

**DIFERENCIACIÓ DE VINS DE LA VARIETAT TREPAT.  
UTILITZACIÓ DE TÈCNIQUES MOLECULARS**

Anna Puig Pujol

Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI).

Plaça Àgora, 2 . Polígon Industrial Domenys II. 08720 Vilafranca del Penedès (Barcelona).

Telf. 93 890 02 11 Fax. 93 890 03 54

[apuigpujol@gencat.cat](mailto:apuigpujol@gencat.cat)

## **RESUM**

Determinar la varietat amb la qual ha estat elaborat un vi es presenta com un aspecte interessant des del punt de vista de la traçabilitat del producte i de la detecció de frauds en el sistema de controls reglamentaris de les diferents denominacions d'origen. En el cas de la D.O. Conca de Barberà, on la varietat autòctona Trepà i els vins elaborats a partir d'ella representen un símbol de reconeixement de la zona, el fet de poder autenticar l'origen varietal del producte és un dels factors de qualitat més valorats pels consumidors en la decisió de la seva adquisició.

L'obtenció i anàlisi de l'ADN procedent de possibles restes de raïm encara presents en els vins s'utilitza per a identificar la varietat amb la que s'han elaborat. Això ha estat possible en el cas de vins negres on el contacte amb la pell durant un període més o menys llarg durant la fase de maceració permet obtenir restes d'ADN vegetal. Però en vins rosats on la possibilitat d'obtenir-ne és més reduïda degut al menor temps de maceració, l'aplicació d'aquesta tècnica ha estat menys estudiada.

El treball que es presenta demostra la utilitat d'una tècnica molecular: l'anàlisi de l'ADN mitjançant marcadors microsatèl·lits, per a la caracterització varietal de vins de la varietat Trepà. S'han analitzat 10 vins en rama monovarietals de Trepà, 6 elaborats a escala industrial i 4 elaborats a escala experimental mitjançant 20 marcadors microsatèl·lit. Els resultats obtinguts s'han comparat amb l'anàlisi de la varietat Trepà a partir de material vegetal (fulla) i també amb els valors resultants de l'anàlisi de 4 vins elaborats a partir de Tempranillo, Garnatxa negra, Monastrell i Pinot noir.

La identificació del Trepà en vins i la diferenciació d'aquesta varietat respecte a altres varietats negres utilitzades per elaborar vins monovarietals ha estat possible gràcies a la utilització d'aquesta tècnica molecular.

## **RESUMEN**

Determinar la variedad 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. En el caso de la D.O. Conca de Barberà, donde la varietat autòctona Trepà y los vinos elaborados a partir de ella representan un símbolo de reconocimiento de la zona, el hecho de poder autenticar el origen varietal del producto es uno de los factores de calidad más valorados por los consumidores en la decisión de su adquisición.

La obtención y análisis del ADN procedente de posibles restos de uva aún presentes en los vinos se utiliza para identificar la variedad con la que han sido elaborados. Esto ha sido posible en el caso de vinos tintos donde el contacto con el hollejo durante un periodo más o menos largo durante la fase de maceración permite obtener restos de ADN vegetal. Pero en vinos rosados donde la posibilidad de obtenerlo es más reducida debido al menor tiempo de maceración, la aplicación de esta técnica ha sido menos estudiada.

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 la variedad Trepát. Se han analizado 10 vinos en rama monovarietales de Trepát, 6 elaborados a escala industrial y 4 elaborados a escala experimental mediante 19 marcadores microsatélite. Los resultados obtenidos se han comparado con el análisis de la variedad Trepát a partir de material vegetal (hoja) y también con los valores resultantes del análisis de 4 vinos elaborados a partir de Tempranillo, Garnacha tinta, Monastrell y Pinot noir.

La identificación del Trepát en vinos y la distinción de esta variedad respecto a otras variedades tintas utilizadas para elaborar vinos monovarietales ha sido posible gracias a la utilización de esta técnica molecular.

## **INTRODUCCIÓ**

Les varietats seleccionades per a la producció de vi exerceixen una forta influència en les característiques específiques i la qualitat del producte, sobretot en zones com la D.O. Conca de Barberà on es potencia l'ús d'una varietat autòctona: el Trepát. El desenvolupament d'un mètode per identificar o diferenciar les varietats utilitzades per elaborar un vi a partir d'una mostra del propi vi és un objectiu perseguit en els últims anys. L'autenticitat dels vins és de principal importància en relació al control de la qualitat i a la informació que queda reflectida en l'etiqueta del producte i en la qual confia el consumidor.

La caracterització i identificació de les varietats de raïm presents en mostos i vins s'ha basat principalment en l'anàlisi de paràmetres químics i bioquímics: components polifenòlics (Revilla et al, 2001; García-Beneytez et al, 2003), perfils d'aminoàcids i proteïnes (Moreno-Arribas et al, 1999; Soufleros et al, 2003) o anàlisis d'elements traça (Day et al, 1995). No obstant, aquests mètodes no sempre mostren resultats satisfactoris (García-Beneytez et al, 2002). En els últims anys, varies tècniques basades en l'anàlisi de l'ADN mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) han demostrat la seva utilitat en la diferenciació de varietats de vinya (Thomas i Scott, 1993; Faria et al, 2000). Entre elles, l'ús de marcadors moleculars microsatèl·lits o SSR ("Simple Sequence Repeats") o STMS ("Sequence-Tagged

Microsatellites Sites”) ha estat el que ha generat millors resultats en la diferenciació de varietats de *Vitis vinifera* L. ja que ha demostrat un alt grau de polimorfisme genotípic (Sefc et al, 2001).

Però la diferenciació de la varietat mitjançant PCR partint d’una mostra de vi presenta moltes dificultats. Diferents treballs que han utilitzat els marcadors microsatèl·lits per identificar la o les varietats en mostos i vins a partir de l’ADN residual del raïm present en la mostra han descrit que el factor limitant i més laboriós és la obtenció i amplificació d’aquest 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 i Martinelli, 2006; Rodríguez-Plaza et al, 2006). La poca quantitat present en la mostra, la seva degradació durant el procés d’elaboració del vi i elements inhibidors de la PCR (tanins, polifenols o polisacàrids) presents en els vins són els principals problemes en l’aplicació d’aquesta tècnica. S’han aconseguit resultats més o menys exitosos en vins procedents de varietats negres on el contacte amb la pell durant la maceració permet obtenir majors quantitats de ADN residual del raïm, però no han resultat igual d’efectius les anàlisis de vins blancs, on la probabilitat d’extreure ADN residual és més petita. En vins rosats, l’aplicació d’aquesta tècnica ha estat poc provada.

Basant-nos en un estudi previ (Puig et al, 2007), el present treball ha volgut reafirmar les possibilitats de l’ús d’aquest mètode com a eina per identificar i corroborar l’autenticitat de vins elaborats amb Trepà, amb la finalitat d’autenticar les característiques qualitatives d’una de les poques varietats autòctones de Catalunya, cultivada principalment en una zona específica com és la D.O. Conca de Barberà.

## **MATERIALS I MÈTODES**

### **Mostres**

Es van analitzar 6 vinificacions de Trepà industrials procedents de la Cooperativa Vinícola de Sarrià. Les característiques principals d’elaboració d’aquestes vinificacions, així com el pes de sediment obtingut després de processar 4,5 L de vi per iniciar l’extracció de l’ADN present en la mostra es troben descrits en la Taula 1.

Així mateix, es van processar 4 vins monovarietals de la varietat Trepà procedents de vinificacions a escala experimental realitzades en la bodega de l’INCAVI. Els principals paràmetres d’elaboració i volum analitzat es troben resumits en la Taula 2.

Segons els resultats obtinguts en un estudi previ (Puig et al, 2007), es va considerar analitzar tots els vins una vegada acabada la fermentació alcohòlica i després d’haver transcorregut un temps d’emmagatzematge en dipòsit (una mitjana de 7 mesos tant pels vins industrials com

pels experimentals). Excepte un dels vins industrials en el que s'havia realitzat una clarificació amb bentonita (veure Taula 1), la resta es tractava de vins en rama en els quals s'havien realitzat 1 o 2 trasbalsos (no clarificats, ni estabilitzats, ni filtrats).

**Taula 1. VINS TREPAT INDUSTRIALS. Característiques de les vinificacions.**

MOSTRA	Volum vinificació (HI)	Hores de maceració	Volum processat (L)	Terbolesa (NTU)	Pes sediment (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

(\*) Vi clarificat amb bentonita (25 g/HI).

**Taula 2. VINS TREPAT EXPERIMENTALS. Característiques de les vinificacions.**

MOSTRA	Volum vinificació (L)	Hores de maceració	Volum processat (L)	Terbolesa (NTU)	Pes sediment (g)
EXPERIMENTAL 1	60	12	3,85	92	6,81
EXPERIMENTAL 2	60	12	3,25	> 1000 <sup>(*)</sup>	101,1 <sup>(**)</sup>
EXPERIMENTAL 3	65	12	3,85	795	42,78
EXPERIMENTAL 4	60	12	3,85	207	8,72

(\*) Fora de l'escala de determinació de l'aparell.

(\*\*) En el sediment, molts cristalls de tartrat i pòsits de matèria colorant.

Els resultats de les anàlisis d'aquestes mostres mitjançant marcadors microsatèl·lits es van comparar amb els mateixos anàlisis realitzats a partir de l'ADN extret de fulles joves de varis clons d'aquesta varietat procedents del material de selecció clonal de l'INCAVI.

### Extracció de l'ADN

L'extracció de l'ADN dels vins es va efectuar a partir dels sediments resultants de la centrifugació a 12500xg durant 20 minuts a 4°C del volum detallat a les taules 1 i 2. Per l'aïllament de l'ADN es va utilitzar la metodologia descrita per Siret et al, 2000. Per millorar

l'extracció final es va aplicar una purificació de l'ADN per columnes "Qiaprep® Spin Miniprep" (Qiagen).

L'extracció i purificació de l'ADN a partir de fulles es va realitzar mitjançant el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

### **Caracterització mitjançant microsatèl·lits: amplificació per PCR i anàlisi**

Es van analitzar 20 *loci* de microsatèl·lits nuclears genèticament independents que en la seva major part es localitzen en diferents grups de lligament: VMC1B11 (C1B11), VMC4F3-1 (C4F31) (Vitis Microsatellite Consortium); 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, 2005). Les amplificacions es van portar a terme utilitzant dues PCR múltiples, anomenades MIX A i MIX B, analitzant en cada una un total de 11 i 9 *loci* de microsatèl·lits respectivament (Vargas et al, en premsa). La separació dels fragments amplificats es va realitzar mitjançant electroforesis capilar en un seqüenciador automàtic ABI PRISM® 310 (Applied Biosystems), utilitzant com a patró intern de tamany el marcador GeneScan-500 LIZ™ (Applied Biosystems). El tamany dels fragments amplificats expressats en parells de bases (pb) es van calcular mitjançant el software GeneMapper v. 3.0. a partir de marcadors endògens.

## **RESULTATS I DISCUSSIÓ**

Els 20 microsatèl·lits utilitzats van amplificar correctament les mostres de Trepat analitzades a partir de material vegetal (fulles). Per cada microsatèl·lit analitzat, es van obtenir 1 o 2 pics en l'electroferograma resultant de l'anàlisi amb el software GeneMapper, que es van interpretar com a genotips homozigots o heterozigots respectivament (Figura 1). Pel Trepat, quatre de les regions microsatèl·lit: VMC1B11, VVIB01, VVIN73 i VVMD28 van resultar ser homozigotes. Els 16 microsatèl·lits restants van donar al·lels heterozigots.



Figura 1. Exemple d'electroferogrames obtinguts a l'anàlitzar diferents varietats amb el microsatèl·lit VVIP31 marcat amb el fluorocrom NED. El primer electroferograma mostra una varietat heterozigota (2 al·lels) mentre que el segon i tercer són exemples de varietats homozigotes (1 al·lel) per aquest locus.

En un estudi previ (Puig et al, 2007) amb 6 microsatèl·lits, ampliat posteriorment als 20 utilitzats actualment, es van analitzar les varietats utilitzades en la D.O. Cava per elaborar cava rosat. Els genotips obtinguts en l'estudi (Taula 3) s'han fet servir de referència en aquest treball per comparar els resultats de l'anàlisi dels vins industrials i experimentals de Trepat.

La Taula 4 mostra l'eficiència d'amplificació i els resultats pels 10 vins de Trepat analitzats, comparant-ho amb els obtinguts en la caracterització de la varietat a partir de fulla.

Dos dels vins elaborats a escala industrial: ind. 2 i ind. 4 i dos a escala experimental: exp. 1 i exp. 4, van poder-se identificar amb 19 dels 20 microsatèl·lits. Les mostres exp. 2, ind. 5, ind. 3 i ind.1 van donar resultats positius amb 11, 10, 7 i 3 microsatèl·lits respectivament. Sols dos lots de vi, ind. 6 i exp. 3 no es van poder caracteritzar com a Trepats per manca d'amplificació.

No obstant, inclús en el cas del vi industrial 1 on sols van amplificar 3 dels 20 *loci* analitzats: VVIP31, VVMD27 i VVMD24, les dades aparegudes podrien ajudar a diferenciar la varietat Trepat de la resta de varietats utilitzades en l'elaboració de vi base per cava rosat.

En aquest estudi s'ha vist que no existeix relació entre el pes del sediment de partida per a l'extracció del ADN i l'eficiència d'amplificació (veure taules 1, 2 i 4) . Tot al contrari, tant en el cas dels lots de vi experimentals com en els de vi industrials, els millors resultats, en general, s'han obtingut en les mostres on hi havia menor pes de sediment: s'ha aconseguit una bona extracció i amplificació de l'ADN de restes de material vegetal procedent del raïm en el cas del vi ind. 4 a partir sols de 1,44 g de sediment. El fet de què a més pes de sediment menys probabilitat de determinar la varietat, podria explicar-se per la presència en quantitat de substàncies (matèria colorant, polisacàrids, cristalls de tartrat, etc) que podrien interferir en el protocol d'obtenció de l'ADN d'origen vegetal i posteriorment en la seva amplificació mitjançant PCR. Aquesta hipòtesi també es relaciona amb el valor de terbolesa mesurat en els diferents lots de vi (taules 1 i 2): en general, a menys terbolesa, millors resultats. Existeix, no obstant, l'excepció del lot de vi industrial 6. En aquest cas, es van obtenir resultats nuls pel fet de què aquesta partida de vi havia estat clarificada amb bentonita. L'adició d'aquest clarificant podria haver causat, per acció física, l'absorció de restes de material vegetal i, per tant, la no obtenció de ADN en suficient quantitat i qualitat per poder ser amplificat.

Del grup de 20 microsatèl·lits utilitzats, els més efectius van ser VVIP31 i VVMD24, donant resultats satisfactoris en 8 dels 10 vins analitzats, seguits de VMC4F3-1, VVIN16 i VVIB01 amb resultats positius en 7 dels 10 lots. El menys eficaç en aquestes condicions d'amplificació va ser el VVIV37.

Taula 3. Resultats obtinguts de l'anàlisi amb 20 microsatèl·lits de les varietats autoritzades per elaborar cava rosat.

	C1b11	C1B11	B01	B01	H54	H54	N73	N73	P31	P31	P60	P60	Q52	Q52	M7	M7	S2	S2	M24	M24
<b>TREPAT</b>	184	184	289	289	164	166	261	261	178	188	317	326	83	87	241	247	129	139	210	216
<b>TEMPRANILLO</b>	172	184	289	293	164	166	254	254	179	179	327	327	83	83	237	250	140	142	208	213
<b>GARNATXA NEGRA</b>	188	194	287	289	164	168	254	261	175	183	317	322	81	87	237	241	133	142	210	215
<b>MONASTRELL</b>	172	188	289	289	166	166	261	261	178	190	317	321	ND*	ND	ND	ND	129	148	208	216
<b>PINOT NOIR</b>	166	172	287	287	164	168	261	263	179	179	317	320	83	87	241	250	133	148	213	215
	M25	M25	C4F31	C4F31	N16	N16	V67	V67	M21	M21	M32	M32	M27	M27	M28	M28	M5	M5	V37	V37
<b>TREPAT</b>	238	252	166	172	151	157	355	363	241	247	238	269	179	193	255	255	222	230	158	162
<b>TEMPRANILLO</b>	238	252	178	182	149	151	363	365	247	254	247	249	183	183	255	255	232	232	167	167
<b>GARNATXA NEGRA</b>	238	252	186	204	151	157	355	362	241	247	238	247	194	194	241	241	222	236	157	168
<b>MONASTRELL</b>	238	260	178	178	151	157	355	362	241	248	238	253	179	189	241	255	222	236	162	162
<b>PINOT NOIR</b>	236	246	178	178	149	158	362	370	247	238	269	269	185	189	216	234	224	234	149	159

(\*) ND: no determinat.



Taula 4. Genotips obtinguts en l'anàlisi de vins industrials i experimentals de Trepat.

MOSTRA	C1b11	C1B11	B01	B01	H54	H54	N73	N73	P31	P31	P60	P60	Q52	Q52	M7	M7	S2	S2	M24	M24
<b>TREPAT (fulla)</b>	184	184	289	289	164	166	261	261	178	188	317	326	83	87	241	247	129	139	210	216
<b>VI IND 1</b>	- (*)	-	-	-	-	-	-	-	178	188	-	-	-	-	241	247	-	-	210	216
<b>VI IND 2</b>	184	184	289	289	164	166	261	261	178	188	317	326	83	87	241	247	129	139	210	216
<b>VI IND 3</b>	-	-	289	289	-	-	-	-	178	188	-	-	-	-	241	247	-	-	210	216
<b>VI IND 4</b>	184	184	289	289	164	166	261	261	178	188	317	326	83	87	241	247	129	139	210	216
<b>VI IND 5</b>	-	-	289	289	164	166	-	-	178	188	-	-	-	-	241	247	129	139	210	216
<b>VI IND 6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VI EXP 1</b>	184	184	289	289	164	166	261	261	178	188	317	326	83	87	-	-	129	139	210	216
<b>VI EXP 2</b>	184	184	289	289	164	166	261	261	178	188	-	-	-	-	-	-	129	139	210	216
<b>VI EXP 3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VI EXP 4</b>	184	184	289	289	164	166	261	261	178	188	317	326	83	87	241	247	129	139	210	216
MOSTRA	M25	M25	C4F31	C4F31	N16	N16	V67	V67	M21	M21	M32	M32	M27	M27	M28	M28	M5	M5	V37	V37
<b>TREPAT (fulla)</b>	238	252	166	172	151	157	355	363	241	247	238	269	179	193	255	255	222	230	158	162
<b>VI IND 1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VI IND 2</b>	238	252	166	172	151	157	355	363	241	247	238	269	179	193	255	255	222	230	-	-
<b>VI IND 3</b>	-	-	166	172	151	157	-	-	-	-	-	-	-	-	255	255	-	-	-	-
<b>VI IND 4</b>	238	252	166	172	151	157	355	363	241	247	238	269	179	193	255	255	222	230	-	-
<b>VI IND 5</b>	-	-	166	172	151	157	-	-	-	-	-	-	-	-	255	255	222	230	-	-
<b>VI IND 6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VI EXP 1</b>	238	252	166	172	151	157	355	363	241	247	238	269	179	193	255	255	222	230	158	162
<b>VI EXP 2</b>	238	252	166	172	151	157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	222	230	-	-
<b>VI EXP 3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VI EXP 4</b>	238	252	166	172	151	157	355	363	241	247	238	269	179	193	255	255	222	230	-	-

(\*) No amplifica.

Que alguns microsatèl·lits funcionin millor que altres pot explicar-se pel fet de què la integritat de l'ADN al final del procés de producció d'un vi pot veure's afectada i això pot donar lloc a que determinats microsatèl·lits no amplifiquin correctament (Siret et al, 2000).

## CONCLUSIONS

El present estudi demostra que l'anàlisi mitjançant marcadors microsatèl·lits de restes de ADN vegetal present en els vins abans de ser clarificats permet comprovar l'autenticitat i traçabilitat de la varietat amb la que s'han elaborat. És en aquesta etapa quan molts vins són qualificats per ser acceptats dins una denominació d'origen. Això permet, en el cas de la D.O. Conca de Barberà, poder preservar sense ambigüitats, els vins elaborats amb la seva varietat autòctona: el Trepat.

## AGRAÏMENTS

A la Cooperativa Vitícola de Sarral, i en concret al Miquel Cantó, per haver-nos subministrat per aquest estudi els lots de vi industrial i tota la informació sobre la seva elaboració.

Al Miquel Vázquez per la seva ajuda en el processament de les mostres en el laboratori.

## 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.
- 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.
- García-Beneytez, E., Cabello, F., Revilla, E. (2003). *Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS*. J. Agric. Food Chem., 51:5622.
- 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.
- Puig, A., Domingo, C., Mínguez, S. (2007). *Application of molecular techniques for rosé wine characterization*. XXX Congreso Mundial de la Viña y el Vino. Budapest.
- 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.
- 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 fluorescent 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.
- Sefc, K.M., Lefort F, Grando MS, Scott KD, Steinkellner H (2001). *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*. Roubelakis-Angelakis, K.A. (Ed.) Kluwer Academic Publicaion, Netherlands, p. 433.
- 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.
- 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