

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

GRUP DE RECERCA DE QUALITAT

reconegut per la Generalitat de Catalunya

(Ref.: 2009 SGR 285).

COMPONENTS DEL GRUP

Investigador Principal: **Dr. Fernando ZAMORA MARÍN**

- Àrea d'Enologia

Coordinador: **Dr. Joan Miquel CANALS BOSCH**

Investigador Post-Doctoral: Mireia Esteruelas

Investigador Post-Doctoral: Nikolaos Kontoudakis

Doctorand: Mariona Gil

Doctorand: Elena González

- Àrea Biologia de la Vinya:

Coordinadora: **Dra. Maria Francesca FORT MARSAL**

Doctorand: Catalina Baig Caimi

Doctorand: Gemma Marsal Andorrà

Permeteu-me que en primer lloc, felicití a les persones que han tingut aquesta iniciativa. Crec que és molt positiu que fem anar la imaginació per a promocionar la nostra Comarca, des de qualsevol vessant, tant si és cultural com científica. Potser per al gran públic, la vessant científica resulta poc entenedora i per tant més avorrida, llavors es feina dels científics tenir la habilitat de posar a l'abast de tothom aquests coneixements. Però també us he de dir, que això no és fàcil. Hi ha temes, que creieu-me, s'hi resisteixen molt.

Quan ens varen oferir participar en aquesta escomesa, la gent que formem l'Àrea Biologia de la Vinya i Viticultura, vàrem estar especialment contents, doncs dos terços dels membres que configurem aquest subgrup som fills de la Conca de Barberà. La Gemma Marsal és de l'Espluga de Francolí, i jo mateixa soc de Montblanc. Per tant no en tingueu cap dubte, que a part de la professionalitat que caracteritza qualsevol aportació que faci un Grup de Recerca de la nostra Universitat a la societat civil, també i podeu sumar "l'amor a la terra" de dos dels tres membres de l'Àrea Biologia de la Vinya del nostre Grup de Recerca.

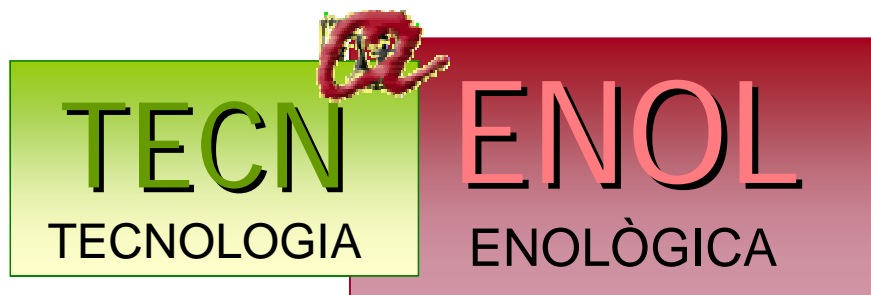
De les dues línies d'investigació que tenim encetades, avui us en fem cinc cèntims d'una d'elles. Concretament de la que anomenem: "Identificació i classificació de varietats de *Vitis vinifera* mitjançant diferents tècniques de Biologia Molecular (Microsatèl.lits i AFLP)". Del treball que us presentem, la primera part, va ser publicada a la revista *Dionysos* del Museu de Vi de Vilafranca del Penedès, el desembre de 2007. La segona part, que correspon a un exemple de com apliquem la tecnologia que us presentem, es tracta d'una conferència que vaig impartir el juliol de 2007 a la Universitat Politècnica de Catalunya. Llavors només treballàvem amb 11 microsatèl.lits, actualment treballem amb 20, i com és obvi pensar aquesta classificació de varietats catalanes tot i que ha sofert variacions per l'increment de marcadors analitzats, en aquest article ens servirà per a il·lustrar la tècnica utilitzada.

Ara només dir-vos que per a nosaltres és un plaer col·laborar amb iniciatives d'aquesta mena i que esperem, de tot cor, que aquesta publicació tingui una llarga durada.

Moltes Gràcies

Dra. Maria Francesca Fort Marsal

en nom del Grup de Recerca TECNENOL (Tecnologia Enològica)



DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Resum

Per a la identificació de varietats de *Vitis vinifera* existeixen diferents metodologies, des de la més antiga com l'ampelografia basada en la tria d'individus segons els seus caràcters morfològics (característiques externes), fins a les més novedoses basades en els Marcadors Moleculars. L'ampelografia utilitzada durant cents d'anys per a classificar varietats, ha estat inductora de diferents tipus d'errors que a voltes poden provocar greus confusions ja que es fonamenten en caràcters fàcilment modificables per l'ambient. En canvi les tècniques de Biologia Molecular basades en els Marcadors Moleculars, es fonamenten en la identificació genòmica (de l'ADN) de les diferents varietats de vinya i per tant en informació invariable. En aquest article es presenta la posada a punt d'una de les tècniques més utilitzades per a l'identificació i tipificació de varietats de *Vitis vinifera*, la tècnica anomenada SSR (Simple Sequence Repeats) o també coneguda com la tècnica dels Microsatèl·lits.

Resumen

Para la identificación de variedades de *Vitis vinifera* existen diferentes metodologías, desde la más antigua como la ampelografía basada en el reconocimiento de individuos según sus caracteres morfológicos (características externas), hasta las más novedosas basadas en los Marcadores Moleculares. La ampelografía utilizada durante cientos de años para clasificar variedades, ha sido la inductora de diferentes tipos de errores que a menudo provocan graves confusiones ya que se fundamentan en caracteres fácilmente modificables por el ambiente. En cambio, las técnicas de Biología Molecular basadas en Marcadores

Moleculares, consisten en la identificación genómica (del ADN) de las diferentes variedades de viña y por lo tanto en información invariable. En este artículo se presenta la puesta a punto de una de las metodologías más utilizadas para la identificación y tipificación de variedades de *Vitis vinifera*, la técnica denominada SSR (Simple Sequence Repeats) o también conocida como la técnica de los Microsatelites.

Abstract

There are several methodologies to identify varieties of *Vitis vinifera*, from the oldest, as is the ampelography, to the newest based on Molecular Markers. The basis of ampelography is the recognition of individuals according to their external morphological characteristics. For many years this methodology have been used to identify varieties despite it is based on parameters easily modified by the environment inducing errors that often lead to serious confusions. Nevertheless, Molecular Biology techniques (Molecular Markers) are based on the genomic identification (DNA) of vines varieties. This article presents the development of the main method used to the identification and characterization of *Vitis vinifera* varieties, the technique known as SSR (Simple Sequence Repeats) or Microsatellites.

Els microsatèl·lits o SSR com a eina per a la identificació de varietats

Catalina Baig ⁽¹⁾, Gemma Marsal ⁽¹⁾, Eloy Alfonso⁽¹⁾, Bet Janer⁽¹⁾, Joan Miquel Canals ⁽¹⁾, Tomàs Puig ⁽²⁾, Carles Sumarroca⁽²⁾, Fernando Zamora ⁽¹⁾ i Francesca Fort ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Tecnologia Enològica. Unitat d'Enologia del CERTA. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia de Tarragona. Universitat Rovira i Virgili. Carrer Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 TARRAGONA, correu-e: mariafrancesca.fort@urv.cat

⁽²⁾ Bodegues Sumarroca S.L.– El Rebato s/n. 08739 Subirats,

1. INTRODUCCIÓ

Durant els últims 20 anys, una intensa renovació varietal ha canviat la realitat vitícola, no només del nostre país sinó també de gran part de la vinya del món. Aquests canvis han condicionat el fet de que s'abandonés el conreu de nombroses varietats autòctones per a substituir-les per altres de més prestigi internacional (Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Ull de llebre, Chardonnay, Riesling entre altres) que estan presents per arreu.

Aquesta renovació varietal ha estat positiva, doncs ha permès revitalitzar i modernitzar el sector, afavorir les noves inversions i obrir nous mercats per als nostres vins. Però també, ha contribuït a que les característiques de la major part dels vins s'uniformitzessin, aconseguint que el concepte de tipicitat anteriorment atribuït a la zona de producció, es dil·luís en front a la creixent homogenitat dels vins.

Un altre aspecte a tenir en compte, és que de manera simultània a aquesta renovació varietal, s'ha desenvolupat una profunda renovació dels cellers elaboradors, de la tecnologia utilitzada en ells i una major formació dels enòlegs. Per tant, ens cal pensar que algunes de les varietats que varen ser desestimades per no oferir el nivell de qualitat requerit, o bé per no estar de moda, potser ho varen ser, per la falta de formació dels elaboradors o per les deficiències en les instal·lacions.

Avui en dia, que parlem cada cop més del concepte de Biodiversitat, sembla evident que existeix una necessitat de recuperar algunes d'aquestes varietats (o bé totes). També cal tenir

present, que un percentatge creixent de consumidors comença ha estar cansat de la homogenitat dels vins i reclama nous dissenys. Per tant, no en tenim cap dubte de que la utilització de varietats diferents pot ser molt útil per assolir aquestes finalitats. A BODEGUES SUMARROCA S.L., sensibilitzats per ambdues problemàtiques, amb el temps, ha anat creant una col·lecció ampelogràfica o germoplasma on s'hi conserven 338 varietats arribades de diversos països del món.

En la nomenclatura habitualment utilitzada per a la designació de les diferents varietats, existeix una gran quantitat de sinonímies (donar diferents noms a una mateixa varietat). Degut al gran nombre de varietats d'aquest germoplasma, és més que probable que algunes d'elles siguin en realitat la mateixa varietat, però amb diferent denominació. Per això, cal realitzar una identificació i una caraterització de les mateixes.

Fins fa relativament poc temps, només es podia caracteritzar una varietat en funció dels criteris morfològics gràcies a la ciència anomenada Ampelografia, això sovint convertia la seva classificació en una feina pesada, difícil i no del tot exacta. El desenvolupament de la Biologia Molecular, ha permès l'aparició de metodologies que permeten la identificació i classificació de diferents varietats viníferes. Tècniques com la utilització de RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), els SSR (*Simple Sequence Repeats*), els AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) o bé els RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), són perfectament aplicables a la finalitat descrita.

Per tant, l'objectiu fonamental del present article és el de donar a conèixer la tècnica dels SSR o també anomenats Microsatèl·lits per a la identificació varietal en *Vitis vinifera*. Per altra part, el fet de disposar d'un camp de varietats tan ampli com el que es planteja, ofereix també la possibilitat d'estudiar tot el conjunt d'aquestes varietats, sota un punt de vista evolutiu, en el que s'agrupen les varietats en funció de la seva proximitat genètica.

Per a il·lustrar la presentació d'aquesta tècnica i amb la finalitat de mostrar un exemple pràctic, us presentem el treball sobre varietats catalanes que la Dra. Fort va presentar en format de conferència dins del 5è Congrés de l'ICEA (Institució Catalana d'Estudis Agraris, filial de l'Institut d'Estudis Catalans), el passat mes de juliol a la Universitat Politècnica de Catalunya, campus Castelldefels.

1.1 PERQUÈ HEM TRIAT ELS SSR PER A IDENTIFICAR I CARACTERITZAR VARIETATS?

Thomas i col·laboradors en 1994, partint de les seves pròpies experiències en la identificació de varietats de *Vitis vinifera*, postulen que el millor sistema serà el que sigui capaç de complir amb les següents tres condicions:

- 1) que sigui un mètode d'identificació
- 2) que es tracti d'un bon sistema d'avaluació i estandardització de la població
- 3) que existeixi cooperació internacional perquè sistemàticament es puguin avaluat totes les col·leccions majors

Actualment les tècniques basades en Marcadors Moleculars per a la identificació i classificació de varietats existents, compleixen amb aquests requisits. De totes elles, les més utilitzades, com anteriorment s'ha esmentat, són els RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), els SSR (*Simple Sequence Repeats*), els AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y els RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

A l'hora de triar-ne una, caldrà valorar quins són les avantatges i inconvenients que ens presenten cadascuna d'elles. Como podem observar en la Fig. 1 triem els SSR perquè: **a)** són molt discriminatius, es per això que ens serviran per a diferenciar individus emparentats; **b)** presenten una complexitat baixa, per aquest motiu resulten ser molt fàcils d'usar i **c)** són molt reproduïbles, dades procedents de diferents laboratoris coincideixen.

INTRODUCCIÓ MARCADORS MOLECULARS				
MARCADOR	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
Discriminació	Moderada	Alta	Alta	Alta
Us	Fàcil	Fàcil	Moderada	Fàcil
Reproducibilitat	Bona	Pobre	Bona	Bona
Complexitat	Baixa	Baixa	Alta	Baixa

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
 RAPD: *Random Amplified Polymorphic ADN*
 AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*
 SSR: *Simple Sequence Repeats*


Departament de Bioquímica i Biotecnologia 

Figura 1. Esquema de les avantatges i inconvenients dels principals MM.

Mentre que els marcadors AFLP, RFLP i RAPD són eines útils per a diferenciar genotips i detectar polimorfisme en *Vitis vinifera*, els marcadors SSR són preferits per a la identificació de varietats (Thomas and Scott, 1993, Regner et al., 1996), ja que combinant dades procedents de diferents laboratoris, ens proporciona perfils únics d'ADN per a cada individu.

1.2 QUÈ SÓN ELS MICROSATÈLLITS?

Els microsatèl·lits (SSR) (Fig. 2): consisteixen en una petita unitat de repetició de seqüències simples o motius, de 1 a 6 nucleòtids (ex: (GA)_n, (GATA)_n (Sefc et al., 2001), amb una alta diversitat al·lèlica a causa del variable nombre de repeticions i que estan altament distribuïdes a través de tot el genoma eucariòtic (Thomas et al., 1993). El seu alt nivell de polimorfisme els ha fet marcadors invaluables per als diferents organismes (Morgante and Olivieri, 1993).

Sample Microsatellites
(repeat unit shown in red)

Mononucleotide: gtcAAA**AA**...AAAAAAAccg
Dinucleotide: tagCAC**ACA**...CACACAtgg
Trinucleotide: actCAG**ACAG**...CAGCAGta
Tetranucleotide: gcaCTTT**CTTT**...CTTTggc

Figura 2. Representació de diferents tipus de Microsatèl·lits o SSR.

Quan aquestes regions són individualment amplificades per mitjà de la PCR, utilitzant un parell d'oligonucleòtids franquejants com iniciadors, mostren casi invariablement polimorfisme a causa de les diferències en la seva longitud, com a conseqüència de l'aparició de diferents quantitats d'unitats de repetició o motius (Morgante and Olivieri, 1993)

L'existència de microsatèl·lits en l'ADN nuclear en plantes va ser demostrat per Delseny et al. 1983. En el raïm, una de les majors aplicacions dels marcadors de microsatèl·lits és la identificació de genotips (Sefc et al., 1998a; Thomas et al., 1994), per a facilitar el maneig de col·leccions de varietats i controlar el comerç de material vegetal.

2. DESENVOLUPAMENT DE LA TÈCNICA DE SEQÜENCIACIÓ

Per a dur a terme un estudi de classificació de varietats de *Vitis vinifera* es parteix de l'extracció de l'ADN de fulles o pàmpols mitjançant protocols d'extracció publicats en articles científics, o bé a partir de «Kits» comercials (que habitualment seran més ràpids). Un cop hem extret l'ADN i l'hem obtingut íntegre i pur, el següent pas ha de seguir és la realització d'una amplificació específica de la zona d'ADN on hi ha/n el/s microsatèl·lit/s que voldrem caracteritzar per a identificar i classificar les

varietats objecte d'estudi. Després podrem analitzar aquesta zona amplificada mitjançant el seqüenciador (Fig. 3).

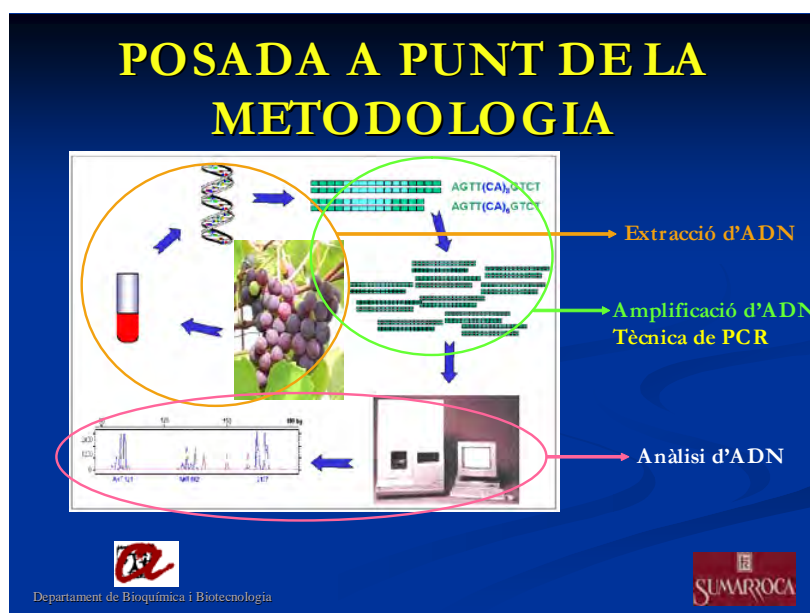


Figura 3. Etapes del desenvolupament de la tècnica dels Microsatèl·lits o SSR.

2.1 AMPLIFICACIÓ DE LA ZONA DELS MICROSATÈL·LITS

L'amplificació de la zona on hi ha/n el/s microsatèl·lit/s es realitza mitjançant una tècnica anomenada PCR («polymerase chain reaction»). Amb aquesta metodologia es poden produir en el laboratori múltiples còpies d'un fragment d'ADN específic, fins i tot en presència de milions d'altres molècules d'ADN. Com el seu nom indica, es basa en l'activitat de l'enzim ADN polimerasa que és capaç de fabricar una cadena d'ADN complementària a una altra ja existent. Els seus únics requeriments són (Fig. 4) que existeixin nucleòtids en el mitjà que són la matèria base per a fabricar l'ADN (els nucleòtids de adenina, timina, citosina i guanina), i una petita cadena d'ADN que pugui unir-se a la molècula que volem copiar perquè serveixi com a iniciador del procés (iniciador, en anglès «primer»).

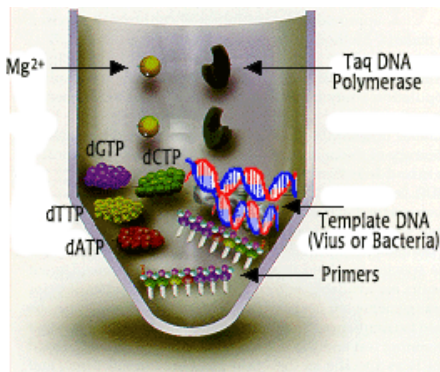


Figura 4. Detall d'un tub de PCR amb tots els components necessaris per a dur a terme la reacció.

La reacció en cadena de la polimerasa es desenvolupa en tres passos (Fig. 5):

- El primer és la separació de les dues cadenes que formen la molècula d'ADN que es vol amplificar, per a això s'ha d'escalfar el ADN a altes temperatures que poden ser pròximes a l'ebullició. Cadascuna d'aquestes cadenes actuarà com motlle per a fabricar el seu complementària.

A continuació es baixa la temperatura per a aconseguir que cada cebador s'uneixi a la seva regió específica dintre de la cadena de ADN.

- L'últim pas consisteix en la generació de la cadena de ADN complementària per acció de la ADN polimerasa. El problema amb el qual es van trobar els científics que van idear aquesta tècnica és que cal augmentar la temperatura de la barreja de reacció fins a valors per sobre dels 70°C perquè les dues cadenes de ADN se separin. A aquestes temperatures tan elevades la ADN polimerasa es inactivava i calia afegir-la de nou en cada cicle. Això va ser així fins que es va descobrir el bacteri *Thermus aquaticus* que viu en aigües termals i que la seva ADN polimerasa (Taq polimerasa) és capaç de treballar a temperatures superiors als 70°C . D'aquesta manera només cal afegir l'enzim a l'inici del procés de reacció i portar a terme tants cicles com sigui necessari. Cadascuna de les molècules de ADN filles poden tornar a entrar en el procés i servir com motlle per a fabricar més còpies. Així després de 20 cicles de reacció es pot obtenir fins a 1 milió de còpies d'una molècula de ADN (Fig. 6).

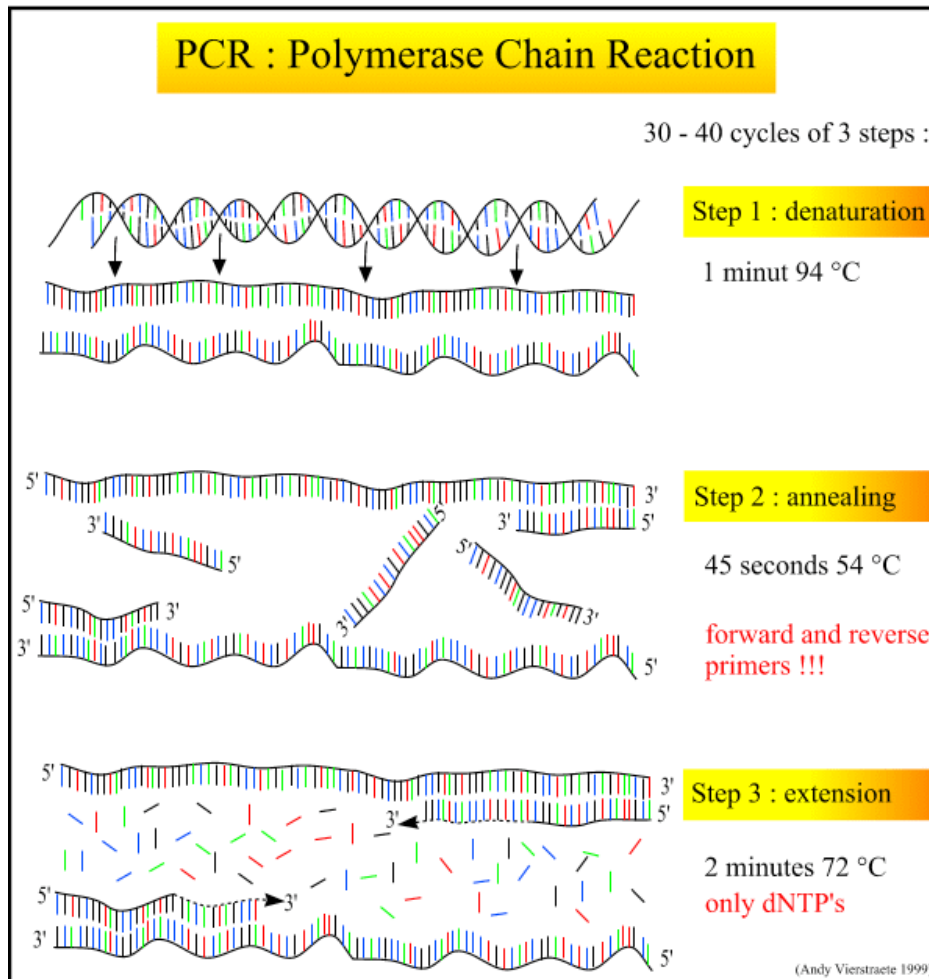


Figura 5. Etapes de desenvolupament de la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

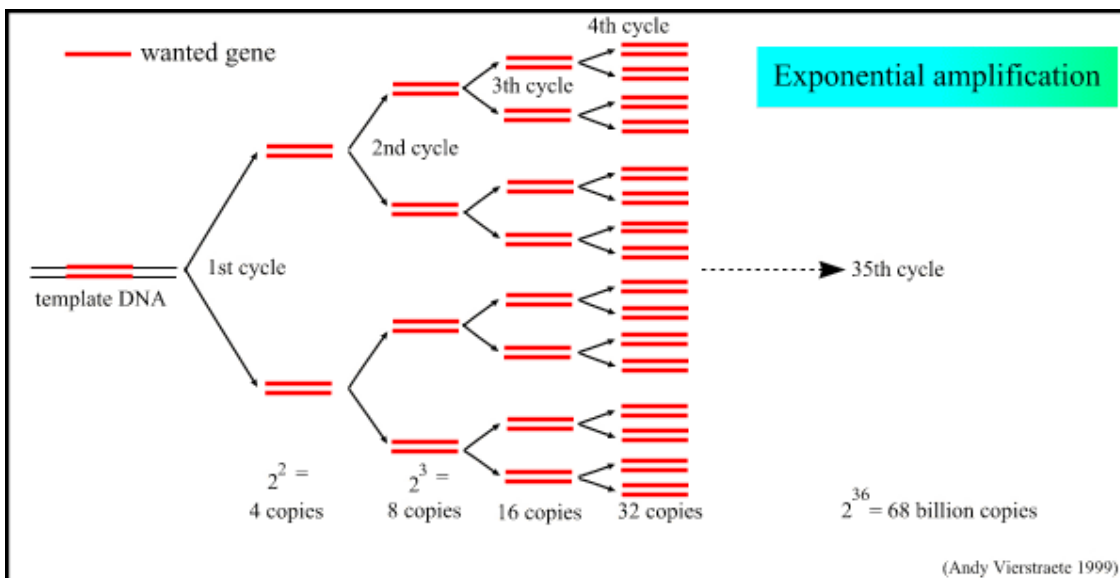


Figura 6. Desenvolupament de la PCR. En cada cicle el nombre de molècules filles creix progressivament geomètricament.

2.2 ANÀLISI DE LA ZONA D'ADN AMPLIFICADA

Al principi, la tècnica per a diferenciar individus consistia en la migració dels productes de PCR a través d'un gel de poliacrilamida, que era més discriminant que el gel d'agarosa a l'hora de diferenciar les bandes obtingudes. Actualment es compta amb equips de seqüenciació que ens substitueixen els gels d'agarosa o poliacrilamida permetent-nos analitzar les longituds dels fragments d'ADN, amb major precisió i menor risc.

La detecció dels amplimers es va fer mitjançant electroforesi capil·lar, utilitzant un seqüenciador automàtic ABI PRISM 310, (*Applied Biosystem (AB)*) (Fig. 7), i analitzats amb el programa GENESCAN (*analysis program ABI*) usant el marcador ROX 500 bp. Les condicions d'electroforesis van ser les següents: 60°C, 15µA i 15KV, el temps d'injecció de la mostra va variar de 5 a 15 segons, cada carrera va tenir una durada de 24 minuts. Per a determinar la grandària dels fragments, l'equip fa ús d'un estàndard de grandària, en aquest cas, el 500ROX (AB), amb valors de longitud fixa a: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 300, 340, 400, 450 i 490 bp, aquests valors serviran de referència perquè l'equip faci la seva corba de regressió i pugui determinar la grandària dels pics de la mostra per mitjà del programa GENESCAN, donant el resultat en parells de bases (Figura 8). Aquest estàndard s'ha de col·locar dintre de cadascuna de les mostres a córrer.

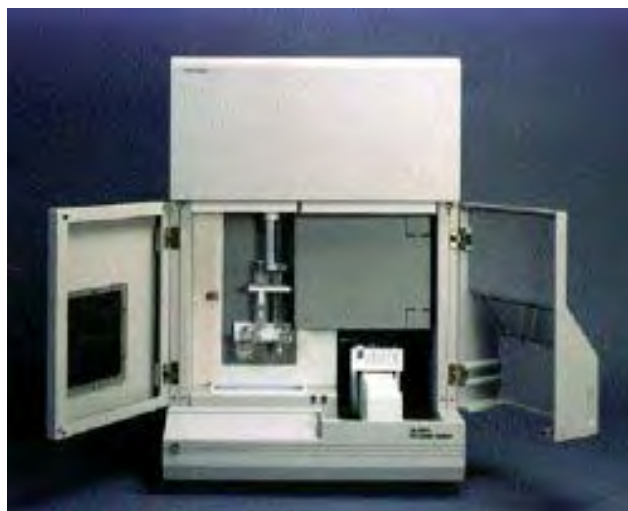


Figura 7. Seqüenciador ABI PRISM 310.

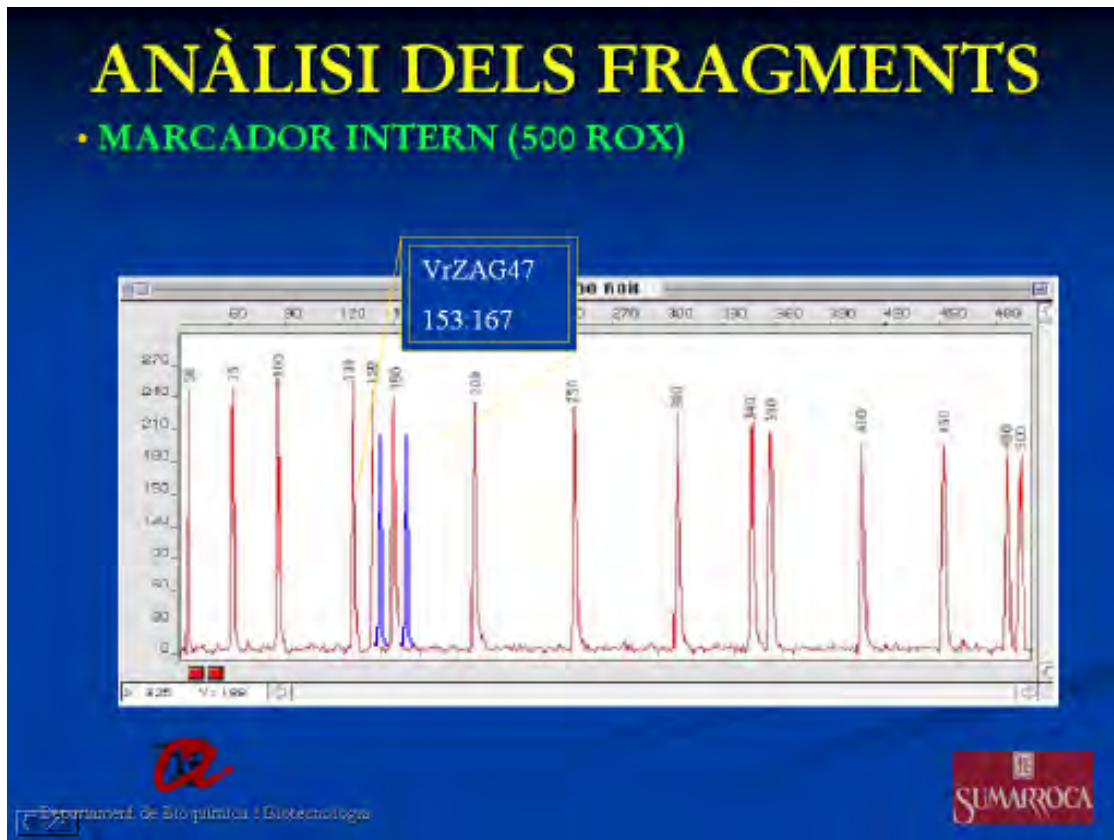


Figura 8. Exemple d'un electroferograma on es pot observar de color vermell el patró de grandària (500 ROX) i de color blau els dos al·lels de la mostra en qüestió.

Davant la impossibilitat de realitzar l'anàlisi de tots els microsatèl·lits en un sol vial, a causa del solapament per similitud de rangs de longitud, es va optar per dissenyar una matriu de dues carreres (Fig. 9), és a dir es van utilitzar dos vials per varietat, combinant microsatèl·lits, marcats fluorescentment, amb tres colors, (HEX: verd, 6FAM: blau, NED: groc; el quart color (el vermell), correspon a l'estàndard de grandària. (Fig. 8). L'equip mostra les dades en forma d'electroferogrames i taules numèriques, a partir de les quals es realitza l'obtenció dels valors finals dels pics analitzats. L'equip fa ús d'un polímer i un tampó específic, proporcionat per la casa comercial.

I

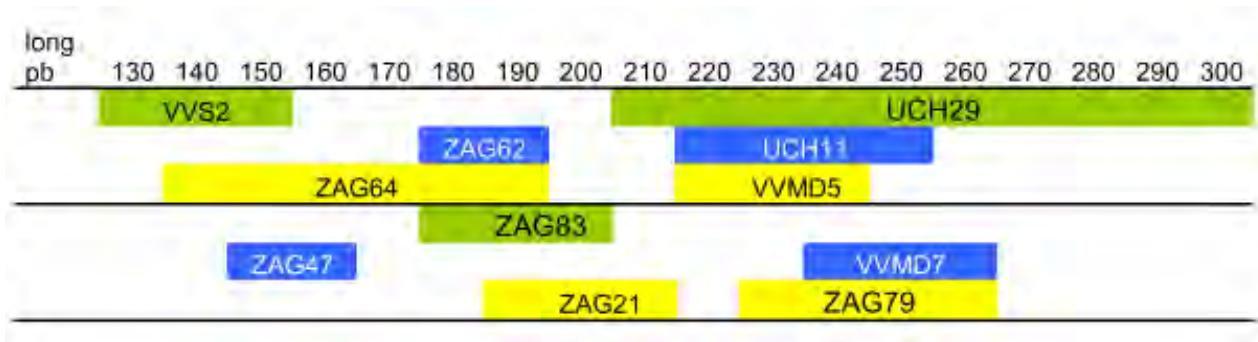


Figura 9. Matriu en dues carreres, segons els fluorocroms i rangs de longitud dels microsatélits.

- PREPARACIÓ DEL SEQÜENCIADOR (Figura 10)

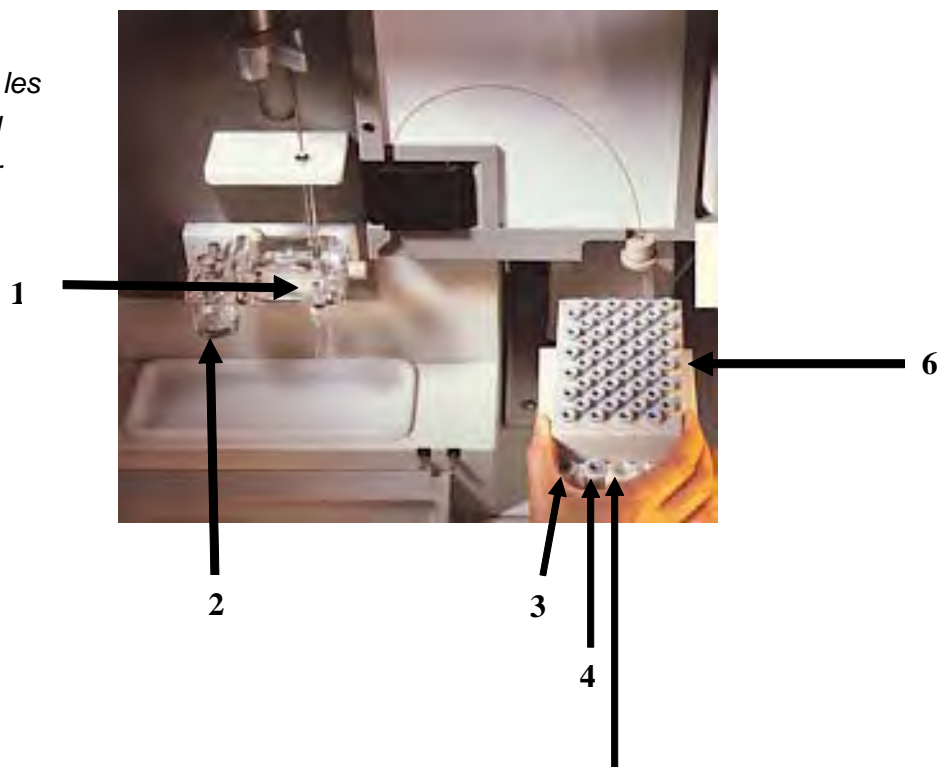
a) El capil·lar utilitzat és d'una longitud de 47 cm i s'omple de polímer POP-4 que serveix de base pel moviment del producte de PCR (posició 1).

b) Preparació de la solució Tampó: es mesclen 1500 µl de la solució Tampó EDTA 1x (AB) amb 13.5 ml d'aigua desionitzada (Milli-Q).

c) Introduïm la solució de Tampó en la posició 2 i 3. En la posició 4 i 5 s'hi afegeix aigua desionitzada que serveix per rentar el capil·lar entre dues injeccions.

d) Col·loquem les mostres en la gradeta (posició 6) i posteriorment ho posem en el seqüenciador.

Figura 10.
Identificació de les
posicions del
seqüenciador



- PREPARACIÓ DEL PROGRAMA DE SEQÜENCIACIÓ

- S'introdueixen el nom de totes les varietats en una llista en el *Sample Sheet* i s'assigna el color del microsatèl·lit que pertoca segons cada mostra, i el color de l'estàndard que sempre és el vermell.
- S'obre la fulla anomenada *Injection List* en la qual es dóna l'ordre d'injecció de totes les mostres i les condicions d'electroforesi. Prèviament a l'ordre de la injecció es fa un test anomenat test de 4 colors que ens indicarà l'estat del capil·lar, és a dir, la possibilitat que es detecti cada color per separat.
- Obtenció i interpretació dels resultats.

- INICI DE LES ANALÍTQUES

A l'inici es van processar vials que solament contenien un microsatèl·lit de la varietat Cabernet sauvignon (com a referència), amb la finalitat de confirmar que el pic obtingut en l'electroferograma coincidia amb la longitud esperada per a aquesta varietat, fent el contrast de les nostres dades amb els publicats per diferents autors. El resultat de tots els microsatèl·lits per a aquesta varietat va ser l'esperat i referenciat.

Un cop comprovat que els resultats d'una varietat coneguda són els correctes, iniciem l'anàlisi de les varietats d'interès.

Els resultats que obtindrem en el nostre *software* els visualitzarem tal com mostra la Figura 10. S'observa que no podem determinar d'una manera exacta els parells de bases del microsatèl·lit d'aquest exemple. Per tant, serà la regressió lineal la que ens mostrarà la longitud final exacta en parells de bases (Figura 11).



Figura 11.

Exemple de la regressió lineal que realitza el software de manera automatizada per mostrar exactament la longitud dels al·lels en parells de bases

3. BIBLIOGRAFIA

Delseny, M., Laroche, M., Penon, P. (1983) Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 113-120.

Lefort, F.; Kalliopi, K.A.; Roubelakis-Angelakis, K.A.(2001). Genetic comparison of Greek cultivars of *Vitis vinifera* L. By nuclear microsatellite profiling. *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2): 101-108.

Morgante, M.; Olivieri, A.M. (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3:175-182.

Regner F.; Steinkellner, H.; Turetschek, E.; Stadlhuber, A.; Glössl, J. (1996) Genetic characterization of grape (*Vitis vinifera*) cultivars by microsatellites analysis, Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung 46: 52-60.

Sefc, K.; Regner, F.; Glössl, J.; Steinkellner, H. (1998a) Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. *Vitis* 37:15-20.

Sefc, K.M., Lefort, F., Grando M.S., Scott K., Steinkellner H, Thomas M.R. (2001) Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*, K.A.Roubelakis-Angelakis editor, Kluwer Publishers, Amsterdam. pp 433-463.

Thomas, M. R.; Cain P.; Scott, N.S. (1994) DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* 25:939-949.

Thomas, M. R.; Scott, N.S. (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged site (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990.