

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE ALBARIÑO

J. R. VIDAL ¹, S. MORENO ², A. MASA ¹ y J. M. ORTIZ ²

¹ Misión Biológica de Galicia. Consejo Superior
de Investigaciones Científicas (CSIC).

² Departamento de Biología Vegetal. E.T.S. Ingenieros
Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid

RESUMEN

De entre las variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en Galicia desde tiempos antiguos, el «Albariño» es sin duda una de las más importantes desde el punto de vista económico. De origen genético desconocido, se han vertido opiniones encontradas acerca de la homogeneidad del material vegetal cultivado bajo esta denominación. En este trabajo presentamos un estudio práctico de la variabilidad genética de este cultivar, para lo que hemos seleccionado en la Denominación de Origen «Rías Baixas» un total de 24 plantas que presentan diferencias de edad (centenarias y jóvenes) morfológicas y/o de producción. Para evaluar el polimorfismo genético, se analizaron diez sistemas enzimáticos y 42 cebadores RAPD. Tanto los isoenzimas como los RAPD generaron patrones de bandas que resultaron comunes a todas las plantas estudiadas revelando respectivamente 73 bandas isoenzimáticas y 308 bandas RAPD. Nuestro estudio muestra una alta homogeneidad genética en el «Albariño» cultivado en la D.O. Rías Baixas, pudiéndose adelantar que las ligeras diferencias que los viticultores observan entre plantas se pue-

den deber más bien a la acción de factores externos (como la presencia de virus) que a diferencias genéticas.

PALABRAS CLAVE

Albariño, germoplasma de vid, isoenzimas, polimorfismo, RAPD, variabilidad genética, virus del enrollado.

INTRODUCCIÓN

En general, se admite que el cultivo de la vid en Galicia fue introducido por los Romanos y que fueron los monjes los que con posterioridad, en la Edad Media, lo consolidaron y extendieron (Huezt de Lempis, 1967). En la actualidad existe un importante patrimonio genético de vid (*Vitis vinifera L.*) en Galicia, siendo sin duda el «Albariño» el cultivar que más importancia ha adquirido por la calidad y prestigio de sus vinos. El desconocimiento de su origen genético ha propiciado la aparición de distintas teorías, de entre las cuales la más ampliamente difundida atribuye a los monjes de Clunny su introducción procedente del valle del Rin y tradicionalmente se relacionó esta variedad con el Riesling (Abeijon, 1951). Recientemente, hemos demostrado que ambas variedades no son próximas genéticamente y que el «Albariño» puede considerarse como una variedad autóctona (Vidal y col., en prensa).

Su principal zona de cultivo se extiende por la provincia de Pontevedra y está amparada por la Denominación de Origen Rías Baixas (Figura 1), creada en 1988 con el objetivo de regular la producción de uva y proteger los vinos producidos en tres subzonas: Sahnés, Rosal y Condado. Si bien es cierto que el «Albariño» ha sido cultivado en Galicia desde muy antiguo (Casares, 1843), su cultivo ha adquirido un fuerte incremento al principio de la década de los 80, en la que de forma descontrolada por falta de una política de selección clonal y sanitaria (Benayas, 1992), viticultores y viveristas han seleccionado su propio material vegetal para la realización de las nuevas plantaciones. En la actualidad, en la D.O. Rías Baixas podemos encontrar algunas viñas con plantas centenarias, que sobrevivieron a la invasión de la filoxera, pero la mayoría de los viñedos tiene plantas de Albariño jóvenes (menor de 25 años) cuya procedencia en algunos casos no es bien conocida.

La observación de ligeras diferencias morfológicas y de producción -de forma especial en las nuevas plantaciones- ha llevado a los viticultores a hablar de falsos «Albariños» o variedades similares que habían sido implantadas en vez de aquella. Estas diferencias obligan a dilucidar si existe una base genética (polimorfismo varietal o intravarietal) o si, por el contrario, son debidas a la acción de factores

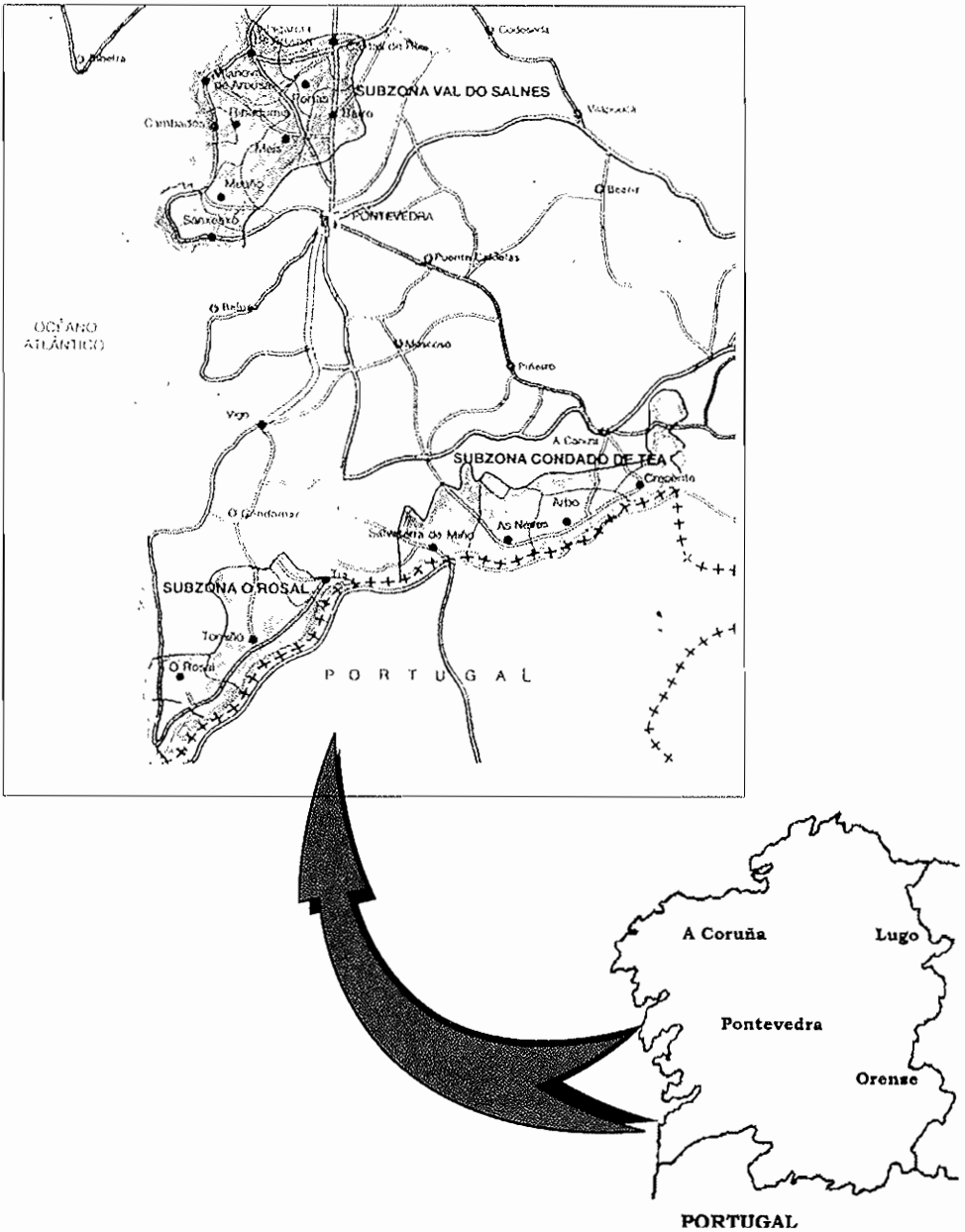


Fig. 1.—Situación de la Denominación de Origen Rías Baixas.

externos, ya que en esta denominación coexisten varias formas de cultivo y la incidencia de virus es alta, de forma especial el virus del enrollado «grapevine leafroll associated virus 3» (GLRaV-3) (Segura y col., 1993).

Si bien el «Albariño» ha sido descrito por métodos ampelográficos (Pérez y col., 1993), los caracteres que la ampelografía utiliza pueden ser afectados ligeramente por factores externos como el suelo, clima, cultivo y la presencia de enfermedades (Wolfe, 1976); por lo tanto, no son los más apropiados para diferenciar e identificar variedades próximas genéticamente. En este sentido, los marcadores moleculares son más resolutivos debido a su total independencia del medio. Tanto los isoenzimas (Wolfe, 1976; Benin y col., 1993) como los marcadores de DNA (Collins y Symons 1993; Moreno y col., 1995; Tschammer y Zyprian 1994) permitieron diferenciar satisfactoriamente variedades muy próximas a nivel genético. De las diferentes técnicas de DNA (Bourquin y col., 1993; Gogorcena y col., 1993) la técnica random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Willians y col., 1990) es considerada apropiada para este objetivo debido a su bajo coste y su rapidez metodológica, pudiendo ser incorporada por los viveros y Consejos Reguladores para sus controles.

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la variabilidad genética en un grupo de 24 plantas seleccionadas a lo largo de la D.O. «Rías Baixas» y cultivadas como «Albariño», utilizando para ello marcadores isoenzimáticos y RAPDs.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Un total de 24 plantas de «Albariño» fueron seleccionadas entre tres áreas de la Denominación de Origen Rías Baixas: Salnés, Condado y Rosal. Diez de ellas corresponden a cepas centenarias y 14 a cepas con menos de 25 años (Tabla 1). Las cepas fueron seleccionadas bien por su morfología típica o por presentar ligeras diferencias ampelográficas «*in situ*».

Extracción de isoenzimas

Raspaduras de sarmientos agostados fueron congeladas con nitrógeno líquido, pulverizadas en un mortero y a continuación mezcladas con el tampón de extracción [Tris-citrato 0,05 M (pH 8,0) conteniendo 0,1% ácido ascórbico; 0,1% hidrocloreuro de cisteína; 1,0% polietilén glicol (MW 4000); y 1 mM 2-mercaptoetanol] (Arulsekara y Parfitt 1986) y polivinil polipirrolidona (PVPP) con una proporción 1:5:0,5 (w/v/w), para realizar la extracción. Los extractos fueron centrifugados a

TABLA I

Plantas de Albariño seleccionadas a lo largo de las subzonas de la Denominación Origen «Rías Baixas»

Código	Area	Viñedo	Edad	GLRaV	Observaciones ¹
A1	Salnés	Cambados 1	C	-	Hoja y racimo pequeños
A2	Salnés	Sanxenxo	C	-	Morfología típica
A3	Salnés	Ribadumia 1	C	-	Hoja y racimo pequeños
A4	Salnés	Ribadumia 2	C	-	Morfología típica
A5	Salnés	Barro	C	-	Morfología típica
A6	Salnés	Meis	C	-	Morfología típica
A7	Rosal	Rosal 1	C	-	Racimo pequeño
A8	Rosal	Rosal 1	C	+	Racimo grande
A9	Salnés	Meaño	C	-	Hoja y racimo pequeños
A10	Salnés	Meaño	C	-	Morfología típica
A11	Salnés	Ribadumia 3	Y	-	Racimo pequeño
A12	Salnés	Ribadumia 3	Y	-	Racimo grande
A13	Salnés	Ribadumia 4	Y	-	Uvas pequeñas
A14	Salnés	Ribadumia 4	Y	-	Morfología típica
A15	Salnés	Vilanova 1	Y	-	Morfología típica
A16	Salnés	Vilanova 2	Y	-	Racimo grande
A17	Rosal	Rosal 2	Y	+	Diferencias morfológicas
A18	Rosal	Rosal 2	Y	+	Diferencias morfológicas
A19	Rosal	Rosal 3	Y	-	Morfología típica
A20	Rosal	Rosal 4	Y	-	Racimo grande
A21	Rosal	Rosal 5	Y	+	Morfología típica
A22	Condado	Arbo 1	Y	-	Racimo grande
A23	Condado	Arbo 2	Y	-	Morfología típica
A24	Condado	Salvaterra	Y	+	Morfología típica

(C) Centenaria: plantas de más de 100 años; (Y) Jóvenes: plantas de menos de 25 años.

GLRaV: resultado del test de ELISA para presencia (+) o ausencia (-) del virus GLRaV-3.

¹ Observaciones ampelográficas en campo para comparación con la morfología típica.

30.000 g durante 25 minutos a 4° C. A continuación se cuantifica la concentración de proteínas del sobrenadante (Bradford, 1976) y se guarda en el congelador a -20° C hasta su posterior análisis.

Análisis de isoenzimas

La separación de isoenzimas se realizó mediante electroforesis vertical utilizando como soporte geles de poliacrilamida. Los geles (160 × 140 × 1 mm) fueron constituidos por tres capas: Resolución (10% acrilamida y 9 cm de longitud), Separación (6% acrilamida y 3 cm de longitud) y Carga (4% acrilamida y 4 cm de longitud). Aproximadamente 150 µg de proteína fueron depositados en cada pocillo. La electroforesis se realizó usando como tampón 5 mM Tris-glycine a 4° C y con un amperaje de 20 mA por gel. Se estudiaron diez sistemas enzimáticos dos años con-

secutivos: Fosfatasa ácida, Catecol oxidasa, Esterasas, Glucosa fosfato isomerasa, Aspartato aminotransferasa, Leucina aminopeptidasa, Malato dehidrogenasa, Fosfoglucomutasa, Peroxidasas y Superóxido dismutasa (Tabla 2). Las soluciones específicas fueron preparadas justo antes de la tinción. Los geles teñidos fueron secados entre dos láminas de papel de celofán. La cuantificación de las bandas se realizó con un analizador de imágenes usando el programa *Whole Band Analyzer* (BioImage, USA).

Estudio de RAPD

La extracción de DNA se realizó siguiendo la metodología propuesta por Torres y col. (1993) utilizando como material vegetal ápices meristemáticos de vid. La reacción de amplificación se realizó en 25 μ L de volumen usando 5 ng de DNA molde, tampón de reacción GoldStar 1X (75 mM Tris-HCl pH 9.0; 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.01 % Tween 20), 1.5 mM MgCl_2 , 100 μ M dNTPs, 0.2 U cebador (British Columbia Set 6) y 0.2 unidades de GoldStar DNA polimerasa (Eurogentec, Belgium). La mezcla de reacción se cubrió con una gota de aceite mineral. El termociclador (Perkin Elmer 480) se programó para un paso inicial de 2 min. a 94 °C seguido por 40 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 36 °C y 2 min. a 72 °C. Cada combinación genotipo-cebador se amplificó al menos dos veces. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis usando como soporte geles del 2 % de agarosa y como tampón 1X TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) a 3V/cm durante 4 horas. La tinción del DNA se realizó en una solución 0.5 (g/mL de Bromuro de Etidio durante 15 min. La película de Polaroid 55 (Print area 9 x 11,5 cm) se usó para conservar el perfil de bandas.

TABLA 2
Sistemas isoenzimáticos estudiados y número de bandas obtenido en cada perfil electroforético

Enzimas	IUB	Número de bandas	Método de tinción
Fosfatasa ácida	E.C. 3.1.3.2	8	Schwennesen <i>et al.</i> (1982)
Catecol oxidasa	E.C. 1.10.1.1	4	Wolfe (1976)
Esterasas	E.C. 3.2.1.2	16	Brewer and Sing (1970)
Glucosa fosfato isomerasa	E.C. 5.3.1.9	4	Wendel and Weeden (1989)
Aspartato aminotransferasa	E.C. 2.6.1.1	5	Sánchez Yélamo (1992)
Leucina aminopeptidasa	E.C. 3.4.11.1	3	Vallejos (1983)
Malato dehidrogenasa	E.C. 1.1.1.37	5	Brewer and Sing (1970)
Fosfoglucomutasa	E.C. 2.7.5.1.	10	Vallejos (1983)
Peroxidasas	E.C. 1.11.1.7	8	Arulsekar and Parfitt (1986)
Superóxido dismutasa	E.C. 1.15.1.1	10	Wendel and Weeden (1989)

IUB: Códigos de la *International Union of Biochemists*.

Detección de Virus

Las raspaduras de sarmientos recogidos al final del otoño se utilizaron para determinar la presencia del virus del enrollado (GLRaV-3) mediante la técnica DAS-ELISA (*double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*) (Clark y Adams 1977). El tejido se mezcló con el tampón de extracción [0,5 M Tris ClH (pH 8,2); 1% polietilenglicol (MW 6000); 0,8% NaCl; 2% polivinilpirrolidona (MW 24000) y 0,05% Tween 20] (Gugerli y col 1984), en proporción 1:5 (w/v), dejándolo en maceración durante cuatro horas para finalmente homogenizar. Los antibióticos y sus conjugados fueron suministrados por Bioreba AG (Basel, Switzerland). Como control negativo se usaron muestras de vid libres del virus. Dos repeticiones de cada muestra fueron analizadas dos veces. Los resultados se analizaron a una absorbancia de 405 nm utilizando un lector de microplacas (Titertek Uniskan, Finland). Las muestras con una absorbancia tres veces superior a la de la muestra sana y mayor que 0,1 fueron consideradas positivas para la presencia del virus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de los zimogramas

Todas las plantas de «Albariño» mostraron el mismo patrón de bandas para los 10 sistemas enzimáticos. Un total de 73 bandas isoenzimáticas comunes fueron reveladas. Las «esterasas» revelaron el número de bandas mas alto mientras que las «leucina aminopeptidasas» revelaron él mas bajo (Tabla 2). La figura 2 muestra el zimograma de peroxidasas para las 20 primeras muestras estudiadas. No se han observado diferencias cuantitativas (bandas polimórficas) ni cualitativas (intensidad de la banda) entre zimogramas obtenidos en dos años consecutivos. Como estudios enzimáticos previos permitieron claramente diferenciar entre variedades de vid que eran próximas genéticamente (Benin y col 1988; Weeden y col., 1988; Vidal 1996), nuestro estudio enzimático nos indica que probablemente todas las plantas estudiadas y cultivadas como «Albariño» pertenecen a la misma variedad.

Análisis de RAPD

Un total de 42 cebadores fueron seleccionados entre 100 cebadores RAPD analizados (British Columbia Set 6) por producir amplificaciones nítidas y revelar un polimorfismo claro entre las variedades «Albariño» y «Garnacha». Cinco plantas de «Albariño» correspondientes a las diferentes morfologías (A1, A7, A8, A15 y A17) fueron seleccionadas para un estudio preliminar. Las amplificaciones fueron repetidas utilizando nuevas extracciones de DNA. Un total de 305 bandas comunes

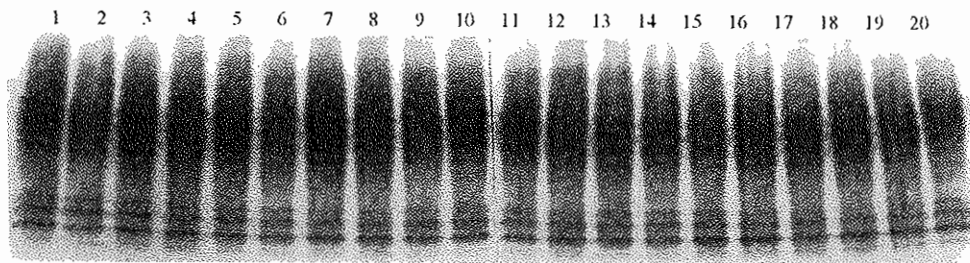


Fig. 2.—Zimogramas de peroxidasas correspondientes a las 20 primeras plantas de «Albariño» citadas en la tabla 1.

fueron amplificadas con un promedio de 7,2 fragmentos por cebador (Tabla 3). El poder discriminante de la mayoría de los cebadores seleccionados fue previamente comprobado sobre 16 variedades (Vidal y col., en prensa). Cuando las 24 plantas de «Albariño» fueron amplificadas con los cebadores más discriminantes, es el caso de los cebadores BC536 (Figura 3a) y BC542 (Figura 3b), los perfiles de bandas obtenidos fueron idénticos. Estudios previos demostraron que cuando la técnica RAPD no revela diferencias entre dos muestras de vid, entonces probablemente se trate de la misma variedad (Collins y Symons, 1993; Jean-Jacques y col., 1993;

TABLE 3
Cebadores seleccionados y número de marcadores RAPD amplificados por cebador con muestras de «Albariño»

Cebadores	Número de marcadores	Cebadores	Número de marcadores
BC. 508	7	BC. 549	8
BC. 511	7	BC. 550	5
BC. 514	7	BC. 551	7
BC. 518	7	BC. 552	8
BC. 521	9	BC. 557	3
BC. 522	8	BC. 559	8
BC. 523	8	BC. 561	6
BC. 524	8	BC. 567	7
BC. 525	8	BC. 575	5
BC. 526	16	BC. 577	2
BC. 528	3	BC. 580	8
BC. 532	6	BC. 584	9
BC. 535	5	BC. 586	9
BC. 536	6	BC. 587	7
BC. 537	8	BC. 592	14
BC. 538	4	BC. 593	4
BC. 541	8	BC. 596	8
BC. 542	10	BC. 597	4
BC. 543	8	BC. 598	8
BC. 545	10	BC. 599	9
BC. 548	4	BC. 600	9

BC: British Columbia primers.

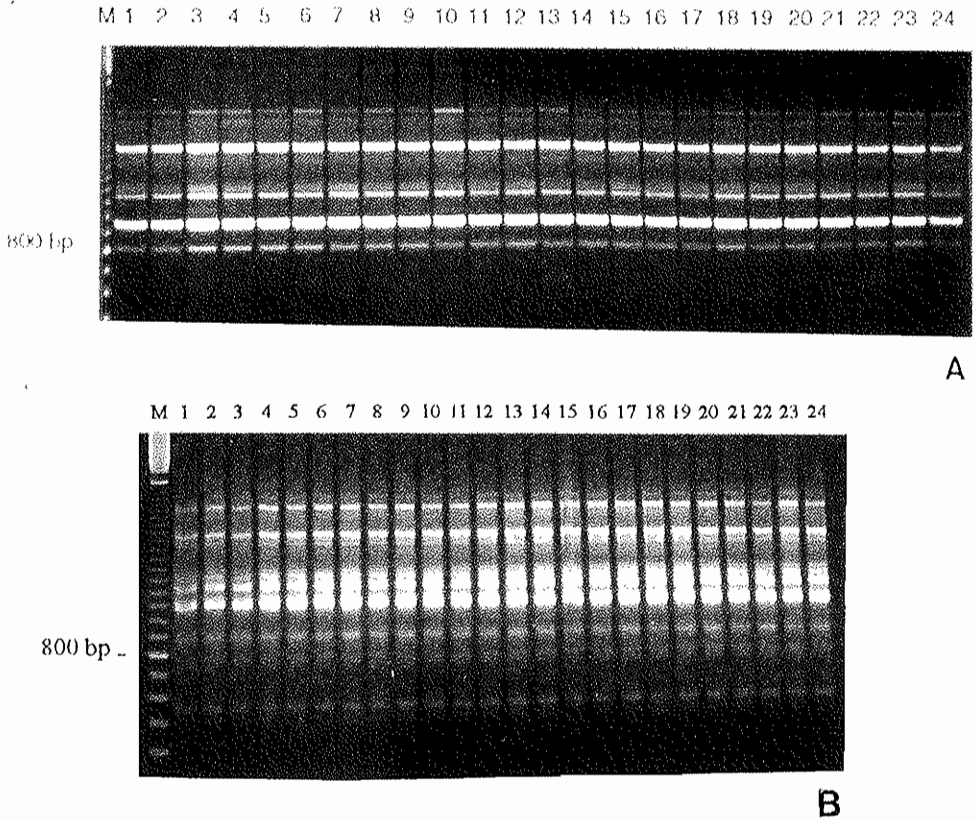


Fig. 3.—Perfiles RAPD generados por los cebadores BC536 (A) y BC542 (B). Los números indicados en la parte superior corresponden a las plantas de «Albariño» citadas en la Tabla 1. M indica el marcador de peso molecular de DNA (100 Base-Pair Ladder). Los números en el lado izquierdo indican el peso molecular en pares de bases (bp).

Moreno y col., 1995; Vidal y col., 1998). Considerando el alto número, tanto de cebadores utilizados como de bandas RAPD obtenidas, al no encontrar marcadores RAPD polimórficos, podemos concluir que todas las muestras seleccionadas pertenecen a la misma variedad.

Factores Externos

Las plantas infectadas con el virus del enrollado (muestras 8, 17, 18, 21 y 24) compartieron el perfil con las plantas sanas. La presencia del enrollado en Albariño (A17 y A18) produjo cambios en la producción y en la morfología, aunque algunas

de las plantas infectadas (A21 y A24) no mostraron ni síntomas de virus ni diferencias ampelográficas. Nosotros encontramos en el mismo viñedo la planta infectada A8 (denominada de racimo grande) que no tiene síntomas de virus y presenta un racimo diferente al nivel morfológico de la planta sana A7 (denominada de racimo pequeño). Distintos autores han indicado que las plantas de vid infectadas por virus pueden sufrir cambios fisiológicos (Walter, 1988) y morfológicos (Barba y col., 1989). Por lo tanto, la presencia del virus del enrollado puede inducir cambios ampelográficos en «Albariño», pero no modificar el patrón de bandas de isoenzimas y RAPDs. El resultado de isoenzimas en «Albariño» está en concordancia con otros obtenidos por Wolfe (1976) para la variedad «Cabernet Sauvignon».

Variabilidad genética

Un estudio ampelográfico previo con diferentes plantas de «Albariño», mostró un polimorfismo foliar al nivel ampelográfico, pero no significativo como para afirmar que se tratan de diferentes cultivares (Loureiro, 1993). Nuestros resultados muestran que las plantas seleccionada tienen una alta homogeneidad genética, ya que no fue revelado un polimorfismo molecular entre las vides centenarias y jóvenes. Parece ser que los viticultores utilizaron con buen criterio las plantas centenarias de sus fincas para realizar los nuevos injertos; por lo tanto no se produjeron errores y otras variedades próximas al «Albariño» no fueron introducidas en vez de esta en las nuevas plantaciones.

Por otra parte, es difícil revelar un polimorfismo intravarietal (clonal) con sistemas enzimáticos y marcadores RAPD. Previamente Subden y col. (1987) no pudieron diferenciar mediante isoenzimas clones de las variedades «Chardonnay» y «Riesling», ni Altube y col. (1991) de la variedad «Garnacha». También, tanto Collins y Symons (1991) como Gogorcena y col. (1993) informaron que los marcadores RAPD no pudieron revelar diferencias significativas entre plantas (clones) de «Pinot Noir». Estos resultados nos indican que ambas técnicas no son adecuadas para la diferenciación intravarietal. Por lo tanto, los futuros estudios sobre polimorfismo intravarietal deberán ser enfocados hacia técnicas de DNA que permitan profundizar más en la información genética de las variedades, como los microsatélites (Thomas y col 1994; Sivestroni y col., 1997), los *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) o los *inverse sequence-tagged repeat analysis* (ISRT) (Sensi y col., 1996).

Finalmente, nos gustaría indicar que las técnicas isoenzimáticas y RAPD nos permitieron llevar a cabo un estudio rápido y práctico de diversidad genética al nivel varietal. Nuestro estudio ayudó a resolver algunas dudas sobre la variabilidad genética del «Albariño» cultivado en la Denominación de Origen Rías Baixas y mostró que algunas diferencias fenotípicas entre plantas pueden ser inicialmente atribuidas a factores no genéticos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Segura (Universidad de Santiago) por facilitar los medios materiales necesarios para realizar el estudio inmunoenzimático ELISA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abejjon, J. 1951. Importancia y porvenir del vino en Galicia. *La semana vitivinícola* 265, 13-15.
- Altube, H.; Cabello F. y Ortiz J.M. 1991. Caracterización de variedades y portainjertos de vid mediante isoenzimas de los sarmientos. *Vitis* 30, 203-212.
- Arulsekhar, S. y Parfitt, D.E. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *Hortscience* 21 (4), 928-933.
- Barba, M.; Cupidi, A. y Faggioli, G. 1989. In vitro culture of grapevine infected by closterovirus type-III. *J. Phytopathol.* 126, 225-230.
- Benin, M.; Gasquez, J.; Mahfoudi, A. y Bessis, R. 1988. Caractérisation biochimique des cépages de *Vitis vinifera* L. par électrophorèse d'isoenzymes foliaires: Essai de classification des variétés. *Vitis* 27, 157-172.
- Benayas, F. 1992. Situación actual de la selección clonal. *Vitivinicultura* 2, 37-39.
- 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.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brewer, G.J. y Sing, C.F. 1970. *An introduction to isozyme techniques*. Academic press, New York.
- Casares, A. 1843. *Observaciones sobre el cultivo de la vid en Galicia*. Imp. Viuda e Hijos de Campanel. Santiago de Compostela.
- Clark, M.F. y Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplates methods of ELISA for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.
- Collins, G.G. y Symons, R.H. 1993. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Molecular Biology Reporter* 11 (2), 105-112.
- Gogorcena, Y.; Arulsekhar, S.; Dandekar, A.M. y Parfitt, D.E. 1993. Molecular markers for grape characterization. *Vitis* 32, 183-185.
- Grando, M.S.; De Micheli, L.; Biasetto, L. y Scienza, A. 1995. RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera* L. *Vitis* 24 (1), 37-39.
- Gugerli, P.; Brugger, J. y Bovey, R. 1984. L'enroulement de la vigne: Mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 16, 299-304.

- Huetz de Lepms, A. 1967. *Vignobles et Vins du Nord-Ouest de L'Espagne*. Tomos I-II. Institut de Géographie. Faculté des lettres. Bordeaux.
- Jean-Jaques, I.; Defontaine, A. y Hallet, J.N. 1993. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* 32, 189-190.
- Loureiro, M.D. 1993. *Estudio ampelográfico de poblaciones del cultivar Albariño*. Tesina, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.
- Moreno, S.; Gogorcena, Y. y Ortiz, J.M. 1995. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hortic.* 62, 237-243.
- Pérez, J.E.; Rega J. y Orriols I. 1993. *Varietades autóctonas de cepas gallegas para vinos blancos*. Ici-Zeltia agroquímicos.
- Sánchez Yélamo, M.D. 1992. Isoenzyme electrophoretic studies among some species of the genus *Erucastum* and *Hirschfeldia incana* (Crucifera: Brassicaceae) with reference to their chemotaxonomic relationships. *Biochemical Systematics and Ecology* 20 (7), 631-637.
- Schwennesen, J.; Mielke, E.A. y Wolfe, W.H. 1982. Identification of seedless table grape cultivars and a bud sport with berry isozymes. *HortScience* 17 (3), 366-368.
- Segura, A.; González, M.L. y Cabaleiro, C. 1993. *Presence of grapevine leafroll in north west of Spain*. 11 th. Meeting ICVG, 64EP. Montreux, Suiza.
- Sensi, E.; Vignani, R.; Rohde, W. y Biricolti, S. 1996. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* 35, 183-188.
- Silvestroni, O.; Di Pietro, D.; Intrieri, C.; Vignani, R.; Filippetti, I.; Del Casino, C.; Scali, M. y Cresti, M. 1997. Detection of genetic diversity among clones of cv. Fortana (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. *Vitis* 36 (3), 147-150.
- Subden, R.E.; Krizus, A.; Loughheed, S.C. y Carey, K. 1987. Isozyme characterization of *Vitis* species and some cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 38(3), 176-181.
- Torres, A.M.; Weeden, N.F. and Martín, A. 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.*, 85:937-945.
- Thomas, M.R.; Cain, P. y Scott, N.S. 1994. DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Molecular Biology* 25, 939-949.
- Tschammer, J. y Zyprian, E. 1994. Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. *Vitis* 33, 249-250.
- Vallejos, C.E. 1983. Enzyme activity staining. En: *Isozymes in plant genetics and breeding*, S. D. Tanksley and T. J. Orton (Ed.), Parte A, 469-516. Elsevier, Amsterdam.
- Vidal, J.R. 1996. *Caracterización de las variedades blancas de vid cultivadas en la Denominación de Origen «Rías Baixas»*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

- Vidal, J.R.; Moreno, S.; Gogorcena, Y.; Masa, A. y Ortiz, J.M. 1998. On the genetic relationships and origin of six grapevine cultivars of Galicia (Spain) using RAPD markers. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(1): (In press).
- Vidal, J.R.; Moreno, S.; Masa, A. y Ortiz, J.M. 1998. Study of the genetic homogeneity of Albariño (*Vitis vinifera* L.) growing in Galicia (Spain) using isoenzyme and RAPD markers. *Vitis* 37(3): 65-66.
- Walker, M.A. y Boursiquot, J.M. 1992. Ampelographic and isozyme data correcting the misnaming of the grape rootstock SO₄ at the University of California, Davis. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(3), 261-265.
- Walter, B. 1988. Some examples of the physiological reaction of the vine in the presence of viurses. *Bull. O.I.V.* 61, 383-390.
- Weeden, N.F.; Reisch, B.I. y Martens, M-H.E. 1988. Genetic analysis of isozyme polymorphism in grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(5), 765-769.
- Wendel, J.F. y Weeden, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: *isozymes in plant biology*, D. E. Soltis and P. S. Soltis (Ed), 5-45, Chapman and Hall, London.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 (22), 6531-6535.
- Wolfe, W. H. 1976. Identification of grape varieties by isozyme banding patterns. *Am. J. Enol. Viticult.* 27(2), 68-73.