362	241	247	238	270	180	194	254	254	222	230	159	163
VINO EXP 2	238	252	166	172	151	157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	222	230	-	-
VINO EXP 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VINO EXP 4	238	252	166	172	151	157	354	362	241	247	238	270	180	194	254	254	222	230	-	-

(*) No amplifica.

4. CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que el análisis mediante microsatélites de restos de ADN vegetal presente en los vinos antes de ser clarificados permite comprobar, procesando volúmenes relativamente pequeños de muestra, la autenticidad y trazabilidad de la variedad con la que se han elaborado. Es en esta etapa cuando muchos vinos son calificados para ser aceptados en una determinada Denominación de Origen. Este hecho permite preservar, sin ambigüedades, los vinos elaborados con variedades autóctonas y autorizadas en cada zona vitivinícola.

5. BIBLIOGRAFIA

- Baleiras-Couto, M.M., Eiras-Dias, J.E. (2006). **Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers.** *Analytica Chimica Acta*, 563: 283-291.
- 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*, 39: 628-633.
- 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*, 50: 243-246.
- Day, M., Zhang, B., Martin, G. (1995). **Determination of the geographical origin of wine using joint analysis of elemental and isotopic composition in differentiation of the principal production zones in France for the 1990 vintage.** *J. Sci. Food Agric.*, 67: 113-123.
- Di Gaspero, G., Peterlunger, E., Testolin, R., Edwards, K.J., Cipriani, G. (2000). **Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*.** *Theor. Appl. Genet.* 101: 301-308.
- Faria, M.A., Magalhães, R., Ferreira, M.A., Meredith, C.P., Ferreira Monteiro, F. (2000). ***Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR).** *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1096-1100.
- García-Beneytez, E., Moreno-Arribas, M.V., Borrego, J., Polo, M.C., Ibáñez, J. (2002). **Application of DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental and commercial wines of *Vitis vinifera* L. using microsatellites markers.** *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6090-6096.
- García-Beneytez, E., Cabello, F., Revilla, E. (2003). **Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS.** *J. Agric. Food Chem.*, 51: 5622-5629.
- Ibáñez, J., De Andrés, M.T., Molino, A., Borrego, J. (2003). **Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellite analysis.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 54: 22-30.
- Ibáñez, J., Vargas, A.M., Palancar, M., Borrego, J., De Andrés, M.T. (2009). **Genetic Relationship among table-grape varieties.** *Am. J. Enol. Vitic.*, 60 (1): 35-42.
- Martín, J.P., Borrego, J., Cabello, F., Ortiz, J.M. (2003). **Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers.** *Genome*, 46: 10-18.
- Merdinoglu, D., Butterlin, G., Bevilacqua, L., Chiquet, V., Adam-Blondon, A. F., Decroocq, S. (2005). **Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR.** *Molecular Breed*, 15: 349-366.

- Moreno-Arribas, M.V., Cabello, F., Polo, M.C., Martínez-Alvárez, P.J., Pueyo, E. (1999). **Assessment of the native electrophoretic analysis of total grape must proteins for the characterization of *Vitis vinifera* L. cultivars.** *J. Agric. Food Chem.*, 47: 114-120.
- Puig, A., Domingo, C., Mínguez, S. (2007). **Application of molecular techniques for rosé wine characterization.** *Actas del XXX Congreso Mundial de la Viña y el Vino*. Budapest, 10-16 June. Hungría.
- Revilla, E., García-Beneytez, E., Cabello, F., Martín-Ortega, G., Ryan, J.M. (2001). **Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them.** *Journal of Chromatography A*, 915: 53-60.
- Rodríguez-Plaza, P., González, R., Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Bravo, G., Martínez-Zapater, J.M., Martínez, M.C., Cifuentes, A. (2006) **Combining microsatellite markers and capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence to identify the grape (*Vitis vinifera*) variety of musts.** *Eur. Food Res. Technol.*, 223: 225-231.
- Savazzini, F., Martinelli, L. (2006). **DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification.** *Analytica Chimica Acta*, 563: 274-282.
- Sefc, K.M., Regner, F., Turetschek, E., Glöss, J., Steinkellner, H. (1999). **Identification of microsatellite sequences in *Vitis* riparian and their applicability for genotyping of different *Vitis* species.** *Genome*, 42: 1-7.
- Sefc, K.M., Lopes, M.S., Lefort, F., Botta, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Ibáñez, J., Pejic, Wagner, H.W., Glössl, J., Steinkellner, H. (2000). **Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars.** *Theor. Appl. Genet.*, 100: 498-505.
- Sefc, K.M., Lefort F., Grando MS, Scott KD, Steinkellner H, Thomas MR (2001). **Cap.17: Microsatellite markers for grapevine: a state of the art.** In: **Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine.** Roubelakis-Angelakis, K.A. (Ed.) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 433. ISBN 0-7923-6949-1.
- Siret, R., Boursiquot, J.M., Merle, M.H., Cabanis, J.C., This, P. (2000). **Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers.** *J. Agric. Food Chem.*, 48: 5035-5040.
- Siret, R., Gigaud, O., Rosec, J.P., This, P. (2002). **Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers.** *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3822-3827.
- Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tsarchhopoulos, C., Biliaderis, C.G., (2003). **Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage.** *Food Chemistry*, 80: 261-273.
- Thomas, M.R., Scott, N.S. (1993). **Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites, STSs.** *Theor. Appl. Genet.*, 86: 985-990.
- Zyprian, E., Topfer, R. (2005). **Development of microsatellite-derived markers for grapevine genotyping and genetic mapping.** NCBI, GeneBank.