

INVESTIGACIONES

COMPARACIÓN DE RAPD Y AFLP COMO MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE VID BASADOS EN EL ESTUDIO DE FRAGMENTOS GENÓMICOS ANÓNIMOS¹

Comparison of RAPD and AFLP as methods for genetic identification on *Vitis* based on the analysis of anonymous genomic sequences

Claudio Narváez R.^{2,3}, Jorge Valenzuela B.³, Carlos Muñoz Sch.³
y Patricio Hinrichsen R.³

ABSTRACT

Until recently grape cultivars were identified based entirely on ampelographic criteria. Currently a number of molecular techniques based on PCR can be applied for exhaustive genetic analysis on plants. These methods proceed through the direct analysis of DNA, in this way avoiding the interference due to environmental interactions. In this paper the application of RAPD and AFLP for the analysis of genetic diversity in a group of more than 50 grape cultivars is presented. Using 18 RAPD primers, 103 information bands were identified, corresponding to 29.9% of polymorphism. In comparison, using only four AFLP primers produced 86 information bands, with a very similar percentage of polymorphism (29.6%). Both methodologies exhibited an adequate degree of reproducibility, evaluated on a collection of 48 Cabernet Sauvignon clones. The dendrograms based on these data sets graphically depicted the ability of both methods to differentiate all the cultivars studied. In the case of Cabernet Sauvignon clones, AFLP permitted the identification of a number of differences that could be related to morphological differences detected among these clones, such as cluster length. The comparison of both methods, principally related to their ability to differentiate cultivars and clones, suggests that AFLP is the more adequate method for both purposes. Nevertheless, both methods could be implemented, given that under controlled conditions appropriate levels of polymorphism and reproducibility are displayed.

Key words: DNA, genome, polymorphism, grapes, *Vitis vinifera* L., *Vitis labrusca*.

INTRODUCCIÓN

Chile es uno de los principales exportadores de uva de mesa del hemisferio sur. Además, la producción y exportación de vinos varietales, tanto de las grandes viñas tradicionales como en las

denominadas “viñas boutique”, ha tenido un aumento sostenido en los últimos años. La conservación y ampliación de estos mercados, así como el de la producción de plantas de vivero, dependerá fundamentalmente de la calidad del producto ofrecido. Un aspecto significativo en este sentido es la capacidad de certificación de origen de los vinos, así como la certificación genética y fitosanitaria de las plantas.

Tradicionalmente, los métodos para identificar genotipos, así como para estimar las relaciones filogenéticas existentes entre ellos, se han

¹Recepción de originales: 05 de mayo de 1999.

²Parte del trabajo de tesis para optar al título de Bioquímico de la Universidad de Chile.

³Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439-3, Santiago, Chile. E-mail: phinrich@platina.inia.cl

basado en el estudio de características morfológicas. En viticultura esta metodología se denomina ampelografía, la que recurre a la observación directa de la planta, sus estructuras y órganos visibles (forma, tamaño y color de planta, hojas y racimos, etc.) y características agronómicas relevantes (Galet, 1979). Sin embargo, estas características pueden ser alteradas por enfermedades, variar en función de la etapa del crecimiento o el ambiente agroclimático. Más aún, estas evaluaciones son subjetivas y están condicionadas al criterio y experiencia individual de cada ampelógrafo.

Esto ha llevado a que en numerosas ocasiones existan genotipos mal indexados, especialmente cuando se trata de cultivares que presentan fenotipos muy similares. Por otra parte, la identidad genética de un cultivar puede modificarse debido a mutaciones somáticas perpetuadas durante su reproducción vegetativa (Vignani *et al.*, 1996), y aunque conserven el nombre original, pueden presentar diferencias tanto fenotípicas como genotípicas (sinonimia). También la sinonimia se aplica a cultivares que aunque genéticamente diferentes, se han manejado como si fueran un único tipo. Alternativamente, la dispersión geográfica de un mismo genotipo o cultivar suele conllevar su redenominación, es decir, varios nombres para un mismo genotipo (homonimia) (Vignani *et al.*, 1996; Cervera *et al.*, 1998).

Los marcadores moleculares superan estas complicaciones, pues con ellos se reconoce directamente las diferencias genéticas entre individuos, obteniéndose un “perfil molecular” o “fingerprinting” característico para cada variedad e independiente de las condiciones de crecimiento de las plantas (Morell *et al.*, 1995). Además, permiten obtener mejores estimaciones de la diversidad genética de una población determinada (Johns *et al.*, 1997), así como información sobre frecuencias alélicas, nivel de heterociguidad de una población y subdivisión de poblaciones, entre otras, en un período de tiempo menor al ocupado mediante estrategias convencionales (Waugh y Powell, 1992).

Para esto, un marcador molecular debe reunir ciertas características tales como: alto grado de polimorfismo, herencia codominante, distribución frecuente y uniforme en todo el genoma, facilidad de estudio, rapidez en los resultados, y costo de desarrollo bajo o proporcional a la cantidad de información reunida. Además, debe poseer un nivel de reproducibilidad adecuado para comparar resultados entre distintos laboratorios. Desafortunadamente, no existe un único marcador que cumpla con estas características, por lo cual es necesario probar diferentes técnicas para aprovechar sus características específicas.

En el contexto del “fingerprinting” de cultivares, la primera metodología molecular aplicada a plantas fue el análisis de polimorfismos en el largo de fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) (Helentjaris *et al.*, 1985). En vides, el RFLP se aplicó por primera vez usando sondas heterólogas de minisatélites (Striem *et al.*, 1990). Bowers *et al.* (1993) desarrollaron un “fingerprinting” de las variedades para vino cultivados en California, EE.UU., probando cinco sondas, pero que revelaban un número reducido de formas alélicas cada una. Por otra parte, Bourquin *et al.* (1993) identificaron 111 alelos diferentes usando una combinación de dos enzimas de restricción y 38 sondas. Los resultados de este trabajo agruparon a los cultivares franceses estudiados de forma similar a lo determinado por ampelografía.

RFLP, sin embargo, corresponde a una metodología técnicamente compleja y de alto costo, por lo que se han desarrollado nuevos métodos basados en la amplificación de secuencias genómicas mediante una reacción de amplificación en cadena (PCR, Polymerase Chain Reaction). Con esta aproximación, se realiza un análisis con una pequeña cantidad de ADN y con protocolos comparativamente sencillos, de los cuales existen numerosas variantes descritas en forma genérica por Staub *et al.* (1996). En este trabajo se usaron dos de estos métodos: la

amplificación de fragmentos usando partidores de diseño aleatorio (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990) y la amplificación de fragmentos genómicos digeridos por enzimas de restricción (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995). Estas metodologías también son conocidas como marcadores “masivos”, ya que permiten generar una gran cantidad de información en breve plazo, sin requerir del conocimiento previo de las secuencias genómicas amplificadas. Ambos recurren al uso de partidores de diseño aleatorio, de manera que reconocen secuencias “anónimas”, dispersas a lo largo de todo el genoma.

El método de RAPD ha sido descrito en detalle por numerosos autores (Williams *et al.*, 1990; Hinrichsen *et al.*, 1996). RAPD difiere de otros métodos de análisis por PCR en que se usa un único partidor de pequeño tamaño (10 mer) y se hace el apareamiento del PCR a bajas temperaturas. Las ventajas del método son su simplicidad y bajo costo, aunque tiene el inconveniente de ser un marcador de tipo dominante, es decir, no es posible discernir sobre la heterocigocidad de los *loci* observados. Además, la reacción es muy sensible a las condiciones de amplificación y a la calidad y concentración del ADN, las cuales influirían en la reproducibilidad del método. En cambio, el análisis por AFLP (Vos *et al.*, 1995), que es esencialmente la combinación de una digestión con enzimas de restricción y de amplificación por PCR, presenta un grado de reproducibilidad mucho mayor. AFLP, por su parte, también es un marcador de tipo dominante y su nivel de complejidad técnica es más alto que RAPD, lo que representa una desventaja. De esta manera, en cada especie o grupo de especies en estudio, es necesario hacer un análisis comparativo antes de decidir qué metodología usar para resolver un determinado problema de análisis genético.

En vides existen numerosos ejemplos de aplicación de RAPD, tanto para diferenciar cultivares como para mapeo genético (Ye *et al.*, 1993;

Weeden *et al.*, 1994; Lodhi *et al.*, 1995). Aunque algunos autores han mostrado reservas respecto de la utilidad de RAPD para realizar estudios genéticos en vides, básicamente por su escasa reproducibilidad (Büscher *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1995), existen antecedentes que sugieren que esta metodología podría usarse para este fin (Collins y Symons, 1993; Gogorcena *et al.*, 1993; Jean-Jaques *et al.*, 1993; Qu *et al.*, 1996; Stavrakakis *et al.*, 1997; This *et al.*, 1997). Además, estudios recientes han demostrado un alto nivel de reproducibilidad (Vidal *et al.*, 1998). RAPD también ha sido usado para identificar progenitores, como en el caso del cultivar Müller-Thurgau, uno de los más cultivados en Europa central (Büscher *et al.*, 1994).

También ha sido aplicado para diferenciar cultivares genéticamente muy relacionados, como Sultanina vs. Sultanina Seedless, uno derivado del otro por una mutación (Bakalinsky *et al.*, 1993; Striem *et al.*, 1994), o un grupo de 14 cultivares de tipo Moscatel (Stavrakakis y Biniari, 1998). Con AFLP, una técnica de desarrollo más reciente, los estudios en vid son escasos, aunque ya se ha publicado un estudio que demuestra su potencial para diferenciar clones de determinados cultivares (Cervera *et al.*, 1998). Así también, Sensi *et al.* (1996) compararon los resultados obtenidos con AFLP y otra técnica de análisis genómico, encontrando buena correlación.

El propósito de este trabajo fue comparar el comportamiento de estas dos metodologías, RAPD y AFLP, considerando aspectos como la facilidad para detectar polimorfismos en esta especie y la capacidad de diferenciar cultivares, y clones de un mismo cultivar. Cabe recordar que en las bases de datos de la vid existen entre 5.000 y 8.000 entradas, de las cuales muchas serían homonimias (Alleweldt, 1988). Además, se han establecido las relaciones genéticas (similitud o distancia genética) entre un número de cultivares de un jardín de variedades, muchos de ellos posibles progenitores a usarse en un programa de mejora genética. De este modo, en un esquema concebido a más largo plazo, estos

marcadores podrán ser usados para asistir el proceso de selección de segregantes analizando directamente su ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Variedades analizadas

Se usaron 57 cultivares de vid (55 *Vitis vinifera* L. y 2 híbridos interespecíficos) que son parte de una colección de genotipos (jardín de variedades) mantenidos en el Centro Regional de Investigación La Platina de INIA. En el Cuadro 1 aparecen ordenados de acuerdo a su uso e indicando qué tipo de análisis se hizo en cada caso. Además, se analizó una colección de 48 clones de Cabernet Sauvignon seleccionados por tener diferente largo de racimo (Muñoz *et al.*, 1985). Las hojas se almacenaron a -80°C hasta que se extrajo el ADN. Para este propósito, se ha determinado que el mejor tejido de esta especie leñosa son hojas recién brotadas de plantas en activa proliferación después de la dormancia invernal.

Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se basaron en el método descrito por Lodhi *et al.* (1994) con algunas modificaciones desarrolladas en el laboratorio. Las muestras de ADN concentrado se centrifugaron para eliminar un sedimento de formación espontánea y luego se determinó la concentración de ADN en un fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer Pharmacia Biotech) usando el reactivo Hoechst 33258 como tinción específica del ADN (compuesto que emite a 480 nm).

Partidores de PCR y adaptadores

Los partidores de RAPD fueron adquiridos en Operon Technologies, Inc. (Alameda, California, EE.UU.), excepto algunos obtenidos de Wako Corp. (Osaka, Japón). La síntesis de los partidores y adaptadores de AFLP se encargó a IDT (Coralville, Iowa, EE.UU.).

Reacción de RAPD

La mezcla de reacción del PCR contenía entre 5 y 10 ng de DNA, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM MgCl₂, 0,4 μM de partidor de Operon Technologies, tampón de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl y 0,01% de gelatina) y 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Gibco-BRL, EE.UU.), en un volumen total de 12,5 μL. Se usó un termociclador Perkin-Elmer con el siguiente programa de amplificación: a) tres ciclos de: desnaturación a 95°C por 1 min; alineamiento a 37°C por 1 min; extensión a 72°C por 80 s; b) 37 ciclos de: denaturación a 94°C por 35 s; alineamiento a 40°C por 40 s; extensión a 72°C por 80 s; c) elongación por 7 min a 72°C. La separación de los fragmentos de ADN amplificados y su registro fotográfico se hizo como lo describió Hinrichsen *et al.* (2000).

Reacción de AFLP

El protocolo de AFLP se desarrolló como fue descrito originalmente (Vos *et al.*, 1995), con algunas modificaciones descritas en Protocolos del CIAT (González *et al.*, 1995). Se digirieron 250 ng de ADN con 2,5 U de *Eco*RI y de *Mse*I, en tampón NEB#2 (New England Biolabs, NEB, Hartford, Connecticut, EE.UU.). Para la ligación de los adaptadores, se usaron 2,5 pmol de adaptador *Eco*RI, 25 pmoles de adaptador *Mse*I y 100 U de T4 ADN ligasa en tampón de T4 ADN ligasa (NEB). Las mezclas de digestión y ligación se combinaron e incubaron toda la noche en un termociclador con un programa de temperaturas de 30 s a 10°C y 30 s a 30°C (Lund *et al.*, 1996). Esta mezcla se diluyó 10 veces para la reacción de PCR+1, la que se realizó en un volumen de 25 μL y contenía 1,5 ng μL⁻¹ de los partidores PM1 y PE1, 0,8 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂ y 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa en buffer de PCR 1X. Se usó el siguiente programa de temperaturas: a) desnaturación a 94°C por 3 min; b) 35 ciclos de 94°C por 3 min, 55°C por 30 s y 72°C por 60 s; y c) elongación a 72°C por 7 min. Para la amplificación selectiva (PCR+3), el producto del PCR+1 se diluyó 20

Cuadro 1. Variedades de vid analizadas

Table 1. *Vitis* cultivars considered in this study

Muestra Nº	Identificación	Variedad	Tipo de vid*	RAPD	AFLP	Concentración ADN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	PC-57	Pinot Chardonnay	VB	+	+	190
2	PC-35	Pinot Chardonnay	VB	+	+	120
3	G-36	Gewürztraminer	VB	+	+	380
4	G-59	Gewürztraminer	VB	+	+	147
5	WR-31	White Riesling	VB	+	+	70
6	WR-40	White Riesling	VB	+	+	185
7	Ch-16	Chasselas Musqué Vrai	VB	+	+	318
8	To-62	Torontel	VB	+	+	92
9	S-34	Sauvignon	VB	+	+	201
10	SB-55	Sauvignon Blanc	VB	+	+	235
11	SB-12	Sauvignon Blanc	VB	+	+	457
12	SG-48	Sauvignon Gris	VB	+	+	81
13	Sau-8M95	Sauvignonasse	VB	+	+	224
14	Se-14	Semillón	VB	+	+	199
15	CS-61	Cabernet Sauvignon	VT	+	+	154
16	CS-66	Cabernet Sauvignon	VT	+	+	ND
17	CS-65	Cabernet Sauvignon	VT	+	+	44
18	PN-18	Pinot Noir	VT	+	+	424
19	PN-45	Pinot Noir	VT	+	+	123
20	C-13	Carmenère	VT	+	+	249
21	Z-15	Zinfandel	VT	+	+	377
22	PB-17	Portugais Bleu	VT	+	+	435
23	RC-42	Ruby Cabernet	VT	+	+	95
24	A-19	Aurora	VT	+	+	201
25	Si-20	Silvaner	VT	+	+	38
26	V-21	Verdot	VT	+	+	111
27	SV-28	Sabat Vongie	VT	+	+	149
28	PS-22	Petite Siraz	VT	+	+	144
29	BS-5	Black Seedless	MN	+	+	266
30	R-9	Ribier	MN	+	+	410
31	E-10	Emperor	MN	+	+	531
32	B-29	Beauty	MN	+	+	66
33	Ex-32	Exótica	MN	+	+	62
34	SF-54	San Francisco	MN	+	+	70
35	MN-51	Moscatel Negra	MN	+	+	123
36	Pe-23	Perlón	MN	+	+	243
37	RS-4	Red Seedless	MR	+	+	214
38	BR-49	Big Red	MR	+	+	100
39	Bl-53	Blush	MR	+	+	170
40	RS-50	Ruby Seedless	MR	+	+	267
41	RS-11	Ruby Seedless	MR	+	+	270
42	Q-41	Queen	MR	+	+	93
43	F-44	Flora	MR	+	+	272
44	MR-37	Moscatel Rosada	MR	+	+	31
45	TS-47	Thompson Seedless	MB	+	+	266
46	TS-64	Thompson Seedless	MB	+	+	99
47	P-60	Perlette	MB	+	+	119
48	Su-26	Superior	MB	+	+	143
49	Pi-52	Pizutello	MB	+	+	159
50	IP-30	Italia Pirovano	MB	+	+	231
51	Cal-39	Calmería	MB	+	+	127
52	Ce-43	Centenial	MB	+	+	285
53	Pa-24	Patagonia	MB	+	+	115
54	25	N.N.	NN	+	+	84
55	K-38	Kaiji	<i>V. vinifera</i>	+	+	189
56	Pl-33	Plima	<i>Híbrido</i>	+	+	409
57	FF-27	Fue Fuji	<i>Híbrido</i>	+	+	60

*VB: Vino blanco; VT: Vino tinto; MN: Mesa negra; MR: Mesa roja; MB: Mesa blanca; NN: genotipo identidad desconocida.

veces, usándose una alícuota de 5 μL que se mezcló con 5 ng del partidor *EcoRI*+3 (excepto cuando se realizó tinción de plata, 30 ng de éste) y 30 ng del partidor *MseI*+3, además de dNTPs 0,8 mM, MgCl_2 2 mM, tampón de PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, 0,01% de gelatina) y 0,5 U de *Taq* polimerasa, en 20 μL de volumen final. El partidor *EcoRI*+3 se marcó en el extremo 5' con γ - ^{33}P -ATP (3000 Cimmol $^{-1}$, 10 mCi mL $^{-1}$, de Amersham, Reino Unido) usando 0,4 U de T4-polinucleótido quinasa (Promega, Madison Wisconsin, EE.UU.). La reacción se incubó a 37°C por 2 h y luego se calentó a 70°C por 10 min para inactivar la enzima. Para la reacción de PCR, el perfil térmico fue el siguiente: a) desnaturación por 3 min a 92°C; b) 1 ciclo de 92°C por 30 s, 65°C por 30 s y 72°C por 1 min; c) los siguientes 11 ciclos se baja en cada uno 0,7 grados durante el alineamiento, hasta llegar a 56°C (efecto "touchdown"); d) 23 ciclos a 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 60 s; y e) elongación por 7 min a 72°C.

Separación electroforética de los productos de la reacción de AFLP

Los productos del PCR+3 se separaron en un gel del tipo de secuenciación de poliacrilamida (PAA) al 6% y 7,5 M de urea, preparado en TBE 1X. Uno de los vidrios se trató con RepelSilane EC (Pharmacia Biotech), lo que facilita separar el gel del vidrio después de la corrida electroforética. Paralelamente, el otro vidrio fue tratado con BindSilane (Promega), reactivo que favorece la unión del gel sobre el vidrio y permite realizar la tinción de plata sobre éste. La electroforesis se corrió en TBE 1X. Los productos de PCR+3 se diluyeron a la mitad con tampón de carga (95% de formamida, 1 mg mL $^{-1}$ de xilen cianol, 1 mg mL $^{-1}$ de azul de bromofenol y 10 mM EDTA) y se calentaron durante 3 min a 95°C. Se colocaron en hielo inmediatamente, y se mantuvieron a 4°C hasta que se cargaron en el gel. El gel se pre-corrió por 25 min antes de cargar las muestras. La corrida se realizó a 70-80 W (temperatura óptima de 50°C) por 2,5 a 3

h o hasta 5 cm antes de caer el xilen cianol desde el gel. Cuando se usó marcación con ^{33}P , el gel se transfirió a un papel filtro Whatman 3MM, se cubrió con celofán tipo AlusaplasTM y se secó a 65°C por 1 h al vacío. Se expuso sobre una placa autorradiográfica Kodak X-Omat AR en un cassette de exposición por 2 a 4 días, dependiendo de la actividad del radioisótopo. Para la tinción de plata, se siguió el protocolo descrito por Bowers *et al.* (1996).

Análisis estadístico

Los polimorfismos detectados fueron escrutados como presencia (1) o ausencia (0) de una banda. Con estos datos se prepararon matrices binomiales, las que fueron usadas para calcular valores de similitud genética entre cada par de genotipos usando el coeficiente de Jaccard, incluido en el paquete estadístico NTSYS-pc versión 2.00 (Applied Biostatistics Inc., Setauket, Nueva York, EE.UU.). Este coeficiente asigna un mayor peso estadístico a las bandas presentes, lo que es deseable en marcadores de tipo dominante como RAPD y AFLP (Powell *et al.*, 1996; Johns *et al.*, 1997). Los dendrogramas fueron preparados aplicando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages) (Rohlf, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para enfrentar el problema de la identificación genética de los numerosos cultivares de vid descritos (Alleweldt, 1988), se ha recurrido en los últimos años al uso de distintos marcadores moleculares. Las metodologías que se usaron en este trabajo (RAPD y AFLP) identifican diferencias entre dos o más genotipos que corresponden en última instancia a cambios en la secuencia del ADN. Estas diferencias se manifiestan como la presencia o ausencia de una determinada banda de ADN, dado por la posibilidad de unión de un partidor al templado de ADN genómico de la vid. Cada una de estas técnicas presenta ciertas ventajas y desventajas comparativas que se evalúan y discuten más adelante.

Análisis mediante RAPD

Dado que RAPD es muy sensible a las condiciones de la reacción, se determinó la concentración óptima de ADN a usar en los análisis. Se ensayó entre 0,3 y 30 ng de ADN por reacción, encontrándose que entre 1,0 y 10 ng los patrones fueron perfectamente reproducibles. Sobre 30 ng por reacción, se perdió la regularidad en los patrones de amplificación; bajo 1 ng la intensidad de las bandas fue muy débil. De esta manera, se hizo todo el estudio usando 5 ng de ADN en cada reacción. Otras condiciones, como la concentración de $MgCl_2$ y otras sales en el buffer, cantidad de enzima, temperatura de alineamiento, etc., fueron las estándares que han sido usadas en otras especies en nuestro laboratorio (e.g., Sagredo *et al.*, 1998). Cabe destacar que es importante optimizar las condiciones de la reacción para evitar que las diferencias en los patrones de bandas se deba a problemas de la reacción, en lugar de reflejar diferencias genéticas.

El análisis de RAPD requiere de una selección de aquellos partidores que entreguen la mayor información posible en la especie o género que se estudie, en este caso, el género *Vitis*. Para ello se usaron tres cultivares diferentes y se ensayaron 80 partidores comerciales, correspondientes a las series OPA, OPB, OPI y OPF, de los cuales fueron elegidos 18 en base a que presentaban un patrón de varias bandas en un amplio rango de tamaño (200 a 3.000 bp) y de fácil lectura (Cuadro 2). Esta lista de partidores en ningún caso es definitiva, ya que *a posteriori* se demostró la alta heterocigocidad en esta especie. Esto significa que potencialmente muchos de los 80 partidores podría identificar alguna diferencia en el grupo de 48 cultivares.

Un ejemplo de las reacciones de RAPD se muestra en la Figura 1, correspondiente al análisis con el partidador OPB-04; destacan en la figura 8 bandas polimórficas de un total de ± 26 amplificadas. Sobre un total de 344 bandas amplificadas por los 18 partidores seleccionados, 103 fueron polimórficas, es decir, RAPD reveló un 29,9% de poli-

morfismo entre los cultivares analizados, lo que es muy alto comparado a otras especies.

La reproducibilidad de los patrones de amplificación de RAPD se verificó en un estudio adicional. Para ello, se analizaron 48 clones de Cabernet Sauvignon, correspondientes a plantas individuales provenientes de Talca, Cauquenes y dos grupos del valle de Santiago (colección de clones mantenido en INIA, Centro Regional de Investigación La Platina); originalmente estos clones fueron seleccionados por tener diferente longitud del racimo (Muñoz *et al.*, 1985). Este estudio, realizado con siete partidores informativos en vides, indicó que los patrones de RAPD tienen una adecuada reproducibilidad para una misma variedad, aun cuando se usen diferentes extracciones de ADN (Figura 2). Además, el patrón genético de cualquier clon analizado es representativo del conjunto de individuos de la misma variedad, existiendo sólo variaciones menores que probablemente corresponden a mutaciones somaclonales, ya que las plantas de vid son propagadas vegetativamente.

Excepcionalmente, se encontraron partidores que mostraron algunas diferencias entre los clones analizados, como E-41 (Figura 2). En este caso, los fragmentos polimórficos podrían corresponder a (i) el *locus* genético correspondiente al gene o genes responsables de las diferencias observadas entre los clones de Cabernet, lo que es poco probable dado que no hay una correlación entre largo de racimo y un determinado alelo, o más bien (ii) secuencias hipervariables (como mini- o microsátélites) que darían cuenta de bandas de tamaño variable. Si las diferencias encontradas a nivel genético están o no relacionadas con las diferencias morfológicas identificadas originalmente en los clones de Cabernet Sauvignon (largo de racimo), es materia de un estudio posterior, que comenzaría con la caracterización de los fragmentos de tamaño variable, amplificados en forma reproducible.

Las bandas polimórficas de RAPD permitieron diferenciar todos los cultivares estudiados, lo que se verificó haciendo un dendrograma (Figura 3).

Cuadro 2. Partidores de RAPD seleccionados, N° de bandas totales amplificadas y N° y fracción de bandas polimórficas**Table 2. Selected RAPD primers, total number of bands and number and fraction of polymorphic ones**

Partidor	Secuencia nucleotídica (5'-3')	N° de bandas totales	Bandas polimórficas	
			N°	Fracción
OPA-13	CAGCACCCAC	19	6	0,316
OPB-04	GGA CTGGAGT	26	8	0,301
OPB-07	GGTGACGCAG	21	5	0,238
OPB-12	CCTTGACGCA	21	5	0,238
OPB-17	AGGGAACGAG	20	5	0,25
OPF-04	GGTGATCAGG	21	10	0,476
OPF-06	GGGAATTCGG	12	5	0,417
OPF-08	GGGATATCGG	12	4	0,333
OPF-09	CCAAGCTTCC	19	5	0,263
OPF-12	ACGGTACCAG	10	5	0,5
OPF-18	TTCCCGGGTT	13	2	0,154
OPF-14	TGCTGCAGGT	19	4	0,21
OPI-04	CCGCCTAGTC	14	6	0,423
OPI-07	CAGCGACAAG	29	7	0,241
OPI-10	ACAACGCGAG	28	10	0,357
OPI-13	CTGGGGCTGA	17	4	0,235
OPI-14	TGACGGCGGT	22	5	0,227
OPI-20	AAAGTGCGGG	21	7	0,333
Total		344	103	
Promedio bandas		19,1	5,7	
Polimorfismo (%)				29,9

Esta representación gráfica permite estimar las relaciones genéticas entre los genotipos, los que formaron grupos escasamente relacionados entre sí, con un porcentaje de similitud entre 28 y 90%. En los agrupamientos obtenidos se observó que algunas variedades genéticamente cercanas, como Sauvignon Gris y Sauvignon Blanc, quedaron asociadas directamente, con un índice de similitud superior al 95%. Este resultado tiene sentido, dado que se sabe que estos dos cultivares se diferencian sólo en los genes que participan en la síntesis de antocianinas. Una situación diferente sucedió con dos muestras de Pinot Chardonnay (PC-57 y PC-46) que mostraron un nivel de similitud de sólo 57,4%, quedando además en grupos genéticos

diferentes. Esto demuestra que se trataría de material indexado incorrectamente, es decir, uno de los dos genotipos (o ambos) no correspondería al cultivar (verificado posteriormente mediante polimorfismo de los respectivos alelos de microsatélites; manuscrito en preparación).

El porcentaje de similitud más alto encontrado en este análisis de RAPD (aparte de los clones de Cabernet Sauvignon, no incluidos en el dendrograma) fue entre PC-57 y un clon de Gewürztraminer (G-36) con 90,2%, rango considerado propio de diferencias entre clones de una misma variedad (Cervera *et al.*, 1998). Los cultivares Patagonia (Pa-24) y Perlette (Per-23) presen-

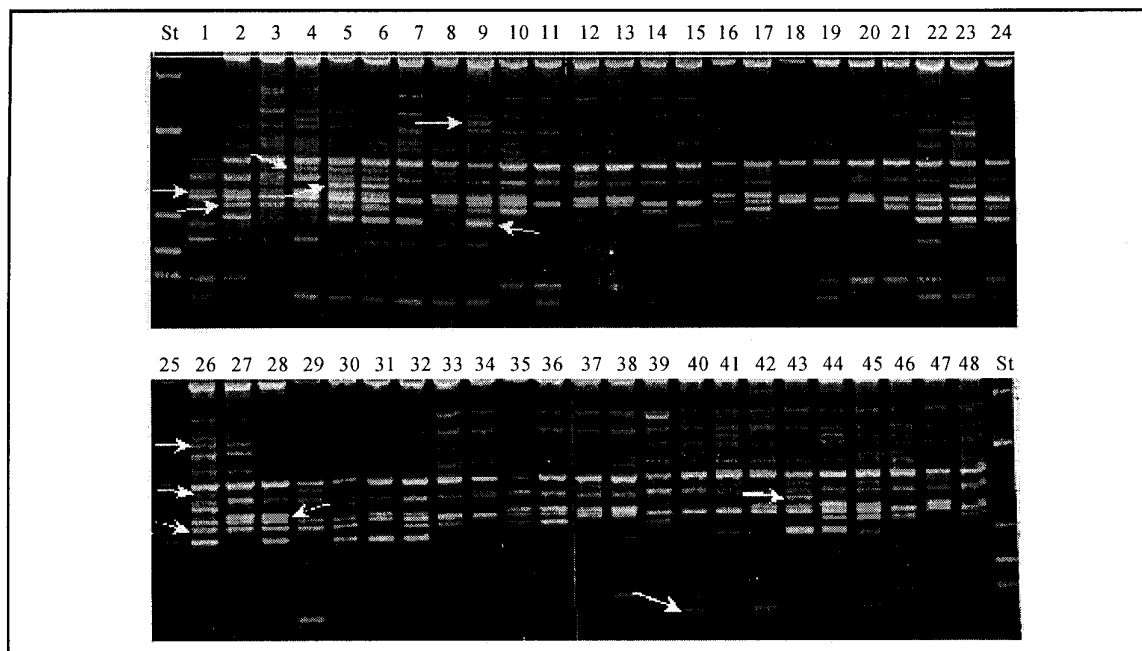


Figura 1. Patrones electroforéticos de genotipos de vid analizados por RAPD con el partidor OPB-04. Las flechas indican las bandas polimórficas.

Figure 1. Electrophoretic patterns of *Vitis* genotypes analyzed by RAPD using OPB-04 primer. Arrows indicate polymorphic bands.

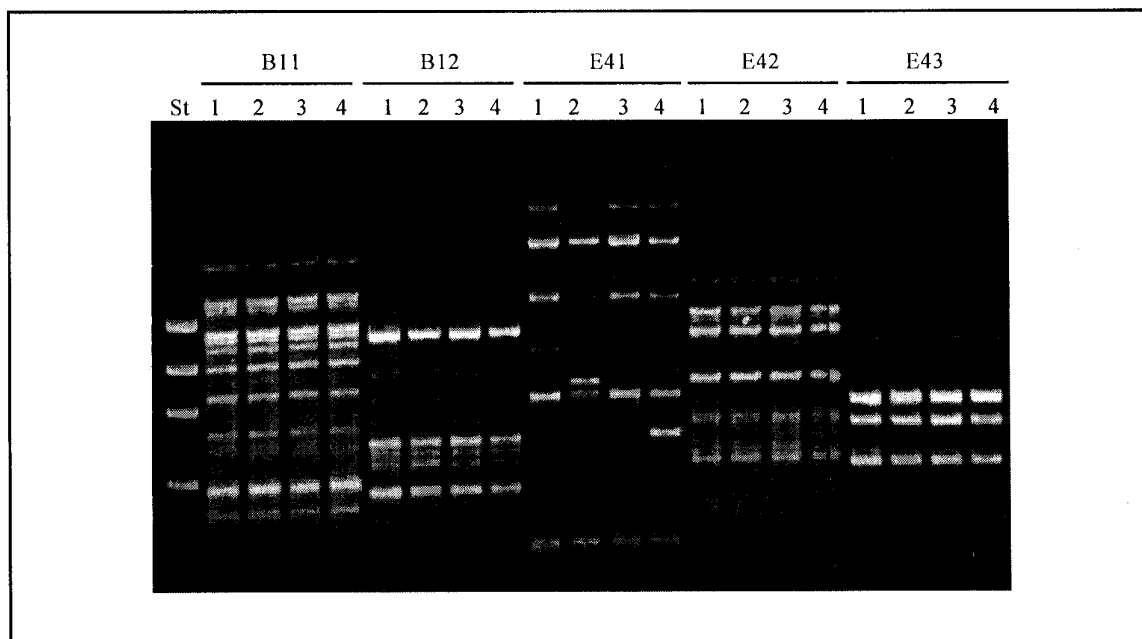


Figura 2. Reproducibilidad de RAPD revelada por la homogeneidad genética de clones de Cabernet Sauvignon. Se muestran los resultados con cinco partidores de RAPD diferentes sobre cuatro genotipos.

Figure 2. RAPD reproducibility revealed by the genetic homogeneity of Cabernet Sauvignon clones. Results for five RAPD primers over a total of four genotypes are shown.

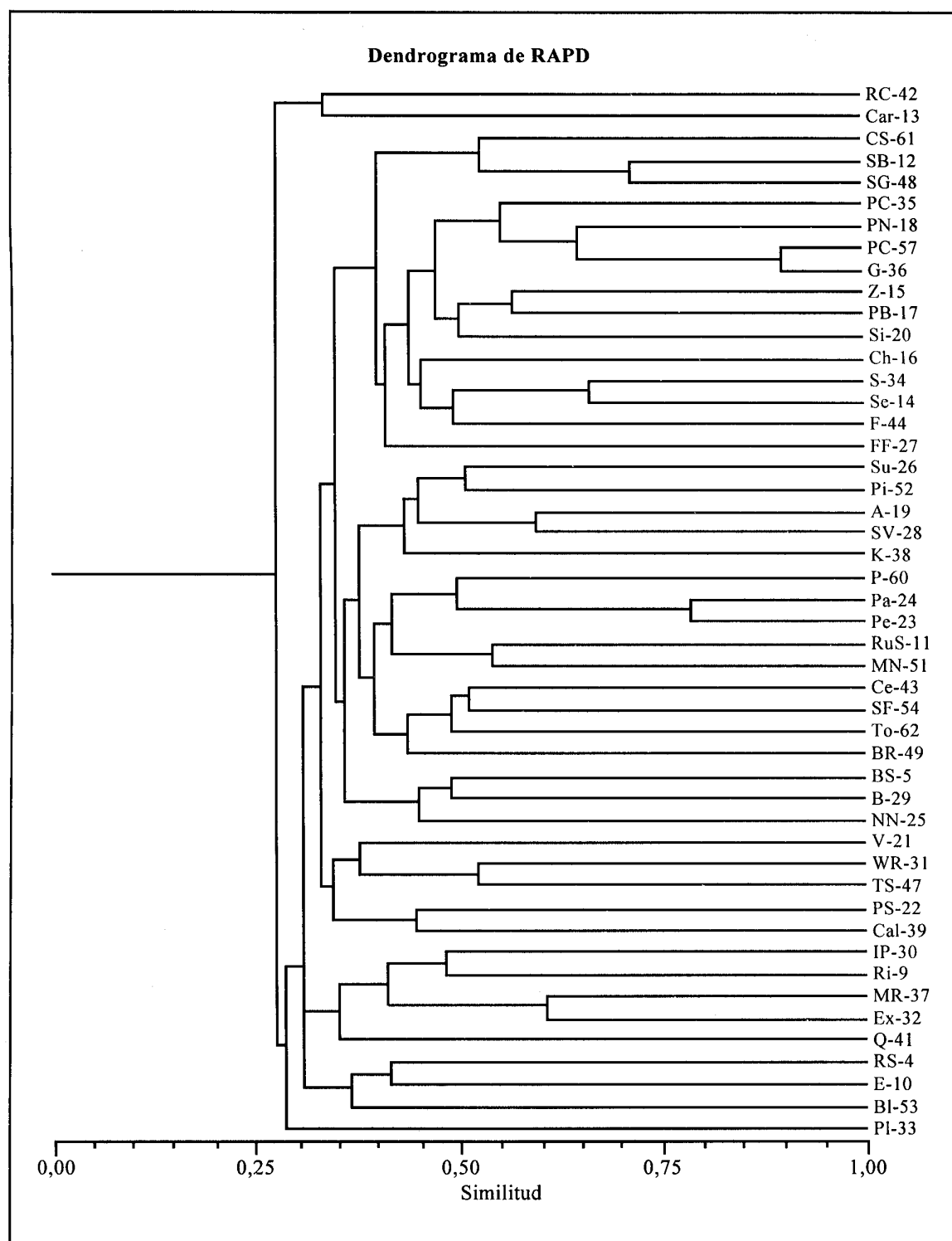


Figura 3. Dendrograma basado en polimorfismos de RAPD que ilustra la similitud genética entre los cultivares analizados.
Figure 3. Dendrogram based on RAPD data showing the genetic similarity among the cultivars considered in this study.

taron también un coeficiente de similitud alto (78,8%), lo que indica una alta similitud genética entre ellos.

De los tres cultivares japoneses incluidos en este estudio, Plima (Pl-33) fue el más divergente (Figura 3), mientras que Kaiji (K-38) y Fue Fuiki (FF-27) se incluyeron en el gran grupo constituido por todos los demás cultivares de *V. vinifera*. Esto coincide con sus pedigríes, ya que Kaiji –uva de mesa– es 100% *V. vinifera* (Flame Tokay x Neo Muscat), mientras que Fue Fuiki –cepa de vino– tiene tres de cuatro ancestros de esta especie y sólo uno, Creveling, es *V. labrusca*; sus ancestros son (Mills [Muscat Hamburg x Creveling] x Angelo Pirovano [Chasselas Rose x M. Hamburg]). Plima, en cambio, fue obtenida por el cruzamiento de Steuben x Himrod, dos cultivares pertenecientes al complejo *Vitis labruscana* (híbridos de *V. vinifera*, *V. labrusca* y otras especies americanas) (Akihiko Sato, National Institute of Fruit Trees Science (NIFTS), Akitsu, Japón, comunicación personal). Este resultado es destacable, dado que se verifica una correspondencia entre la genealogía y la información que entrega el análisis molecular.

Análisis mediante AFLP

Los productos de una reacción de AFLP en la que se usó la combinación PE 1C/PM 1D se presentan en la Figura 4. La calidad del ADN usado en esta serie de reacciones de AFLP fue apropiada, observándose un patrón general de bandas amplificadas comparable entre cultivares. Este aspecto es relevante si se considera que se deben cumplir exitosamente varias etapas (digestión, ligación, amplificaciones), las que podrían verse afectadas por la presencia de compuestos fenólicos propios de especies leñosas como la vid (Pandey *et al.*, 1996). En forma reiterada, algunas muestras no presentaron productos de amplificación. Estas muestras no fueron incluidas en los análisis posteriores. El uso de cuatro combinaciones de partidores *EcoRI* y *MseI* generó 86 bandas polimórficas,

que representan aproximadamente un 30% de los fragmentos amplificados (Cuadro 3), porcentaje muy similar al determinado para RAPD. Para AFLP, de manera similar que para RAPD, es necesario determinar las condiciones óptimas para cada especie, incluida la selección de partidores más informativos. De esta manera, este 30% de informatividad del método podría ser bastante mayor si se seleccionaran partidores como PE1A/PM1C, que por sí solo reportó 32 polimorfismos (53%).

Los productos de AFLP fueron visualizados por marcación radiactiva del partidor con γ -³³P. También se probó la tinción con plata, sin embargo, el contenido de información se reduce por la menor sensibilidad del método. Por ejemplo, usando la misma combinación de partidores (PE1A/PM1C, ver Cuadro 3), la tinción de plata reveló 22 bandas, de las cuales sólo 8 fueron polimórficas (36%); por el contrario, la marcación con γ -³³P reveló 60 bandas totales, 32 de ellas informativas (más del 50%). Esto pudiera ser de importancia en el estudio de clones de una variedad, en donde las diferencias entre genotipos son usualmente de difícil detección. Este resultado no es concluyente, pues otros autores no han encontrado diferencias en términos de la eficiencia de la identificación de bandas (Chalhoub *et al.*, 1997) comparando el uso de isótopos radiactivos con tinción argéntica.

Cervera *et al.* (1998) han demostrado recientemente que en AFLP es posible enriquecer patrones de bandeo mediante la combinación de dos partidores *EcoRI* en una misma reacción, obteniéndose la suma de ambos. Este resultado se ha reproducido bajo nuestras condiciones, combinando los partidores PE1C y PE1I con PM1B (Figura 5). En general, se verificó la sumatoria de ambos patrones, correspondientes a las reacciones por separado, aunque en algunos casos se observó la pérdida de polimorfismos, probablemente por comigración de bandas informativas de un patrón con bandas no discriminatorias del otro.

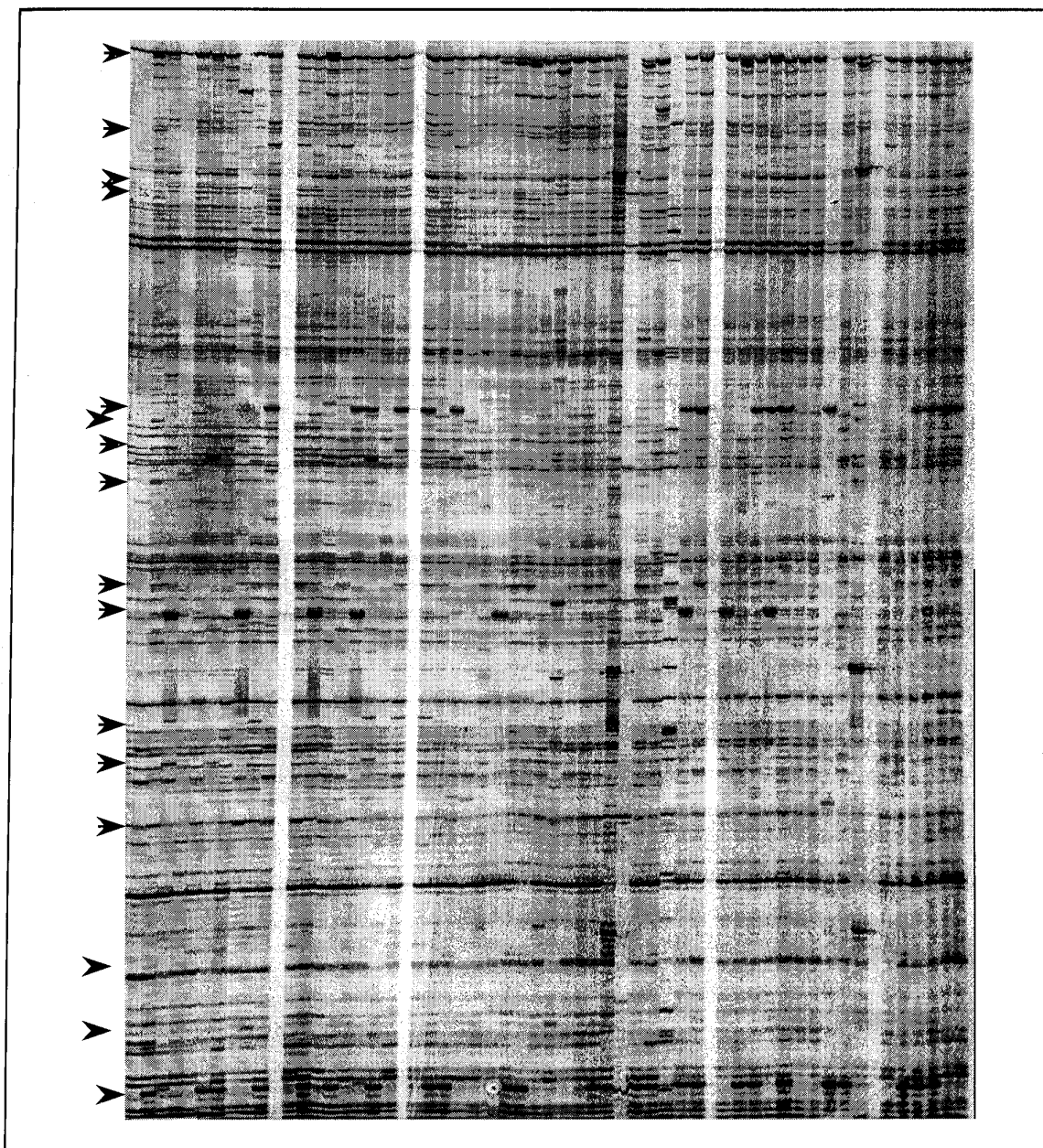


Figura 4. Patrones de AFLP de cultivares de vid usando la combinación de partidores descrita en el texto. Las flechas del lado izquierdo señalan la posición de 16 bandas informativas.

Figure 4. AFLP patterns for *Vitis* cultivars generated with the primer combination mentioned on the text. Arrows at the left label 16 polymorphic bands.

Cuadro 3. Partidores de AFLP usados, número y fracción de bandas polimórficas detectadas**Table 3. AFLP primer characteristics, number and fraction of polymorphisms**

Combinación de partidores	Secuencia adicional (<i>Eco/Mse</i>)	Nº total de bandas	Bandas polimórficas	
			Nº	Fracción
PE1C/PM1B	AGT/GCG	60	18	0,30
PE1A/PM1C	AAC/GAC	60	32	0,53
PE1C/PM1D	AGT/GGT	65	16	0,25
PE1H/PM1B	AGA/GCG	105	20	0,19
Total		290	86	
Promedio de bandas por gel		72,5	21,5	
Bandas polimórficas (total) (%)				29,6

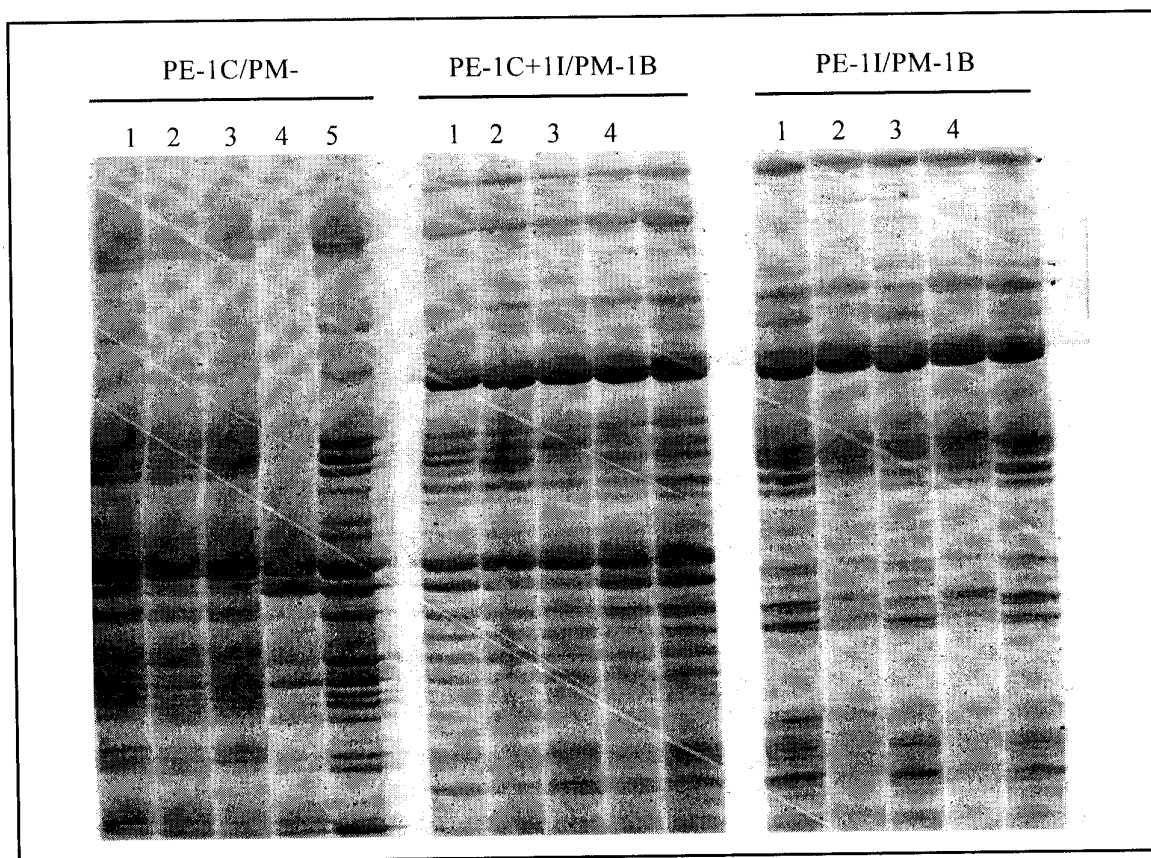


Figura 5. Efecto de la combinación de dos partidores *EcoRI* sobre el número total de bandas de amplificación de AFLP. En este caso, se muestra una porción del gel correspondiente a la combinación de partidores PE1C y PE11 con PM1B.

Figure 5. Effect of the combination of two *EcoRI* primers on the total number of AFLP amplified fragments. In this case, an area of the PE1C and PE11 plus PM1B primer combination is shown.

Basados en los polimorfismos de AFLP se preparó un dendrograma (Figura 6) que presenta el resultado del agrupamiento de acuerdo a los índices de similitud obtenidos para cada par de cultivares. Los agrupamientos obtenidos destacaron la escasa diferencia propia de clones de un determinado cultivar. Por ejemplo, los clones de Cabernet Sauvignon (Figura 7) mencionados previamente mostraron mínimas diferencias, no cuantificadas, uno de los cuales es CS-61, incluido en el dendrograma. El otro "clon" incluido (CS-66), que tiene algo menos de 80% de similitud, no corresponde a un auténtico Cabernet Sauvignon, de acuerdo a resultados de microsatélites (manuscrito en preparación). Otros pares de clones, como Ruby Seedless (RuS-50 y RuS-11) o Sauvignon Blanc (SB-12 y SB-55) exhibieron similitudes genéticas superiores o próximas al 90% (Figura 6).

Estos resultados coinciden con lo informado por Cervera *et al.* (1998). Un valor menor que 90% sugeriría que se trata de variedades diferentes como ocurre para el caso de los genotipos Thompson Seedless (TS-47 y TS-64) y Gewürztraminer (G-59 y G-36), que presentaron índices de similitud de 46,51% y 25,93%, respectivamente. Estos resultados también concuerdan con lo detectado por otros sistemas de marcadores, e.g., RAPD y microsatélites, y demostrarían que se trata de plantas erróneamente indexadas debido, probablemente, a su gran similitud ampelográfica. De forma similar a RAPD, AFLP no agrupó ningún conjunto de cultivares en un cluster en particular. Esto tiene relación con el origen muy diverso de los cultivares, o en otras palabras, que esta especie tiene una base genética muy amplia. Por otra parte, haciendo un análisis por tipo de variedades separadas en aquellas de vino y de mesa, no se reconocieron bandas polimórficas asociadas con alguno de estos dos grupos.

Los cultivares Perlón y Patagonia, Exótica y Moscatel Negro, y Sauvignon (S-34) y Semillón (Se-14), mostraron coeficientes de similitud de 80,6; 82,9 y 78,9%, respectivamente, y por tanto están muy cerca del rango de las

variaciones genéticas propias de clones. Cabe mencionar que dichos pares de cultivares presentan características morfológicas muy similares entre sí, lo que sugeriría una posible situación de sinonimia. Además, se debe destacar que las agrupaciones entre Patagonia y Perlón, Sauvignon (S-34) y Semillón, Exótica y Moscatel negro, así como el de Gewürztraminer (G-36) y Pinot Chardonnay (PC-57), coinciden con las agrupaciones basadas en datos de RAPD. Esto es especialmente relevante porque se confirma el resultado obtenido mediante RAPD.

De los cultivares de origen japonés, Plima (Pl-33) se aleja del resto del grupo, lo cual es consistente con la mayor diferencia genética que se asocia a diferentes especies. En esto hay coincidencia entre AFLP y RAPD, al igual que para el cultivar Kaiji (K-38), que se mantiene consistentemente agrupado con cultivares de *V. vinifera* (Fue Fuji no fue analizada por AFLP). Estos resultados se reflejan en haber encontrado siete bandas polimórficas que sólo aparecieron en Pl-33, mientras que en K-38 sólo se observaron dos bandas exclusivas.

Diferenciación de clones de Cabernet Sauvignon

Utilizando mezclas de ADN de cinco clones de Cabernet Sauvignon de cuatro poblaciones provenientes de Talca, Peumo y dos cuarteles de INIA, Centro Regional de Investigación La Platina (Pt-78 y Pt-79), se hicieron reacciones de AFLP con 23 combinaciones de partidores. Con 11 de ellas se reconocieron diferencias entre los clones de Pt-78 y Peumo respecto de los clones de Talca y Pt-79. También se usó ADN de un clon de Cabernet Sauvignon proveniente de EE.UU., que no presentó diferencias con las mezclas de ADN de clones de Talca y Pt-79.

En la Figura 7 se muestran las diferencias obtenidas con dos combinaciones de partidores. A pesar que las diferencias son evidentes, se requiere hacer un estudio que sea más represen-

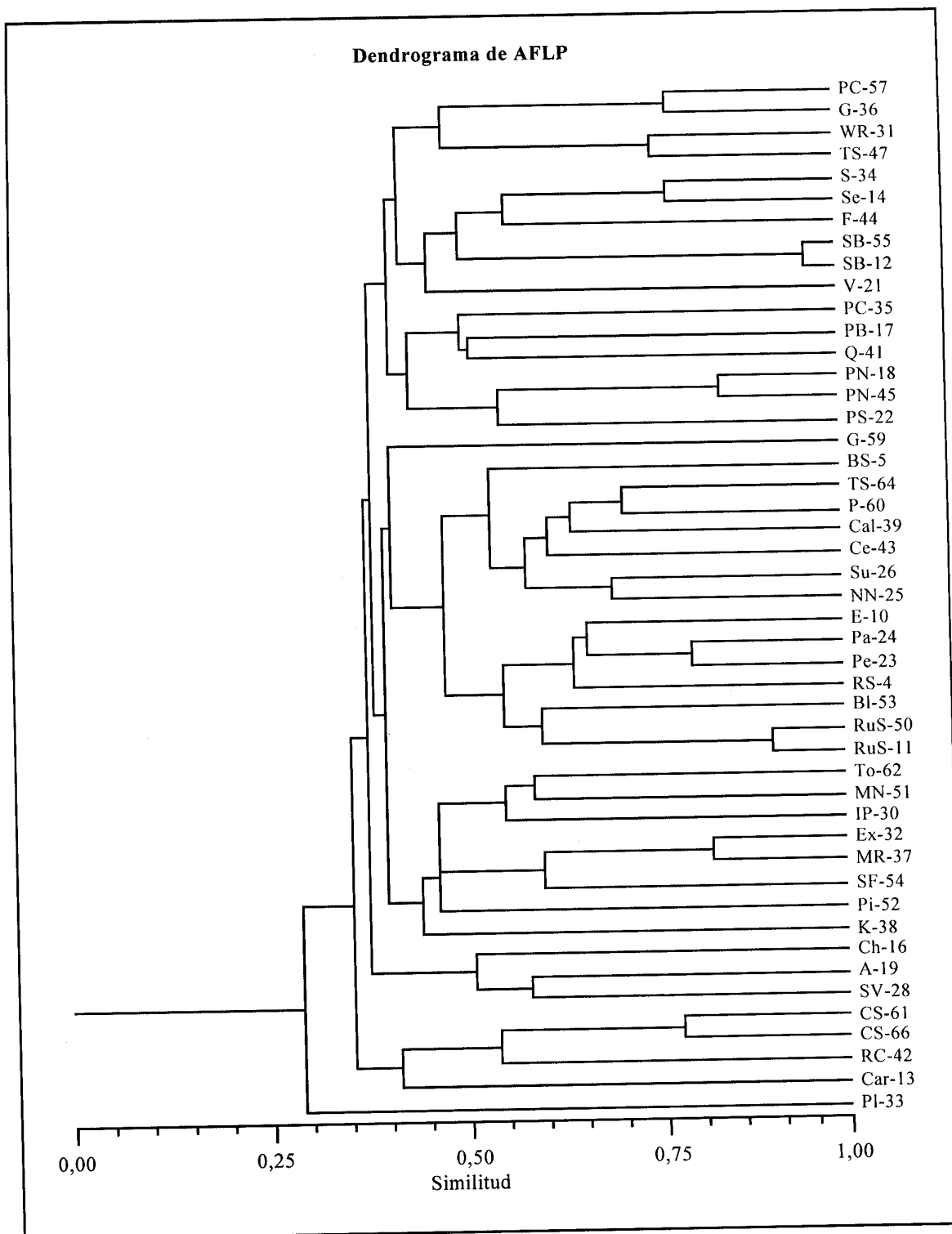


Figura 6. Dendrograma basado en polimorfismos de AFLP.
Figure 6. Dendrogram based on AFLP polymorphisms.

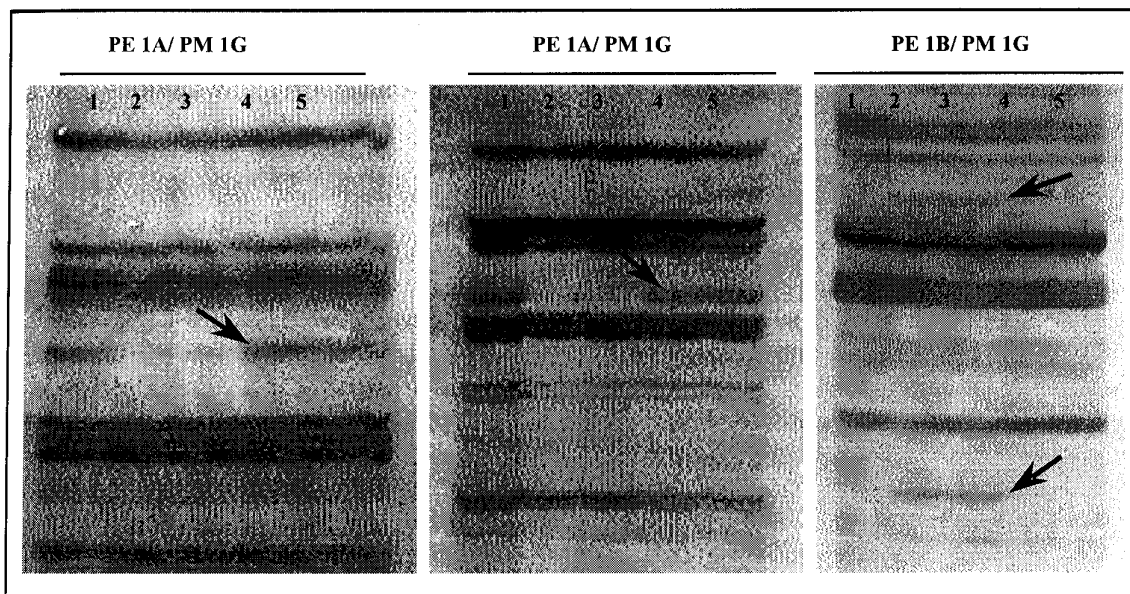


Figura 7. Diferencias entre clones de Cabernet Sauvignon de racimo largo y corto. Los carriles corresponden a: 1, Talca; 2, Peumo; 3, Pt-78; 4, Pt-79; 5, clon de EE.UU. Las fotos corresponden a fragmentos de dos reacciones de AFLP, según se indica. Las flechas destacan las bandas polimórficas.

Figure 7. Clonal differences revealed by AFLP among long and short cluster in C. Sauvignon. Lanes are: 1, Talca; 2, Peumo; 3, Pt-78; 4, Pt-79; 5, USA clone. Images correspond to fragments of larger gels for two AFLP reactions, as it is indicated. Arrows show polymorphic bands.

tativo de las poblaciones de clones comparadas, de manera de eliminar la posibilidad de que tales diferencias entre poblaciones sólo sean diferencias obtenidas para los clones incluidos en este análisis ("apertura de los grupos"). Actualmente se trabaja en la caracterización de estas bandas (clonamiento y secuenciación) para verificar si se trata de marcos de lectura abiertos, señales de regulación génica, o secuencias no codificantes. Si se detectara un gen de función conocida, quedaría abierta la posibilidad de utilizarlo para mejoramiento genético del cultivo vía transformación genética. Sin embargo, esto implicaría la identificación y caracterización del gen, determinación de su carácter dominante o recesivo, aislamiento del gen y clonamiento en vectores de transformación apropiados, etc., todas etapas de alta dificultad técnica que se justificarían sólo si el carácter codificado fuera de alto interés.

Comparación entre los métodos de análisis molecular en vides

Un aspecto de gran interés es determinar cuál sería la mejor herramienta para "fingerprinting". Desde este punto de vista, es necesario realizar estudios comparativos entre las diferentes técnicas disponibles. Sin embargo, este aspecto está escasamente cubierto en la literatura. Incluso en cultivos anuales, que han recibido tradicionalmente una mayor atención, existen pocos antecedentes. Una excepción es el trabajo realizado por el grupo de Rafalski en soya (Powell *et al.*, 1996), donde se demuestra la importancia de realizar estos estudios para elegir un marcador apropiado para cada propósito. En especies de propagación agámica no existen estudios de esta naturaleza, y este trabajo constituye un importante aporte en este sentido. A diferencia de lo descrito por Powell *et al.* (1996), donde se demostró que AFLP tiene una mayor

capacidad que RAPD para detectar diferencias entre genotipos, en este trabajo se ha encontrado valores equivalentes (en torno al 30%) de bandas polimórficas para ambas metodologías, lo que puede explicarse porque en el caso de RAPD se realizó una selección de los partidores más informativos, aumentando así la eficiencia del método de una forma arbitraria. Esta elevada heterogeneidad genética entre cultivares podría explicarse, en parte, por los orígenes muy diversos de los progenitores (en muchos casos desconocidos, especialmente en el caso de los cultivares de vino), aunque la gran heterocigocidad detectada parece ser condición propia de la especie (*Vitis vinifera* L.) o del propio género *Vitis*.

Un método alternativo a los presentados en este trabajo para hacer diferenciación genética son los microsatélites (SSR), que son secuencias repetidas dispersas en el genoma en muy alto número de copias, compuestas de 1-6 nucleótidos repetidos en tandem hasta 60 veces (Tautz 1989). Su análisis se basa también en PCR, usando partidores complementarios a secuencias vecinas al microsatélite. Dado que es usual observar *loci* de SSR con más de 10 alelos y frecuencia de heterocigocidad esperada superior a 0,6 (Morgante y Olivieri, 1993), ellos son excelentes candidatos para ser usados en la tipificación genética de cultivares de vid. Actualmente se trabaja paralelamente en vid con los tres tipos de marcadores, de tal manera de generar un volumen de información apropiado para

poder justificar plenamente el uso de una u otra metodología, según si se quiera diferenciar cultivares o clones en esta importante especie (Hinrichsen *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

- Se ha optimizado el uso de marcadores moleculares de tipo RAPD y AFLP para el análisis genético de vides.
- Ambos métodos permitieron diferenciar todos los cultivares analizados.
- Para algunos cultivares se analizó más de una planta o clon, demostrándose que ambas técnicas tienen un alto grado de reproducibilidad. Sin embargo, en una serie de casos se encontraron diferencias genéticas sustanciales entre plantas supuestamente de la misma variedad, lo que se explicaría por errores de indexación derivado de una alta similitud ampelográfica.
- AFLP sería una buena alternativa para diferenciar clones, dado que tiene una alta reproducibilidad y entrega mayor información por cada reacción que RAPD.
- No se evidenció la existencia de "grupos genéticos" discretos. En cambio se revelaron profundas diferencias entre cultivares, lo que coincide con la alta heterocigocidad descrita en esta especie.

RESUMEN

Hasta hace un tiempo, los cultivares de vid sólo podían ser diferenciados en base a observaciones ampelográficas. Actualmente se dispone de numerosos métodos moleculares basados en PCR que permiten un exhaustivo análisis genético de las plantas analizando directamente su genoma y evitando, de esta manera, la interferencia de efectos ambientales. En este trabajo se presentan los resultados de la aplicación de dos de

estos métodos, RAPD y AFLP, para estudiar la diversidad genética existente en un grupo de más de 50 cultivares de vid. Usando 18 partidores de RAPD se identificaron 103 bandas informativas, correspondiente a un 29,9% de polimorfismo. Por su parte, usando cuatro combinaciones de partidores de AFLP se obtuvieron 86 bandas informativas (29,6% de polimorfismo). Ambos métodos mostraron un adecuado grado

de reproducibilidad, evaluada sobre una colección de clones de Cabernet Sauvignon. Los dendrogramas preparados en base a estos datos graficaron la capacidad de ambos métodos para diferenciar todos los cultivares estudiados. En el caso de los clones de Cabernet Sauvignon, AFLP permitió identificar una serie de diferencias que podrían estar asociadas a diferencias en el largo de los racimos que presentan estos clones. La comparación de ambos métodos, principalmente en cuanto a su capacidad para diferenciar cultivares y clones, sugiere que AFLP es el método más adecuado para ambos propósitos. Sin embargo, ambos métodos

podrían ser implementados, dado que bajo condiciones controladas muestran apropiados niveles de polimorfismo y reproducibilidad.

Palabras claves: ADN, genoma, polimorfismo, vides, *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*.

AGRADECIMIENTOS

Especiales agradecimientos a María Herminia Castro por el apoyo técnico y a Margarita Barticevic por los antecedentes sobre filogenia de cultivares japoneses.

LITERATURA CITADA

- ALLEWELDT, G. 1988. The genetic resources of *Vitis*. Genetic and geographic origin of grape cultivars, their prime names and synonyms. 2nd edition. Federal Research Centre for Grape Breeding Geilweilerhof. Siebeldingen, Germany. 546 p.
- BAKALINSKY, A.T.; WILSON, D. AND ARULSEKAR, S. 1993. DNA fingerprinting of grape rootstocks. Am. J. Enol. Vitic. 44: 468 (Abstract).
- BOURQUIN, J.C.; SONKO, A.; OTTEN, L. AND WALTER, B. 1993. Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. Theor. Appl. Genet. 87: 431-438.
- BOWERS, J.E.; BANDMAN, E.B. AND MEREDITH, C.P. 1993. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. Am. J. Enol. Vitic. 44: 266-274.
- BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R. AND MEREDITH, C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). Genome 39: 628-633.
- BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E. AND BLAICH, R. 1993. Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10mer primers. Vitis 32: 187-188.
- BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E.; BACHMANN, O. AND BLAICH, R. 1994. On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). Vitis 33: 15-17.
- CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; SANCHÁ, J.C.; MARTINEZ DE TODA, F. AND 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). Theor. Appl. Genet. 97: 51-59.
- CHALHOUB, B.A.; THIBAUT, S.; LAUCOU, V.; RAMEAU, C.; HÖFTE, H., AND COUSIN R. 1997. Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. BioTechniques 22: 216-220.

- CIPRIANI, G.; FRAZZA, G.; PETERLUNGER, E. AND TESTOLIN, R. 1994. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. *Vitis* 33: 211-215.
- COLLINS, G.G. AND SYMONS, R.H. 1993. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Molec. Biol. Rep.* 11: 105-112.
- GALET, A. 1979. A practical ampelography: grapevine identification. Commstock Publishing Association. Ithaca, New York, USA. Cornell University Press. 248 p.
- GOGORCENA, Y.; ARULSEKAR, S.; DANDEKAR, A.M. AND PARFITT, D.E. 1993. Molecular markers for grape characterization. *Vitis* 32: 183-185.
- GONZÁLEZ, D.O.; PALACIOS, N.; GALLEGO, G. Y TOHME, J. 1995. Protocolos para marcadores moleculares. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p. 36-40.
- GRANDO, M.S.; DE MICHELI, L.; BIASETTO, L. AND SCIENZA, A. 1995. RAPD markers in wild and cultivated *V. vinifera*. *Vitis* 34: 37-39.
- HELENTJARIS, T.; KING, G.; SLOCUM, M.; SIEDENSTRANG, C. AND WEGMAN, S. 1985. Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.* 5: 109-118.
- HINRICHSEN, P.; AMIGO, C.; ALVARADO, R. Y MUÑOZ, C. 1996. Identificación de variedades chilenas de arroz (*Oryza sativa* L.): evaluación del uso de perfiles proteicos y de fragmentos polimórficos amplificados al azar (RAPD). *Agricultura Técnica (Chile)* 56: 1-10.
- HINRICHSEN, P.; KUNCAR, J.C.; HIRAI, M.; MUÑOZ, C. Y LAVIN, A. 1999. Diversidad genética en accesiones chilenas de *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. determinada mediante RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). *Agricultura Técnica (Chile)* 59: 151-168.
- HINRICHSEN, P.; NARVÁEZ, C.; VALENZUELA, J.; MUÑOZ, C.; BOWERS, J.E. AND MEREDITH, C.P. 2000. Fingerprinting of grape cultivars grown in Chile: Comparison of methods based on anonymous sequences and a set of microsatellite *loci*. *Acta Horticulturae* (In press).
- JEAN-JAQUES, I.; DEFONTAINE, A. AND HALLET, J.N. 1993. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* 32: 189-190.
- JOHNS, M.A.; SKROCH, P.; NIENHUIS, J.; HINRICHSEN, P.; BASCUR, G. AND MUÑOZ, C. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Science* 37: 605-613.
- LODHI, M.A.; YE, G.; WEEDEN, N.F. AND REISH, B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12: 6-13.
- LODHI, M.A.; DALY, M.J.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F. AND REISCH, B.I. 1995. A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome* 38: 786-794.
- LUND, A.H.; DUNCH, M. AND PEDERSEN, F.S. 1996. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res.* 24: 800-801.
- MORELL, M.K.; PEAKALL, R.; APPELS, R.; PRESTON, L.R. AND LLOYD, H.L. 1995. DNA profiling techniques for plant variety identification. *Aust. J. Exp. Agric.* 35: 807-819.

- MORGANTE, M. AND OLIVIERI, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- MUÑOZ, I.; VALENZUELA, J. Y PEZOA, J. 1985. Comparación entre tipos de Cabernet Sauvignon. Chile. *Investigación y Progreso Agropecuario La Platina* 28: 35-37.
- PANDEY, R.N.; ADAMS, R. AND FLOURNOY, L. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14: 17-22.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S. AND RAFALSKI, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germoplasm analysis. *Molec. Breed.* 2: 255-263.
- QU, X.; LU, J. AND LAMIKANRA, O. 1996. Genetic diversity in muscadine and American bunch grapes based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Amer. Hort. Sci.* 121: 1020-1023.
- ROHLF, F.J. 1997. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.00. Setauket, New York, USA. Exeter Software Publications. 31 p.
- SAGREDO B.; HINRICHSSEN, P.; LÓPEZ, H.; CUBILLOS, A. AND MUÑOZ, C. 1998. Genetic variation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) cultivated in Chile determined by RAPDs. *Euphytica* 101: 193-198.
- SENSI, E.; VIGNANI, R.; ROHDE, W. AND BIRICOLTI, S. 1996. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* 35: 182-188.
- STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C. AND GUPTA, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31: 729-741.
- STAVRAKAKIS, M.N.; BINIARI, K. AND HATZOPOULOS, P. 1997. Identification and discrimination of eight Greek grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* 36: 175-178.
- STAVRAKAKIS, M.N. AND BINIARI, K. 1998. Genetic analysis of grape cultivars belonging to the muscat family by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* 37: 119-122.
- STRIEM, M.J.; SPIEGEL-ROY, P.; BEN-HAYYIM, G.; BECKMANN, J. AND GIDONI, D. 1990. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-*loci* probes. *Vitis* 29: 223-227.
- STRIEM, M.J.; BEN-HAYYIM, G. AND SPIEGEL-ROY, P. 1994. Developing molecular genetic markers for breeding using polymerase chain reaction procedures. *Vitis* 33: 53-54.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- THIS, P.; CUISSET, C. AND BOURSQUOT, J.M. 1997. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 492-501.
- VIDAL, J.R.; MORENO, S.; MASA, A. AND ORTIZ, J.M. 1998. Study of the genetic homogeneity of Albariño (*Vitis vinifera* L.) growing in Galicia (Spain) using isozyme and RAPD markers. *Vitis* 37: 145-146.
- VIGNANI, R.; BOWERS, J.E. AND MEREDITH, C.P. 1996. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* "Sangiovese". *Scientia Hort.* 65: 163-169.

- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REINJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRUITERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AND ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- WAUGH, R. AND POWELL, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotech.* 10: 186-191.
- WEEDEN, N.F.; HEMMAT, M.; LAWSON, D.M.; LOHDI, M.; BELL, R.L.; MANGANARIS, A.G.; REISCH, B.I.; BROWN, S.K. AND YE, G.N. 1994. Development and application of molecular marker linkage maps in woody fruit crops. *Euphytica* 77: 71-75.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. AND TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- XU, H.; WILSON, D.J.; ARULSEKAR, S. AND BAKALINSKY, A.T. 1995. Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 714-720.
- YE, G.N.; WEEDEN, N.F. AND REISCH, B.I. 1993. Genetic mapping and fingerprinting of grape vines using molecular markers. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 468 (Abstract).