



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Genética y Microbiología

**IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CROMOSÓMICAS
IMPLICADAS EN EL CONTROL GENÉTICO DE
CARACTERES DE INTERÉS PARA LA MEJORA
GENÉTICA DE LA UVA DE MESA**

Iván Carreño Ruiz

2012



**IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CROMOSÓMICAS
IMPLICADAS EN EL CONTROL GENÉTICO DE
CARACTERES DE INTERÉS PARA LA MEJORA
GENÉTICA DE LA UVA DE MESA**

Iván Carreño Ruiz

2012

Directores

Leonor Ruiz García

**Dpto. Biotecnología y Protección
de Cultivos**

Juan Carreño Espín

Dpto. Viticultura y Enología

To whom it may concern

Colmar, 30th August 2012

Report on the doctoral thesis of Ivan Carreño entitled "Identification of chromosomal regions involved in the genetic control of traits of interest for genetic improvement of table grape"

The general objective of the work developed by Ivan Carreño is to provide new knowledge and modern tools in order to get a better genetic control of the main traits (phenology, production and berry quality) in the table grape breeding process. For this purpose, he used Ruby Seedless x Muscatuel F1 progeny which was analysed, at the same time, with molecular markers for genotyping and by phenotyping phenology, production and berry quality traits. The data obtained allowed him to establish an integrated linkage map spanning 1190 cM on 19 linkage groups and then, to detect numerous QTLs for budbreak, flowering, veraison, fertility, cluster weight, berry weight, berry diameter and texture. More, Ivan Carreño proposed candidate genes putatively underlying the detected QTLs.

In conclusion, the objectives proposed and the methods used by Ivan Carreño are relevant and the results obtained are based on well-conducted experiments. The work developed reached perfectly the scheduled objectives. So, in my opinion, this work is a significant contribution to the investigation of grapevine breeding and genetics. This thesis is thus suitable to be presented to access to the doctor degree.



Dr Didier Merdinoglu, PhD

Research Director, Head of the Laboratory

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
CENTRE DE RECHERCHE DE COLMAR

28 Rue de Herrlisheim – BP 507 – 68021 COLMAR Cedex – Tel 03 89 22 49 00 - Fax 03 89 22 49 33

Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof
Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof

JKI, Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen, Germany



Julius Kühn-Institut

Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Federal Research Centre for Cultivated Plants

www.jki.bund.de

Bearbeiter/-in:

Fon: 0 63 45 / 41-117

Fax: 0 63 45 / 91 90 50

E-Mail: Ludger.hausmann@jki.bund.de

Ihr AZ:

Unser AZ:

Datum: 03.09.2012

Suitability Report

To whom it may concern:

As leader of the working group for Genome research at the JKI Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof I first met Mr. Iván Carreño Ruiz in 2009 when he spent three months at our institute. He impressed me with his profound and comprehensive knowledge about table grape genetics and breeding. During the time I noticed that he is an outstanding PhD student interested not only in his own research subject but also in related research fields and methods like for instance grapevine genomics and resistance breeding.

When Mr. Iván Carreño Ruiz presented me his doctoral thesis my opinion of his scientific work was fully confirmed. He identified several trait-linked molecular markers which could be very useful for marker-assisted selection in table grape breeding programs. He first established a genetic map of a table grape mapping population using latest marker techniques skillfully. Fifteen phenological and quality-related traits were phenotyped and replicated in four following seasons. Due to the excellent data mining and statistical validation of the data his QTL analysis led to solid and very valuable new results. Mr. Iván Carreño Ruiz achieved the proposed objectives since he applied the methods in an appropriate way. This work is a relevant contribution to the identification of genetic loci of agronomical important grapevine traits. The grapevine breeding community will benefit from it worldwide. Therefore, this work is suitable to be presented as a doctoral thesis.

Sincerely yours,

(Ludger Hausmann, PhD)



CENTRE DE MONTPELLIER

INRA UMR – AGAP
2 place Viala bât.21
34060 Montpellier cédex 1

Montpellier, le 29 août 2012

Votre correspondant : DR CHARLES ROMIEU
☎ +33(0)4.99.61.28.88
charles.romieu@supagro.inra.fr

Thesis Evaluation Report

In his document entitled *Identification of chromosomal regions involved in the genetic control of traits of interest for genetic improvement of table grape*, Ivan Carreno Ruiz presents a successful QTL analysis of a Ruby seedless x Moscatel progeny of 78 offsprings segregating, in particular, for different traits determinant for the quality of berries. Integration of QTL data with the physical map of grapevine allowed to find new candidate genes for phenological stages and quality fruit traits in table grape. The whole set of data and the discussion open new perspective both in the direction of the selection of new cultivars , and also on the genetic and physiological determinism of important berry attributes.

The proposed objectives are clearly stated, the methodologies used to reach them correspond to state of the art standarts, moreover, original ones are validated, which may interest research a large audience on other fruits. The results obtained are discussed within the frame of a pertinent analysis of the litterature, opening new perspectives, on the conceptual and methodological point of views.

This work makes a relevant contribution to the investigation of grapevine breeding and genetics and is suitable to be presented as a Doctoral Thesis

Dr CHARLES ROMIEU, Habilité à Diriger les Recheches.

Institut National de la Recherche Agronomique

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	vii
SUMMARY	xv
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	xxiii
ÍNDICE DE TABLAS	xxv
ÍNDICE DE FIGURAS	xxvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La vid	3
1.1.1. Origen de la vid	4
1.1.2. Genoma de la vid	5
1.2. Importancia socio-económica	8
1.3. La mejora genética en la uva de mesa: caracteres de interés	9
1.3.1. Caracteres fenológicos	10
1.3.2. Caracteres de productividad y calidad	18
1.4. Identificación de los determinantes genéticos responsables de caracteres de interés	27
1.4.1. Marcadores genéticos moleculares	28
1.4.1.1. Microsatélites (SSR, Simple Sequence Repeat)	30
1.4.1.2. SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)	31
1.4.2. Construcción de mapas de ligamiento	32
1.4.3. Mapas genéticos en vid	34
1.4.4. Mapeo de caracteres cuantitativos o QTLs (Quantitative Trait Loci)	37
1.4.5. QTLs en vid	40
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1. Material vegetal	53
3.2. Extracción de ADN	55
3.3. Marcadores moleculares	56
3.3.1. Marcadores tipo microsatélite (SSR, Simple Sequence Repeat)	56
3.3.1.1. Amplificación de las secuencias SSRs mediante PCR	56
3.3.1.2. Detección de los fragmentos amplificados marcados con fluorescencia	57
3.3.2. Marcadores tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	57
3.4. Análisis de ligamientos y construcción de mapas genéticos	58
3.4.1. Marcadores utilizados en la construcción de los mapas de ligamiento	58
3.4.2. Mapas de ligamiento generados	59
3.4.3. Construcción de los mapas de ligamiento	59
3.4.4. Estimación de los tamaños y coberturas de los mapas de ligamiento	60
3.5. Evaluación fenotípica	61
3.5.1. Caracteres fenológicos	61
3.5.2. Caracteres de productividad y calidad	62

3.5.3. Correlaciones y transformación de los datos	64
3.6. Análisis de QTLs (Quantitative Trait Loci)	64
4. RESULTADOS	67
4.1. Construcción de los mapas de ligamiento	69
4.1.1. Marcadores analizados y polimorfismos obtenidos	69
4.1.2. Nivel de heterocigosis	70
4.1.3. Distorsión en la segregación de los marcadores	71
4.1.4. Construcción de los mapas de ligamiento	72
4.1.4.1. Mapa saturado de Ruby Seedless	73
4.1.4.2. Mapa saturado de Moscatuel	74
4.1.4.3. Mapa integrado saturado	74
4.1.4.4. Mapa marco de Ruby Seedless	76
4.1.4.5. Mapa marco de Moscatuel	76
4.1.4.6. Mapa marco integrado	77
4.1.5. Comparación de los mapas de ligamiento desarrollados	77
4.2. Análisis de los determinantes genéticos que controlan los caracteres de interés en uva de mesa	89
4.2.1. Distribución de los caracteres fenotípicos	89
4.2.1.1. Caracteres fenológicos	89
4.2.1.2. Caracteres de productividad y calidad	92
4.2.2. Análisis de correlación de los caracteres fenotípicos	97
4.2.3. Identificación y localización de QTLs	101
5. DISCUSIÓN	121
5.1. Construcción de los mapas de ligamiento	123
5.1.1. Heterocigosis y distorsión de los marcadores analizados	123
5.1.2. Alineamiento y comparación de los mapas de ligamiento obtenidos	126
5.2. Análisis de los determinantes genéticos que controlan los caracteres de interés en uva de mesa	130
5.2.1. Caracteres fenológicos	132
5.2.2. Caracteres de productividad y calidad	138
6. CONCLUSIONES	153
7. CONCLUSIONS	159
8. BIBLIOGRAFÍA	165
9. ANEXOS	193
Anexo 1. Pedigrí de los parentales	195
Anexo 2. Genotipos de Ruby Seedless (R) y Moscatuel (M) para los 201 microsatélites estudiados	197
Anexo 3. Genes candidatos co-localizados con los QTLs detectados	199

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), por poner a mi disposición las instalaciones, medios técnicos e instrumentación necesarios para el desarrollo del trabajo experimental.

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la concesión de una beca-contrato predoctoral que ha permitido la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Consejería de Educación y Cultura de la Región de Murcia por la financiación de los trabajos realizados para la presente memoria de tesis, enmarcados dentro del proyecto de investigación BIO-AGR 06/03-0007 titulado 'Identificación y validación de marcadores moleculares para la selección de nuevas variedades de uva de mesa'.

A mi directora de Tesis, Leonor Ruiz García, persona a la que le debo más que esta Tesis, ya que de ella he aprendido mucho más que Genética Molecular, haciéndome crecer en más planos que el estrictamente científico. De corazón, gracias.

A mi director de Tesis, Juan Carreño Espín, cuyos sabios consejos me han ayudado a sortear grandes obstáculos durante este tiempo.

A mi tutor de la universidad, Victoriano Garre Mula, por su plena disposición.

A la Dra. Celia Martínez Mora por su ayuda con las extracciones de ADN, y a la Dra. Rosa Arroyo García por su colaboración en el genotipado con microsatélites.

Al Dr. José Miguel Martínez Zapater y al Dr. Diego Lijavetzky por el genotipado de la población con SNPs, financiado por la Fundación Genoma España dentro del proyecto de investigación GRAPEGEN, además de haberme enseñado tanto en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB), y de ser dos grandes referentes para mi desarrollo como científico.

De la gente que está o en su día estuvo en el CNB, me gustaría agradecer al Dr. José Antonio Cabezas y a la Dra. Maite De Andrés, además de su amistad, su inestimable ayuda en todo lo relacionado con el genotipado, la construcción de los mapas y análisis de QTL. Y al Dr. Javier Ibáñez por su plena disposición.

A la Dra. Eva Zyprian, persona que me acogió en Alemania como nunca hubiera imaginado, y de la que aprendí, además de otras técnicas de Genética Molecular, valentía, tranquilidad y versatilidad.

Me es imposible determinar la medida en que las personas que forman parte de mi vida han podido influir sobre la realización de esta Tesis. Quizá la única estimación posible es el tiempo en que estas personas han permanecido a mi lado. Es por ello que considero más oportuno seguir el orden cronológico en que entraron a formar parte de mi vida, y que sin ellas hubiera hecho este trabajo de otro modo, o no lo hubiera hecho. Así que en primer lugar están mis tres Ángeles: Silvia, Irene y Lucía, que han vivido de primera mano el agónico final, y que han hecho posible mi supervivencia emocional durante el mismo. La gente de Bullas que me acogieron y me salvaron la vida en mis estancias allí: Irene, Ángeles y María José, Pilar, José María Zagaleco, Isa, Kisko y tantos otros.... Los compis de tesis y desahogos varios, asiduos de la plaza de abastos: Celia, Almu, Goyo, Salva, Víctor Imposibiloginófilo, María, Lola, Luis, Carlos, ... María del Mar, el ser con el que compartí tanto, y al que le debo tanto. Los preciosos encuentros vitales con Tania y Lorenzo, y con Mavi y Taty, de esos que marcan a fuego para toda la vida. Es muy difícil que un alumno pueda querer tanto a su profesora de inglés, y sentir a su familia como suya. Gracias Carol. Se me encoje el corazón para mencionar a las dos Mariajos y a Espe, al Ayalica, La Rubia, Marti, Gema Lyder, y a tanta gente bella, como Nieves. Mis enormes Sola, Irene, Dela, John, Iñaki, Belén, Crespo, Carol, Esther, Josefina, Fuen ... compañeros de fatigas en tantas historias que merecerían otra Tesis. Josh y Andrés, hermanos que llenaron innumerables vacíos en mi persona. La gente de La Copa, mi primo mellizo Madriles, Mesones, Meriyous. Juan y Gregorio, Alfonso Miguel y David, como hermanos para mí, igual que Diana, Juenn, Patas, y mi gran Lechu.

Gracias a todos vosotros, con toda mi alma.

A mi Maestro, Manuel Juan Navarro. Un padre para mí, gran inspirador y ejemplar transmisor de los Grandes Valores, que me supo “picar” en su momento y aconsejar cuando más lo necesitaba.

Y a las personas que han hecho lo que soy, sin las cuales nada de esto hubiera sido posible, y a las que dedico esta Tesis Doctoral. A mis padres y a mis hermanos.

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más antiguos y con mayor importancia económica del mundo. Las principales variedades son altamente heterocigotas, por lo que la mejora de la vid se puede abordar mediante el cruzamiento de diferentes variedades o especies, y la selección en generaciones F_1 o posteriores de uno o varios de los mejores híbridos. La mayoría de los caracteres que son significativos en viticultura están controlados por un gran número de genes de efecto menor, junto con la influencia de las condiciones ambientales. La identificación temprana de individuos que portan las combinaciones alélicas deseadas permite a los mejoradores disponer de poblaciones más efectivas, dando como resultado un menor coste en el mantenimiento y evaluación. La identificación de genes y marcadores moleculares que controlan los caracteres de calidad acelerará el proceso de mejora creando nuevas oportunidades para la mejora de este cultivo.

Una aproximación hacia la optimización del proceso de mejora genética es la identificación de regiones cromosómicas, o QTLs (Quantitative Trait Loci), implicadas en el control genético de los caracteres de calidad, basada en el uso de mapas genéticos y la evaluación fenotípica de una progenie segregante. El objetivo del mapeo de QTLs es identificar el número y la localización de los determinantes genéticos responsables de la variación de caracteres cuantitativos en estudio y su estabilidad entre diferentes campañas. El ligamiento de marcadores con los caracteres heredables permite asociar el genotipo de un individuo con el fenotipo expresado, convirtiendo la selección asistida por marcadores en un proceso muy eficiente.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo del programa de mejora genética de la uva de mesa en el IMIDA es la obtención de nuevas variedades bien adaptadas a las condiciones climáticas de Murcia, y con una mejor composición genética. Dentro de dicho programa, se generó una población F_1 de 78 híbridos obtenida mediante el cruzamiento de Ruby Seedless y Moscatuel, cultivada en una parcela experimental del IMIDA. El objetivo de este trabajo es la identificación, en un mapa genético, de los principales factores determinantes de un carácter fenotípico dado, y su co-localización con la posición de secuencias de genes candidatos relacionados con el fenotipo. Para ello, hemos considerado dos objetivos específicos:

1. La construcción de mapas genéticos de vid a partir de una población F_1 obtenida del cruzamiento dirigido entre las variedades apirenas de uva de mesa, Ruby Seedless y Moscatuel.

2. El empleo de estos mapas y de los datos fenotípicos de la población para llevar a cabo un análisis QTL que permita identificar las regiones cromosómicas implicadas en el control genético de los caracteres de interés.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Este estudio se basa en una progenie F_1 de 78 híbridos obtenida mediante rescate de embriones (Carreño y col., 1997) a partir de un cruzamiento controlado entre las variedades de uva de mesa apirenas Ruby Seedless (parental femenino) y Moscatuel (parental masculino).

Ruby Seedless es una variedad apirena de maduración tardía (principios de septiembre), que muestra un índice de fertilidad de 1,5 (número de racimos por brote del año). Sus bayas son de tamaño mediano, color rojo, flavor neutro y textura media. Por su parte, Moscatuel es una variedad apirena de maduración algo más temprana (agosto), con un índice de fertilidad de 1,2. Presenta bayas de tamaño mediano, color amarillo, flavor moscatel y consistencia blanda. Por tanto, esta progenie segrega para algunos de los caracteres más importantes en uva de mesa, como la apirenia, textura, color, flavor moscatel, fecha de maduración y fertilidad.

Análisis de marcadores

La extracción de ADN total se llevó a cabo a partir de hojas jóvenes mediante el protocolo descrito por Hormaza (2002) o usando el kit comercial "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, IZASA, España), siguiendo el protocolo del fabricante.

Los parentales y la población de mapeo fueron genotipados usando marcadores microsatélite (SSR, Simple Sequence Repeat) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Se analizaron 335 marcadores SNP (Lijavetzky y col., 2007) en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen), de los cuales 105 resultaron informativos. Para los análisis con SSRs, primero se genotiparon 8 híbridos y los parentales con 201 loci (NCBI UniSTS GeneBank database). De acuerdo con su tipo de segregación, se seleccionaron 154 para llevar a cabo el mapeo. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis capilar usando un secuenciador multicapilar ABI Prism 3730, y los fragmentos fueron separados usando el programa GeneMapper (Applied Biosystems).

Construcción de los mapas de ligamiento

La construcción de los mapas genéticos se llevó a cabo con el programa informático JoinMap[®] 3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001), aplicando la función de Kosambi para estimar las distancias de mapa (Kosambi, 1944). Los marcadores que mostraron segregación distorsionada fueron incluidos en el mapa, a menos que afectaran significativamente al orden de marcadores circundantes. Los grupos de ligamiento (GLs) y el orden de los marcadores fue determinado usando umbrales de 3,0 para el LOD, y de 0,35 para la tasa de recombinación. Para el mapeo de QTLs se desarrollaron mapas marco usando solamente marcadores que estuvieran distribuidos de forma regular en los GLs y que fueran lo más informativos posible. Los GLs fueron numerados del 1 al 19 de acuerdo con Adam-Blondon y col. (2004).

Evaluación fenotípica

Se evaluaron quince caracteres para cada genotipo en tres o cuatro campañas (2005-2008). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 13.0 para Windows.

Caracteres fenológicos

La brotación fue evaluada como la fecha en que el 50% de los brotes estaban en el estado C de Baggiolini (Baggiolini, 1952), y la floración como la fecha en que el 50% de las flores estaban abiertas y con las anteras visibles. El envero se consideró como la fecha en la que el 50% de las bayas estaban coloreadas y/o ablandadas, y la maduración como la fecha en que las bayas tuvieran un índice de maduración (IM) entre 2 y 3. El IM se calculó como la relación entre el contenido de azúcar, medido en °Brix, y la acidez, medida como g/L de ácido tartárico.

Caracteres de productividad y de calidad

Los caracteres de productividad y de calidad fueron evaluados en la maduración, excepto el índice de fertilidad que fue evaluado antes de la floración. La fertilidad fue estimada como el número de inflorescencias por sarmiento del año. El peso del racimo fue calculado usando tres racimos representativos por genotipo, y el peso de las bayas fue calculado usando 100 bayas tomadas al azar por genotipo. El diámetro de las bayas (y) se calculó mediante la fórmula $y = ax + b$, donde ' x ' es el peso promedio de 100 bayas, y ' a ' y ' b ' se obtuvieron mediante una recta de regresión usando los datos del peso y del diámetro ecuatorial de 15 bayas por genotipo.

La textura se determinó con un analizador de textura TA.XT2. Se realizó un test de compresión a 20 bayas sin pelar por genotipo, en el que se midió la fuerza requerida (en Newtons) para deformar las bayas un 20% de su anchura en la posición ecuatorial. Además fue evaluada mediante la cata de 5 bayas, estableciendo tres clases fenotípicas: blanda, media y crujiente. El color de la piel de las bayas se determinó con un colorímetro Minolta Chroma Meter, modelo CR-300, usando el índice CIRG (Carreño y col., 1995). Se realizaron tres medidas en la región ecuatorial de 15 bayas por genotipo. Además el color fue evaluado de forma visual siguiendo el código 225 de la OIV. Para la apirenia, se extrajeron todas las semillas y/o esbozos seminales de 15 bayas por genotipo, se contaron y pesaron (peso fresco), se desecaron a 80 °C durante 48 horas y se volvieron a pesar (peso seco). Finalmente, el flavor moscatel fue evaluado mediante la cata de 5 bayas por genotipo tomadas al azar. Se establecieron cuatro categorías: flavor neutro, moscatel ligero, moscatel y moscatel fuerte.

Análisis de QTLs

El análisis de QTLs se llevó a cabo con el programa MapQTL[®] 4.0 (Van Ooijen y col., 2002). Se basó en tres métodos diferentes: el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (KW; Lehmann, 1975), el mapeo simple de intervalos (MI, Lander y Botstein, 1989) y el mapeo de QTLs múltiples (MQM, Jansen y Stam, 1994). Inicialmente, se identificaron posibles QTLs con los métodos KW y MI. Los umbrales de LOD a nivel de grupo de ligamiento y a nivel genómico fueron establecidos con un nivel de significación de $\alpha=0,20$, $\alpha=0,05$ y $\alpha=0,01$ mediante 1.000 permutaciones (Churchill y Doerge, 1994). Solo fueron tenidos en cuenta los QTLs sugerentes o significativos que fueron detectados en más de una campaña con MI. En las regiones detectadas se seleccionaron marcadores como cofactores para el análisis MQM. Cuando un nuevo QTL era detectado con este método, se añadían como cofactores los marcadores ligados a este QTL y se repetía el análisis hasta que no se detectaba ningún QTL nuevo. La posición del QTL fue estimada con la localización del valor máximo de LOD, y de un intervalo de confianza LOD-1. El efecto aditivo y la varianza fenotípica explicada por cada QTL fue estimada mediante el modelo MQM.

La distribución normal de los datos fue determinada con los test de Kolmogorov–Smirnov y Shapiro–Wilk. Los datos desviados significativamente de la normalidad con uno o ambos test fueron transformados siguiendo una escala de potencias (Hoaglin y col., 2000).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción de los mapas de ligamiento

De los 536 marcadores moleculares analizados, el número total de marcadores informativos fue de 259 (154 SSRs y 105 SNPs), de los cuales el 82% resultaron completamente informativos.

El mapa completo de Ruby Seedless constó de 180 marcadores moleculares distribuidos en 28 grupos de ligamiento (GLs), con un tamaño de 901 cM, una cobertura observada de 61% y una distancia promedio entre loci de 6 cM. Este mapa incluyó 5 intervalos mayores de 20 cM. El mapa completo de Moscatuel consistió en 171 marcadores moleculares distribuidos en 26 GLs, con un tamaño de 939 cM, una cobertura observada de 56% y una distancia promedio entre loci de 6,5 cM. Este mapa presentó 5 intervalos mayores de 20 cM. El mapa integrado tuvo un tamaño de 1.190 cM con 248 marcadores repartidos en 24 GLs, una cobertura observada de 64% y una distancia promedio entre loci de 5,3 cM. Este mapa incluyó 5 intervalos mayores de 20 cM. Los mapas marco desarrollados para el mapeo de QTLs tuvieron tamaños y coberturas similares a los mapas completos.

Evaluación fenotípica

La distribución de los datos fenotípicos fue muy similar en los años analizados. Se observó variación continua y segregación transgresiva para la mayoría de los caracteres evaluados.

Caracteres fenológicos

Los valores medios de brotación, floración, envero y maduración (días desde el 1 de enero) mostraron diferencias significativas entre los años estudiados. Estas diferencias señalan la influencia de los factores ambientales sobre estos caracteres. Ruby Seedless fue el parental más temprano para brotación y floración, mientras que Moscatuel lo fue para envero y maduración. La mayoría de la progenie mostró una brotación y maduración situada entre los dos progenitores, y una floración y envero más tardía que éstos.

Caracteres de productividad y calidad

Entre los caracteres de productividad y calidad, la fertilidad mostró la mayor influencia de los factores ambientales, probablemente porque está altamente determinada por la temperatura y la radiación solar que reciben las yemas el año anterior a la evaluación. El índice de fertilidad promedio de la progenie (0,93) fue inferior a los valores de ambos progenitores. Más del 70% de los híbridos mostraron

un peso de racimo fuera del rango establecido por los progenitores. El peso medio de las bayas de la progenie (3,91 gr) fue superior al de los parentales, y el diámetro osciló entre 13 y 23 mm. Solo el 10% de la progenie fue crujiente como Ruby Seedless, el 30% blanda como Moscatuel, y la mitad de la progenie tuvo textura media. El color de la piel fue amarillo para la mitad de los híbridos, como Moscatuel, y el resto fueron coloreados en diferente gradación. El 29% de la población presentó semillas, y el 71% fue apirena.

Correlación entre campañas

De los caracteres fenológicos, solo el envero presentó correlación significativa en todos los años evaluados, al igual que todos los caracteres de productividad y de calidad del fruto, excepto la fertilidad.

Correlación entre caracteres

Pocas correlaciones entre caracteres fueron significativas, con un coeficiente de correlación de Pearson (r) superior a 0,5. Muchas de ellas se dieron entre parámetros del mismo carácter. El tamaño de la baya correlacionó con el peso del racimo ($r > 0,5$) y con el número de semillas y peso de los componentes seminales, sugiriendo un efecto pleiotrópico del locus *SDI*.

Detección de QTLs

Los datos fenotípicos y los mapas marco (R, Ruby Seedles; M, Moscatuel; I, integrado) se emplearon para llevar a cabo los análisis de QTLs. Estos análisis se realizaron usando el modelo de QTLs múltiples (MQM) basado en los QTLs detectados al menos durante dos campañas mediante el mapeo simple de intervalos. Usando la información disponible de la vid, se identificaron algunos genes candidatos en las regiones detectadas. La búsqueda de genes candidatos se realizó en los intervalos de confianza de los QTLs. Muchos QTLs identificados en este trabajo fueron detectados previamente por otros autores.

Se identificaron cinco QTLs para la brotación, pero solo el de mayor efecto (hasta el 23% de la varianza total) detectado en el GL 12 fue significativo a nivel genómico. Aunque la región del GL 7 solo se detectó en una campaña y de forma sugerente, fue identificada por otros autores.

Detectamos cinco regiones responsables de la variación en el tiempo de floración, que explicaron entre el 5% y el 39,8% de la varianza total. Las regiones de los GLs 2, 14 y 15, identificadas en otras poblaciones, fueron detectadas consistentemente junto con la región superior del GL 18. Se encontraron cinco

genes relacionados con floración en los intervalos de confianza de algunos QTLs: *VvSOC1.3* en el GL 2, *VvFUL-L* y *VvSEP1* en el GL 14, *VvSOC1.1* en el GL 15 y *VvSVP2* en el GL 18 (región superior).

Los QTLs relacionados con el envero explicaron entre el 6% y el 18% de la varianza total. Los QTLs de los GLs 1, 3, 5, 17 y 18 fueron estables entre campañas. Las regiones detectadas de forma sugerente en los GLs 7 y 18 fueron descritas por otros autores. En el intervalo de confianza del QTL detectado en el GL 18 se localizaron los genes *VvMSA* y *VvABF7*.

La fecha de maduración resultó estar bajo el control de doce regiones genómicas, que explicaron entre el 7% y el 34,7% de la varianza total. Los QTLs de los GLs 1, 12 y 14 fueron detectados consistentemente de forma sugerente. La región detectada en el GL 18 fue identificada en otra progenie.

Para la fertilidad se identificaron once QTLs que explicaron entre el 7% y el 27% de la varianza total. Los QTLs de los GLs 5 y 14 fueron detectados consistentemente de forma sugerente y significativa, respectivamente. Ocho genes relacionados con fertilidad co-localizaron con los siguientes QTLs: *VvGID1b* en el GL 7_a, *VvAGL12* en el GL 12, *VvSVP2*, *VvAGL17.1*, *VvAP3.1* y un gen codificante de la citoquinina oxidasa CF404552 en el GL 18, y *VvGID1a* y *VvGASA4* en el GL 14.

Se detectaron seis QTLs para el peso del racimo, que explicaron entre el 6% y el 20% de la varianza total. Muchos de ellos fueron consistentes, pero con carácter sugerente. Los QTLs detectados en los GLs 5 y 16 fueron identificados en otra progenie.

Para el peso y el diámetro de las bayas se detectaron tres QTLs comunes, confirmando la correlación entre estos caracteres. El QTL identificado en el GL 18, consistente y significativo a nivel genómico, tuvo el mayor efecto (17%-46% de la varianza total).

La textura resultó estar bajo el control de trece regiones, que explicaron entre el 7% y el 24,5% de la varianza total. Los QTLs de los GLs 7, 9 y 18 se detectaron consistentemente con carácter sugerente. Muchos genes asociados al ablandamiento de las bayas (metabolismo y estructura de la pared celular, y acuaporinas) fueron localizados en el intervalo de confianza de los distintos QTLs.

Se confirmó la presencia de un QTL significativo de efecto mayor (52%-67% de la varianza total) para el color de las bayas, localizado en el GL 2. Los factores de transcripción *VvmybA1*, *VvmybA2* and *VvmybA3* localizaron en esta región. Además se detectaron QTLs de efecto menor en los GLs 16 y 17.

Para los parámetros relacionados con la apirenia se detectaron varios QTLs, de los cuales el único detectado a nivel genómico en el GL 18 tuvo un gran efecto (hasta el 91% de la varianza total), de acuerdo con otros autores. El gen *VvAGL11* localizó en esta región. Los QTLs detectados en los GLs 2 y 16 fueron identificados por otros autores.

Para el flavor moscatel se identificaron seis QTLs, siendo el único significativo a nivel genómico el localizado en el GL 5. Este QTL explicó hasta el 77% de la varianza, y fue detectado en otras progenies. El gen *VvDXS* localizó en esta región. El QTL de efecto menor detectado en el GL 10 fue identificado por otros autores.

Conclusión

De los resultados anteriores deducimos que el cruzamiento entre Ruby Seedless y Moscatuel puede generar una gran variabilidad fenotípica, que puede ser útil en el desarrollo de nuevas variedades con características mejoradas. El análisis conjunto de los datos fenotípicos y las variaciones genotípicas de los loci SSR y SNP nos permitió identificar varios QTLs para estados fenológicos y caracteres de productividad y calidad del fruto en uva de mesa. Estos resultados abren nuevas perspectivas para futuros estudios del control genético de estados fenológicos y caracteres de productividad y calidad en vid.

SUMMARY

1. INTRODUCTION

Grape (*Vitis vinifera* L.) is one of the most ancient and economically important crops worldwide. The main cultivars are highly heterozygous, so grapevine breeding involves the crossing of heterozygous parents of different cultivars or species, and the selection in the F₁ or later generations for one or a few of the best hybrids. Most of the grapevine characters that are significant in viticulture are controlled by a large number of genes of minor effect, together with influences of the environment. Early identification of individuals carrying the desired allele combinations allows breeders to grow larger effective populations, which results in decreasing maintenance and evaluation costs. The identification of genes and molecular markers underlying quality traits will help accelerate the breeding process creating new opportunities for crop improvement.

An approach towards the improvement of conventional breeding is the identification of chromosomal regions or QTL (Quantitative Trait Loci) involved in the genetic control of quality traits, based on genetic maps and phenotypic evaluation of a segregating progeny. The purpose of QTL mapping is to identify the number and location of the genetic determinants responsible for the variation of the quantitative traits under study and their stability among different years. The linkage of markers with heritable traits is used to associate the genotype of an individual with the expressed phenotype, and would make marker-assisted selection (MAS) very efficient.

2. OBJECTIVES

The main objective of the table grape breeding program at the IMIDA is to obtain new cultivars well adapted to Murcia's climate conditions and with better genetic composition. With this purpose, a Ruby Seedless x Moscatuel F₁ progeny of 78 hybrids was generated, maintained and cultured in the field at the IMIDA. The goal of this work is the identification of the major genetic determinants for a given phenotypic trait in genetic maps and their co-localization with the position of candidate gene sequences related to the relevant phenotype. For this purpose, we considered two specific objectives:

1. The construction of grapevine genetic maps using a progeny derived from a controlled cross between the seedless table grape cultivars Ruby Seedless and Moscatuel.

2. Use these maps and the phenotypic data of the progeny for QTL analyses in order to develop helpful markers for breeding programs.

3. MATERIAL AND METHODS

Plant material

This study is based on a F₁ progeny of 78 hybrids obtained via embryo rescue (Carreño et al. 1997) from controlled crosses between the seedless table grape cultivars Ruby Seedless (female progenitor) and Moscatuel (male progenitor).

Ruby Seedless is a late-maturing seedless variety with a fertility index of about 1.5 (number of clusters per year shoot). Berries are red, medium-sized, medium-textured and with neutral taste. On the other hand, Moscatuel is a mid-maturing seedless variety with a fertility index of 1.2. Berries are yellow, medium-sized, soft and with intense muscat taste. Therefore, this progeny segregates for some of the most important traits in table grape, like seedlessness, berry texture, color, muscat flavor, ripening time and fertility.

Marker Analysis

Total DNA extraction was performed from young leaves according to the protocol described by Hormaza (2002) or using the commercial kit "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, IZASA, España), following the manufacturer's protocol.

Parents and mapping population were genotyped using microsatellite (SSR, Simple Sequence Repeat) and SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers. Three hundred and thirty-five SNP markers (Lijavetzky et al., 2007) were analyzed in the Spanish National Genotyping Centre (CeGen), resulting informative for linkage mapping one hundred and five of them. For SSR analyses the genitors and 8 progeny individuals were first genotyped at 201 loci (NCBI UniSTS GeneBank database). One hundred and fifty-four of them were selected for linkage mapping according to their segregation type. PCR products were separated by capillary electrophoresis using an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer sequencer, and fragments were sized using GeneMapper software (Applied Biosystems).

Genetic Linkage Map

Genetic mapping was performed with JoinMap[®] 3.0 software (Van Ooijen and Voorrips, 2001) applying the Kosambi function for the estimation of map distances (Kosambi, 1944). Markers showing distorted segregation were originally included in the map calculation unless they significantly affected the order of neighboring markers. Linkage groups (LGs) and marker order were determined

using threshold values of 3.0 for LOD and 0.35 for recombination rate. For QTL mapping, framework maps were also developed using only markers evenly distributed along LGs and fully informative when possible. The LGs were numbered from 1 to 19 according to Adam-Blondon et al. (2004).

Phenotypic evaluation

Fifteen segregating agronomic traits were evaluated for each genotype in three or four seasons (2005-2008). All statistical analyses were performed using SPSS 13.0 for Windows.

Phenological traits

Budbreak was measured as the date when 50% of the buds were in Baggiolini stage C (Baggiolini, 1952), and flowering as the date when 50% of the flowers were opened and the anthers were visible. Veraison was considered as the date when 50% of the berries were coloring and/or softening, and ripening as the date when most berries have a maturity index (MI) between 2 and 3. The MI is calculated as the ratio between sugar content, measured in °Brix, and acidity, measured as g/L of tartaric acid.

Productive and quality traits

Productive and quality traits were evaluated at harvest (ripeness), except the fertility index which was scored before flowering. Fertility was scored as the number of inflorescences per young shoot. Cluster weight was calculated using three representative clusters per genotype, and berry weight was calculated using 100 berries taken randomly per genotype. Berry diameter (y) was calculated by the formula $y = ax + b$, where 'x' is the average weight of 100 berries, and 'a' and 'b' were obtained through a regression line using data from the weight and the equatorial diameter of 15 berries per genotype.

Texture was determined by a TA.XT2 texture analyser. The compression test of 20 unpeeled berries per genotype was carried out by measuring the required force (in Newton) to get 20% deformation of their height in their equatorial position. Also, it was evaluated by tasting 5 berries per genotype and their classification into 3 phenotypic classes: soft, medium and crispy. Berry skin color was determined with a colorimeter Minolta Chroma Meter, CR-300 model and using the CIRG index (Carreño et al., 1995). Three measurements were done in the equatorial zone of 15 berries per genotype. Also, skin color was visually divided following the code OIV 225. For seedlessness, all the seeds and/or seed rudiments of 15 berries per

genotype were extracted, counted, weighted (fresh weight), dried at 80 °C during 48 hours and weighted again (dry weight). Finally, muscat flavor was evaluated by tasting 5 berries taken randomly per genotype. Four categories were established: neutral flavor, slight muscat, muscat and strong muscat.

QTL analysis

QTL analysis was done using MapQTL[®] 4.0 software (Van Ooijen et al., 2002). It was based on three different methods: Kruskal-Wallis nonparametric test (KW; Lehmann, 1975), simple interval mapping (SIM; Lander and Botstein, 1989) and multiple QTL mapping (MQM; Jansen and Stam, 1994). Initially, possible QTLs were identified by the KW and SIM methods. Both genome-wide and linkage-group-wide LOD thresholds corresponding to a significance level of $\alpha=0.20$, $\alpha=0.05$ and $\alpha=0.01$ were established through 1,000 permutations (Churchill and Doerge, 1994). Only significant or suggestive QTLs detected with SIM in more than 1 growing season were considered. Then scored markers in those regions were used as cofactors in MQM analysis. When a new QTL was found in this way, markers linked to this QTL were added as cofactors and the search was reiterated until no new QTL could be detected. QTL position was estimated from the location of the maximum LOD value with a 1-LOD support interval. Additive effect and percentage of phenotypic variance explained by each QTL were estimated from the MQM model.

Data was tested for normality with both the Kolmogorov–Smirnov and the Shapiro–Wilk tests. Data significantly deviated from normality were transformed following a power scale (Hoaglin et al., 2000).

4. RESULTS AND DISCUSSION

Linkage maps construction

Out of 536 molecular markers analyzed, the total number of informative markers was 259 (154 SSRs and 105 SNPs), of which 82% were completely informative markers

The complete linkage map of Ruby Seedless consisted of 180 molecular markers distributed in 28 linkage groups (LGs) covering 901 cM, with an observed coverage of 61% and an average distance between loci of 6 cM. This map included 5 intervals longer than 20 cM. The complete linkage map of Moscatuel consisted of 171 molecular markers distributed in 26 LGs covering 939 cM, with an observed coverage of 56% and an average distance between loci of 6.5 cM. This map included 5 intervals longer than 20 cM. The integrated map covered 1,190 cM with 248 markers at an average distance between loci of 5.3 cM, and an observed

coverage of 64%. This map included only 1 interval longer than 20 cM. The framework maps developed for QTL mapping had similar size and coverage than the corresponding complete maps.

Phenotypic evaluation

The phenotypic data distributions were very similar in the analyzed years. Continuous variation and transgressive segregation were observed for most of the evaluated characters.

Phenological traits

The mean values of budbreak, flowering, veraison and maturity (days since 1st January) showed significant differences among the years of the study. These differences show the influence of the environmental conditions on these traits. Ruby Seedless was the earlier parent for budbreak and flowering, while Moscatuel was the earlier parent for veraison and maturity. Most of the progeny showed a budbreak and ripening situated between both progenitors, and a flowering and veraison later than both parents.

Productive and quality traits

Among productive and quality traits, fertility showed the highest influence of the environmental factors probably because is largely determined by temperature and solar radiation received by the buds during the season before the evaluation. The mean fertility index (0.93) of the progeny was lower than the values of both progenitors. Over 70% of the hybrids showed a cluster weight outside the range established by the values of both progenitors. The mean berries weight (3.91 g) of the progeny was higher than the values of both progenitors, and the berry diameter oscillated among 13 and 23 mm. Only 10% of the progeny was crispy as Ruby Seedless, 30% soft as Moscatuel and half of the progeny was medium textured. The skin color was yellow for the half of the progeny, as Moscatuel, and colored for the rest in different gradation. We can classify 29% of the progeny as seeded, while 71% were seedless.

Correlation between years

Correlation between all studied years was significant only for veraison among phenological traits, and for all productive and quality traits except for fertility.

Correlation between traits

Few correlations between traits were significant, with Pearson coefficient (r) higher than 0.5. Many of them concerned the parameters of the same character. Moreover, berry size correlated with cluster weight ($r > 0.5$) and also with the number of seeds and weight of seminal components, as previously reported, suggesting a pleiotropic effect of the *SDI* locus.

QTL detection

Phenotypic data and framework maps (R, Ruby Seedles; M, Moscatuel; I, integrated) were used to perform QTL analysis. QTL analyses were carried out using a multiple QTL model (MQM) based on QTLs detected at least during two previous seasons via interval mapping. Using the available grapevine information, several candidate genes underlying QTLs were identified. The search for candidate genes was performed within the confidence intervals calculated for the QTLs. Many of the QTLs identified in this work were previously detected by other authors.

Five QTLs were found for budbreak, but only the QTL on LG 12 was consistently significant at genome-wide level, and had the largest effect (up to 23% of total variance). Although the region on LG 7 was detected only one year at linkage-group level, it was reported by other authors.

We detected five regions responsible for the variation in flowering time, explaining between 5% and 39.8% of total variance. Regions on LGs 2, 14 and 15 were found in other segregating populations, and were consistently detected along with that identified on the upper part of LG 18. Five genes linked to the flowering process were found within the confidence intervals of detected QTLs: *VvSOC1.3* on LG 2, *VvFUL-L* and *VvSEP1* on LG 14, *VvSOC1.1* on LG 15 and *VvSVP2* on LG 18 (upper part).

The QTLs detected for veraison explained between 6% and 18% of total variance. QTLs on LGs 1, 3, 5, 17 and 18 were stable over years. Regions detected at linkage-group level on LGs 7 and 18 were reported by other authors. *VvMSA* and *VvABF7* genes were found within the confidence interval of the QTL detected on LG 18.

Ripening date resulted under the control of twelve genomic regions, explaining between 7% and 34.7% of total variance. The QTLs on LGs 1, 12 and 14 were consistently detected at linkage-group level. The region detected on LG 18 was found in another segregating progeny.

Eleven QTLs were detected for fertility explaining between 7% and 27% of total variance. The QTLs on LGs 5 and 14 were consistently detected at linkage-

group and genome-wide level, respectively. Eight genes linked to the fertility process co-located with the following QTLs: *VvGID1b* on LG 7_a, *VvALG12* on LG 12, *VvSVP2*, *VvALG17.1*, *VvAP3.1*, and a gene coding for citoquinin oxidase CF404552 on LG 18, and *VvGID1a* and *VvGASA4* on LG 14.

Six QTLs for cluster weight were detected, explaining between 6% and 20% of total variance. Many of them were consistently significant only at linkage-group level. However, the QTLs detected on LGs 5 and 16 were also identified in another progeny.

Three QTLs for both weight and diameter of berries were detected, confirming the phenotypic correlation between these traits. The QTL identified on LG 18 was consistently significant at genome-wide level and had the largest effect (17%- 46% of total variance).

Thirteen QTLs for texture were detected on different linkage groups, explaining between 7% and 24.5% of total variance. QTLs on LGs 7, 9 and 18 were consistently detected at linkage-group level. Many genes associated to berry softening (cell wall structure and metabolism, and aquaporins) were located within the confidence interval of all QTLs, so that could be considered as exploratory information.

One QTL with major effect (52%- 67% of total variance) was confirmed for berry color on LG 2 at genome-wide level (99%). The transcription factors *VvmybA1*, *VvmybA2* and *VvmybA3* were located within this region. Also two QTLs of minor effect were detected on LG 16 and LG 17.

Several QTLs were detected for all seedlessness-related parameters, but the only one identified on LG 18 had a large effect (up to 91% of total variance) at genome-wide level, in agreement with other authors. The *VvAGL11* gene was located within this region. Two minor QTLs detected on LGs 2 and 16, were previously identified by other authors.

Six QTLs for muscat flavor were detected, being the identified on LG 5 the only one significant at genome-wide level. This QTL explained up to 77% of total variance, and was also detected in other progenies. The *VvDXS* gene was located within this region. One minor QTL detected on LG 10, was also identified in others studies.

Conclusion

From the above results we deduce that crossing Ruby Seedless and Moscatuel can generate a large phenotypic variability that may be useful in the development of new cultivars with improved attributes. The joint analysis of these

phenotypic data and of genetic variations at SSR and SNP loci allowed us to identify several QTLs for phenological stages and productivity and quality fruit traits in table grape. Candidate genes were found in the confidence intervals of some of these QTLs. These results open new perspectives for future studies on the genetic determinism of phenological stages and productivity and quality traits in grapevine.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
CAPs	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CeGen	Centro Nacional de Genotipado
cm	Centímetro
cM	Centimorgan
CNB	Centro Nacional de Biotecnología
DHPLC	Denaturing High-Performance Liquid Chromatography
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
ESTs	Expressed Sequence Tags
G	Fuerza G centrífuga
g	gramo
GL	Grupo de ligamiento
ha	Hectárea
IGGP	International Grape Genome Project
IM	Índice de maduración
IMIDA	Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
Kb	Kilobase
KW	Kruskal-Wallis
L	Litro
LOD	Likelihood ratio; Logarithm of odds
M	Molar
m	Metro
m.a.	Millones de años
Mb	Megabase
mg	Miligramo
MI	Mapeo simple de intervalos
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MQM	Multiple QTL Mapping / Marker-QTL-Marker
μM	Micromolar
μL	Microlitro
ng	Nanogramo
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAMPL	Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
seg	Segundo
SIM	Simple Interval Mapping
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSCP	Single Stranded Conformational Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
S-SAP	Sequence-Specific Amplification Polymorphism
STR	Short Tandem Repeat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Temperatura de anillamiento teórica
U	Unidad
U/ha	Unidad fertilizante por hectárea = Kilogramo por hectárea
V	Voltio
VMC	Vitis Microsatellite Consortium



ÍNDICE DE TABLAS

3. MATERIAL Y MÉTODOS		Pág.
Tabla 3.1	Transformaciones realizadas según la escala de potencias en función del tipo de asimetría encontrada en los datos	64
4. RESULTADOS		
Tabla 4.1.1	Descripción de los marcadores moleculares analizados para la construcción de los mapas de ligamiento	70
Tabla 4.1.2	Nivel de heterocigosis en loci de microsatélites desglosados por GL	71
Tabla 4.1.3	Características de los mapas de ligamiento desarrollados	75
Tabla 4.1.4	Tamaños y coberturas de los mapas de ligamiento generados	78
Tabla 4.2.1	Parámetros principales de los caracteres fenológicos evaluados	91
Tabla 4.2.2	Parámetros principales de los caracteres de productividad y calidad evaluados	96
Tabla 4.2.3	Matriz de correlación de Pearson del mismo carácter entre las distintas campañas	98
Tabla 4.2.4	Matriz de correlación de Pearson de los caracteres fenológicos en las distintas campañas evaluadas	99
Tabla 4.2.5	Matriz de correlación de Pearson de los caracteres de productividad y calidad en las distintas campañas evaluadas	100
Tabla 4.2.6	Matriz de correlación de Pearson del envero con variables relacionadas con el grado de apirenia	100
Tabla 4.2.7	Descripción de los QTLs detectados para el tiempo de brotación	102
Tabla 4.2.8	Descripción de los QTLs detectados para el tiempo de floración	103
Tabla 4.2.9	Descripción de los QTLs detectados para el tiempo de envero	104
Tabla 4.2.10	Descripción de los QTLs detectados para el tiempo de maduración	106
Tabla 4.2.11	Descripción de los QTLs detectados para la fertilidad	108
Tabla 4.2.12	Descripción de los QTLs detectados para el peso medio del racimo	109
Tabla 4.2.13	Descripción de los QTLs detectados para el peso medio de las bayas	110
Tabla 4.2.14	Descripción de los QTLs detectados para el diámetro medio de las bayas	112
Tabla 4.2.15	Descripción de los QTLs detectados para la textura de las bayas	113
Tabla 4.2.16	Descripción de los QTLs detectados para el color de las bayas	115
Tabla 4.2.17	Descripción de los QTLs detectados para el número de semillas	116
Tabla 4.2.18	Descripción de los QTLs detectados para el peso fresco de las semillas y/o esbozos seminales por baya	117
Tabla 4.2.19	Descripción de los QTLs detectados para el peso seco de las semillas y/o esbozos seminales por baya	117
Tabla 4.2.20	Descripción de los QTLs detectados para el número total de semillas y/o esbozos seminales por baya	118
Tabla 4.2.21	Descripción de los QTLs detectados para el flavor moscatel	119
5. DISCUSIÓN		
Tabla 5.1.1	Grado de heterocigosis de los SSRs analizados en distintos fondos genéticos del género <i>Vitis</i>	124
Tabla 5.1.2	Porcentaje de marcadores con segregación distorsionada en mapas desarrollados a partir de distintos fondos genéticos de <i>Vitis</i>	125
Tabla 5.1.3	Características de los mapas de vid publicados hasta el momento	129



ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN	Pág.
Figura 1.1.1. Escenario de la evolución de las angiospermas (Velasco y col., 2007)	7
Figura 1.1.2. Posición de los eventos de poliploidización en la evolución de las plantas con genoma secuenciado. (Jaillon y col., 2007)	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
Figura 3.1. Características principales de las variedades utilizadas como parentales en la generación de la población de mapeo (Antonacci, 1991)	54
4. RESULTADOS	
Figura 4.1.1 Mapas de ligamiento de Ruby Seedless (R), Moscatuel (M) e integrado (RM)	80
Figura 4.2.1 Distribución media de los caracteres fenológicos estudiados (05-08)	90
Figura 4.2.2 Distribución media de los caracteres de productividad y calidad estudiados (05-08)	94

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La vid

La vid es uno de los cultivos más antiguos y de mayor importancia económica del mundo. Procedente de Asia, se cultiva en todas las regiones templadas. El producto principal derivado de sus frutos, el vino, fue considerado divino, una bebida de los dioses. Además de la elaboración de vino y otras bebidas alcohólicas, sus bayas se utilizan para consumo en fresco (uva de mesa) o pasificadas, y para la obtención de zumos. Se describe como una planta vivaz y trepadora, con tronco retorcido, vástagos muy largos, flexibles y nudosos, que se fija a tutores naturales mediante órganos especializados llamados zarcillos, opuestos a las hojas. Las hojas son alternas, pecioladas, grandes y partidas en cinco lóbulos puntiagudos. Sus flores son verdosas, pequeñas, regulares, con estambres opuestos a los pétalos y pistilo con dos carpelos (Mullins y col., 1992; Hidalgo, 2002). Las variedades cultivadas poseen en general flores hermafroditas, mientras que las formas silvestres son dioicas, con plantas de flores femeninas y plantas de flores masculinas (Srinivasan y Mullins, 1976). Su fruto es la uva, una baya o grano más o menos redondo y jugoso que forma racimos. Esta baya está constituida por una película exterior denominada hollejo (epicarpio), la pulpa (mesocarpio), y el endocarpio, que contiene un máximo de cuatro pepitas, aunque hay variedades, como Red Globe, que pueden contener hasta seis.

El encuadre taxonómico la sitúa dentro de la división Magnoliophyta, clase Magnoliatae, subclase Rosidae, superorden Celastranae, orden Rhamnales, familia Vitaceae y género *Vitis*. El género *Vitis* es el de mayor importancia agronómica dentro de la familia de las Vitáceas. Originario de las zonas cálidas o templadas del hemisferio norte de América, Europa y Asia, está formado aproximadamente por unas 60 especies interfértiles (This y col., 2006). Según Galet (1967), en el género *Vitis* se diferencian dos secciones o subgéneros: *Muscadinia* y *Euvitis*.

El subgénero *Muscadinia* incluye tres especies (*V. rotundifolia* Michx, *V. munsoniana* Simpson y *V. popenoeii* Fen) procedentes de las zonas cálidas y templadas del sudeste de América del Norte. Estas especies se caracterizan por la presencia de zarcillos simples, corteza del sarmiento adherente y con lenticelas, nudos sin diafragma, bayas poco azucaradas de maduración escalonada, y un número diploide de cromosomas (2n) igual a 40.

El subgénero *Euvitis* incluye más de cincuenta especies caracterizadas por la presencia de zarcillos bifurcados, corteza del sarmiento exfoliable, nudos con diafragma, y un número diploide de cromosomas (2n) igual a 38. Sus especies pueden ser clasificadas, por su distribución geográfica natural, en americanas y europeo-asiáticas. Dentro de estas últimas, la especie *Vitis vinifera* es la única con

una importancia económica relevante, y la única empleada en la producción mundial de vino. Actualmente coexisten dos formas de esta especie en Eurasia y en el Norte de África: la forma cultivada *V. vinifera* ssp. *vinifera* (o *sativa*), y la forma silvestre *V. vinifera* ssp. *silvestris* (o *sylvestris*). Esta separación en subespecies se basó principalmente en las diferencias morfológicas debidas a la selección o proceso de domesticación de la vid por el hombre a lo largo del tiempo.

1.1.1. Origen de la vid

La historia de la vid está estrechamente relacionada con el desarrollo de la cultura humana, y ha sido revisada recientemente por This y col. (2006). Si bien los fósiles más antiguos que se tienen de la familia de las Vitáceas son del Eoceno inferior, hace unos 56 millones de años (m.a.), es en el Plioceno superior (2-2,5 m.a.) cuando aparecen en Europa las primeras vides silvestres. Refugiadas durante el Cuaternario en la cuenca mediterránea y sur del mar Caspio, al terminar el periodo frío emigraron hacia la cuenca mediterránea este-oeste, extendiéndose en la actualidad desde las costas atlánticas de Europa hasta Tayikistán y el oeste del Himalaya, y desde las laderas del Rin hasta los bosques norteros de Túnez (Zohary y Hopf, 2000; Hidalgo, 2002; McGovern, 2003).

Los cazadores-recolectores del Paleolítico (2,8 m.a. - 8.500 años a.C.) usaban las bayas de vid silvestre (*V. vinifera* ssp. *silvestris*) como fuente de alimento (Zohary, 1996). A partir de ese momento, el hombre comenzó a seleccionar plantas de vid hermafroditas por presentar sus racimos un mayor número de bayas. También seleccionaban aquellas plantas cuyas bayas fueran de mayor tamaño y con un mayor contenido de azúcar (Zohary y Hopf, 2000). La selección se llevaba a cabo tanto para la obtención de alimento como para la elaboración de vino, dato que viene confirmado por el hallazgo de recipientes de cerámica del Neolítico (8.500 - 4.000 años a.C.) que contenían restos de semillas y de ácido tartárico en el interior de los mismos (McGovern y col., 1996; Hidalgo, 2002). Este proceso de domesticación dio lugar a la vid cultivada (*V. vinifera* ssp. *sativa*), que se diferencia de la vid silvestre tanto a nivel fenotípico como genético (revisado por This y col., 2006). Además de las evidencias arqueológicas e históricas que sugieren que los primeros eventos de domesticación de la vid se dieron en el Oriente Próximo (McGovern y col., 1996), otros estudios genéticos a lo largo de la cuenca mediterránea apoyan la existencia de sucesos de domesticación secundarios, independientes del proceso de domesticación inicial en el centro de diversidad de la especie (Arroyo-García y col., 2006; Lopes y col., 2009; Myles y col., 2011). Recientemente, el análisis de las relaciones genéticas entre vides

silvestres españolas y cultivadas sugiere una contribución genética de las accesiones silvestres de España a las actuales variedades occidentales (De Andrés y col., 2011).

La expansión de la vid domesticada tuvo lugar desde el centro de diversidad de la vid, Oriente Próximo, hacia regiones como el Valle de Jordania (4.000 años a.C.), Egipto (3.000 a.C.), sur y centro de las montañas Zagros (Irán), y la Baja Mesopotamia (3.000 a.C. aproximadamente). La expansión occidental está documentada en Creta (2.200 a.C.) y en las costas de las penínsulas Itálica e Ibérica (800 a.C.) (McGovern, 2003). El cultivo de la vid alcanzó China y Japón unos 1.200 años a.C. Durante el Imperio romano alcanzó muchas regiones templadas de Europa, llegando incluso a Alemania. Al final de la influencia romana, el cultivo de la vid era común en la mayoría de los lugares de Europa donde es cultivada hoy en día.

En la Edad Media, la Iglesia católica a través de las cruzadas extendió el cultivo de la vid y facilitó el intercambio de germoplasma. La extensión del Islam hacia el norte de África, España y Oriente Medio, tuvo también un papel importante en la expansión de la uva, en especial de la uva de mesa (Royer, 1988). Durante la Edad Media aparecen nombres de variedades que aún se usan hoy en día. Posteriormente, los misioneros introdujeron la vid cultivada en América, primero como semillas (fáciles de transportar) y luego mediante esquejes traídos de Francia, Alemania, España, Italia y Europa Oriental. En el siglo XIX los esquejes fueron llevados también a Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda, y más tarde al norte de África.

1.1.2. Genoma de la vid

Aunque la vid cultivada tiene flores hermafroditas autofecundables, es normal la fertilización cruzada por insectos y el viento, por lo que presenta un genoma altamente heterocigoto y con muchas mutaciones recesivas letales (Olmo, 1979; Thomas y Scott, 1993). Recientemente se ha secuenciado el genoma de la variedad Pinot Noir (Velasco y col., 2007), así como de una línea altamente homocigota de la misma variedad, obtenida mediante sucesivos retrocruzamientos (Jaillon y col., 2007). Estos trabajos de secuenciación han permitido conocer de forma concisa características del genoma de la vid que antes eran inferidas por métodos tales como la citometría de flujo (Lodhi y Reisch, 1995) o los mapas genéticos (Lodhi y col., 1995; Dalbó y col., 2000; Doligez y col., 2002; Adam-Blondon y col., 2004; Fischer y col., 2004; Riaz y col., 2004; Fanizza y col., 2005; Cabezas y col., 2006; Doligez y col., 2006 a y b; Di Gaspero y col., 2007; Mejía y

col., 2007; Troggio y col., 2007; Welter y col., 2007; Costantini y col., 2008; Salmaso y col., 2008; Vezzulli y col., 2008; Doligez y col., 2010).

El genoma de la vid se distribuye en 19 cromosomas ($2n = 38$), con un tamaño entre 487,1 Mb (Jaillon y col., 2007) y 504,6 Mb (Velasco y col., 2007). Es, por tanto, de un tamaño muy similar al estimado para el álamo balsámico de California [*Populus trichocarpa*, 485 Mb (Tuskan y col., 2006)], y el arroz [*Oryza sativa*, 420 Mb (Goff y col., 2002)], casi cuatro veces el genoma de *Arabidopsis* [*Arabidopsis thaliana*, 125 Mb (Kaul y col., 2000)], la mitad que el del tomate [*Solanum lycopersicum*, 1.000 Mb (Lodhi y Reisch, 1995)], una sexta parte que el del maíz (*Zea mays*, 3.000 Mb), y 33 veces menor que el del trigo [(*Triticum ssp.*, 16.000 Mb) (Goff y col., 2002)]. El número estimado de genes es de 29.585-30.434, con un promedio de 372 codones y 5 exones por gen (Jaillon y col., 2007; Velasco y col. 2007). Este valor es comparable con los 26.819 genes identificados en *Arabidopsis*, y considerablemente menor que los 45.555 genes del álamo, y que los 37.544 genes identificados en el genoma del arroz.

El análisis de los elementos con secuencias repetitivas pone de manifiesto que el 24,7-41,4% del total genómico son elementos transponibles, más abundantes en vid que en el álamo, el arroz o *Arabidopsis*. La distribución de estos elementos repetitivos es muy poco uniforme a lo largo del genoma, siendo muy abundantes en los intrones (Jaillon y col., 2007). Además, se han identificado 88.909 secuencias de microsatélites (repeticiones de motivos muy cortos y sencillos), que ocupan 2,1 Mb, lo que supone el 0,42% del total del genoma (Velasco y col. 2007).

Velasco y col. (2007) identifican y validan dos millones de polimorfismos debidos a la sustitución en una secuencia de un nucleótido por otro o SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), con una frecuencia de 4,0 SNPs por Kb, menor en las regiones codificantes que en las no codificantes. El 86,7% de los genes contienen uno o más SNPs, lo que resulta muy interesante a la hora de emplearlos como marcadores genéticos, dado que los SNPs pueden ser causa de variación fenotípica natural.

El genoma de la vid contiene un elevado número de copias de ciertas familias de genes, en comparación con el de otras plantas (Jaillon y col., 2007). Es el caso de la estilbeno sintasa, enzima que controla la síntesis de fitoalexinas estilbénicas, y que está codificada por una familia multigénica formada por 43 genes identificados. Esta enzima cataliza la última etapa de la biosíntesis de la ruta del resveratrol, una sustancia relacionada con los beneficios antioxidantes asociados al consumo de vino tinto (Baur y Sinclair, 2006). Igualmente, se han

identificado 89 genes funcionales relacionados con la biosíntesis de los terpenoides, que además de estar implicados en la interacción planta-ambiente, son metabolitos secundarios responsables del aroma y sabor de las bayas y, por tanto, del vino.

El origen del genoma de la vid, así como del resto de angiospermas, está muy relacionado con eventos de duplicación genómica sucedidos a lo largo de la historia de los vegetales. La secuenciación del genoma de *Arabidopsis* (Kaul y col., 2000) reveló que durante los 300 millones de años anteriores hubo tres eventos de duplicación genómica (1R, 2R y 3R), que dieron lugar a las especies actuales de angiospermas (Simillion y col., 2002; Bowers y col., 2003). La primera duplicación genómica (1R) parece haber sucedido antes de la separación entre las monocotiledóneas y las dicotiledóneas, hace unos 145-125 m.a. (De Bodt y col., 2005). La segunda duplicación probablemente ocurrió en la expansión de las eudicotiledóneas (112-93,5 m.a.), antes de la divergencia entre el álamo y *Arabidopsis*. La última duplicación tuvo lugar después de la divergencia entre ambas especies (83-14,5 m.a.) (Figura 1.1.1.). Ya que muchas regiones del genoma de la vid aparecen triplicadas, Velasco y col. (2007) proponen que la duplicación del genoma compartida por todas las eudicotiledóneas (2R) fue seguida por un evento de hibridación en *Vitis*, muy poco después de su separación del linaje que dio lugar al álamo y *Arabidopsis*.

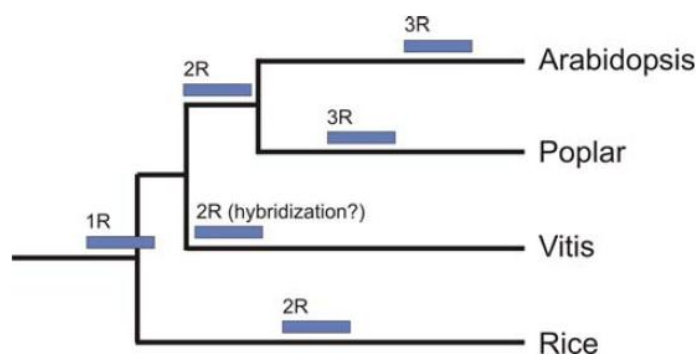


Figura 1.1.1. Escenario de la evolución de las angiospermas (Velasco y col., 2007)

El trabajo de Jaillon y col. (2007) contradice estos resultados, y concluye que el actual genoma haploide de la vid se originó a partir de la contribución de tres genomas ancestrales, que dieron lugar a un organismo denominado paleohexaploide. Dicho trabajo estudió el momento en que se produjo este fenómeno, comparando el genoma de la vid con el de otras tres especies secuenciadas: el álamo (*P. trichocarpa*), *Arabidopsis* (*A. thaliana*) (ambas dicotiledóneas), y el arroz

(*O. sativa*, monocotiledónea). Este estudio sitúa la aparición de este genoma paleo-hexaploide en algún momento después de la separación entre las monocotiledóneas y las dicotiledóneas, hace 130-240 m.a., y antes de la propagación de la rama de los Eurósidos (Figura 1.1.2), entre los que se encuentran plantas de gran importancia económica como las legumbres, el algodón o las brasicáceas. Todas estas plantas tienen, por tanto, un ancestro común hexaploide. Las comparaciones del genoma de la vid con el de *Arabidopsis* y el álamo, revelan que en el linaje de *Arabidopsis* hubo dos eventos de duplicación genómica posteriores a la separación de los Eurósidos 1, así como una duplicación posterior en el álamo (Figura 1.1.2).

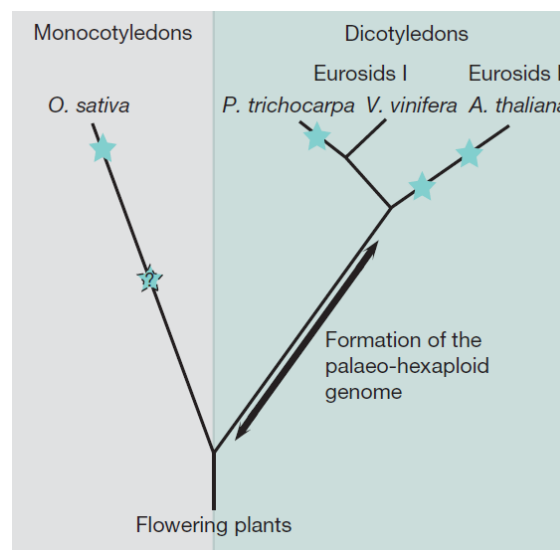


Figura 1.1.2. Posición de los eventos de poliploidización en la evolución de las plantas con genoma secuenciado. (Jaillon y col., 2007)

1.2. Importancia socio-económica

El cultivo de la vid es una actividad de gran importancia económica a nivel mundial. En el año 2007 hay cultivadas más de 7,7 millones de hectáreas de vid en el mundo, que producen 66,5 millones de toneladas (OIV, 2011), situando a la vid como la cuarta fruta más producida, después de la banana, las naranjas y las manzanas (FAO, 2007).

Europa es el mayor productor de uva con el 44% de la producción mundial. La lista de los países europeos productores de uva está encabezada por Italia, Francia y España, siendo este último país el quinto productor mundial. Este dato pone de manifiesto la gran importancia económica que tiene en España el cultivo de la vid, considerando además que representa el 11% de las explotaciones agrarias

nacionales, con una población activa dedicada de 96.000 personas en 2007 (INE, 2008).

El 30,2% de la uva producida en el mundo se dedica al consumo en fresco (uva de mesa), siendo Asia el mayor productor, encabezado por China, Irán, Turquía e India. España, en el duodécimo puesto, es el segundo productor de uva de mesa en Europa, por detrás de Italia. De las 1,1 millones de ha cultivadas en España (Estadísticas OIV, 2009), el 97,6% se dedica a la producción de vino, el 1,9% a la producción de uva de mesa, el 0,2% para la obtención de uvas pasas y el 0,3% para viveros de viñedo (www.mapa.es).

La Región de Murcia produce el 40% de la uva de mesa de España, lo que la convierte, junto con la Comunidad Valenciana, en el principal productor nacional (INE, 2008). Sin embargo, cabe destacar que la Región de Murcia destina al consumo en fresco el 55% de su producción de uvas, muy por encima de la Comunidad Valenciana (25%), Andalucía (12%) o Baleares (3,1%).

Dado el gran peso que el cultivo de la uva de mesa supone para la agricultura de la Región de Murcia, y en definitiva para su economía, es de vital importancia que se desarrollen proyectos de mejora genética dirigidos a la obtención de nuevas variedades que permitan mantener la competitividad que caracteriza a esta Región, e incluso mejorarla. Estas nuevas variedades, adaptadas a las condiciones agroclimáticas de nuestra Región, proporcionarían un mayor margen de beneficios para el agricultor, y permitirían mantener viva esta tradición milenaria, y una de las bases de nuestra cultura y economía.

1.3. La mejora genética en la uva de mesa: caracteres de interés

El cultivo de la uva de mesa en España supone la aceptación de dos grandes inconvenientes. En primer lugar, los agricultores han de pagar unos royalties a los obtentores de las variedades que se comercializan en Europa, destino mayoritario de las exportaciones españolas. Por otro lado, tales variedades no siempre están adaptadas a las condiciones agroclimáticas de Murcia y Alicante, que son las productoras del 90% de la uva de mesa nacional. Asimismo, el creciente número de explotaciones de uva de mesa en países emergentes, cuyo mantenimiento resulta más barato, deja un margen más estrecho de beneficios en países desarrollados como España, para todos los eslabones que componen esta industria.

Es por ello que se hace necesario el desarrollo de programas de mejora genética de uva de mesa, para obtener variedades adaptadas a tales condiciones agroclimáticas, y que permitan obtener un mayor margen de beneficios al agricultor.

Estas nuevas variedades han de cumplir con los parámetros de calidad exigidos por el consumidor, que incluyen la presencia de racimos de tamaño medio, con color uniforme, que contengan bayas grandes y sin semillas, y que al comer presenten un flavor (sabor y aroma) atractivo, y textura crujiente. Al mismo tiempo, el cultivo de estas nuevas variedades ha de suponer ventajas a nivel agronómico, como presentar una alta productividad y un espectro amplio de maduración que incluya la producción fuera de los picos productivos de los países de nuestro entorno.

El conocimiento de los determinantes genéticos que regulan los principales caracteres de interés de la uva de mesa, permite el desarrollo de herramientas de gran utilidad para los proyectos de mejora. La disponibilidad de marcadores moleculares ligados a estos caracteres disminuiría significativamente el coste y el tiempo necesarios para el desarrollo de nuevas variedades. A continuación se expone un resumen de los caracteres de interés en la mejora de la uva de mesa, que han sido objeto de estudio en el presente trabajo.

1.3.1. Caracteres fenológicos

La fenología es el estudio de los eventos o etapas del crecimiento de las plantas que ocurren cada año, y sus relaciones con factores climáticos como la temperatura, radiación solar y número de horas de luz (Mullins y col., 1992). Los cultivos utilizan los procesos fenológicos como herramienta metabólica para adaptarse a los cambios climáticos (Duchêne y Schneider, 2005; Terrier y col., 2005). En el último siglo se ha producido un aumento de las temperaturas, que se ha traducido en el incremento de más de un día por año del número de días favorables para la actividad de la vid, es decir, días que tienen una temperatura promedio superior a 10°C (Mullins y col., 1992; Duchêne y Schneider 2005). Esto ha supuesto cambios en la fenología de la vid, provocando la extensión de su ciclo vegetativo.

Conocer la duración de los estados fenológicos de la vid, nos permite también prever su ventana productiva, aspecto muy importante en uva de mesa donde se busca producir fuera de los picos productivos de otras zonas.

La vid mantiene un ciclo vegetativo anual que pasa por diferentes fases de gran complejidad, en un orden constante. La primera manifestación externa de actividad de la planta, tras el reposo invernal, es el lloro que fluye por las heridas y cortes de poda como consecuencia del comienzo de la actividad radicular, la activación de la respiración celular y la movilización de las reservas de la planta. Continúa con la brotación, y una fase de crecimiento activo hasta la floración. Tras la fecundación y cuaje, el grano de uva crece siguiendo la típica curva doble

sigmoide que se describe a través de tres fases de crecimiento: crecimiento rápido (fase I), latencia (fase II), y maduración (fase III). A finales del verano tiene lugar el crecimiento otoñal, y al finalizar el mismo se produce el agostamiento del pámpano y la caída de la hoja (Coombe, 1973, 1992; Jackson, 2000; Hidalgo, 2002; revisado en Carmona y col. 2008).

En el presente trabajo se han evaluado las siguientes fases del ciclo vegetativo de la vid:

Brotación. La salida de la dormición de las yemas está controlada genética y ambientalmente, de modo que el fotoperiodo y la temperatura juegan un papel fundamental en estos procesos (Mullins y col., 1992; Hidalgo, 2002; Pérez y Lira, 2005). Las yemas de la vid se pueden encontrar en distintos estados de dormición (*paradormición*, *endodormición* y *ecodormición*), en función de las condiciones ambientales y el estado fenológico de la planta (Lang y col., 1987). Durante la fase de crecimiento del sarmiento las yemas se encuentran en estado de *paradormición*, de modo que pueden brotar en caso de que se elimine el meristemo apical del mismo, o las hojas y ramas laterales. En este caso, la brotación es dependiente de reguladores del crecimiento que se originan fuera de la yema. En el estado de *endodormición*, que comienza al final del verano o principios del otoño, la brotación está reprimida por señales internas de la yema, y se requiere satisfacer ciertas condiciones de frío para que tenga lugar. Apenas hay datos cuantitativos de las horas de frío requeridas para la salida de la endodormición en la vid, que según un estudio preliminar podrían ser de 200-600 horas (Ophir y col., 2009). Por último, durante la fase final del invierno y la primavera tiene lugar la *ecodormición*, estado en el cual la brotación está limitada temporalmente por factores ambientales adversos.

En regiones con inviernos templados o calientes, uno de los mayores obstáculos para el desarrollo económico de muchos cultivos es una prolongada endodormición (Shulman y col., 1983). En estas regiones, para mantener una producción económicamente viable se hace imprescindible el uso de medios artificiales que sustituyan la vernalización (Erez, 1995). Uno de los agentes químicos más eficaces usado para estimular la brotación es la cianamida de hidrógeno (H_2CN_2 , en adelante CH) (Shulman y col., 1983), aunque el uso de este producto ha sido recientemente prohibido por su peligrosidad para la salud humana. La aplicación de CH produce en las yemas una disminución e inducción de determinadas enzimas (Keilin y col., 2007), dando una idea de qué procesos metabólicos están implicados en la salida de la dormición. Asimismo, señales de

estrés como la alta temperatura, la desecación o la anaerobiosis provocan la salida de la endodormición (Lavee y May, 1997), pudiendo ser incluso más efectivas que la vernalización y la CH (Halaly y col., 2008).

Pérez y Lira (2005) observaron que hay un incremento transitorio de H_2O_2 en las yemas poco antes de la brotación, y concluyen que este pico de H_2O_2 podría actuar como una señal para la expresión de los genes relacionados con la ruptura de la endodormición, entre los que se encuentran factores de transcripción, protein-kinasas y protein-fosfatasa (Or y col., 2000, 2002; Neill y col., 2002).

Recientemente se ha publicado un trabajo que realiza un análisis de expresión génica, empleando la técnica de hibridación con microarrays, tras la aplicación de CH y un choque térmico en las yemas (Ophir y col., 2009). En este estudio se distinguen dos patrones de expresión génica, uno de inducción y otro de represión. En el grupo de genes que se inducen destacan los que pertenecen a las categorías funcionales relativas a estrés oxidativo, ubiquitinación, chaperonas, degradación de proteínas, unión a GTP y metabolismo secundario. Dentro de este grupo, los genes relacionados con estrés oxidativo, glicólisis y respiración anaerobia mostraron un pico de expresión mucho mayor. En el grupo de genes que se reprimen, destacan los relacionados con transporte electrónico, metabolismo de la pared celular, hormonas, lípidos y membrana. En base a toda la información disponible, Ophir y col. (2009) proponen un modelo de las rutas metabólicas que intervienen en la salida de la dormición, estableciendo un enlace entre el estrés subletal, la actividad mitocondrial, las condiciones de hipoxia, además del metabolismo de hormonas como el etileno y ácido abscísico, y el crecimiento celular.

Floración. La transición más importante en el desarrollo de las plantas con flor es pasar del desarrollo vegetativo al reproductivo. El lugar en el tiempo en el que se produce esta transición es esencial para maximizar el éxito de la reproducción, especialmente en especies con polinización cruzada que requieren una floración sincronizada. Este es el caso de las vides silvestres de las que deriva *Vitis vinifera* (Simpson y Dean, 2002). El proceso se ve afectado tanto por condiciones bióticas (competición, polinizadores, herbívoros) como abióticas (fotoperiodo, temperatura, nutrientes), y se caracteriza por la acumulación de nuevas reservas nutricionales durante el mismo (Mullins y col., 1992; Jackson, 2000; Duchêne y Schneider, 2005; Roux y col., 2006). La calidad y rendimiento del cultivo depende, en gran medida, tanto de esta acumulación de reservas como de evitar dichas condiciones de estrés biótico y/o abiótico. La identificación de la variación molecular asociada al tiempo de

floración es un paso clave para seleccionar variedades adaptadas a diferentes latitudes y ciclos de cultivo (Roux y col., 2006).

En vid, el desarrollo de los órganos florales y el tiempo de floración se ven afectados por las condiciones ambientales que se dan desde antes de la brotación hasta la aparición de las flores (Mullins y col., 1992; Jackson, 2000; Boss y col., 2003; Carmona y col., 2007a; 2008; Keller y col., 2010), pudiendo afectar finalmente al rendimiento de la planta (Chloupek y col., 2004). Por ello se hace necesaria la obtención de genotipos menos sensibles a las condiciones ambientales, que permitan mantener a largo plazo las regiones productoras de uva.

En *Arabidopsis* se dispone de mucha información respecto de los genes implicados en el control de los diferentes estados del desarrollo reproductivo de la planta (ver Roux y col., 2006 para revisión), lo que ha permitido la identificación y el análisis funcional de los correspondientes genes ortólogos en *V. vinifera*, poniendo de manifiesto semejanzas y diferencias entre ambas especies. El conocimiento actual del control genético de la floración en vid y el impacto del manejo del cultivo y del efecto ambiental en la producción del viñedo, ha sido revisado recientemente por Carmona y col. (2008).

En vid se han identificado numerosos genes relacionados con la inducción de la floración (Joly et al., 2004; Boss y col., 2006; Sreekantan y Thomas, 2006; Carmona y col., 2007b; Almada y col., 2009; Díaz-Riquelme y col., 2009), la identidad del meristemo floral (Carmona y col., 2002; Calonje y col., 2004; Joly y col., 2004; Boss y col., 2006; Díaz-Riquelme y col., 2009), o la identidad de los órganos florales (Boss y col., 2001, 2002, 2003; Sreekantan y col., 2006; Poupin y col., 2007; Díaz-Riquelme y col., 2009), aunque la información sobre la función biológica de los mismos es aún escasa. Igualmente se han descrito variantes somáticos alterados en el desarrollo reproductivo que han permitido involucrar a las giberelinas en la represión de la floración (Boss y Thomas, 2002; Franks y col., 2002), e implicar a una familia de genes MADS-box tanto en el desarrollo de órganos florales como en el desarrollo de inflorescencias (Sreekantan y col., 2006; Chatelet y col., 2007).

Envero y Maduración. Como se ha mencionado anteriormente, tras el cuajado las bayas experimentan un incremento de su volumen, siguiendo una curva de crecimiento doble sigmoide en tres fases (Coombe, 1973, 1992; Jackson, 2000; Hidalgo, 2002). En la fase I, donde hay una gran actividad de división celular, las bayas son duras y verdes, y acumulan cantidades considerables de ácidos orgánicos a un pH aproximado de 2,5. Tras esta fase de crecimiento exponencial,

llega una fase II de crecimiento lento en la que se desarrolla el embrión. Al final de la fase II, las bayas empiezan a perder su color verde, punto conocido como envero. El envero, del término francés 'véraison', es una etapa de transición que se utiliza para describir los cambios fisiológicos que se producen en la uva, indicativos del inicio de la maduración. Estos cambios, que culminarán durante la maduración o fase III, incluyen el ablandamiento del tejido, un crecimiento basado en la expansión celular, descenso en la acidez y consiguiente subida de pH a ~3,5, acumulación de azúcares y compuestos relacionados con el sabor y el aroma, pérdida de clorofila en la piel, y acumulación de antocianinas en las variedades de color (Coombe, 1973; Robinson y Davies, 2000; Conde y col., 2007). La fase de maduración se inicia con el envero y culmina con la vendimia, de manera que el inicio del envero determina de forma crítica la fecha de la recolección. Si se produce un retraso en la fecha de vendimia, tiene lugar la sobremaduración de la uva (fase IV), produciéndose una concentración de sus componentes y la pérdida de peso debido al agua evaporada.

El estado óptimo de maduración de la uva está estrechamente relacionado con la calidad de la misma. Sin embargo, existe una variación en el grado de maduración de las bayas dentro de un mismo racimo, entre racimos de una misma cepa, y entre cepas de un mismo viñedo. Esto supone una dificultad a la hora de determinar el momento óptimo de maduración en un viñedo y, por tanto, el momento adecuado para llevar a cabo la vendimia. De ahí que uno de los objetivos importantes de la viticultura sea la obtención de una cosecha con un estado de maduración uniforme, que permita realizar la recolección en el estado óptimo de maduración y garantizar la calidad de la producción.

Aunque la fisiología básica de la maduración de la vid ha sido bien descrita, queda mucho por conocer acerca de los procesos genéticos y bioquímicos que gobiernan estos cambios fisiológicos. Este conocimiento podría proporcionar herramientas que permitan seleccionar genotipos con un proceso de maduración más uniforme, y que tenga lugar en el momento adecuado bajo las condiciones agroclimáticas donde son cultivados. Al mismo tiempo, la comprensión de los mecanismos que desencadenan el inicio del envero permitirá prever el comportamiento de una planta ante unas condiciones agroclimáticas determinadas. El análisis de QTLs, tanto para el envero como para el tiempo óptimo de maduración, podrá permitir la identificación de genes determinantes en el desarrollo de estas fases del ciclo vegetativo.

En el caso de la vid, no se conoce de forma precisa cuáles son las señales que desencadenan el proceso de maduración. Las bayas no son meros órganos de

almacenamiento con el único cometido de acumular azúcares y otros compuestos importados. En su interior existe una gran actividad metabólica, de modo que el proceso de maduración es el resultado de un programa coordinado. Los cambios drásticos que ocurren en las bayas durante el envero, coinciden con unos cambios igualmente significativos en la expresión génica y síntesis de proteínas (Robinson y Davies, 2000). Si bien, el único signo apreciable del inicio del envero es el comienzo del ablandamiento de las bayas y la pérdida del color verde, los recientes análisis del transcriptoma de las bayas durante su desarrollo han mostrado que el inicio del envero está marcado por un cambio substancial en la expresión de genes (Terrier y col., 2005; Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Fortes y col., 2011; Lijavetzky y col., 2012). Durante la fase de pre-envero, hay una tendencia hacia la inducción de genes implicados en mecanismos reguladores, respuesta a estímulos endógenos (principalmente metabolismo hormonal), señales de transducción y metabolismo de proteínas. Esto sugiere una fuerte reprogramación celular que tiene lugar en las células de la baya hasta el envero. Sin embargo, durante el post-envero hay una prevalencia de procesos metabólicos implicados en el metabolismo de la pared celular, acumulación de azúcares, y síntesis y transporte de metabolitos responsables del color, y del aroma y sabor de la uva. Por otro lado, en esta fase existe una regulación negativa de genes implicados en la división celular, síntesis de proteínas y fotosíntesis (Pilati y col. 2007).

Se han identificado varios factores de transcripción cuya expresión incrementa desde el envero en adelante. Entre ellos se encuentran algunos relacionados con la síntesis de antocianinas y taninos, el desarrollo del fruto, señalización por ácido abscísico (ABA), transporte de azúcares, o respuesta a estrés (Çakir y col, 2003; Olsen y col., 2005; Terrier y col., 2005; Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Fortes y col., 2011; Lijavetzky y col., 2012).

Diferentes trabajos han permitido identificar genes que se expresan durante el envero y la maduración de la uva, relacionados con el metabolismo de la pared celular y, por tanto, con la expansión celular y el ablandamiento de las bayas (Barnavon y col., 2001; Nunan y col., 2001; Terrier y col., 2005; Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Fouquet y col., 2008; Glissant y col., 2008; Lückner y col., 2009; Lijavetzky y col., 2012).

En relación al metabolismo hormonal, los genes que más se expresan en el proceso de maduración son los relacionados con etileno y auxinas, seguidos de los relacionados con el abscísico y los brasinoesteroides. Se encontraron muy pocos genes relacionados con las citoquininas, giberelinas y ácido jasmónico (Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Fortes y col., 2011; Lijavetzky y col., 2012). Aunque la vid

está considerada como un cultivo de maduración no climatérica, hay trabajos que demuestran que el etileno juega un importante papel en el desarrollo y maduración de sus frutos (Hale y col., 1970; Chervin y col., 2004; Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Fortes y col., 2011). El inicio del envero parece estar controlado en gran medida por los niveles de auxinas en la baya (Davies y col., 1997), pero aunque es conocida su implicación en la división y crecimiento celular de los tejidos, su papel en la regulación del desarrollo de las bayas está por determinar (Deluc y col., 2007; Fortes y col., 2011; Lijavetzky y col., 2012). El ABA puede tener un papel importante en el proceso de maduración, ya que esta hormona empieza a acumularse de forma gradual antes del envero, y cuando se llega a esta fase lo hace de forma rápida (Coombe y Hale, 1973). De hecho, se ha encontrado un patrón de expresión de varias proteínas relacionadas con ABA que se ajusta a la tasa de acumulación observada de esta hormona (Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Lund y col., 2008; Lückner y col., 2009; Fortes y col., 2011). Los brasinoesteroides también parecen tener un papel decisivo en la maduración de las bayas de vid, lo que ha sido confirmado por experimentos de aplicación de esta hormona sobre los racimos (Symons y col., 2006), y con análisis transcriptómicos (Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007) y proteómicos (Lückner y col., 2009). Se sabe muy poco acerca del papel de las giberelinas en el desarrollo de las bayas, excepto una probable función en la expansión celular (Pérez y col., 2000; Terrier y col., 2005; Deluc y col., 2007; Fortes y col., 2011; Lijavetzky y col., 2011).

A partir del envero, el ratio azúcar/ácido se incrementa hasta la maduración. Los azúcares, además de conferir el sabor dulce a las bayas y de ser la fuente para la fermentación en la elaboración del vino, actúan como elementos reguladores de genes responsables del desarrollo del aroma y de las propiedades organolépticas del fruto (Conde y col., 2007). Mientras que en la primera fase del desarrollo de la baya prácticamente toda la sacarosa que se importa del floema es metabolizada para la división y crecimiento celular, a partir del envero los azúcares se acumulan en las vacuolas en forma de glucosa y fructosa. Esto se pone de manifiesto tanto por la expresión selectiva de transportadores de azúcares durante el desarrollo de la baya, como por la expresión de genes que metabolizan estos azúcares (Terrier y col., 2005; Zhang y col., 2006; Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Lückner y col., 2009; Fortes y col., 2011; Lijavetzky y col., 2012). Los análisis de expresión génica y metabolitos dejan patente que durante la fase verde de las bayas se produce una síntesis y almacenamiento de los dos ácidos más abundantes de la vid, el málico y el tartárico, que alcanzan su mayor abundancia justo antes del envero. Es en este punto donde se produce un cambio en las enzimas que metabolizan estos ácidos,

que ocasionan una disminución de su concentración a lo largo de la maduración (Terrier y col., 2005; Deluc y col., 2007; Fortes y col., 2011; Lijavetzky y col., 2012).

En el caso de las uvas con color, las antocianinas responsables del mismo, y sus transportadores, comienzan a sintetizarse durante el envero, como ha sido observado a nivel transcriptómico (Robinson y Davies, 2000; Terrier y col., 2005; Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Fortes y col., 2011; Lijavetzky y col., 2012), y proteómico (Lücker y col., 2009). Igualmente, durante la maduración se produce la acumulación de compuestos aromáticos, como los terpenos, bencenoides y fenilpropanoides (Dimitriadis y Williams, 1984; Gunata y col., 1985a; Mateo y Jiménez, 2000). En uva de mesa el aroma moscatel es muy valorado y ha sido objeto de estudio. A nivel metabólico, se ha descrito durante la maduración de las bayas de Moscatel de Hamburgo un incremento de los compuestos aromáticos no glicosilados (odorantes) responsables de este aroma. No obstante, en las bayas maduras el contenido de la fracción glicosilada (no odorífica) de estos compuestos fue mayor que la fracción libre, a excepción de linalol, diendiol I y II y limoneno (Fenoll y col., 2009). Recientemente, se ha descrito también la evolución de los compuestos aromáticos en las variedades Ruby Seedless y Moscatuel (Fenoll y col., 2012).

Otro grupo de genes que se expresan de forma diferencial durante el envero y la maduración de la vid son los relacionados con el estrés biótico y abiótico. Los productos de estos genes son sintetizados durante todo el proceso de desarrollo de las bayas. No está claro si tienen un rol en la maduración *per se*, son inducidos como protección frente a patógenos, o como una consecuencia inevitable de los cambios físicos y químicos que ocurren en la baya durante la maduración. De hecho, el incremento de glucosa y fructosa en las vacuolas que sucede en la maduración, da lugar a una disminución de la actividad hídrica en la baya que ocasiona una fuerte alteración del potencial osmótico en el resto de las células, lo que puede provocar la inducción de algunos genes de respuesta a estrés. Por otro lado, en la vid se ha detectado la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, que también actúan como elementos de regulación de multitud de procesos biológicos (Robinson y Davies, 2000; Terrier y col., 2005; Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Lücker y col., 2009; Fortes y col., 2011; Lijavetzky y col., 2012).

Por último, se han identificado genes inducidos selectivamente en el envero y durante el proceso de maduración relacionados con el ritmo circadiano dependiente de la luz, así como elementos que enlazan las rutas hormonales con las señales lumínicas, lo que sugiere su implicación en el desarrollo de la baya

(Pilati y col., 2007; Fortes y col., 2011). Además, los datos de Pilati y col. (2007) sugieren que hay un proceso de muerte celular programada durante la maduración, ya que desde el envero en adelante se induce la expresión de siete de los diez genes relacionados con el proceso de apoptosis.

1.3.2. Caracteres de productividad y calidad

Como se comentó al inicio de este capítulo, conjuntamente con los caracteres fenológicos de interés para el mejorador, en la obtención de nuevas variedades de uva de mesa es necesario tener en cuenta caracteres relacionados con la productividad y la calidad organoléptica del producto, de cara al consumidor. A continuación se comentan algunos de ellos:

Fertilidad. La fertilidad o productividad medida como el número de racimos por sarmiento, es un carácter de gran importancia en uva de mesa para los agricultores, ya que el rendimiento por hectárea está correlacionado con el número de racimos por planta (Fanizza y col., 2005). De ahí la importancia de seleccionar aquellos híbridos que maximicen este carácter bajo las condiciones agroclimáticas de la zona de cultivo.

Las inflorescencias (precursoras de los racimos) y los zarcillos son órganos estrechamente relacionados que derivan de la misma estructura meristemática conocida como *anlage* o primordio no diferenciado (Srinivasan y Mullins, 1981). Estos primordios, producidos en la fase adulta de la planta, son meristemas laterales derivados del meristemo apical caulinar, que suelen aparecer en dos de cada tres nudos, y que se localizan en la parte opuesta a las hojas (Mullins y col., 1992; Jackson, 2000). Estos meristemas no brotarán hasta la campaña siguiente a su formación, tras la dormición de invierno (endodormición), y se diferenciarán en inflorescencias, zarcillos, e incluso en tallos, en función de ciertos factores ambientales y hormonales que tienen lugar durante el año anterior al de la brotación. Los factores ambientales más importantes para la diferenciación de los *anlagen* hacia inflorescencias, proceso denominado como inducción floral, son exposiciones cortas a altas temperaturas y a elevada intensidad lumínica (Mullins y col., 1992), coincidiendo con los mismos estímulos que reciben las vides silvestres cuando alcanzan el dosel arbóreo.

Existen dos grupos de hormonas que afectan a la diferenciación floral en vid de forma opuesta. Por un lado, las citoquininas promueven la diferenciación de los *anlagen* en inflorescencias, mientras que las giberelinas son necesarias para la iniciación del *anlagen* pero inhiben su diferenciación hacia inflorescencias,

favoreciendo el desarrollo de zarcillos (Srinivasan y Mullins, 1980). Generalmente, las plantas no inician la diferenciación floral hasta los 2-5 años de cultivo. Algunos genotipos son capaces de producir inflorescencias en su segundo año de vida cuando están expuestos a la luz, bien irrigados y fertilizados, lo que indica la relevancia del estado nutricional de la planta en el inicio del desarrollo reproductivo (Jackson, 2000; Hidalgo, 2002).

Las investigaciones a nivel molecular del desarrollo reproductivo de la vid se han basado en la identificación y el análisis funcional de genes ortólogos a los identificados en *Arabidopsis* (ver Carmona y col., 2008 para revisión). La mayoría de estos estudios se han centrado en genes reguladores de la inducción floral, así como en genes implicados en la identidad del meristemo floral y de los órganos de la flor (Carmona y col., 2002; 2007; Calonje y col., 2004; Díaz-Riquelme y col., 2009). Asimismo, existen estudios acerca de los elementos génicos implicados en la respuesta a giberelinas y citoquininas, en relación a la fertilidad tanto en *Arabidopsis* como en vid (Aubert y col., 1998; Boss y Thomas, 2002; Ferreira y Kieber, 2005; Roxrud y col., 2007; Ariizumi y col., 2008).

Peso del racimo. De un lado, el viticultor está interesado en el rendimiento total de las plantas en campo, y relaciona este factor con el peso del racimo. De otro lado, el consumidor de uva de mesa demanda racimos con un tamaño medio de entre 0,5 y 1 kg. Sin embargo, Fanizza y col. (2005) mostraron que existe una mayor correlación del rendimiento con el número de racimos por planta que con el peso del racimo. Estos autores observaron también que el peso del racimo estaba correlacionado en mayor medida con el número de bayas por racimo que con el peso de las mismas, confirmando lo observado por otros estudios (Smart y col., 1982; Dunn y Martin, 2000; López-Miranda y Yuste, 2004). La influencia que los factores ambientales ejercen sobre este carácter es dependiente de la variedad (Fanizza y col., 2005), aunque existen actividades del hombre que incrementan el peso de los racimos, como su poda o la eliminación de algunos de ellos de la planta (Wolpert y col., 1983; Lavín y col., 2001).

Peso y diámetro de las bayas. De cara al consumidor, el éxito de una nueva variedad de uva de mesa depende en gran medida del tamaño de las bayas (peso y diámetro). Igualmente, algunos autores han correlacionado el tamaño de las bayas con la productividad de la planta (Costantini y col., 2008). Dada la alta correlación existente entre el calibre y el peso de las bayas, cualquiera de estas dos medidas puede ser usada para determinar su tamaño (Fanizza y col., 2005). En variedades

de uva de mesa apirena, uno de los grandes inconvenientes es la falta de calibre para alcanzar los tamaños comerciales, debido a que las semillas producen hormonas que estimulan el crecimiento de las bayas, principalmente giberelinas (Pérez y col., 2000). Por tanto, se hace necesario la aplicación externa de GA₃ para estimular este crecimiento. Hay variedades apirenas, como Sultanina, que necesitan hasta tres tratamientos para alcanzar calibres comerciales. No obstante, se pueden encontrar casos en los que de forma natural aparecen bayas de calibre grande con escasos rudimentos seminales en su interior (Barticevic y col., 2004). Al igual que sucede con el peso del racimo, el ambiente puede ejercer cierta influencia sobre el tamaño de las bayas, en mayor o menor medida dependiendo de la variedad (Fanizza y col., 2005).

Textura de las bayas. La consistencia de las bayas es uno de los factores determinantes de la calidad de la uva de mesa, ya que los consumidores prefieren bayas con textura crujiente. El ablandamiento de las bayas de vid sucede antes que en otras frutas que también tienen una curva de crecimiento doble sigmoide, como la manzana o el melocotón. En el caso de la uva, el ablandamiento sucede al final del segundo ciclo de crecimiento, en el envero, varias semanas antes de la maduración (Nunan y col., 1998, 2001; Yakushiji y col., 2001). La degradación de la pared celular es en gran medida responsable del ablandamiento durante la maduración de la fruta (Brummel y Harpster, 2001).

Las células de la vid, al igual que todas las dicotiledóneas, tienen una pared primaria formada por microfibrillas de celulosa que están cubiertas y entrecruzadas por una matriz de glucanos, siendo el más abundante la hemicelulosa xiloglucano (Carpita y Gibeaut, 1993). Los espacios del entramado formado por la celulosa y la matriz de glucanos están ocupados por una red de pectinas, que consisten en cadenas lineares de poligalacturonato intercaladas con cadenas de ramnogalacturonano muy ramificadas (Brummel y Harpster, 2001; Glissant y col., 2008).

Durante el desarrollo y la maduración de las bayas se ha observado un incremento en la solubilidad de los galacturonanos, además de un incremento en hidroxiprolina que indicaría un incremento en la cantidad de extensinas, ricas en este compuesto. También se ha observado que durante el ablandamiento se produce una disminución de la celulosa, y una degradación de xiloglucano y de pectinas. Se sugiere, por tanto, que la actividad de enzimas como la endo-1,4-β-glucanasa específica de xiloglucano, xiloglucano endo-transglicosilasa, manan endomanosidasas, α-galactosidasa, pectin-metilesteresas, acetilesteresas,

poligalacturonasas o liasas (pectato liasas) y extensinas (α -expansinas), resulta determinante para el ablandamiento de las bayas durante el envero y la maduración (Carpita y Gibeaut, 1993; Nunan y col., 1998; Brummel y Harpster 2001; Yakushiji y col., 2001; Cosgrove, 2005). De hecho, mediante análisis transcriptómicos se han podido observar incrementos muy significativos en la expresión de los genes que codifican para estas enzimas, así como de factores de transcripción activadores de algunas de ellas (Deluc y col., 2007; Glissant y col., 2008; Lijavetzky y col., 2012).

Otro factor que afecta a la variación de la textura de las uvas es la cantidad de agua contenida en el interior de las mismas. Durante la fase de crecimiento de las bayas, la presión de turgencia suministra la energía mecánica necesaria para extender la pared celular (Cosgrove, 2005). Entre el envero y la maduración se ha detectado en las bayas una disminución en la conductancia de agua de hasta 10 veces (Tyerman y col., 2004). Casi la totalidad del agua que entra en las bayas antes del envero proviene del xilema, mientras que después del envero es importada por el floema, teniendo que atravesar membranas plasmáticas (Greenspan y col., 1994). Es por ello que los canales de agua (acuaporinas) localizados en la membrana plasmática y en el tonoplasto juegan un papel importante en el control de los flujos de agua inter e intracelulares (Glissant y col., 2008). Los análisis de expresión génica han puesto de manifiesto que los genes relacionados con acuaporinas, en general, disminuyen su expresión durante el desarrollo de las bayas, de modo que la mayoría de ellos se expresan antes o durante el envero, disminuyendo su expresión durante la maduración (Deluc y col., 2007; Pilati y col., 2007; Fouquet y col., 2008; Lijavetzky y col., 2012).

Color de las bayas. El color es un factor de calidad importante como apreciación visual previa al resto de sensaciones que vamos a percibir del fruto. Esto determina que pueda ejercer de factor excluyente, de modo que si un producto se rechaza en el examen visual, no se van a evaluar el resto de parámetros de calidad por excelentes que éstos puedan resultar (Carreño, 1997).

Los colores rojos, azulados o violetas que presentan la mayoría de las frutas y flores, se deben a la presencia de antocianos o antocianinas, pigmentos visibles al ojo humano. La acumulación de antocianinas es el factor responsable del color de las uvas tintas, localizándose fundamentalmente en la piel de la baya, más concretamente en el interior de las vacuolas y en órganos esféricos conocidos como antocianoplastos (Boss y col., 1996). En las uvas tintoreras también se encuentran en la pulpa (Flanzy, 2003). En vid, la biosíntesis de las antocianinas coincide con el envero y se intensifica durante la maduración (Winkler y col., 1974).

En las uvas rojas se acumulan mayoritariamente derivados de cianidina y/o peonidina, y en uvas negras delphinidina, petunidina y/o malvidina (Kobayashi y col., 2001). La acumulación de antocianos evoluciona paralelamente con la síntesis de azúcar, aumentando rápidamente durante la maduración hasta alcanzar una concentración máxima que varía en función de la variedad. En este máximo se paraliza la síntesis y acumulación de antocianos (Boss y col., 1996).

Los antocianos forman parte de los flavonoides, cuya ruta principal de biosíntesis ha sido bien descrita (Harbone, 1962; Holton y Cornish, 1995). La acumulación de antocianos es reflejo de la actividad de las enzimas involucradas en la ruta biosintética (Boss y col., 1996; Jaakola y col., 2002). Estas enzimas están reguladas a nivel de transcripción (Castellarin y Di Gaspero, 2007) y también por factores ambientales, como la luz y la temperatura, de manera que en vid las altas temperaturas reprimen la biosíntesis de antocianos, mientras que las bajas temperaturas la inducen (Mori y col., 2005; Yamane y col., 2006; Ubi y col., 2006).

Las vides silvestres tienen bayas de color negro o rojizo-negro, con altas cantidades de antocianos (Revilla y col., 2010), excepto algunos mutantes ocasionales que son de color blanco. Es por ello que las variedades blancas deben ser el resultado de mutaciones que afectan a la ruta biosintética de antocianos (Slinkard y Singleton, 1984). Durante la ruta biosintética de los antocianos, se expresan dos tipos de genes: los genes estructurales que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de antocianos, y los genes reguladores, que controlan la transcripción de los genes estructurales (Jaakola y col., 2002). Se sabe que el gen *VvUFGT*, que codifica para una enzima que cataliza uno de los últimos pasos de la ruta biosintética de antocianinas, se expresa en las variedades tintas y no en las blancas, coincidiendo con la acumulación de antocianinas (Boss y col., 1996; Kobayashi y col., 2001, 2002; Downey y col., 2003). Esta diferencia entre ambos tipos de variedades, además del efecto ambiental en la expresión del gen *VvUFGT* (Mori y col., 2005, 2007), estaría dada por una mutación en el gen *VvmybA1* (Kobayashi y col., 2004; Lijavetzky y col., 2006; Yakushiji y col., 2006; Walker y col., 2007), factor de transcripción que regula la expresión de *VvUFGT* (Kobayashi y col., 2002), coincidiendo la acumulación de antocianinas con la expresión de *VvmybA1* (Kobayashi y col., 2001, 2002, 2004, 2005). Por otro lado, se ha puesto de manifiesto que otros factores de transcripción como *VvmybA2* (Walker y col., 2007) y *Vvmyb5b* (Deluc y col., 2008) también afectan a la coloración de las bayas.

Si bien los trabajos anteriormente expuestos giran en torno a la presencia o ausencia de color, Fournier-Level y col. (2009) demostraron que cinco polimorfismos en los genes adyacentes *VvmybA1*, *VvmybA2* y *VvmybA3* eran

responsables del 84% de la variación en la cantidad de antocianos, y por tanto, de la variación cuantitativa del color. Según estos autores, puede haber otros loci que también estén implicados en la biosíntesis de antocianinas, como demuestran Deluc y col. (2008) con la descripción de *Vvmyb5b*.

Apirenia. Este es uno de los caracteres más demandados por los consumidores y, por tanto, un objetivo importante en los programas de mejora genética de uva de mesa. Se considera uva apirena aquella que no contiene semillas, o si las contiene, no son perceptibles en la degustación debido a que no están lignificadas. Desde el punto de vista fisiológico, se pueden distinguir dos tipos de apirenia: apirenia partenocárpica o de tipo Corinto, y apirenia estenospermocárpica o de tipo Sultanina. En la primera, el desarrollo del ovario se produce sin fecundación, interrumpiéndose este proceso en el momento de la formación del tubo polínico. Los frutos así obtenidos presentan ausencia total de semillas (Antonacci, 1991). Este tipo de apirenia aparece de manera espontánea en la variedad Corinto, que deriva de la variedad con semilla “Liatiko” y es empleada para la obtención de pasas. La apirenia de tipo Corinto se encuentra de forma accidental en un gran número de variedades, como Aramón y Gamay, pero solo en unas pocas aparece de forma constante en todas las cepas (Hidalgo, 2002).

En el segundo tipo de apirenia, la estenospermocárpica o de Sultanina, sí se produce fecundación pero el desarrollo del óvulo y/o del endospermo se detiene en algún momento después de la polinización (Nitsch y col., 1960; Barrit, 1970), de manera que las semillas no llegan a lignificar y no son perceptibles en la degustación. En muchas variedades, como Moscatel de Alejandría o Moscatel de Hamburgo, se encuentra de forma accidental, y es normal y constante en todas las cepas en un cierto número de variedades conocidas, desde la antigüedad en Asia Media, bajo el nombre genérico de Kishmish (entre ellas Kishmish blanca, o Sultanina). Todas las variedades actuales de uva de mesa apirenas de pedigrí conocido derivan de Sultanina, también conocida como Thomson Seedless (Ibáñez y col., 2009; Vargas y col., 2009). Aunque Sultanina ha sido la única fuente de apirenia en la mejora de uva de mesa, el mismo fenotipo ha aparecido de forma espontánea dando lugar a nuevas variantes naturales como resultado de mutaciones somáticas. Es el caso de las variedades Chaselas apirena, Bayad o Selección Bruni 1 (Karaagac y col., 2012).

La apirenia presenta una correlación negativa con el tamaño de las bayas (Fanizza y col., 2005), ya que las semillas producen hormonas necesarias para el desarrollo de las mismas, siendo las giberelinas las de mayor relevancia (Coombe,

1960; Pérez y col., 2000). Es por ello que las variedades de uva de mesa apirenas requieren la aplicación externa de hormonas para alcanzar un tamaño de baya adecuado (Barticevic y col., 2004). Con objeto de incrementar la probabilidad de obtener nuevas variedades apirenas, en los programas de mejora se realizan cruzamientos en los que ambos parentales son apirenos. Con este tipo de cruzamientos se tiene que recurrir al rescate de embriones mediante el cultivo *in vitro* de los mismos (Cain y col., 1983), disminuyendo el número total de plantas obtenidas, en comparación con los cruzamientos entre variedades con semilla, o de apirenas x semilla (Juan Carreño, comunicación personal). Este inconveniente, junto con el elevado coste del proceso, plantea la necesidad de realizar cruzamientos en los que el parental femenino tenga semillas, para después poder hacer una selección de los híbridos apirenos mediante el empleo de marcadores moleculares. La apirenia estenospermocárpica es un carácter que presenta una variación de carácter cuantitativo, de manera que las bayas de los híbridos procedentes de los distintos cruzamientos anteriormente planteados, para la obtención de nuevas variedades apirenas, poseen un rango fenotípico muy amplio que abarca desde la ausencia total de semillas hasta la presencia de semillas completamente formadas. Por otro lado, la apirenia también puede inducirse externamente en variedades tales como Moscatel de Alejandría, Italia, Pirovano, Ribier y Emperador, usando aplicaciones de estreptomycin y/o GA₃ en distintas dosis, en estados fenológicos de pre, plena y/o post-floración (Valenzuela y Lobato, 2000; Barticevic y col., 2004).

Se han manejado varias hipótesis acerca de los factores genéticos implicados en la apirenia estenospermocárpica. El modelo más aceptado postula la presencia de tres genes recesivos y complementarios, heredados de forma independiente y regulados por un gen dominante (Bouquet y Danglot, 1996). Este gen dominante es responsable de la inhibición del desarrollo de la semilla, por lo que más tarde fue llamado *SDI* de “*Seed Development Inhibitor*” (Lahoge y col., 1998). Estudios posteriores han confirmado parcialmente este modelo, poniendo de manifiesto la relevancia del locus *SDI* para el carácter, y han desarrollado y analizado la eficiencia de marcadores moleculares ligados a dicho locus con el objeto de ser utilizados como predictores de la apirenia en programas de mejora genética (Lahogue y col., 1998; Adam-Blondon y col., 2001; Mejía y Hinrichsen, 2003; Cabezas y col., 2006; Mejía y col., 2007, 2011; Korpás y col., 2009). Entre los marcadores desarrollados, los microsatélites VMC7F2 (Cabezas y col., 2006; Karaagac y col. 2012) y p3_VvAGL11 (Mejía y col., 2011) se perfilan como los candidatos más plausibles a ser usados en programas de mejora. Se ha

comprobado que VMC7F2 se encuentra a 463 pb aguas arriba del gen *VvAGL11* (Mejía y col., 2011). Este gen pertenece a una familia de factores de transcripción responsable de la identidad del óvulo en monocotiledóneas y dicotiledóneas. *VvAGL11*, en cuya caja TATA se encuentra el marcador p3_ *VvAGL11*, ha mostrado tener una expresión específica en el carpelo, expresándose altamente en flores, tras la caída de la caperuza, y en semillas (Díaz-Riquelme y col., 2009).

Por otro lado, Hanania y col. (2007) concluyeron que el gen que codifica para la chaperonina 21 del cloroplasto es esencial para el desarrollo de las semillas de las bayas de vid. Asimismo, recientemente se ha identificado a una proteína de extensión de ubiquitina (S27a) como posible responsable del control del desarrollo de los órganos reproductores y del embrión de la vid (Hanania y col., 2009). Ninguno de estos dos genes co-segregaron con el locus *SDI* (Mejía y col., 2011).

Flavor moscatel de las bayas. El flavor, o conjunto de impresiones olfativas y gustativas provocadas en el momento del consumo de las bayas, juega un papel esencial en la calidad de la uva de mesa, y en la industria del vino. En general, y de manera simplificada, en uva se pueden distinguir dos grandes grupos de compuestos relacionados con el aroma: compuestos libres volátiles, que contribuyen directamente al aroma, y compuestos precursores no volátiles. Los compuestos precursores se encuentran generalmente como formas ligadas o glicosiladas, por lo que no contribuyen directamente al aroma de la uva. En general, las formas glicosiladas son más abundantes que las libres (Dimitriadis y Williams, 1984; Gunata y col., 1985a).

Dentro de los compuestos responsables del aroma primario de las uvas, el aroma moscatel es debido principalmente a los monoterpenos, en su forma de alcoholes o monoterpenoles. Unas 50 moléculas pertenecientes a esta familia han sido identificadas en uva y vinos (Mateo y Jiménez, 2000), y se ha demostrado que los monoterpenoles, particularmente, contribuyen al aroma varietal en *V. vinifera* (Ebeler, 2001). Las principales moléculas responsables del aroma moscatel de las uvas son el linalol, nerol, geraniol, α -terpineol y citronelol (Ribéreau-Gayon y col., 1975), aunque hay otros compuestos que se encuentran en menor concentración y que también influyen en el aroma moscatel (Ribéreau-Gayon y col., 1975; Wilson y col., 1984; Park y col., 1991; Mateo y Jiménez, 2000; Fenoll y col., 2009, 2012).

Estos compuestos aromáticos se localizan en la pulpa y, principalmente, en el hollejo de las bayas (Wilson y col., 1986; Gunata y col., 1985b). Como se ha mencionado anteriormente, los monoterpenos se pueden encontrar glicosilados o en estado libre, siendo en esta última forma cuando tienen capacidad odorífica. La

fracción glicosilada de estos compuestos se encuentra en las bayas de vid de forma mucho más abundante que su fracción libre, pudiendo llegar a una relación del 90% y 10%, respectivamente (Wilson y col., 1984; Park y col., 1991). La distribución de ambas fracciones en el conjunto de la baya se modifica durante el desarrollo de la misma. En el momento de la maduración, hay una mayor concentración de las dos fracciones en la piel, comparado con la pulpa. Aunque teniendo en cuenta que la piel representa menos del 10% de peso total de la baya, el contenido final de estos compuestos es mayor en la pulpa (Wilson y col., 1986; Park y col., 1991). La fracción glicosilada de los monoterpenos puede convertirse en fracción libre mediante hidrólisis enzimática o física (Wilson y col., 1984), de modo que el proceso de vinificación o la masticación pueden incrementar el componente aromático del producto.

En las plantas, los terpenos están formados por la conversión del geranyl difosfato (GPP) que proviene de la condensación de dos precursores: isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero alílico, dimetilalil pirofosfato (DMAPP). La biosíntesis de IPP y DMAPP tiene lugar a través de dos rutas distintas, la ruta citoplasmática del ácido mevalónico (MVA) y la ruta plastídica del metil-eritritol-fosfato (MPE). En vid, la ruta predominante para la biosíntesis de monoterpenos es la del MPE (Luan y Wüst, 2002). Un gen estructural de esta ruta, el *VvDXS*, que codifica para la D-xilulosa 5-fosfato sintasa, ha sido identificado recientemente como un gen candidato posicional implicado en la concentración de las formas volátiles y no volátiles de geraniol, nerol y linalol, componentes terpénicos responsables en gran medida del aroma moscatel (Battilana y col., 2009; Duchêne y col., 2009). *VvDXS* cataliza la primera reacción en la ruta del MEP, siendo uno de los principales reguladores de la biosíntesis de monoterpenos en vid (Luan y Wüst, 2002). Se ha observado que un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en la secuencia de *VvDXS* está asociado a la variación en la cantidad de los tres compuestos terpénicos citados, de modo que existe un alelo “neutro” y un alelo “moscatel” (Emanuelli y col., 2010). El alelo moscatel provoca un incremento en la eficiencia de la proteína, favoreciendo la ruta biosintética de los monoterpenos responsables del aroma (Battilana y col., 2011). Este SNP, puede ser utilizado como marcador molecular en programas de mejora genética para seleccionar plantas con aroma moscatel elevado.

1.4. Identificación de los determinantes genéticos responsables de caracteres de interés

La selección indirecta, facilitada o asistida por marcadores genéticos, se ha utilizado en mejora desde los primeros tiempos de la genética (Sax, 1923). Un marcador genético se puede definir como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético (Nuez y col., 2000; De Vienne, 2003a). Los marcadores genéticos más utilizados por el mejorador han sido los morfológicos; preferentemente caracteres que controlados por un solo gen, mostraran un fenotipo constante en diferentes ambientes. A pesar de la sencillez de evaluación de estos marcadores, en determinadas especies son poco frecuentes, y su utilidad está limitada por la influencia ambiental sobre su expresión y por la elevada frecuencia con la que estos genes presentan interacciones con otros. Igualmente, en algunos casos solo se pueden evaluar al final del ciclo de la planta, encareciendo el coste del espacio necesario (Vázquez y col., 2000).

Los marcadores proteicos han sido también muy utilizados en la Mejora Genética Vegetal. Su evaluación es más compleja pero la influencia ambiental es menor que en los morfológicos. Los más empleados han sido las isoenzimas, que al diferir en carga eléctrica se pueden separar electroforéticamente en geles de almidón o acrilamida. Son marcadores codominantes, permitiendo diferenciar individuos homocigotos de heterocigotos. Su utilidad viene limitada por su reducido número, sus interacciones o modificaciones postranscripcionales, o por su diferente expresión en tejidos distintos (Vázquez y col., 2000).

Los marcadores de ADN, o marcadores moleculares, tienen su origen en variaciones individuales en la secuencia común del ADN. Proporcionan al mejorador marcadores que cubren todo el genoma, posibilitan su evaluación en estadios muy tempranos y a partir de muestras mínimas que no destruyen el individuo, no presentan interacciones intergénicas, y no son influenciados por el ambiente. Su aplicación dentro de la mejora genética de plantas va desde la caracterización de la variación genética, identificación varietal, conservación y uso de recursos genéticos, hasta la generación de mapas genéticos y selección asistida por marcadores (García-Mas y col., 2000; Nuez y col., 2000; De Vienne y col., 2003). La construcción de los mapas genéticos implica la descripción de cada uno de los marcadores moleculares, la disposición ordenada entre ellos y la determinación de la distancia que los separa, construyendo así grupos de marcadores ligados entre sí que deben corresponder cada uno de ellos a un cromosoma (De Vienne, 2003b).

La mayor parte de los caracteres de interés agronómico son de herencia compleja, controlados por varios genes, con interacciones entre ellos y con el ambiente. Estos caracteres cuantitativos generalmente dan lugar a distribuciones fenotípicas de tipo continuo (Kearsey y Pooni, 1998). Las regiones del genoma responsables de la variación cuantitativa de un carácter se denominan QTLs (Quantitative Trait Loci). La construcción de mapas genéticos o de ligamiento, utilizando marcadores moleculares, posibilita la identificación y localización de QTLs en una población de individuos, y la selección indirecta. El mapeo de QTLs, además de ser una aproximación clásica al conocimiento de la función génica (del fenotipo al genotipo), conlleva una profundización en el conocimiento de la base genética de estos caracteres. Este conocimiento supone una base teórica para diseñar el método de mejora más adecuado en cada situación, y mejorar la eficiencia de la selección.

Por otro lado, el desarrollo de mapas físicos (en los que se ordena y localiza físicamente el genoma de un determinado organismo) y su integración con los mapas genéticos, es un punto de partida de gran importancia para aislar genes de interés y dilucidar de forma masiva las funciones de los genes de un organismo (genómica funcional).

1.4.1. Marcadores genéticos moleculares

A partir de los años 70, las técnicas moleculares permiten detectar y estudiar variaciones individuales o polimorfismos a nivel de secuencia del ADN y, por tanto, el desarrollo de marcadores genéticos moleculares. Se trata de polimorfismos que se pueden detectar por una gama diversa de técnicas y que permiten diferenciar genéticamente a organismos de la misma o distinta especie (De Vienne y col., 2003; Collard y col., 2005). Normalmente, se analiza un pequeño fragmento del ADN que puede o no contener genes.

Se pueden clasificar en dos grandes grupos: los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) y el resto. Los primeros, a su vez, se pueden clasificar según amplifiquen secuencias conocidas o secuencias aleatorias, aunque también existen marcadores que comparten ambas características. La amplificación de fragmentos de ADN y la evaluación directa de las diferencias en longitud de los productos amplificados sin necesidad de transferencia e hibridación, ha supuesto un cambio cualitativo en las posibilidades de utilización de los marcadores de ADN en Mejora Genética Vegetal.

Todos los marcadores moleculares pueden ser visualizados, de modo que se pueden identificar los alelos que porta un individuo para un determinado

marcador. La visualización se puede llevar a cabo mediante técnicas electroforéticas en gel de agarosa o acrilamida, o mediante la utilización de secuenciadores. En función de la información que los marcadores moleculares pueden ofrecer, se les clasifican como dominantes o codominantes. Un marcador es dominante cuando los individuos homocigotos no se pueden diferenciar de los heterocigotos, de manera que se describen por presencia/ausencia de un fragmento. Si un marcador dominante es visualizado en un gel de agarosa mediante una banda, es imposible saber si el individuo porta el marcador en las dos copias del cromosoma (homocigoto), o solo en una de ellas (heterocigoto). Los marcadores codominantes sí permiten distinguir entre individuos homocigotos y heterocigotos. Este tipo de marcadores siempre amplificarán dos alelos, de modo que se visualizarán dos bandas si el individuo es heterocigoto, o una sola banda en caso de ser homocigoto (Nuez y col., 2000; de Vienne y col., 2003). A continuación se describen algunos de los marcadores más utilizados en vid.

Los primeros marcadores moleculares utilizados, los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), se desarrollaron a principios de la década de los ochenta (Botstein y col., 1980; Wyman y White, 1980). Con estos marcadores, el polimorfismo será detectado como una diferencia en la longitud de los fragmentos de restricción generados. Son de carácter codominante, y presentan como grandes inconvenientes el requerimiento de información previa a su evaluación y su elevado coste económico y laboral (García-Mas y col., 2000; De Vienne y col., 2003). A continuación les siguió una larga lista de marcadores que fueron apareciendo a medida que evolucionaban las técnicas de análisis molecular, de los cuales mencionaremos los más utilizados en vid. El polimorfismo de los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) se genera por la amplificación del ADN genómico mediante PCR, usando un único cebador de secuencia corta (8-10 pb) y aleatoria. Son marcadores de obtención sencilla y barata, pero presentan como inconvenientes que son de naturaleza dominante, tienen baja reproducibilidad entre laboratorios, y no son transferibles entre cruzamientos y, por tanto, menos aún entre especies (Williams y col., 1990; Welsh y col., 1991; García-Mas y col., 2000). Los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) se basan en la combinación de la digestión con enzimas de restricción y la PCR selectiva (Vos y col., 1995). Son marcadores dominantes más reproducibles que los RAPDs, no precisan de información previa pero sí de una tecnología más compleja y cara (García-Mas y col., 2000; De Vienne y col., 2003). Algunos marcadores, como los SAMPLs (Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci) (Vogel y Scolnick, 1998) y los S-SAPS (Sequence-Specific Amplification Polymorphisms)

(Waugh y col., 1997), derivan de una modificación de la técnica de los AFLPs. Los marcadores tipo RFLP, RAPD y AFLP, pueden convertirse en marcadores específicos de PCR más sencillos de evaluar, como los SCARs (Sequence Characterised Amplified Regions). Estos marcadores, que pueden ser codominantes, permiten la detección de un único locus, aunque requieren información previa sobre la secuencia a estudiar. La conversión hacia marcadores tipo SCARs puede ocasionar la pérdida de polimorfismo (Konieczny y Ausubel, 1993). Como solución a este inconveniente, los fragmentos amplificados por PCR pueden ser digeridos con enzimas de restricción con objeto de generar polimorfismo. Esto da lugar a marcadores tipo CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence), y a su variante dCAPS, ambos de carácter codominante. Los SSCPs (Single Strand Conformation Polymorphisms) se desarrollan aprovechando los cambios en la configuración tridimensional provocados por las variaciones en la secuencia de ADN, lo que ocasiona diferencias en la movilidad en un gel de acrilamida, dando lugar al polimorfismo (Orita y col., 1989). Esta técnica, que precisa de la amplificación específica de una región por PCR, es útil para detectar polimorfismos debidos a una sola base.

En este trabajo se han utilizado dos tipos de marcadores moleculares que se detallan a continuación: los microsatélites y los SNPs.

1.4.1.1. Microsatélites (SSR, Simple Sequence Repeat)

Los microsatélites, SSRs (Simple Sequence Repeats) o STRs (Short Tandem Repeats) son regiones genómicas hipervariables constituidas por una pequeña unidad de repetición de di-tri o tetranucleótidos en tándem, aunque también son posibles algunas combinaciones más complejas. El diseño de cebadores específicos para las secuencias únicas que flanquean la región redundante permite la amplificación por PCR de la región repetida. La base genética del polimorfismo detectado se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tándem entre individuos y, consecuentemente, del tamaño del fragmento amplificado. Cuando las diferencias en longitud de los fragmentos amplificados es alta se pueden evaluar en geles de agarosa, pero es más frecuente su evaluación en geles de acrilamida o en secuenciadores de ADN. El uso de estos marcadores ha estado limitado por la dificultad de localizarlos en el genoma y la necesidad de determinar previamente las secuencias que flanquean la repetición. Tienen un desarrollo costoso y su uso está limitado a especies en las que exista esta información o en las que pueda transferirse desde especies próximas. Una vez que se dispone de esta información, son marcadores de bajo coste que presentan

perfiles genéticos fácilmente interpretables, permitiendo el intercambio de información entre laboratorios (García-Mas y col., 2000; De Vienne y col., 2003).

Un microsatélite puede tener multitud de alelos, en función del número de repeticiones que presenta en los distintos individuos. Esto es debido a que estas secuencias tienen una tasa de mutación más alta que cualquier otro tipo de secuencias. Aunque el motivo de esto no está del todo dilucidado, podría deberse a que durante la replicación del ADN, la nueva cadena formada se empareja con la repetición equivocada, de modo que la ADN polimerasa puede añadir o deletar una o más copias de la repetición en la nueva cadena de ADN (Moxon y Wills, 1999). También puede deberse a errores en la recombinación (Oliveira y col., 2006).

Además de ser marcadores muy polimórficos y abundantes, distribuidos por todo el genoma, son marcadores codominantes, altamente reproducibles y transferibles entre cruzamientos, ya que las secuencias que flanquean las repeticiones se conservan entre individuos de la misma especie y parcialmente entre especies afines. Por todo ello, han sido los marcadores moleculares más utilizados en estudios genéticos (Thomas y col., 1994; Bowers y Meredith, 1997; Oliveira y col., 2006).

Actualmente, toda la información disponible acerca de los microsatélites identificados en el genoma de la vid se encuentra en la base de datos UniSTS del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Muchos de ellos han sido publicados en revistas de investigación, como los VMC (Di Gaspero y col., 2000, Pellerone y col., 2001, Arroyo-García y Martínez-Zapater, 2004), desarrollados por el consorcio privado Vitis Microsatellite Consortium (Agrogene SA, Moissy, Cramayel, France), así como los VrZAG (Sefc y col., 1999), VVS (Thomas y Scott, 1993, Thomas y col., 1994), VVMD (Bowers y col., 1996, 1999), SCU (Scott y col., 2000), UDV (Di Gaspero y col., 2005), VVI (Merdinoglu y col., 2005) y VChr (Cipriani y col., 2008).

1.4.1.2. SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)

Los SNPs son marcadores cuyo polimorfismo se origina por variaciones de un solo nucleótido en la secuencia de ADN. Dada su naturaleza, los SNPs se encuentran presentes en cualquier región genómica, por lo que pueden marcar cualquier gen de interés para la mejora, y ofrecen la posibilidad de explotar una variación inmensa. El nivel de polimorfismo es muy similar entre regiones codificantes y no codificantes, aunque es ligeramente superior en estas últimas. Es el polimorfismo más abundante en la mayoría de los organismos (Rafalski, 2002 a, b), pero requiere el conocimiento previo de la secuencia de los alelos a investigar.

En vid se ha observado la presencia de un SNP cada 64 o 250 pb, según los estudios (Lijavetzky y col., 2007; Velasco y col., 2007). Aunque son marcadores bialélicos, presentan las ventajas de ser codominantes y altamente reproducibles entre laboratorios y técnicas de detección, ya que los alelos se diferencian por un nucleótido en una posición dada, en lugar de por el tamaño de los mismos, como sucede con el resto de marcadores moleculares. Por todo ello se consideran marcadores de gran interés y utilidad, tanto en la construcción de mapas genéticos como en la identificación varietal (García-Mas y col., 2000; De Vienne y col., 2003).

La detección de SNPs pasa necesariamente por la amplificación de secuencias genómicas, que pueden provenir de cDNAs, BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), o bases de datos publicadas con ESTs (Expressed Sequence Tags). Existen varios métodos para detectar SNPs en estas secuencias, como el desarrollo de SSCPs (Orita y col., 1989) y de CAPS (Konieczny y Ausubel, 1993), la re-secuenciación de ESTs (Lijavetzky y col., 2007) y de secuencias terminales de BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) (Salmaso y col., 2008), o la secuenciación de genomas completos como el recientemente secuenciado genoma de la vid (Jaillon y col., 2007; Velasco y col., 2007). Gracias a los últimos adelantos en la secuenciación de ADN, se está avanzando en la producción en gran escala de este tipo de polimorfismo en plantas (Margulies y col., 2005; Shen y col., 2005; Streemers y Gunderson, 2005; Tobler y col., 2005).

La evaluación del polimorfismo se puede realizar en geles donde se resuelven los productos de amplificación generados utilizando cebadores específicos, uno de los cuales hace coincidir el extremo 3' con el nucleótido origen del polimorfismo. También se puede resolver el polimorfismo mediante cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante (DHPLC, 'Denaturing High-Performance Liquid Chromatography'), conocidas las temperaturas de fusión de los productos PCR de los alelos a estudiar, en base a sus secuencias. La utilidad de los SNPs reside en su uso a gran escala, por lo que se han propuesto métodos más sofisticados, que implican el uso de microchips.

1.4.2. Construcción de mapas de ligamiento

Un mapa genético o de ligamiento es una representación de la posición relativa de los genes o marcadores dentro de un cromosoma o grupo de ligamiento. Se dice que dos marcadores están ligados cuando se sitúan sobre el mismo cromosoma y tienden a heredarse juntos. La población empleada para su construcción puede provenir de un cruzamiento (F_1), de uno o varios

retrocruzamientos (F_{1+n}), o de un conjunto de individuos no emparentados directamente (germoplasma).

La construcción de un mapa genético implica la estimación de la distancia genética o distancia de mapa entre dos loci, estimada dos a dos. Esta distancia se define como el valor de la fracción de recombinación entre loci, es decir, la proporción en que se forman nuevas asociaciones entre dos pares de marcadores respecto al número total de asociaciones. Su valor mínimo es 0 y el máximo 0,5, correspondiendo este último valor con la situación de independencia genética de los loci. La distancia entre marcadores es un valor relativo para cada cruzamiento puesto que depende de los marcadores que se consideren. Aumentando el número de marcadores entre dos determinados su distancia cambiará incrementándose (Kearsey y Pooni, 1998; Nuez, 2000; De Vienne, 2003b).

Una vez comprobado el ligamiento mediante una prueba chi-cuadrado, se puede estimar el valor de recombinación por distintos métodos. Los métodos basados en la regresión y en la máxima verosimilitud son los que obtienen menor desviación típica de las estimas, y por ello son los más utilizados por los distintos paquetes informáticos disponibles. Calculados los pares de valores de recombinación entre loci, hay que definir la significación de éstos, es decir, la probabilidad de que dos loci estén ligados con el valor calculado frente a la probabilidad de que sean independientes con la misma segregación. Es lo que se conoce como valor LOD (Likelihood Ratio, o Logarithm of Odds), que es el logaritmo decimal de la razón de desigualdad (Morton, 1955). Un LOD > 3 es equivalente a decir que la hipótesis alternativa (ligamiento) es 1.000 veces más probable que la hipótesis nula (independencia). El nivel de significación o valor LOD, es elegido por el investigador. Aumentando su valor se evitará la falsa inclusión de marcadores en los distintos grupos de ligamiento (GL), y se incrementará el número de grupos establecidos. Cuando se dispone de un buen conjunto de datos, y se utilizan los marcadores adecuados a la población disponible, el número de GL será igual al complemento haploide de la especie en cuestión. No es conveniente bajar el valor LOD para forzar esta equivalencia, recomendándose valores superiores a 3 (Kearsey y Pooni, 1998; Nuez, 2000; De Vienne, 2003b).

Para ordenar los marcadores ligados se han descrito diferentes algoritmos que calculan la bondad de un mapa determinado entre todos los posibles (Lander y Green, 1987). El programa JoinMap calcula de forma automática las ordenaciones que hacen mínimo los cuadrados de la diferencia entre los valores de recombinación observados (obtenidos directamente de todos los pares de valores)

y los estimados en el mapa. De este modo, a partir de los dos marcadores más próximos en el grupo a ordenar, se van añadiendo nuevos loci y al final se obtiene la bondad del mapa medida con un valor chi-cuadrado. Siempre que se disponga de marcadores comunes, este programa permite también integrar mapas obtenidos con diferentes poblaciones y parentales, basándose en las distancias entre pares de valores (Stam, 1993). La integración de mapas permite establecer el orden de los marcadores inicialmente genotipados en otras poblaciones, y la transferencia de marcadores a las variedades empleadas para la construcción del mapa integrado. La robustez de un mapa será función tanto del tamaño de la población utilizada, como de la presencia de marcadores que presenten segregación sesgada o no mendeliana, o errores de genotipado.

La fórmula que relaciona la distancia en un mapa de ligamiento con la fracción de recombinación se conoce como función de mapa. Las dos funciones de mapa más utilizadas fueron desarrolladas por Haldane (Haldane, 1919) y Kosambi (Kosambi, 1944). Haldane asume ausencia de interferencia mientras que Kosambi considera la presencia de interferencia positiva. De esta forma, la distancia de Kosambi tiene en cuenta que la probabilidad de un sobrecruzamiento en un intervalo disminuye con la existencia de un sobrecruzamiento en el intervalo adyacente. Esta distancia se expresa en centimorgan (cM), de manera que 1 cM es la distancia que separa a dos loci entre los cuales se espera un número de sobrecruzamientos de 0,01. Valores entre 40 y 50 cMs indican que los loci segregan de forma independiente (Kosambi, 1944).

1.4.3. Mapas genéticos en vid

Debido al carácter altamente heterocigoto de la vid, la estrategia seguida para la construcción de los mapas genéticos es la del pseudocruzamiento prueba en dos sentidos (Grattapaglia y Sederoff, 1994), utilizando poblaciones F_1 derivadas de cruzamientos intra o interespecíficos, o de autocruzamientos. Consiste en la construcción de dos mapas del mismo cruce, uno con la segregación debida a la meiosis de la madre y otro del padre. Los primeros mapas genéticos de vid fueron construidos en 1995 por Lodhi y col. a partir de una población F_1 de 60 individuos procedente del cruce entre híbridos interespecíficos, utilizando marcadores tipo RFLP, RAPD e isoenzimas. Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos proyectos de desarrollo de mapas genéticos a partir de cruces intra e interespecíficos de vid, donde el tipo de marcadores moleculares utilizados ha ido variando con el tiempo. Los primeros mapas fueron construidos fundamentalmente con AFLPs, RAPDs, CAPS y SSCPs (Dalbó y col., 2000; Doligez y col., 2002;

Grando y col., 2003; Doucleff y col., 2004; Fischer y col., 2004; Cabezas y col., 2006).

Los marcadores microsatélite (SSR) son muy útiles para comparar GLs homólogos entre distintos mapas, por ser altamente transferibles entre laboratorios y por su carácter codominante (Grando y col., 2003). Esto hizo que a partir de 2004 empezaran a usarse con mayor asiduidad (Adam-blondon y col., 2004; Riaz y col., 2004; Fanizza y col., 2005; Doligez y col., 2006 a, b; Lowe y Walker, 2006; Riaz y col., 2006; Di Gaspero y col., 2007; Mejía y col., 2007; Welter y col., 2007; Costantini y col., 2008; Salmaso y col., 2008; Vezzulli y col., 2008; Battilana y col., 2009; Duchêne y col., 2009; Fournier-Level y col., 2009; Doligez y col., 2010; Riaz y col., 2011). El mapa construido por Adam-Blondon y col. (2004) a partir de 245 SSRs en una progenie de un cruce intraespecífico de *V. vinifera* (Siraz x Garnacha), ha sido tomado como referencia por el IGGP (International Grape Genome Program) para el establecimiento de la nomenclatura de los GLs de *V. vinifera*. A partir del año 2007, la mejora de la tecnología que facilita el desarrollo de marcadores tipo SNP, y la enorme abundancia de estos polimorfismos en el ADN de la vid, propició la progresiva incorporación de estos marcadores a los mapas genéticos. Esto ha permitido que se pueda mapear un gran número de marcadores moleculares desarrollados a partir de genes candidatos implicados en el control de los caracteres de interés. De este modo, se puede detectar si un determinado gen co-localiza con un QTL, lo que indica un posible papel del gen sobre el carácter (Di Gaspero y col., 2007; Troggio y col., 2007; Welter y col., 2007; Costantini y col., 2008; Salmaso y col., 2008; Vezzulli y col., 2008; Battilana y col., 2009; Duchêne y col., 2009). Aunque los SNPs han permitido el mapeo del mayor número de genes, también se han encontrado polimorfismos tipo SSR o AFLPs partiendo de secuencias génicas obtenidas a partir de ESTs o cDNAs (Scott y col., 2000; Decroocq y col., 2003; Riaz y col., 2006).

El primer mapa integrado lo construyeron Doligez y col. (2006a), utilizando cinco progenies desarrolladas por distintos grupos de investigación: una proveniente del autocruzamiento de Riesling, y otras derivadas del cruce Siraz x Garnacha, Chardonay x Bianca, Riesling x Cabernet Sauvignon, y entre las variedades de uva de mesa MTP2223-27 (Dattier de Beyrouth x 75 Pirovano) y MTP2121-30 (Alphonse Lavallée x Sultanina). En dicho mapa de referencia se estableció el orden de 502 marcadores SSR, altamente transferibles, muy útil para la construcción de otros mapas genéticos. Di Gaspero y col. (2007) construyeron un mapa integrado orientado a la búsqueda de QTLs relacionados con la resistencia a enfermedades. Este mapa fue construido a partir de cuatro mapas parentales,

provenientes de los cruces interespecíficos Chardonnay x Bianca, y Cabernet Sauvignon x 20/3, empleando SSRs y marcadores derivados de análogos a genes de resistencia (RGAs). Bianca y 20/3 son híbridos obtenidos mediante cruzamientos donde el 80% del fondo genético corresponde a diferentes especies del género *Vitis*. Con este mapa se consigue establecer la posición cromosómica de los marcadores derivados de RGAs, empleando el marco de SSRs cuyo orden fue establecido anteriormente por Doligez y col. (2006a). Vezulli y col. (2008) construyeron un mapa integrado a partir de tres cruzamientos intraespecíficos (Siraz x Pinot Noir, Siraz x Garnacha, Cabernet Sauvignon x Riesling), en el que incluyen 283 SSRs y 501 SNPs. Recientemente, se ha publicado un mapa integrado a partir de poblaciones provenientes del cruzamiento entre ocho variedades de vid (Dominga, Autumn Seedless, Monastrell, Cabernet Sauvignon, Ruby Seedless, Moscatuel, Moscatel de Hamburgo, y Sugaone), en el que se incluyen 168 SSRs y 202 SNPs (Cabezas y col., 2011).

Para que un mapa sea efectivo en el estudio de un carácter, ha de ser construido con una progenie que segregue para el carácter deseado, por lo que es conveniente que los parentales sean fenotípicamente distintos para el mismo. Siguiendo este criterio, se ha generado un abanico de mapas útiles para la investigación de un gran número de caracteres de calidad del fruto como la apirenia (Doligez y col., 2002; Cabezas y col., 2006; Mejía y col., 2007; Costantini y col., 2008), tamaño y peso de las bayas (Doligez y col., 2002; Fanizza y col., 2005; Cabezas y col., 2006; Mejía y col., 2007; Costantini y col., 2008), color de las bayas (Doligez y col., 2002; Fischer y col., 2004; Fournier-Level y col., 2009), y aroma moscatel (Sevini y col., 2004; Doligez y col., 2006 b; Battilana y col., 2009; Duchêne y col., 2009). Con esta herramienta también se ha estudiado la productividad, evaluada bien como el rendimiento total de la planta, el número de racimos por planta, el número de bayas por racimo y peso del racimo (Fanizza y col., 2005), o bien como el número de inflorescencias por brote (Doligez y col., 2010). Otros mapas han permitido el estudio de caracteres fenológicos como el tiempo de brotación, floración, envero o maduración (Mejía y col., 2007; Costantini y col., 2008; Duchêne y col., 2011).

En el estudio de la resistencia a enfermedades y plagas, se han empleado mapas a partir de cruces interespecíficos, en los que al menos uno de los parentales pertenece a una especie del género *Vitis* de procedencia americana, que manifiesta algún tipo de resistencia. Así, existen mapas sobre los que se ha realizado análisis de QTLs para resistencia a enfermedades como el mildiu, oídio y podredumbre negra o gris (Lodhi y col., 1995; Dalbó y col.; 2000; Fischer y col.,

2004; Di Gaspero y col., 2007; Welter y col., 2007; Salmaso y col., 2008), a la bacteria *Xylella fastidiosa*, responsable de la enfermedad de Pierce (Doucleff y col., 2004; Riaz y col., 2006), o a plagas como el nemátodo *Xypinema index* (Doucleff y col., 2004; Xu y col., 2008). Los patrones o portainjertos también han sido objeto de estudio mediante el uso de mapas genéticos, ya que existen multitud de caracteres que estas especies de vitáceas pueden aportar al cultivo de la variedad de *V. vinifera* injertada. Entre estos caracteres se encuentran la resistencia a plagas como filoxera o nemátodos, tolerancia frente a suelos salinos, crecimiento vigoroso, clorosis inducida por el limo, y el éxito en el injertado (Lowe y Walker, 2006).

Conocida la implicación de una región (o regiones) del genoma en un carácter, tras un análisis previo de QTLs, algunos autores han empleado una estrategia de mapeo parcial, saturando dicha(s) zona(s) con marcadores adicionales, con objeto de profundizar en el estudio de la(s) misma(s) (Adamblondon y col., 2001; Duchêne y col., 2009; Riaz y col., 2011).

1.4.4. Mapeo de caracteres cuantitativos o QTLs (Quantitative Trait Loci)

Un QTL es una región del genoma responsable de la variación cuantitativa en la expresión de un carácter. El primer paso para el mapeo genético de un locus que controla un carácter cuantitativo o QTL, es la existencia de una asociación estadística significativa entre la segregación del carácter y la segregación de un marcador genético en una población determinada (Jensen, 1989). Esta asociación indica que el marcador genético está *ligado* a un locus que controla todo o parte del carácter cuantitativo. Obtenido el mapa de ligamiento de una población que muestra variación continua para un carácter, el procedimiento básico y simplificado de análisis de QTLs para este carácter es similar al seguido para la construcción del mapa. En los intervalos entre pares de marcadores adyacentes, se calcula el LOD para presencia de un locus influyendo en el carácter en estudio (probabilidad de la presencia de un QTL frente a la probabilidad de la ausencia del mismo). Si la puntuación LOD excede el valor umbral crítico, hay evidencia de un QTL ligado al marcador. El resultado es una valoración de las regiones cromosómicas afectando este carácter (Kearsey y Pooni, 1998; de Vienne y Causse, 2003).

Existen diversos programas informáticos para el análisis de QTLs con aproximaciones muy similares (De Vienne y Causse, 2003). En la mayoría de ellos, se comienza con el mapeo por intervalos (MI) propuesto por Lander y Botstein (1989). Los programas calculan por regresión la asociación entre los valores del

carácter en estudio, en cada individuo, y su genotipo, para cada marcador y en intervalos regulares entre marcadores. Esta regresión depende de unos valores, denominados estimadores de máxima probabilidad (EMP), que maximizarán la probabilidad de que los datos fenotípicos estén ligados a un posible QTL. El estimador más efectivo es el que refleja el efecto fenotípico causado por la sustitución de un alelo en dicho QTL (el efecto sería nulo en caso de no ligamiento del QTL). Estos EMP son comparados con los EMP obtenidos bajo la suposición de que no hay ningún QTL ligado, con la siguiente ecuación:

$$\text{LOD} = \text{Log}_{10} (\text{EMP QTL ligado} / \text{EMP QTL no ligado})$$

donde LOD (Logarithm of Odds) refleja la estima del ajuste, es decir, la probabilidad de la presencia de un QTL frente a la probabilidad de la ausencia del mismo. Si el LOD sobrepasa un determinado valor umbral, se señalará la presencia de un QTL.

La significación estadística de los QTLs se obtiene calculando un valor umbral de LOD mediante diferentes métodos (Doerge y Rebaï, 1996). La mayoría de los programas informáticos utilizan el método empírico desarrollado por Churchill y Doerge (1994) basado en la teoría de la permutación (Fischer, 1935), que consiste en cambiar o permutar aleatoriamente los datos cuantitativos entre los individuos de la población de mapeo, con el fin de destruir cualquier relación entre los valores fenotípicos y los marcadores o valores genotípicos. Este método, al ser un método empírico (estudia directamente los datos) y no paramétrico (no aplicado a un modelo con una distribución particular), es válido para cualquier diseño experimental, sin exigencias en cuanto al tamaño poblacional, y con cualquier densidad de mapa, pudiendo ser aplicado a datos que no siguen una distribución normal. Aunque no depende de las densidades de mapa, Krugliak y Lander (1995) recomiendan usar el umbral obtenido con un mapa denso, con el fin de minimizar los falsos positivos. La precisión con la que se calculan los valores umbrales estará determinado por el número de permutaciones. Un número de 1.000 permutaciones se considera adecuado para un nivel de significación $\alpha = 0,05$ (Doerge y Churchill, 1996).

El MI analiza pares de marcadores a lo largo de todo el genoma, y permite obtener información de todos los cromosomas con un solo análisis, de modo que se pueden detectar varios QTLs simultáneamente. Sin embargo, con este método los QTLs son mapeados uno cada vez, sin tener en cuenta la presencia de otros QTLs (mapeados o no). Por lo tanto, este método en sí mismo tiene escaso valor puesto que un carácter cuantitativo por definición está controlado por varios genes. El

efecto de otros QTLs no ligados es equivalente al efecto ambiental y reducirá el valor LOD. Como consecuencia, el poder de detección puede estar comprometido, y las estimaciones de la localización y efectos de los QTLs pueden estar sesgadas (Jansen, 1993). El ligamiento entre dos QTLs implicados en el control del carácter estudiado dará lugar a desplazamientos de los picos de máximo LOD.

Sin embargo, el MI permite la detección de aquellos marcadores que pueden estar implicados en el control del carácter. Estos marcadores se emplean como cofactores en los modelos desarrollados para análisis de QTLs múltiples, utilizando un modelo de regresión múltiple. El resultado es la reducción del ruido de fondo y una mejor definición de los valores LOD. Jansen (1992, 1993, 1994a) propone un método muy similar al propuesto por Zeng (1994), en el que combina la regresión múltiple con el MI. Este método consiste en fijar modelos de un único QTL (uno por cada intervalo) y el uso de marcadores seleccionados como cofactores para la regresión del fenotipo sobre el genotipo. De ese modo se consigue eliminar los efectos de posibles QTLs en otras partes del genoma. Este marco unificador de modelos para detección y mapeo de QTLs múltiples recibe el nombre de MQM (Jansen, 1994a), acrónimo de Multiple-QTL Models y también de Marker-QTL-Marker (que refleja la inserción de QTLs entre marcadores del mapa de ligamiento). Jansen (1994b) demuestra que la probabilidad de un error tipo II (QTL presente pero no detectado) en el caso de QTLs no ligados (en distintas cromosomas) es menor con MQM que con MI. También observa que la detección de distintos QTLs ligados (en el mismo cromosoma) es mucho más fácil con MQM que con MI, tanto para QTLs con efectos opuestos (mutuamente neutralizantes), que a menudo no son detectados, como para QTLs con el mismo signo (Martínez y Curnow, 1992).

Actualmente, el procedimiento propuesto por Van Ooijen (2009) para la detección y mapeo de QTLs es hacer inicialmente una búsqueda de posibles QTLs usando una regresión lineal múltiple o el MI. Después, marcar como cofactores aquellos marcadores más cercanos a los QTLs detectados, que harán el papel de QTLs cercanos para el posterior análisis MQM. Este análisis MQM hará una búsqueda de QTLs a lo largo del genoma, como el MI, pero teniendo en cuenta la presencia de los cofactores seleccionados, de modo que se reducirá la varianza residual y, por tanto, se aumentará el poder de detección de otros QTLs. Tras el primer análisis MQM es posible que varíe la posición de algunos QTLs detectados anteriormente, por lo que habrá que marcar nuevamente los cofactores más cercanos y volver a hacer el análisis MQM. Este proceso se repetirá las veces necesarias hasta obtener un set de cofactores que maximice el perfil de probabilidad de los QTLs detectados.

Los programas informáticos suelen dar en sus salidas, conjuntamente con la estima del ajuste, generalmente con un valor LOD, el porcentaje de variabilidad explicada y la componente aditiva. El programa utilizado en este trabajo, MapQTL[®] v 4.0 (Van Ooijen y col., 2002), lleva implementados los métodos MI y MQM, junto con el test de permutaciones. Estos métodos están siendo ampliamente utilizados por la comunidad científica.

1.4.5. QTLs en vid

El mapeo por intervalos (MI) y el mapeo de QTLs múltiples (MQM) permiten seleccionar el umbral de LOD, y por tanto la detección de QTLs, a dos niveles. En primer lugar, esta operación se puede hacer en cada GL de forma independiente, de modo que los QTLs que se detecten tendrán un nivel de significación estadístico en función de los parámetros restringidos a ese GL. En segundo lugar, se puede establecer el umbral de LOD a nivel genómico, de manera que los QTLs detectados que superen dicho LOD umbral tendrán un poder estadístico muy superior al primer caso, ya que se tiene en cuenta la variación de todos los marcadores presentes en el genoma completo. En base a esto, los QTLs que superan el umbral LOD solo a nivel de GL se denominan *sugerentes*, y los que lo superan a nivel genómico *significativos*. Asimismo, los QTLs detectados con los datos de varias campañas se denominan QTLs *consistentes*.

Durante las últimas dos décadas ha habido un progreso considerable en el desarrollo de marcadores moleculares en vid, que han sido usados para el mapeo de QTLs de caracteres de calidad (Doligez y col., 2002, 2006, 2010; Fischer y col. 2004; Fanizza y col., 2005; Cabezas y col., 2006; Costantini y col., 2008; Fournier-Level y col., 2009; Duchêne y col., 2011; Karaagac y col., 2012) o resistencia a enfermedades (Akkurt y col., 2007; Welter y col., 2007; Xu y col. 2008; Riaz y col., 2011), y que ofrecen la oportunidad de incrementar la eficiencia de la mejora convencional a través de la selección asistida por marcadores. Aunque los QTLs hayan sido detectados utilizando mapas construidos mediante cruzamientos interespecíficos, como en el caso de la resistencia a enfermedades, contribuyen al conocimiento de las regiones cromosómicas y de los genes que intervienen en los caracteres de interés en *V. vinifera*. Si bien esta especie no dispone de los genes de resistencia *per se*, estos pueden ser incorporados mediante el cruzamiento con otras especies del género *Vitis*, como en el caso de la variedad Regent, altamente resistente a oídio y a mildiu (Eibach y Töpfer, 2003).

A continuación se exponen los QTLs que han sido descritos para los caracteres de mayor importancia en vid. Los GLs de los trabajos publicados con

anterioridad al mapa de Adam-blondon y col. (2004), se han renombrado en este resumen de acuerdo con dicho mapa de referencia.

Fenología. Son pocos los trabajos publicados relacionados con el estudio de las distintas fases fenológicas mediante el análisis de QTLs. Acerca de la brotación, Duchêne y col. (2011) describieron dos QTLs principales en los GLs 4 y 19, y otros QTLs menores en los GLs 4, 6, 7, 10 y 14. Ninguno de ellos explicó más del 12,7% de la varianza fenotípica total. En este trabajo, la brotación fue evaluada como los días grado desde el 15 de febrero hasta que el 50% de las yemas alcanzaron el estadio C de Baggiolini (1952).

Respecto a la floración, Costantini y col. (2008) detectaron QTLs significativos en los GLs 1, 2 y 6 (7,3-16,4% varianza explicada), estableciendo como tiempo de floración aquel en el que el 50% de las flores están abiertas. Duchêne y col. (2011) identifican dos QTLs en los GLs 7 y 14 (16,2-27,4% var. expl.), y otros QTLs menores en los GLs 2, 6, 15 y 16. En este caso, la floración se midió como el número de días grado desde la brotación hasta la floración.

En cuanto al envero, establecido como el punto en que las bayas experimentan el ablandamiento típico del inicio de este estadio, Fischer y col. (2004) detectaron QTLs en los GLs 2, 6 y 15, y Costantini y col. (2008) en los GLs 2, 6 y 16, que explicaron entre el 5,8% y el 12,6% de la varianza fenotípica. Duchêne y col. (2011) identificaron para este carácter QTLs en los GLs 16 y 18 (13,7-16% var. expl.), además de otros QTLs de efecto menor en los GLs 7 y 14. En este trabajo, el envero se midió como el número de días grado desde la floración hasta el envero.

Referente al tiempo de maduración, Mejía y col. (2007) detectaron QTLs en los GLs 17 y 18, mediante el método de MI, que explicaron el 14,3-31,8% de la variación fenotípica. Los híbridos apirenos maduraron antes que los que tenían semillas, y el QTL del GL 18 co-localizó con otro QTL detectado para la apirenia, por lo que los autores atribuyen un efecto pleiotrópico de la semilla sobre el tiempo de maduración. Costantini y col. (2008) detectaron un QTL significativo en el GL 6 que explicó hasta el 17,2% de la varianza fenotípica. En ambos trabajos, el carácter se estimó como el punto en que el mosto alcanzó 17 y 16 °Brix, respectivamente.

Fertilidad. Este carácter, medido como el número de racimos por sarmiento, correlaciona fuertemente con el rendimiento o productividad (Kg de uva por planta o hectárea) (Fanizza y col., 2005). Estos autores examinaron el número de racimos por planta, detectando QTLs sugerentes en los GLs 8 y 19 con los datos de una

campana. Doligez y col. (2010) estudiaron la fertilidad midiendo el número de inflorescencias por brote en el momento de la floración, empleando dos poblaciones F_1 de uva de mesa. En ambas progenies detectaron un QTL significativo y consistente en el GL 5, que explicó hasta el 18,1% de la varianza fenotípica total. Al mismo tiempo, en uno de los cuatro mapas parentales detectaron dos QTLs significativos en el GL 14, que explicaron hasta el 11,5% de la varianza. En una de las progenies, se detectó otro QTL en el GL 5, cerca del mencionado anteriormente en el mismo GL, que tuvo carácter significativo, explicando en torno al 10% de la varianza total. Otras regiones fueron detectadas con los datos de una sola campana en los GLs 17 y 18, aunque no especifican el efecto de estos QTLs sobre el carácter.

Peso del racimo. El único trabajo que analiza QTLs para peso del racimo es el de Fanizza y col. (2005), en el que se consideró este carácter como uno de los componentes del rendimiento de la planta. En una progenie de uva de mesa detectaron QTLs de carácter sugerente en los GLs 5, 12, 16 y 17 (1,3-4% var. expl.), siendo consistente solo el QTL del GL 5.

Peso y diámetro de las bayas. Ambos caracteres están estrechamente correlacionados, por lo que el estudio de uno de ellos ofrece la información del otro (Mejía y col., 2007). Relacionados con el diámetro de la baya, Fischer y col. (2004) detectaron QTLs en los GLs 3 y 10, mediante MI, mientras que Fanizza y col. (2005) detectaron QTLs sugerentes en los GLs 4, 5, 13, 16 y 18 para el peso de las bayas. Varios autores detectaron para estos caracteres una región significativa y consistente en la parte inferior del GL 18, que explicó entre el 22% y el 66,9% de la varianza fenotípica total (Doligez y col., 2002; Cabezas y col., 2006; Mejía y col., 2007; Costantini y col., 2008). El identificado por Cabezas y col. (2006) co-localizó con el QTL detectado para la apirenia en dicho trabajo, por lo que estos autores discutieron sobre el posible efecto pleiotrópico entre ambos caracteres. Además del mencionado en el GL 18, se detectaron QTLs para el peso de las bayas en otros GLs. Doligez y col. (2002) detectaron un QTL de efecto menor en el GL 12 (6% var. expl.), y Cabezas y col. (2006) localizaron un QTL sugerente en el GL 15 (15-19% var. expl.), y otro significativo en la parte superior del GL 18 (23% var. expl.). Mejía y col. (2007) también detectaron dos QTLs sugerentes en los GLs 8 y 15 (19,3-23,6% var. expl.) y un tercer QTL en el GL 1 (13,4% var. expl.). Costantini y col. (2008) detectaron dos QTLs de efecto menor en los GLs 1 y 12 (4,6- 7,5% var. expl.), que no siempre tuvieron carácter significativo.

Color. El control genético del color de las bayas ha sido analizado mediante análisis QTL en tres progenies F₁ segregantes para este carácter (Doligez y col., 2002; Fisher y col., 2004; Fournier-Level y col., 2009). En los dos primeros mapas, el color fue evaluado cualitativamente de forma visual e incorporado como marcador morfológico, mientras que en el trabajo de Fournier-Level lo evaluaron cuantitativamente, midiendo el contenido en antocianinas. En todos los casos, el color localizó de forma significativa en el GL 2, explicando hasta el 62% de la variación fenotípica (Fournier-Level y col., 2009).

Apirenia. Todos los grupos de trabajo que han estudiado este carácter, lo han desglosado en varios parámetros, como número de semillas totalmente formadas (NS), número de semillas y/o esbozos seminales (NS_EB), peso fresco (PF) y seco (PS) de las semillas y/o esbozos seminales, o materia seca de las semillas y/o esbozos seminales (MS = PS/PF). El primer trabajo que abordó un estudio genético de la apirenia basándose en la búsqueda de QTLs fue el de Doligez y col. (2002). Estos autores detectaron una región en el GL 18, implicada consistentemente en todos los parámetros estudiados (NS_EB, PF, PS, MS), y con un gran efecto sobre los mismos (11-51% var. expl.). Conjuntamente, para NS detectaron de manera consistente un QTL significativo en el GL 1 (11% var. expl.). Cabezas y col. (2006) detectaron QTLs en los GLs 1, 3, 10, 14 y 18 para PF, y en todos los casos produjeron un efecto de disminución del peso de las semillas y/o esbozos seminales. El QTL del GL 18 (63% var. expl.) fue detectado en la parte inferior del GL, coincidiendo con el publicado por Doligez y col. (2002). Por otro lado, en la región central del GL 18 del mapa integrado también detectaron un nuevo QTL (con intervalos de confianza no solapantes), que explicó el 12-25% de la variación fenotípica. Respecto al NS_EB, consideraron tres QTLs que localizaron en los GLs 4, 14 y 18 (8-29% var. expl.).

Los resultados de Costantini y col. (2008) confirman la presencia de un QTL consistente y de efecto mayor en el GL 18 para los parámetros NS, MS, PF y PS (13,8-91,4% var. expl.). También identificaron otros QTLs consistentes de efecto menor para todos los parámetros. Así, detectaron una región en el GL 2 para NS, QTLs en los GLs 6, 10, 13 y 15 para PF, y en los GLs 2 y 15 para PS, co-localizando este último con el detectado para PF en el mismo GL. Mejía y col (2007) analizaron mediante el método MI los caracteres PF, PS, NS_EB, NS y MS durante dos campañas. Para PF y NS detectaron QTLs significativos en los GLs 16 y 18, que explicaron entre el 80,8% y el 94,5% de la varianza fenotípica total. En el mismo intervalo de confianza del QTL detectado para ambos caracteres en el GL

18, también posicionaron QTLs para los caracteres PS y MS que explicaron porcentajes similares de variación fenotípica. Relacionados con NS, NS_EB y MS, se detectaron otros QTLs en los GLs 4, 8 y 15, respectivamente, que explicaron entre el 40,6% y el 96,1% de la varianza. Los altos porcentajes de varianza explicada por estos QTLs pueden ser debidos a las limitaciones del MI, al tamaño poblacional, y/o a intervalos de confianza poco saturados (Mejía y col., 2007).

Aroma. Con la excepción del estudio preliminar realizado por Sevini y col. (2004), el primer trabajo exhaustivo de investigación sobre la base genética del aroma fue realizado por Doligez y col. (2006b). Este trabajo se basó en mediciones para el contenido de linalol, nerol y geraniol, durante tres campañas, en una población F_1 derivada de una variedad no aromática y Moscatel de Hamburgo. De esta forma identificaron un QTL significativo y consistente de efecto mayor en el GL 5, relacionado con el contenido de linalol, nerol y geraniol, que explicó entre el 17% y el 55% de la varianza fenotípica. Asimismo, el aroma evaluado mediante un panel de cata también co-localizó en esta región. Estos autores detectaron otros QTLs de efecto menor para el contenido de linalol en el GL 2, y para nerol y geraniol en el GL 13. Posteriormente, Battilana y col. (2009) estudiaron el contenido de linalol, nerol y geraniol en dos progenies segregantes durante varias campañas. En la primera progenie, derivada del cruce intraespecífico entre las variedades de *V. vinifera* Italia y Big Perlon, detectaron un QTL significativo y consistente en el GL 5 (84% var. expl.) para los tres compuestos, y otro QTL consistente y significativo para linalol en el GL 10 (11-36% var. expl.). En una segunda progenie, formada a partir del cruce interespecífico Moscato Bianco (*V. vinifera*) y *V. riparia*, detectaron para los tres compuestos un QTL de efecto mayor en el GL 5 (64-93% var. expl.), y un QTL significativo adicional en el GL 2 para linalol (32% var. expl.).

Dûchene y col. (2009) analizaron en dos campañas la composición de linalol, α -terpineol, citronelol, nerol y geraniol, en dos progenies derivadas de los autocruzamientos de las variedades Moscatel Ottonel y Gewurztraminer. Para la primera progenie se construyó un mapa genético en el que se incluyeron marcadores que cubrieron todos los cromosomas de la vid, pero para la segunda progenie se construyó un mapa parcial solo con el GL 5. Estos autores detectaron en los dos mapas el mismo QTL en el GL 5 para todos los compuestos. En todos los casos la variación fenotípica (81-87%) estaba ligada a la variación en el marcador derivado del gen *DXS1*. Igualmente, en el mapa completo de Moscatel Ottonel encontraron QTLs de efecto menor en los GLs 10 y 15 para linalol, y en los GLs 1 y 13 para geraniol y α -terpineol, respectivamente.

Resistencia a enfermedades y plagas. La resistencia frente a enfermedades y plagas ha sido objeto de varios estudios que abordan el mapeo genético y análisis de QTLs. En cuanto a las enfermedades como el oídio (*Uncinula necator*) y mildiu (*Plasmopara viticola*), Dalbó y col. (2001) detectaron un QTL de efecto mayor para la resistencia a oídio en el GL 14 (41% var. expl.), empleando una población F₁ obtenida a partir del cruce interespecífico entre *V. cinerea* y *V. rupestris*. Posteriormente, Fischer y col. (2004) detectaron mediante MI un QTL consistente de efecto mayor para resistencia a oídio en el GL 15 (22,9-65% var. expl.). Respecto a la resistencia a mildiu, detectaron un QTL consistente de efecto mayor en el GL 18 (46,5-69,5% var. expl.), y un QTL de efecto menor en el GL 5. En este estudio, se utilizó una progenie derivada del cruce entre el híbrido interespecífico Regent, con elevada resistencia frente a ambos hongos, y la variedad susceptible Lemberger. Ampliando el número de marcadores moleculares para el mismo mapa genético (Regent x Lemberger), Welter y col. (2007) volvieron a detectar el mismo QTL consistente y de efecto mayor para oídio en el GL 15. Asimismo, para mildiu detectaron el mismo QTL de efecto mayor en el GL 18 y un QTL consistente de efecto menor en el GL 4.

La enfermedad de Pierce, causada por la bacteria *Xylella fastidiosa*, ha sido estudiada mediante análisis QTL por el grupo de Krivanek y col. (2006), usando el mapa construido por Doucleff y col. (2004). Estos autores detectaron un QTL en el GL 14 responsable del 72% de la varianza fenotípica total.

Por último, Xu y col. (2008) detectaron un QTL de efecto mayor (59,9% var. expl.) en el GL 19 asociado con la resistencia frente a la plaga causada por el nemátodo *Xypinema index*, además de un QTL de efecto menor en el GL 17.

2. OBJETIVOS

El cultivo de uva de mesa en España, y particularmente en la Región de Murcia que cuenta con casi la mitad de la producción nacional, es una actividad de gran importancia económica que puede verse comprometida por dos factores. En primer lugar, por el incremento de la producción en países emergentes con mano de obra mucho más barata, y en segundo lugar, por el creciente predominio en el mercado de variedades que precisan del pago de fuertes royalties para su cultivo, y que no siempre están adaptadas a las condiciones agroclimáticas de nuestra región. De ahí que sea de vital importancia la incorporación de nuevas herramientas en los programas de mejora genética que permitan el mantenimiento de la competitividad. El desarrollo de estas herramientas pasa por la profundización en el conocimiento de los determinantes genéticos que regulan los caracteres de interés en este cultivo, y el desarrollo de marcadores moleculares o de ADN que permitan una selección más rápida y eficaz de los caracteres de interés en dichos programas de mejora.

Una aproximación hacia el estudio de dichos componentes genéticos se basa en el desarrollo de mapas de ligamiento que, apoyándose en la segregación fenotípica de los caracteres de interés, nos permitan identificar los grupos de ligamiento y las regiones de los mismos implicados en el control genético de dichos caracteres. Los marcadores moleculares más próximos a estas regiones pueden ser unos buenos predictores del fenotipo, pudiendo ser empleados para seleccionar híbridos que presenten determinadas características antes de ser plantados en campo. De este modo, el proceso de selección se acelera significativamente, garantizando la obtención de nuevas variedades de forma mucho más rápida y eficaz, permitiendo así que la industria de la uva de mesa de este país, y en concreto de la Región de Murcia, mantenga el alto nivel de competitividad que le caracteriza, e incluso lo mejore.

Por todo ello, en el presente trabajo se estableció como objetivo global la identificación de los determinantes genéticos implicados en el control de caracteres de interés para la mejora de la uva de mesa, y se plantearon dos objetivos concretos:

1. La construcción de mapas genéticos de vid a partir de una población F_1 obtenida del cruzamiento dirigido entre las variedades apirenas de uva de mesa, Ruby Seedless y Moscatuel.

2. El empleo de estos mapas y de los datos fenotípicos de la población para llevar a cabo un análisis QTL que permita identificar las regiones cromosómicas implicadas en el control genético de los caracteres de interés.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

En el desarrollo de los mapas genéticos y el análisis de QTLs se ha utilizado una progenie F_1 procedente de un cruzamiento dirigido entre las variedades de uva de mesa apirenas Ruby Seedless, como parental femenino, y Moscatuel, como parental masculino (Anexo 1). Dado el carácter apireno de ambos parentales, los híbridos se obtuvieron mediante la técnica de rescate de embriones *in vitro* (Carreño y col., 1997), lográndose un total de 78 genotipos. El cruzamiento se llevó a cabo en 1996 dentro del programa de mejora genética de uva de mesa del IMIDA.

La progenie y las variedades parentales se establecieron en campo sobre su propio pie en la finca experimental Torreblanca, situada en Torrepacheco (Murcia), con coordenadas $0^{\circ} 54' 01''$ de longitud Oeste y $37^{\circ} 46' 29''$ de latitud Norte, y elevada 46 metros sobre el nivel del mar. El marco de plantación fue de $2,5 \times 0,5$ m, con un sistema de conducción en parral y riego por goteo. Mediante el riego se aportaron anualmente 200 U/ha de K, 110 U/ha de N, 70 U/ha de P_2O_5 y 50 U/ha de MgO. Asimismo se aportaron 16 kg/ha de quelato de hierro (riqueza 6%), 8 kg/ha de quelato de Zn (riqueza 16%) y 6 kg/ha de quelato de Mn (riqueza 14%).

Ruby Seedless, también conocida como King's Ruby, se obtuvo en 1939 por H.P. Olmo en Davis (California) cruzando Emperor y Sultana Moscata (Antonacci, 1991). Presenta bayas de tamaño mediano, color rojo, sabor neutro y textura media. Muestra un índice de fertilidad de 1,5 (número de racimos por brote del año) y es de maduración tardía (principios de septiembre) (Figura 3.1).

Moscatuel, procede del cruzamiento entre Moscatel Rosado n^o2 x (Cardinal x Sultanina). Presenta bayas de tamaño mediano, color amarillo, sabor moscatel y consistencia blanda. Esta variedad muestra un índice de fertilidad de 1,2 y es de maduración algo más temprana (agosto) (Figura 3.1).

Dadas las características de los parentales, esta población fue seleccionada para este trabajo por la segregación esperada, y la observada previamente, de algunos de los caracteres más importantes en uva de mesa. Esencialmente la progenie segrega para consistencia de la baya, color, sabor moscatel, fecha de maduración e índice de fertilidad. El carácter apireno de la uva también segrega en la progenie debido a su control genético cuantitativo.

Figura 3.1. Características principales de las variedades utilizadas como parentales en la generación de la población de mapeo (Antonacci, 1991). Los datos entre paréntesis y el de fertilidad corresponden al promedio obtenido durante los cuatro años de evaluación en el presente estudio.



Ruby Seedless		Moscatuel
<u>RACIMO</u>		
Muy largo	LONGITUD	Largo
Suelto	COMPACIDAD	Suelto
Elevado (688 gr)	PESO	Medio (561 gr)
<u>BAYAS</u>		
Ovoide	FORMA	Esférico o troncovoide
Bajo (3,2 gr)	PESO	Bajo (3,7 gr)
Roja	COLOR	Amarilla
Media	PIEL	Delgada/Fina
Media	TEXTURA	Blanda
Ligeramente jugosa	PULPA	Ligeramente jugosa
Neutro	SABOR	Moscatel
Rudimentarias (apirena)	SEMILLAS	Rudimentarias (apirena)
Media (30 agosto)	MADURACIÓN	Precoz-media (16 agosto)
1,50	FERTILIDAD	1,16



3.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Hormaza (2002), a partir de hojas jóvenes. Éstas se procesaron inmediatamente, o bien se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento posterior de la extracción. Se partió de aproximadamente 1 cm^2 de hoja que se pulverizó en un mortero con 1-2 ml de nitrógeno líquido. A continuación se añadió 1 ml de tampón de extracción CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 1% PVP; 0,1% bisulfito sódico; y 0,2% β -mercaptoetanol), y se continuó el prensado hasta formar una papilla homogénea que fue trasvasada a un tubo limpio. Tras añadir 100 μl de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 (v/v) y homogeneizar bien la mezcla, los tubos se incubaron en un baño a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y se les añadió cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 (v/v) hasta rellenarlos. Tras una agitación vigorosa, se centrifugaron a 7000 G durante 4 min, y se trasvasó el sobrenadante a tubos de 1,5 ml. Seguidamente, se añadió 1 ml de etanol al 96%, previamente enfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la mezcla se dejó reposar durante 20 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La madeja de ADN precipitado se recogió con una varilla de vidrio, y se lavó sumergiendo la varilla durante 10 min en 1 ml de una solución formada por acetato sódico 0,2 M disuelto con etanol al 76%. A continuación se realizó otro lavado de 10 min en 1 ml de acetato amónico 0,01 M disuelto en etanol al 76%. Tras los lavados, las varillas con el ADN se depositaron en tubos limpios, dejándose evaporar el etanol de lavado a temperatura ambiente. Una vez evaporado el etanol, se resuspendió el ADN en tampón TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 mM EDTA) y se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. La cantidad de tampón TE añadido osciló entre 0,1 y 0,4 ml, dependiendo de la cantidad de ADN precipitado en la varilla de vidrio.

La cantidad y calidad del ADN extraído se evaluaron sometiendo las distintas muestras a electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0,8% y tampón TBE1x (18 mM Tris-Bórico pH 8; 0,4 mM EDTA), junto con un marcador de peso molecular conocido. Las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente y bajo una diferencia de potencial de unos 2 V/cm. La tinción de los geles con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio y su iluminación con luz ultravioleta permitió la visualización del ADN, mediante un equipo de análisis de imagen Gel Doc XR (Bio-Rad). La cantidad de ADN se estimó por comparación visual con patrones de concentración conocida. La calidad se evaluó atendiendo a la presencia de una banda nítida de alto peso molecular, y a la presencia o ausencia de un rastro a partir de esta banda, signo de rotura y/o degradación del ADN.

En los casos en los que hubo que repetir la extracción de ADN de algunos híbridos, ésta se realizó utilizando el kit comercial “DNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, IZASA, España), siguiendo el protocolo del fabricante.

3.3. Marcadores moleculares

3.3.1. Marcadores tipo microsatélite (SSR, Simple Sequence Repeat)

Para la construcción de los mapas de ligamiento, se estudiaron 201 marcadores microsatélites nucleares (Anexo 2) mediante la amplificación por PCR de los alelos presentes en cada locus. Toda la información disponible acerca de estos marcadores se encuentra en la base de datos UniSTS del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los cebadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Applied Biosystems (<http://www.appliedbiosystems.com>), de manera que el cebador directo de cada par se modificó en su extremo 5' con la incorporación de una molécula de fluorocromo de entre cuatro posibles (NED, 6-FAM, VIC o PET). Este marcaje nos facilitó detectar el fragmento amplificado posteriormente.

En primer lugar, se realizaron pruebas de amplificación para cada pareja de cebadores utilizando ambos parentales y ocho híbridos, lo que nos permitió determinar el rango de tamaños alélicos, el tipo de segregación que presentaba cada locus en la población, así como las condiciones de PCR adecuadas para cada uno de ellos. El análisis completo de toda la progenie se llevó a cabo solo con los SSRs que se encontraban en heterocigosis en al menos un parental, y que además segregaban en la descendencia.

3.3.1.1. Amplificación de las secuencias SSRs mediante PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ L que contenía 20 ng de ADN genómico, 1x de tampón de PCR (Ecogen), 1,9 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μ M de cada cebador (Applied Biosystems) y 0,4 U de *Taq* ADN polimerasa (Ecogen). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 45 seg a la temperatura de anillamiento (t_0) respectiva de cada par de cebadores y 1 min a 72 °C, finalizando con 10 min de extensión a 72 °C. En los casos en los que no se obtuvieron amplificaciones adecuadas, se empleó un programa de amplificación (*touchdown*, Don y col., 1991) donde, manteniendo el resto de parámetros idénticos al método anterior, tras el primer ciclo a la temperatura de anillamiento (t_0), le siguieron 14 ciclos en los que dicha t_0 disminuyó 0,2 °C por ciclo, y 20 ciclos a la

temperatura de anillamiento alcanzada (t_0-3) °C. La t_0 utilizada para la amplificación de cada locus fue, como norma, inferior en tres grados a la temperatura de anillamiento teórica (T_m) de la pareja de cebadores. Las amplificaciones se llevaron a cabo en los termocicladores Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 y Eppendorf Mastercycler ep gradient S.

3.3.1.2. Detección de los fragmentos amplificados marcados con fluorescencia

Tras las reacciones de PCR se comprobó si se había producido amplificación mediante la visualización del producto de PCR en geles de agarosa. Se tomaron alícuotas de 8 μ L de cada tubo y se les añadió 5 μ L de tampón de carga, sometiénolas posteriormente a electroforesis en geles de agarosa al 1% y TBE 1x, junto con el marcador de peso molecular GeneRuler 100bp (Fermentas). La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente bajo una diferencia de potencial de 6 V/cm. La tinción de los geles con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio y su iluminación con luz ultravioleta permitió la visualización directa de los productos de amplificación (Gel Doc XR, Bio-Rad).

El siguiente paso consistió en la separación de los fragmentos amplificados por PCR en un secuenciador multicapilar ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Dichos análisis se realizaron en la Unidad de Genómica-Campus Moncloa del Parque Científico de Madrid (www.fpcm.es), donde se envió una muestra de cada producto de PCR diluido con agua, entre diez y cien veces, de acuerdo a la intensidad observada en el gel de agarosa. Previamente a la separación de los productos amplificados en el secuenciador, se añadió a cada muestra el volumen correspondiente de formamida y del marcador de peso molecular GS500LIZ (Applied Biosystems). Una vez recibidos los datos brutos procedentes del servicio de secuenciación, la detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo con el programa informático GeneMapper™ v3.7 (Applied Biosystems). Cada SSR se identificó por el tamaño amplificado y por el color de la fluorescencia (“NED”, amarillo; “6-FAM”, azul; “VIC”, verde; y “PET”, rojo). Esto permitió que se pudieran realizar cargas múltiples en el secuenciador automático, en base a los tamaños de amplificación esperados y a los distintos fluorocromos utilizados.

3.3.2. Marcadores tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Los marcadores SNPs analizados fueron desarrollados en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid, por el grupo de investigación del Profesor D. José Miguel Martínez Zapater, dentro del marco del proyecto GRAPEGEN (Lijavetzky y col., 2007). Tras analizar 451 ESTs (Expressed

Sequence Tags) de distintas variedades de vid, se generaron siete pools de 48 SNPs cada uno mediante la técnica SNPlex™ (Tobler y col., 2005). La progenie, junto con las variedades parentales, se genotiparon con estos pools en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen, www.cegen.org).

3.4. Análisis de ligamientos y construcción de mapas genéticos

Dado el alto grado de heterocigosidad de la vid, se pudo utilizar una progenie F_1 en la construcción de los mapas de ligamiento de Ruby Seedless y Moscatuel, siguiendo la estrategia del pseudocruzamiento prueba en dos sentidos (Grattapaglia y Sederoff, 1994), mediante el análisis de la segregación de marcadores moleculares en la progenie. Empleando la información generada a partir de estos mapas se construyó también un *mapa integrado* del cruzamiento.

3.4.1. Marcadores utilizados en la construcción de los mapas de ligamiento

Los marcadores utilizados (SSRs y SNPs) son de tipo codominante y, por tanto, pueden discriminar entre híbridos homocigotos y heterocigotos para cada locus. Se pueden clasificar en:

- **Marcadores completamente informativos:** con ellos se puede diferenciar los alelos heredados en la progenie del parental materno de los heredados del parental paterno.
 - **abxaa** (SSRs y SNPs): se encuentran en heterocigosis en **Ruby Seedless** y en homocigosis en **Moscatuel**, y por tanto, aportan información únicamente sobre las meiosis ocurridas en Ruby Seedless. Son útiles en la construcción del mapa de Ruby Seedless y el integrado. Con este tipo de marcadores se obtienen dos genotipos: **aa** y **ab**.
 - **aaxab** (SSRs y SNPs): se encuentran en homocigosis en **Ruby Seedless** y en heterocigosis en **Moscatuel**. Aportan información únicamente sobre las meiosis ocurridas en Moscatuel, y son útiles para la construcción del mapa de Moscatuel y el integrado. Con este tipo de marcadores se obtienen dos genotipos: **aa** y **ab**.
 - **abxcd** y **abxac** (SSRs): se encuentran en heterocigosis en ambos parentales. Son útiles en la construcción de ambos mapas parentales y del integrado. Con este tipo de marcadores se obtienen cuatro genotipos: **ac**, **ad**, **bc**, **bd** y **aa**, **ac**, **ba**, **bc**, respectivamente.

- **Marcadores parcialmente informativos:** son aquellos con los que no es posible diferenciar los alelos heredados de la madre de los heredados del padre.
 - **abxab** (SSRs y SNPs): se obtienen tres genotipos: **aa**, **bb** y **ab**, pero en este último caso no se puede diferenciar que alelo procede de cada parental. Por ello, son parcialmente útiles en la construcción de los correspondientes mapas.

3.4.2. Mapas de ligamiento generados

Como primer paso en la construcción de los *mapas marco*, se procedió a la construcción de los *mapas saturados*, empleándose todos los marcadores heterocigotos, al menos para un parental, y que segregaron en la progenie. A partir de la información obtenida de los mapas saturados, se seleccionaron los marcadores más útiles para la construcción de los *mapas marco*, dando prioridad a aquellos que no daban problemas de orden, que fueran más informativos y estuvieran presentes en los mapas de ambos progenitores (*abxac* y *abxcd*), que no presentaran distorsión en la segregación mendeliana de sus alelos, y que estuvieran bien espaciados dentro de los grupos de ligamiento (entre 5 y 15 cM).

3.4.3. Construcción de los mapas de ligamiento

La construcción de los mapas de ligamiento se realizó utilizando el programa informático JoinMap 3.0 (Van Ooijen y Voorrips, 2001), empleando diferentes matrices de datos genotípicos en función del mapa a construir. Para el mapa de Ruby Seedless y el de Moscatuel, se utilizaron en cada caso sólo los marcadores que eran heterocigotos en cada parental, es decir, los marcadores de tipo *abxaa*, *abxac*, *abxcd* y *abxab* para Ruby Seedless, y los marcadores de tipo *aaxab*, *abxac*, *abxcd* y *abxab* para Moscatuel. Además, en ambos casos, se adaptó la matriz de datos genotípicos a un tipo de población DH (Doubled Haploid), utilizando en cada caso sólo el alelo proveniente del parental cuyo mapa se iba a generar. En la construcción del mapa integrado, se utilizaron todos los marcadores útiles tanto para Ruby Seedless como para Moscatuel. En este caso se empleó una matriz de datos para un tipo de población CP (Cross Pollinators), que utiliza la información de la segregación genotípica de ambos parentales.

La distorsión respecto de la segregación mendeliana esperada de cada locus se determinó mediante un análisis chi-cuadrado, implementado en el programa JoinMap, comparando para cada marcador las frecuencias genotípicas esperadas con las observadas, dados los genotipos parentales. En función de la

matriz de datos empleada para realizar este análisis, se pudieron estudiar dos tipos de distorsión: la distorsión en la segregación de los *genotipos*, empleando los datos genotípicos que se utilizaron para la construcción del mapa integrado, y la distorsión en la segregación de los *alelos* aportados por cada parental a la progenie, para lo cual se emplearon los datos utilizados para la construcción del correspondiente mapa parental.

En primer lugar, se agruparon los marcadores que pertenecen al mismo grupo de ligamiento (GL) con $LOD \geq 3,0$. Una vez efectuados los agrupamientos, el orden de los marcadores dentro de cada GL se estableció con una $LOD \geq 3,0$ y una frecuencia de recombinación (REC) $\leq 0,35$. En algunos casos, fue necesario relajar estos parámetros de mapeo, disminuyendo la LOD o aumentando la REC, para permitir la unión de determinados marcadores o grupos de marcadores dentro de un GL. La función de mapeo de Kosambi (1944) se usó para convertir las fracciones de recombinación en distancias de mapa, medidas en centimorgan (cM). Los GLs fueron numerados siguiendo la nomenclatura del mapa de referencia de Doligez y col. (2006a).

3.4.4. Estimación de los tamaños y coberturas de los mapas de ligamiento

El **tamaño observado del genoma** se calculó de dos modos: como el sumatorio de los tamaños de todos los GLs (G_{ob}); y mediante la fórmula de Nelson y col. (1994) (G_{on}), que toma en consideración todos los marcadores, agrupados y no agrupados.

$$G_{on} = G_{ob} + X(L - R)$$

donde:

- X = distancia máxima observada entre dos marcadores
- L = número total de GLs, tripletes, dobles y marcadores no ligados
- R = número haploide de cromosomas

El **tamaño estimado del genoma (Ge)** se determinó de acuerdo al método 3 de Chakravarti y col. (1991), basado en Hulbert y col. (1988):

$$G_e = \frac{N(N-1)X}{K}$$

con un intervalo de confianza = $\frac{G_e}{(1 \pm 1.96/\sqrt{K})}$

basado en Gerber y Rodolphe (1994), donde:

- G_e = tamaño estimado del genoma
- N = número de marcadores posicionados
- $N(N-1)$ = número de comparaciones entre parejas de marcadores
- X = distancia máxima entre marcadores adyacentes a una $LOD \geq 3$
- K = número de parejas de marcadores a $LOD \geq 3$

La **cobertura de mapa esperada** fue estimada de dos modos: mediante el método de Lange y Boehnke (1982) ajustado para los extremos de los cromosomas (G_{cl}); y mediante el de Bishop y col. (1983) que considera cromosomas lineales (G_{cb}).

$$G_{cl} = 1 - e^{-xy/1.25G_e}$$

$$G_{cb} = 1 - \left[\frac{2R}{N+1} \left(\left(1 - \frac{X}{2G_e} \right)^{N+1} - \left(1 - \frac{X}{G_e} \right)^{N+1} \right) + \left(1 - \frac{RX}{G_e} \right) \left(1 - \frac{X}{G_e} \right)^N \right]$$

donde:

- N = número de marcadores posicionados
- X = distancia máxima (cM) en el mapa marco entre marcadores adyacentes a $LOD \geq 3$
- G_e = tamaño estimado del genoma
- R = número haploide de cromosomas

La **cobertura de mapa observada** (C_{ob}) se calculó como el cociente del tamaño observado y el tamaño estimado del genoma (G_{ob}/G_e).

3.5. Evaluación fenotípica

Las 78 plantas procedentes del cruzamiento, así como las variedades parentales, fueron evaluadas para caracteres relacionados con el estado fenológico de las mismas, con su productividad, y con la calidad de la uva en el momento de maduración óptima para el consumo humano. Todos estos caracteres fueron evaluados al menos durante dos campañas durante el periodo 2005–2008, con el objeto de establecer la estabilidad y solidez de los QTLs identificados.

3.5.1. Caracteres fenológicos

Brotación. Se consideró como la fecha en que la planta presentó el 50% de las yemas con la punta verde visible, es decir, en estadio C de Baggiolini (Baggiolini, 1952).

Floración. Se determinó como la fecha en que la planta presentó el 50% de las flores con la caliptra abierta o desprendida, y por tanto con los estambres visibles.

Envero. Se señaló como la fecha en la que se apreció el ablandamiento y/o coloración del 50% de las bayas de la planta.

Maduración. Se estableció como la fecha en que la uva de cada planta presentó un índice de maduración (IM) promedio entre 2 y 3. El IM se calculó como la relación entre el contenido de azúcar, medido en °Brix, y la acidez, medida en g/L de ácido tartárico. El contenido de azúcar se estimó con un refractómetro Atago pocket PAL-1, y la acidez con un valorador de acidez Metrohm 702 SM Titrino.

Una vez tomados estos datos fenotípicos, cada estado fenológico se expresó calculando para cada híbrido el número de días transcurridos desde el día 1 de enero hasta la fecha en que éste alcanzó el correspondiente estado fenológico.

3.5.2. Caracteres de productividad y calidad

Todos estos caracteres se evaluaron cuando la uva de cada planta alcanzó el estado de maduración óptimo (IM = 2-3), exceptuando el índice de fertilidad, que fue evaluado en el periodo comprendido entre el final de la brotación y el inicio de la floración.

Fertilidad. El índice de fertilidad se calculó como la relación entre el número de racimos y el número de sarmientos del año.

Peso del racimo. Se obtuvo a partir del peso medio de tres racimos representativos de cada planta.

Peso de las bayas. Se calculó a partir del peso medio de 100 bayas tomadas al azar de una mezcla de tres racimos representativos de cada planta.

Diámetro de las bayas. Se seleccionaron 15 bayas representativas de cada planta, a las que se les determinaron individualmente dos variables: el peso y el diámetro ecuatorial (medido con un calibre Mituloyo CD-15D). A partir de estos datos, mediante una recta de regresión, se calculó el diámetro medio de las bayas mediante la fórmula $y = ax + b$. El valor de "y", correspondiente al diámetro de las

bayas, se consigue al sustituir x por el peso medio de 100 bayas, una vez obtenidos los valores de a y b con la recta de regresión.

Textura de las bayas. La consistencia de las bayas de cada planta se estimó como la fuerza media necesaria, expresada en newtons (N), para alcanzar una deformación del 20% de la baya. Este ensayo se realizó en 20 bayas sin pelar de cada híbrido, utilizando un analizador de textura modelo TA.XT Plus/30. Las medidas de compresión se realizaron con una sonda de 100 mm de diámetro, a una velocidad de pre-ensayo de 5 mm seg⁻¹, velocidad de ensayo de 1,5 mm seg⁻¹ y velocidad post-ensayo de 10 mm seg⁻¹. También se catalogó la textura mediante la cata de 5 bayas por híbrido, en tres clases fenotípicas: blandas, medias y crujientes.

Color de las bayas. Se determinó con un colorímetro Minolta Chroma Meter modelo CR-300 (Osaka, Japón), acoplado a un procesador de datos (DP-100). Se realizaron tres mediciones en la zona ecuatorial de 15 bayas representativas de cada híbrido, utilizando el espacio de color CIELAB definido por las coordenadas colorimétricas L^* , a^* y b^* . El valor de L^* oscila entre el color negro ($L^*=0$) y blanco ($L^*=100$), el de a^* entre el rojo ($+a^*$) y verde ($-a^*$), y el de b^* entre el amarillo ($+b^*$) y azul ($-b^*$). Para la clasificación de las bayas según su color, se calculó el índice CIRG (Carreño y col., 1995), en el que intervienen las coordenadas de índice de luminosidad (L^*), ángulo de tono (h), y Cromo o saturación (C), según la ecuación:

$$\text{CIRG} = (180-h) / (L^* + C)$$

También se evaluó de forma visual, empleando el código 225 de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV).

Apirenia. El grado de apirenia de cada planta se estimó diseccionando 15 bayas representativas de cada híbrido, de las que se extrajeron las semillas y/o los esbozos seminales presentes en las mismas. Tras eliminar los restos de pulpa mediante fricción sobre papel de filtro, se determinaron cuatro parámetros relacionados con este carácter: el número medio de semillas (carácter leñoso) por baya, el número total de semillas y/o esbozos seminales por baya, el peso medio fresco de las semillas y/o esbozos seminales por baya, y el peso medio seco de semillas y/o esbozos seminales por baya. El peso seco de las semillas y/o esbozos seminales se obtuvo tras su desecación a 80 °C en una estufa durante 48 horas.

Flavor moscatel. Este carácter fue determinado para cada híbrido mediante la cata de 5 bayas tomadas al azar. Se establecieron cuatro categorías: flavor neutro, moscatel ligero, moscatel, y moscatel fuerte.

3.5.3. Correlaciones y transformación de los datos

Tras la evaluación fenotípica de los caracteres, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los distintos caracteres evaluados en una misma campaña, así como para el mismo carácter entre los distintos años, empleándose el paquete estadístico SPSS 13.0.

Como paso previo al análisis de QTLs para cada carácter, se estudió el ajuste a la distribución normal de los datos fenotípicos mediante el análisis de Kolmogorov-Smirnov y el de Shapiro-Wilk, implementados en el programa SPSS. Los datos que presentaron distribución no asimétrica se intentaron ajustar a una distribución normal mediante su transformación con una escala de potencias (Hoaglin y col., 2000) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Transformaciones realizadas según la escala de potencias en función del tipo de asimetría encontrada en los datos.

Potencia	Re-expresión	Tipo de asimetría que corrige
3	X^3	Negativa
2	X^2	Negativa
1/2	\sqrt{X}	Positiva
0	$\text{Log } X$	Positiva
-1/2	$-1/\sqrt{x}$	Positiva
-1	$-1/x$	Positiva

3.6. Análisis de QTLs (Quantitative Trait Loci)

La identificación y localización de QTLs en los distintos mapas genéticos obtenidos se llevó a cabo con el programa informático MapQTL[®] 4.0 (Van Ooijen y col., 2002). El análisis de QTLs desarrollado con el mapa integrado se realizó empleando el tipo de población CP (Cross Pollinators), que utiliza la información de la segregación genotípica de ambos parentales. Para los análisis desarrollados con el mapa de cada progenitor, se ajustó la información de segregación genotípica al tipo de población DH (Doubled Haploid), con el objeto de evitar que los datos de un progenitor interfirieran en el análisis de QTLs del otro.

Se utilizaron diferentes métodos de análisis de QTLs, como el método no paramétrico de Kruskal-Wallis (Lehmann, 1975), y los métodos paramétricos de mapeo de intervalos (MI) (Lander y Botstein, 1989) y el modelo aproximado de múltiples QTLs (MQM) (Jansen, 1993, 1994), siguiendo las indicaciones del manual del programa. Inicialmente se identificaron los posibles QTLs mediante el método de Kruskal-Wallis y el mapeo de intervalos (MI). La presencia de un QTL fue considerada cuando el valor estadístico que maximiza la presencia de un QTL respecto de la ausencia del mismo (LOD, Logarithm of Odds) superó un determinado valor umbral. Dicho valor umbral se calculó mediante un análisis de 1.000 permutaciones de los datos fenotípicos sobre los datos genotípicos (Churchill y Doerge, 1994). Este análisis permitió establecer el valor umbral de LOD a partir del cual un QTL se considera significativo a nivel genómico (QTL significativo), o sólo a nivel de grupo de ligamiento (QTL sugerente) (Lander y Kruglyak, 1995). Ambos valores umbrales se calcularon para un nivel de significación del 99% ($\alpha=0,01$), 95% ($\alpha=0,05$) y 80% ($\alpha=0,20$).

Tras este primer análisis por el método MI, para cada carácter se seleccionaron tanto los QTLs significativos como sugerentes que se detectaron al menos en dos campañas (QTLs consistentes), y se procedió a un segundo análisis, utilizando el modelo aproximado de múltiples QTLs (MQM). Este método estima la robustez de los QTLs previamente identificados y determina el nivel de significación de los mismos. Para ello, se seleccionó como cofactor el marcador molecular que se encontraba más cercano a la región cromosómica donde el QTL presentaba la LOD máxima. Al igual que con el método MI, el valor umbral de LOD calculado nos permitió considerar o no la presencia de un QTL. Si tras el primer análisis MQM se detecta un cambio en la posición de algún QTL, se escoge nuevamente el marcador más cercano al pico de LOD y se vuelve a ejecutar el análisis MQM. Este procedimiento se repite hasta que se encuentra un modelo estable que explique cada carácter. Tras establecer el modelo, se calculó el efecto aditivo de cada marcador [(diferencia entre la media fenotípica de los individuos que presentan el alelo 1 y los que presentan el alelo 2) / 2], y el porcentaje de la varianza explicada por cada QTL, así como el porcentaje de la varianza explicada por el conjunto de QTLs que conforman el modelo de control de cada carácter.

4. RESULTADOS

4.1. Construcción de los mapas de ligamiento

La construcción de los mapas de ligamiento se llevó a cabo a partir de una población F_1 , generada mediante el cruzamiento dirigido entre las variedades de uva de mesa Ruby Seedless y Moscatuel (ver apartado 3.1).

Los marcadores moleculares empleados fueron de dos tipos: microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats) y SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Se consideraron marcadores útiles aquellos que fueron polimórficos para al menos uno de los parentales y que, además, segregaron en la población de mapeo. Así, los marcadores cuyos alelos se presentaron en heterocigosis en Ruby Seedless, es decir, marcadores de tipo abxaa, abxab, abxac y abxcd, fueron útiles para la construcción del mapa de este parental. Del mismo modo, los marcadores de tipo aaxab, abxab, abxac y abxcd fueron útiles para generar el mapa de Moscatuel. Todos los marcadores útiles en la construcción del mapa de cada progenitor, lo fueron también para la construcción del mapa integrado.

Los distintos mapas se construyeron a partir del estudio de segregación en la progenie de los marcadores útiles seleccionados, y estableciendo sus relaciones de ligamiento tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartado 3.4).

4.1.1. Marcadores analizados y polimorfismos obtenidos

Se analizaron un total de 201 pares de cebadores SSRs, de los cuales 154 (76,6%) fueron polimórficos y presentaron un patrón de segregación claro (Tabla 4.1.1). De los 47 SSRs no útiles, 38 fueron homocigotos para ambos parentales (tipo aaxaa), 6 fueron descartados porque los productos de amplificación no presentaron un patrón claro, y 3 porque no amplificaron. De los 154 SSRs útiles, 119 (77,3%) lo fueron para la construcción del mapa de Ruby Seedless y 114 (74%) para la construcción del mapa de Moscatuel (Tabla 4.1.1).

De los 335 SNPs analizados, solo 105 resultaron útiles, lo que supone un 31,3% del total (Tabla 4.1.1). Sesenta y nueve no amplificaron, 154 resultaron ser homocigotos para ambos progenitores, y 7 fueron descartados porque los productos de amplificación no segregaron en la progenie o no presentaron un patrón claro. De los 105 SNPs útiles, 67 (63,8%) lo fueron para la construcción del mapa de Ruby Seedless y 65 (61,9%) para la construcción del mapa de Moscatuel (Tabla 4.1.1).

Resumiendo, el número total de marcadores seleccionados para los estudios de ligamiento fue de 259 (48,3% del total de marcadores analizados). De ellos, 212 (82%) fueron totalmente informativos (abxaa, aaxab, abxac, y abxcd), es decir, marcadores en los que para cada individuo de la población de mapeo es

posible diferenciar los alelos materno y paterno (Tabla 4.1.1). El número de marcadores totalmente informativos empleados para la construcción de los mapas materno y paterno fue de 139 y 132, respectivamente. Los restantes marcadores fueron de tipo parcialmente informativo (abxab). El número de marcadores comunes a ambos parentales (tipo abxab, abxac y abxcd) fue de 106 (79 SSRs + 27 SNPs), válidos solo para Ruby Seedless (tipo abxaa) fueron 80 (40 SSRs + 40 SNPs), y válidos solo para Moscatuel (tipo aaxab) fueron 73 (35 SSRs + 38 SNPs) (Tabla 4.1.1).

Tabla 4.1.1. Descripción de los marcadores moleculares analizados para la construcción de los mapas de ligamiento.

Tipo Segregación	Nº marcadores analizados			Válidos mapa Ruby Seedless			Válidos mapa Moscatuel			Válidos mapa integrado		
	SSR	SNP	Total	SSR	SNP	Total	SSR	SNP	Total	SSR	SNP	Total
descartados	6	7	13	--	--	--	--	--	--	--	--	--
no detectados	3	69	72	--	--	--	--	--	--	--	--	--
aaxaa	38	154	192	--	--	--	--	--	--	--	--	--
abxaa	40	40	80	40	40	80	--	--	--	40	40	80
aaxab	35	38	73	--	--	--	35	38	73	35	38	73
abxab	20	27	47	20	27	47	20	27	47	20	27	47
abxac	42	--	42	42	--	42	42	--	42	42	--	42
abxcd	17	--	17	17	--	17	17	--	17	17	--	17
Total	201	335	536	119	67	186	114	65	179	154	105	259

4.1.2. Nivel de heterocigosis

Teniendo en cuenta los 451 marcadores detectados y no descartados (192 SSRs + 259 SNPs), se calculó el nivel de heterocigosis en base al porcentaje total de marcadores heterocigotos (57%) frente al de homocigotos (43%). El nivel de heterocigosis detectado fue muy similar en ambos parentales, independientemente de los marcadores utilizados (41% en Ruby Seedless y un 40% en Moscatuel). Si comparamos el grado de heterocigosis de los 192 SSRs de genotipo conocido para Ruby Seedless y Moscatuel frente a los 259 SNPs, se observa una gran diferencia entre los mismos, de manera que el 62-59% de los SSRs son heterocigotos frente a solo el 26-25% de los SNPs (Tabla 4.1.1).

La selección de los 154 microsatélites útiles para la construcción del mapa integrado, se llevó a cabo tras determinar el genotipo de las variedades parentales para los 192 loci detectados y no descartados. La información disponible acerca de la localización cromosómica de estos loci (Doligez y col., 2006 a; Vezzuli y col.,

2008), nos permitió desglosar la heterocigosis por GL utilizando los datos obtenidos con los microsatélites (Tabla 4.1.2). Se observaron regiones especialmente homocigotas, en las que el número de SSRs heterocigotos llegó a representar menos de la mitad de los analizados. Es el caso de los GLs 5, 6, 7 y 8 del mapa de Ruby Seedless, y los GLs 2, 7, 9, 11 y 19 de Moscatuel. En dos GLs (5 y 9) se observó un nivel de heterocigosis muy diferente en cada parental, de más del 30%. Algunos GLs (3, 13 y 14) presentaron niveles de heterocigosis significativamente superiores a las medias de los genomas de ambos parentales.

Tabla 4.1.2. Nivel de heterocigosis en loci de microsatélites desglosados por GL. Se indica el número de loci de genotipo conocido en cada GL, así como el número y porcentaje de los que se encuentran en heterocigosis para cada parental.

	Número de loci	Loci en heterocigosis	
		Ruby Seedless	Moscatuel
GL1	10	6 (60%)	6 (60%)
GL2	13	8 (62%)	6 (46%)
GL3	6	5 (83%)	5 (83%)
GL4	10	6 (60%)	8 (80%)
GL5	9	4 (44%)	9 (100%)
GL6	10	4 (40%)	6 (60%)
GL7	14	7 (50%)	5 (36%)
GL8	10	4 (40%)	6 (60%)
GL9	13	8 (62%)	4 (31%)
GL10	8	5 (63%)	6 (75%)
GL11	10	6 (60%)	4 (40%)
GL12	9	6 (67%)	5 (56%)
GL13	7	6 (86%)	6 (86%)
GL14	11	10 (91%)	8 (73%)
GL15	11	7 (64%)	6 (55%)
GL16	12	8 (67%)	7 (58%)
GL17	6	4 (67%)	5 (83%)
GL18	15	10 (67%)	9 (60%)
GL19	8	5 (63%)	3 (38%)
Total	192	119 (62%)	114 (59%)

4.1.3. Distorsión en la segregación de los marcadores

El grado de distorsión de cada marcador respecto de las frecuencias mendelianas esperadas se determinó mediante un test de tipo chi-cuadrado (ver apartado 3.4.3 de Materiales y Métodos). A un nivel de significación del 5% ($P \leq 0,05$), 51 de los 259 marcadores útiles para la construcción de los mapas de ligamiento (el 19,7%), presentaron algún tipo de segregación distorsionada. De

éstos, 28 marcadores (55%) fueron comunes a ambos parentales, 12 marcadores (23,5%) fueron útiles solo para Ruby Seedless, y 11 marcadores (21,5%) fueron útiles solo para Moscatuel. Del total de marcadores distorsionados, 40 (6 parcialmente informativos y 34 completamente informativos) presentaron distorsión en la segregación de los *genotipos*, de manera que 6 de ellos no mostraron distorsión para la segregación de los *alelos* (VMC1C10, VMC3C11_1, VMC3D7, VVIB63, VVIM42A, y VVIV67). Cuarenta y cinco marcadores (8 parcialmente informativos y 37 completamente informativos) presentaron distorsión en la segregación de los *alelos* de alguno de los parentales: 4 presentaron distorsión solo en la segregación de los *alelos* aportados por Ruby Seedless (VMC4H6, VVIN54, VVIV04 y VVIV37) y 4 solo en los *alelos* aportados por Moscatuel (VMC5E9, VVIB09, VVIP10 y VVMD32).

Para el mismo nivel de significación (5%), 28 (20 totalmente informativos y 8 parcialmente informativos) de los 186 marcadores seleccionados para el mapa de Ruby Seedless (el 15,1%), y 25 (17 totalmente informativos y 8 parcialmente informativos) de los 179 seleccionados para el mapa de Moscatuel (el 14%), presentaron segregaciones distorsionadas.

Estos marcadores se indican con un número diferente de asteriscos en los correspondientes mapas, en función del nivel de significación presentado (Figura 4.1.1).

4.1.4. Construcción de los mapas de ligamiento

En primer lugar se construyeron los denominados *mapas saturados*, estudiando las relaciones de ligamiento entre todos los marcadores que resultaron útiles en la población de estudio. Siguiendo la estrategia del pseudocruzamiento prueba en dos sentidos (Grattapaglia y Sederoff, 1994), se generó un mapa saturado para cada progenitor y un mapa integrado del cruzamiento, utilizando como parámetros de mapeo una LOD $\geq 3,0$ y una REC $\leq 0,35$. El número final de marcadores posicionados en los mapas fue inferior al número de marcadores considerados inicialmente como válidos (Tabla 4.1.3). Esto es debido a que algunos marcadores no pudieron ser agrupados en ningún GL, y otros tuvieron que ser eliminados debido a que ocasionaban problemas para posicionar los marcadores circundantes, o porque no fue posible ligarlos con los parámetros de mapeo inicialmente establecidos. Aunque el número de GLs obtenidos en los tres mapas fue mayor al número haploide de cromosomas de la vid ($n = 19$), gracias a la utilización de marcadores SSRs comunes a los empleados en los mapas de referencia disponibles (Adam-blondon y col., 2004; Doligez y col. 2006 a), se pudo

agrupar los GLs obtenidos en el número haploide de *V.vinifera* empleando la nomenclatura aceptada por el International Grape Genome Program (IGGP).

A partir de la información obtenida de los mapas saturados, se construyeron los *mapas marco* de cada parental y el integrado del cruzamiento. Los marcadores se seleccionaron siguiendo varios criterios: se dio prioridad a aquellos que no ocasionaban problemas de orden dentro del GL; que fueran completamente informativos y estuvieran presentes en los mapas de ambos progenitores (abxac y abxcd); que no presentaran segregación distorsionada; y que estuvieran bien espaciados a lo largo de los grupos de ligamiento (entre 5 y 15 cM). En algunos casos fue necesario relajar los umbrales de LOD y la frecuencia de recombinación (REC), debido a que la disponibilidad de un menor número de marcadores ocasionaba que algunos GLs quedaran divididos en subgrupos. En estos casos, tanto los marcadores como el orden de los mismos coincidieron con el establecido en los mapas de referencia anteriormente mencionados.

Se consideraron regiones distorsionadas aquellas que tuvieron un agrupamiento mínimo de dos marcadores contiguos distorsionados.

4.1.4.1. Mapa saturado de Ruby Seedless

En la construcción del mapa saturado de Ruby Seedless se utilizaron inicialmente 186 marcadores moleculares (119 SSRs y 67 SNPs), de los cuales 106 fueron comunes a ambos parentales y 80 válidos solo para Ruby Seedless (Tabla 4.1.1). Dos de estos marcadores, el SSR VMC4H5 y el SNP Vvi_2319, no se agruparon en ningún GL, y el SSR VMC4C10_DG_C se agrupó en un GL distinto al observado en el mapa de referencia de Doligez y col. (2006 a), de modo que se excluyó del análisis. Por otro lado, el marcador SSR VMC5G7, agrupado en GL 2, fue descartado porque ocasionaba problemas para establecer la posición de los marcadores circundantes. Además, el SSR VVIB32 y el SNP SNP255_265, aunque se agruparon en sus GLs (GL 12 y 4, respectivamente), no pudieron ser incluidos en el mapa, pese a relajar los parámetros iniciales de trabajo (LOD, REC). Únicamente dos de los 28 marcadores distorsionados no fueron incluidos en el mapa saturado de Ruby Seedless: el SSR VMC4C10_DG_C en el GL 12 y el SNP Vvi_2319 en el GL 14 (Figura 4.1.1).

Finalmente fueron posicionados 180 marcadores que se distribuyeron en 28 GLs, cuatro de ellos constituidos por dos marcadores, y dos GLs por tres marcadores (Tabla 4.1.3). El tamaño observado del mapa (G_{ob}) fue de 901,1 cM, presentando una distancia media entre marcadores de 6,0 cM. El número de intervalos entre marcadores consecutivos fue de 151, cinco de los cuales fueron

mayores de 20 cM. El tamaño medio de los GLs, excluyendo aquellos formados por dos marcadores, fue de 36,6 cM, oscilando entre 7,1 y 76,1 cM. Se observaron regiones distorsionadas en los GLs 1_a, 7_b, 12 y 18_a (Figura 4.1.1).

4.1.4.2. Mapa saturado de Moscatuel

En la construcción del mapa saturado de Moscatuel se utilizaron inicialmente 179 marcadores moleculares (114 SSRs y 65 SNPs), de los cuales 73 fueron válidos solo para el mapa de Moscatuel (Tabla 4.1.1). Dos SSRs (VVMD5 y VVMD37) y tres SNPs (SNP945_88, SNP1109_253 y Vvi_2319) no se agruparon en ningún GL. Otros dos SSRs (VMC4C10_DG_C y VMC8G9) se agruparon en GLs distintos a los observados en el mapa de referencia de Doligez y col. (2006 a), por lo que se eliminaron del estudio. Además, el SSR VVIV35 fue eliminado debido a que ocasionaba problemas para colocar el resto de marcadores del GL 11. Únicamente tres de los 25 marcadores distorsionados no fueron incluidos en el mapa saturado de Moscatuel: el SSR VMC4C10_DG_C en el GL 12, el SNP Vvi_2319 en el GL 14 y el SSR VVMD37 en el GL 14 (Figura 4.1.1).

El mapa obtenido presentó 171 marcadores distribuidos en 26 GLs, dos de ellos formados por dos marcadores, y siete de ellos por tres marcadores (Tabla 4.1.3). El tamaño de mapa observado (G_{ob}) fue de 939,3 cM, con una distancia media entre marcadores de 6,5 cM. El número de intervalos entre marcadores consecutivos fue de 144, cinco de los cuales presentaron una distancia superior a 20 cM. El tamaño medio de los GLs, excluyendo los formados por dos marcadores, fue de 37,6 cM, oscilando entre 4,4 y 106,8 cM. La región superior del GL 8 presentó un agrupamiento importante de marcadores distorsionados (Figura 4.1.1).

4.1.4.3. Mapa integrado saturado

Para generar el mapa integrado saturado se partió de 259 marcadores (154 SSRs y 105 SNPs) (Tabla 4.1.1). Seis SSRs (VMC5G7, VVIV35, VVIB32, VVIQ61, VVMD37 y VMC6F11) y tres SNPs (SNP517_224, SNP593_149 y Vvi_2319) fueron eliminados al ocasionar problemas para establecer el orden de los marcadores circundantes en los respectivos GLs. Al igual que sucedió con los mapas de los parentales, dos SSRs (VMC4C10_DG_C y VMC8G9) se excluyeron del estudio por agruparse en GLs distintos a los observados en el mapa de referencia de

Tabla 4.1.3. Características de los mapas de ligamiento desarrollados. La letra detrás de cada GL indica el subgrupo, contando a partir de la parte superior del GL, según el orden establecido en la Figura 4.1.1.

		Ruby Seedless		Moscatuel		Integrado	
		Saturado	Marco	Saturado	Marco	Saturado	Marco
Marcadores	marcadores estudiados	536	180	536	179	536	259
	marcadores válidos	186	110	179	107	259	165
	marcadores distorsionados	28	14	25	13	40	22
	marcadores no agrupados	2	--	5	--	0	0
	marcadores asignados a GL	184	110	174	107	259	165
	marcadores posicionados	180	110	171	107	248	165
Grupos de ligamiento	nº total de GL	28	28	26	26	23	23
	nº de GL de 2 marcadores	4 (GL5a, GL6b, GL8a,c)	7 (GL1a, GL5a, GL6a,b, GL7c, GL8a,c)	2 (GL7b, GL19a)	8 (GL2b, GL7a,b, GL9a, GL14a, GL18b, GL19a,b)	1 (GL5a)	3 (GL5a, GL6a, GL7c)
	nº de GL de 3 marcadores	2 (GL4a, GL7b)	4 (GL4a,b, GL7a,b)	7 (GL2b, GL7a, GL9a,b, GL12, GL14a, GL19b)	2 (GL9b, GL12)	1 (GL7b)	1 (GL7b)
	nº de GL con más de 3 marcadores	22	17	17	16	21	19
	tamaño del GL menor (cM)*	7,1 (GL7c)	11,9 (GL8b)	4,4 (GL7a)	19,5 (GL8b)	7,1 (GL7c)	18,1 (GL7b)
	tamaño del GL mayor (cM)	76,1 (GL12)	76,1 (GL12)	106,8 (GL5)	108,8 (GL5)	97,0 (GL5b)	96,6 (GL5b)
	tamaño medio de los GL (cM)	32,2	32,4	36,1	35,7	51,8	51,8
	tamaño medio de los GL (cM)*	36,6	40,4	37,6	45,9	53,8	58,1
	GL con intervalos >20 cM	5 (GL3, GL9, GL11, GL12, GL16)	6 (GL3, GL9, GL10, GL11, GL12, GL16)	4 (GL1, GL3, GL5a, GL6)	9 (GL1 ^(dos) , GL3, GL5, GL6, GL9, GL13, GL15, GL19)	1 (GL12)	3 (GL1, GL12, GL16)
	distancia media entre marcadores	6,0	11,1	6,5	11,5	5,3	8,4
Intervalos	nº de intervalos totales	151	82	144	81	225	142
	nº intervalos de 0 a 5 cM	88	10	79	7	135	44
	nº intervalos de 5 a 10 cM	30	29	27	30	45	47
	nº intervalos de 10 a 15 cM	17	24	22	26	32	36
	nº intervalos de 15 a 20 cM	11	13	11	9	12	12
	nº intervalos de 20 a 25 cM	4	5	3	7	0	2
	nº intervalos >25 cM	1	1	2	2	1	1
Tamaño observado del mapa (cM)		901,1	908,2	939,3	928,9	1190,4	1191,4

* Sin considerar los GLs formados por solo dos marcadores

Doligez y col. (2006 a). Únicamente cuatro de los 40 marcadores distorsionados no fueron incluidos en el mapa integrado saturado: SNP517_224 en el GL 1, SNP593_149 en el GL 8, Vvi_2319 en el GL 14 y VVMD37 en el GL 14 (Figura 4.1.1).

Finalmente, el mapa integrado saturado presentó 248 marcadores repartidos en 23 GLs, de los cuales el GL 5_a está formado por dos marcadores y el GL 7_b por tres (Tabla 4.1.3; Figura 4.1.1). El tamaño observado fue de 1190,4 cM, con una distancia media entre marcadores de 5,3 cM. De los 225 intervalos entre marcadores, uno fue mayor de 20 cM. El tamaño medio de los GLs, sin contar el formado por dos marcadores, fue de 53,8 cM, oscilando entre 7,1 y 97 cM. Se observaron regiones distorsionadas en seis GLs: tres de ellas localizaron en los GLs 1, 7_b y 18, coincidiendo con el mapa de Ruby Seedless; una localizó en el GL 8, al igual que en el mapa de Moscatuel; y dos localizaron en los GLs 15 y 17, no detectadas anteriormente en los mapas parentales (Figura 4.1.1).

4.1.4.4. Mapa marco de Ruby Seedless

Para la construcción del mapa marco de Ruby Seedless se seleccionaron 110 marcadores moleculares (83 SSRs y 27 SNPs), 14 de los cuales presentaron una segregación distorsionada (Tabla 4.1.3).

La longitud observada del mapa marco fue de 908,2 cM, con una distancia media entre marcadores de 11,1 cM. De los 28 GLs en los que se distribuyeron los marcadores, siete resultaron formados solo por dos marcadores, y cuatro por tres marcadores. El número de intervalos entre marcadores consecutivos fue de 82, de los cuales seis fueron mayores de 20 cM. El tamaño medio de los GLs, excluyendo aquellos formados por dos marcadores, fue de 40,4 cM, oscilando entre 11,9 y 76,1 cM. Los GLs 1_a, 7_b y 12 presentaron regiones distorsionadas (Figura 4.1.1).

4.1.4.5. Mapa marco de Moscatuel

El mapa marco de Moscatuel se construyó empleando 107 marcadores (89 SSRs y 18 SNPs), 13 de los cuales mostraron distorsión en la segregación (Tabla 4.1.3).

La distancia observada de este mapa fue de 928,9 cM, con una distancia media entre marcadores de 11,5 cM. De los 26 GLs en los que se distribuyeron los marcadores, ocho presentaron solo dos marcadores, y dos tres marcadores. El tamaño medio de los GLs, sin contar aquellos formados por solo dos marcadores, fue de 45,9 cM, oscilando entre 19,5 y 108,8 cM. De los 81 intervalos entre

marcadores, nueve fueron mayores de 20 cM, y dos de ellos localizaron en el GL 1 (Figura 4.1.1). El GL 8_a presentó una región distorsionada.

4.1.4.6. Mapa marco integrado

Para la construcción de este mapa se seleccionaron 165 marcadores (120 SSRs y 45 SNPs), teniendo la cautela de que además estuvieran presentes en los mapas marco de los progenitores. De los marcadores seleccionados, 22 presentaron distorsión en la segregación de genotipos (Tabla 4.1.3).

El mapa construido presentó un tamaño observado de 1191,4 cM, con una distancia media entre marcadores de 8,4 cM. De los 23 GLs obtenidos, tres estaban formados solo por dos marcadores, y uno por tres marcadores (Tabla 4.1.3). El tamaño medio de los GLs fue de 58,1 cM, oscilando entre 18,1 y 96,6 cM. Tres de los 142 intervalos entre marcadores fueron mayores de 20 cM (Figura 4.1.1). Los GLs 7_b y 8 presentaron regiones distorsionadas (Figura 4.1.1).

4.1.5. **Comparación de los mapas de ligamiento desarrollados**

La presencia en todos los GLs de marcadores en heterocigosis para ambos parentales, tanto de tipo totalmente informativo (abxac, abxcd) como parcialmente informativo (abxab), permitió establecer las homologías entre los GLs de los tres mapas obtenidos en este trabajo.

El número de GLs obtenidos fue de 28 para el mapa de Ruby Seedless, 26 para el mapa de Moscatuel y 23 para el mapa integrado. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, la utilización de marcadores SSRs comunes con el mapa de referencia adoptado por el International Grape Genome Program (IGGP), permitió establecer las homologías de los GLs obtenidos de manera que el número final de GLs observados fue de 19 (Figura 4.1.1).

Los tamaños y las coberturas del mapa integrado, tanto saturado como marco, fueron superiores respecto a los valores obtenidos en los respectivos mapas parentales, excepto para el tamaño observado G_{on} que fue ligeramente superior en el mapa saturado de Moscatuel (Tabla 4.1.4). Comparando los mapas saturados de los parentales, se observó que los tamaños del mapa de Moscatuel fueron ligeramente superiores a los de Ruby Seedless, aunque los intervalos de confianza fueron solapantes para el tamaño estimado. No ocurrió lo mismo con la cobertura de mapa, que fue ligeramente superior en Ruby Seedless. En cuanto a los tamaños de los mapas marco, los de Moscatuel fueron superiores a los de Ruby Seedless, excepto para el tamaño observado G_{on} . La cobertura fue similar en ambos mapas

marco, si bien la cobertura observada fue ligeramente superior en el de Ruby Seedless.

Tabla 4.1.4. Tamaños y coberturas de los mapas de ligamiento generados. Para cada mapa se indica su tamaño observado, calculado ⁽¹⁾ mediante la suma del tamaño de todos los GLs, y ⁽²⁾ mediante la fórmula de Nelson y col. (1994). El tamaño estimado se calculó mediante el método 3 de Chakravarti y col. (1991), y el intervalo de confianza mediante la fórmula basada en Gerber y Rodolphe (1994). La cobertura de mapa observada se calculó como el cociente G_{ob}/G_e . La cobertura esperada fue calculada mediante la fórmula ⁽¹⁾ de Lange y Boehnke (1982) y empleando ⁽²⁾ la de Bishop y col. (1983) (ver fórmulas en Materiales y Métodos: 3.4.4).

		Ruby Seedless		Moscatuel		Integrado	
		saturado	marco	saturado	marco	saturado	marco
	N	180	110	171	107	248	165
	X	27	27	31	31	27	27
	K	590	230	529	224	889	430
	L	30	28	31	26	23	23
	R	19	19	19	19	19	19
	sin agrupar	2	0	5	0	0	0
	GL	28	28	26	26	23	23
	Tamaño de mapa	Observado ⁽¹⁾ (G_{ob})	901	908	939	929	1190
Observado ⁽²⁾ (G_{on})		1198	1151	1306	1143	1298	1299
Estimado (G_e)		1474	1407	1681	1549	1850	1690
<i>intervalo de confianza</i>		1364	1246	1549	1370	1736	1544
		1603	1616	1838	1783	1980	1866
cobertura de mapa	Observada (C_{ob})	61%	65%	56%	60%	64%	71%
	Esperada ⁽¹⁾ (G_{cl})	93%	82%	92%	82%	94%	88%
	Esperada ⁽²⁾ (G_{cb})	94%	85%	94%	85%	96%	91%

N: número de marcadores marco.

X: distancia máxima entre dos marcadores a una $LOD \geq 3,0$.

K: parejas de marcadores que presentan una $LOD \geq 3,0$.

L: número total de GL, dobletes, tripletes, y marcadores sin agrupar.

R: número haploide de cromosomas en *Vitis vinifera*.

Aunque el tamaño de los mapas parentales resultó bastante similar, al comparar entre sí los GLs se observaron diferencias importantes entre ellos (del doble de tamaño o más): mientras que los GLs 7 y 12 del mapa de Ruby Seedless fueron de tamaño muy superior al de Moscatuel, la situación inversa se dio en los GLs 4, 5, 6 y 8. (Figura 4.1.1).

El orden de los marcadores estuvo bien conservado, comparando los tres mapas entre sí (Figura 4.1.1). Un total de 19 marcadores presentaron algún tipo de discrepancia en su posición, de los cuales 12 resultaron ser del tipo parcialmente

informativo (abxab). Los GLs en los que se encuentran estos cambios de posición son el GL 1, 2, 4, 13, 14, 15 y 18 (Figura 4.1.1).

Cotejando el orden de los SSRs con el del mapa de referencia publicado por Doligez y col. (2006 a), se detectaron discrepancias en la posición de algunos marcadores. Así, en el GL 4, la posición de VVMD32 y VMC2E10 fue inversa en los mapas de los parentales, y la posición de VMC6C10 y VMC2H5 en el GL 14 del mapa integrado. También se encontraron marcadores con posiciones distintas al mapa de referencia, en los tres mapas obtenidos (VVIV67, UDV047 y VVIB63 del GL 15, y VVIT65, VVIV17 y UDV104 del GL 16), o solo en el mapa integrado (VVIQ22B y VVIN73 del GL 17).

Figura 4.1.1. Mapas de ligamiento de Ruby Seedless (R), Moscatuel (M) e integrado (RM). En la parte superior se representan los mapas saturados, y en la parte inferior los mapas marco. En rojo aparecen los marcadores heterocigotos en Ruby Seedless y homocigotos en Moscatuel (*abxaa*), en verde los homocigotos en Ruby Seedless y heterocigotos en Moscatuel (*aaxab*). En azul los heterocigotos para ambos parentales, de tipo parcialmente informativo (*abxab*), y en negro los heterocigotos para ambos parentales, de tipo completamente informativo (*abxac*, *abxcd*). Los marcadores distorsionados presentan un número variable de asteriscos en función del nivel de distorsión (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$; **** $P < 0,001$; ***** $P < 0,0005$). Los marcadores que no se agruparon o que fueron descartados se encuentran al pie de su correspondiente grupo de ligamiento.

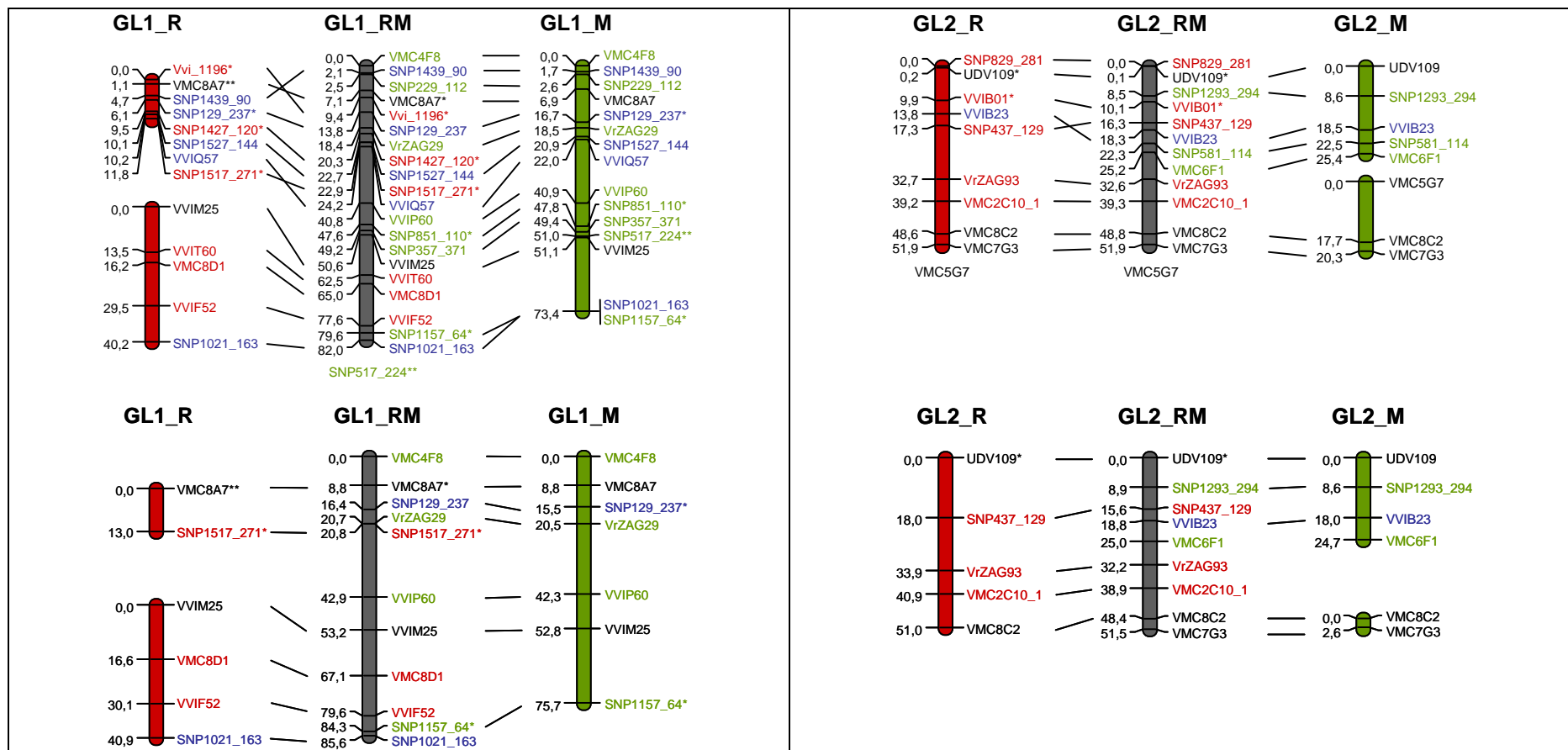


Figura 4.1.1 (continuación)

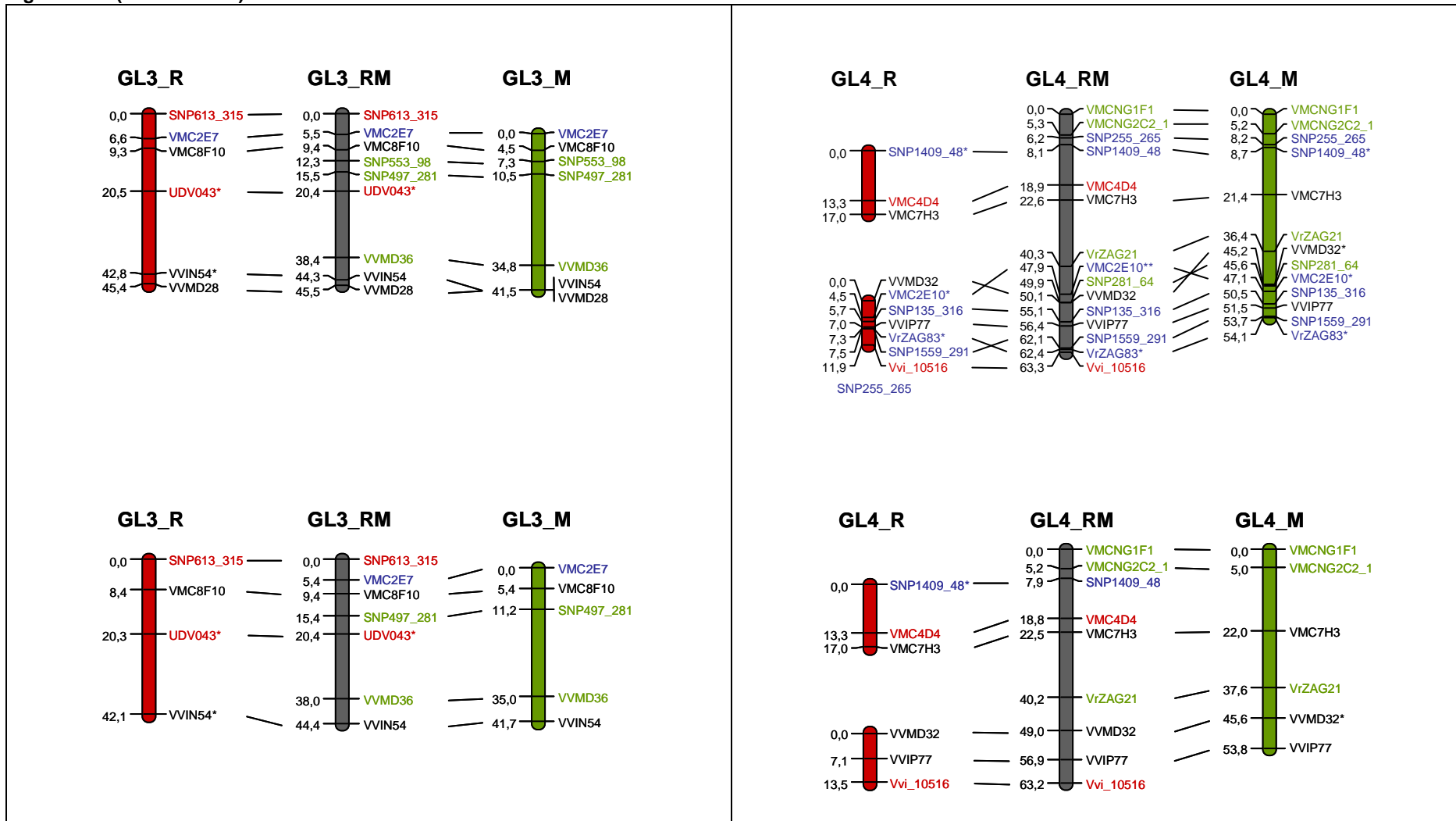


Figura 4.1.1 (continuación)

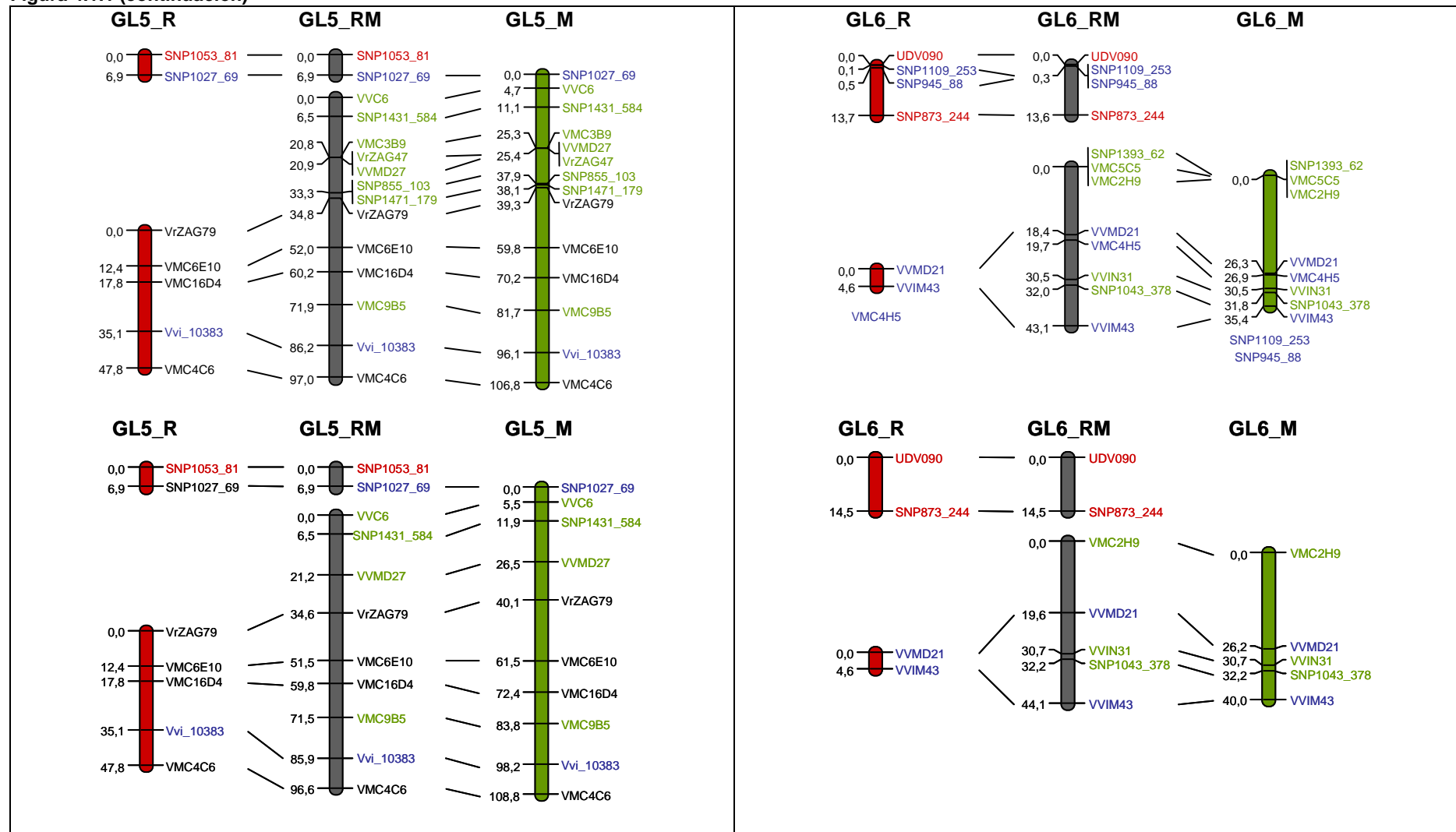


Figura 4.1.1 (continuación)

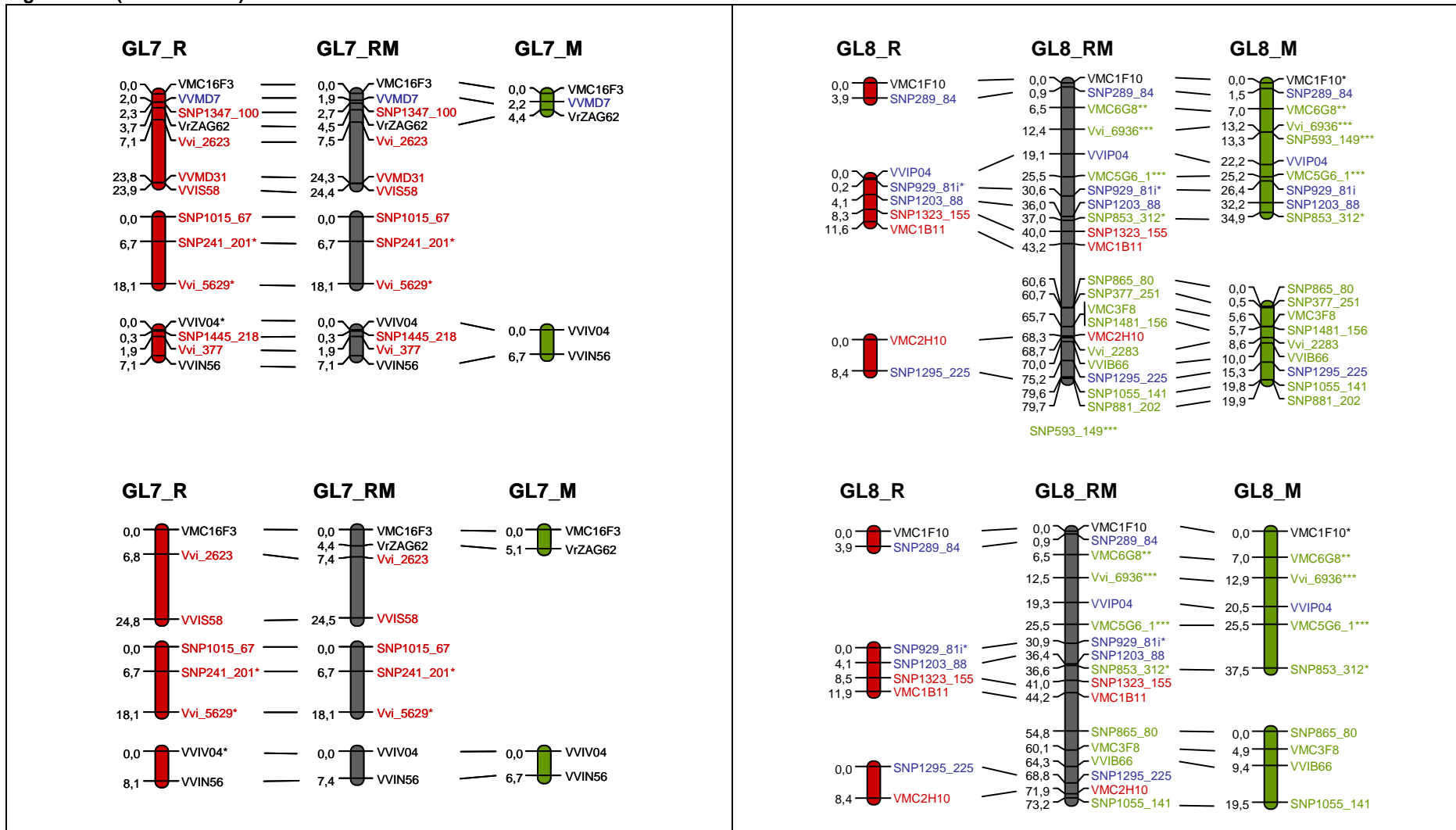


Figura 4.1.1 (continuación)

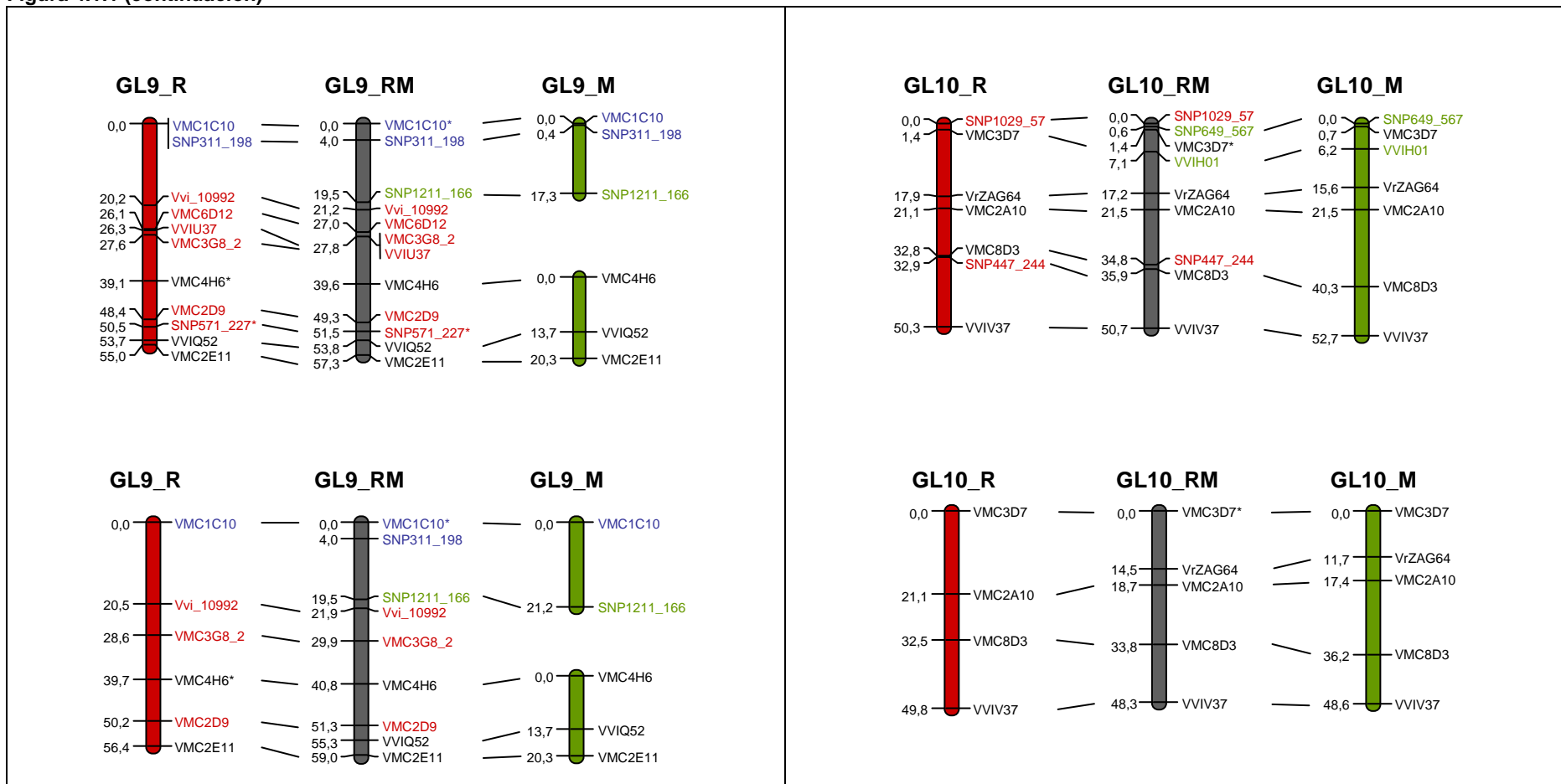


Figura 4.1.1 (continuación)

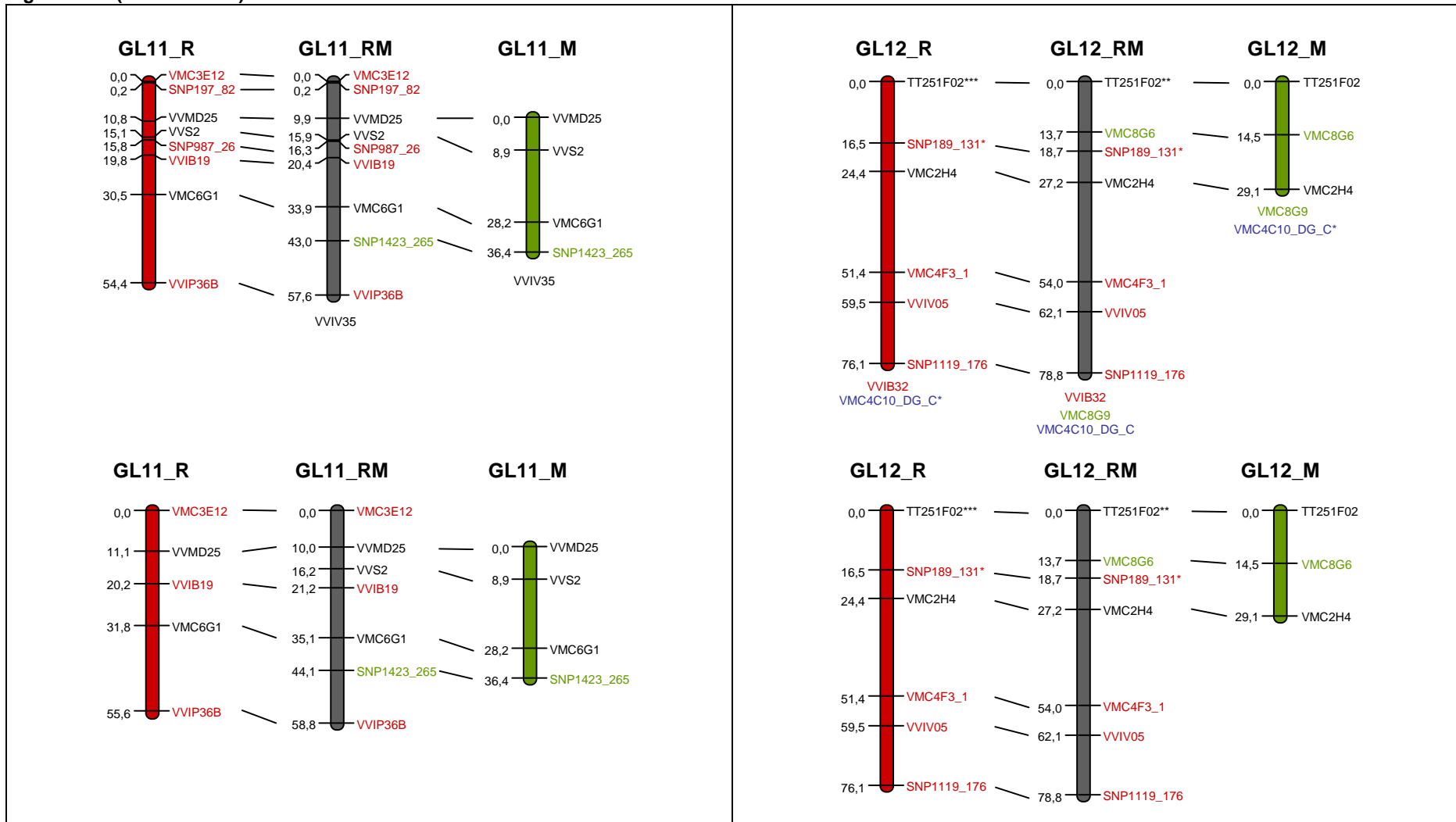


Figura 4.1.1 (continuación)

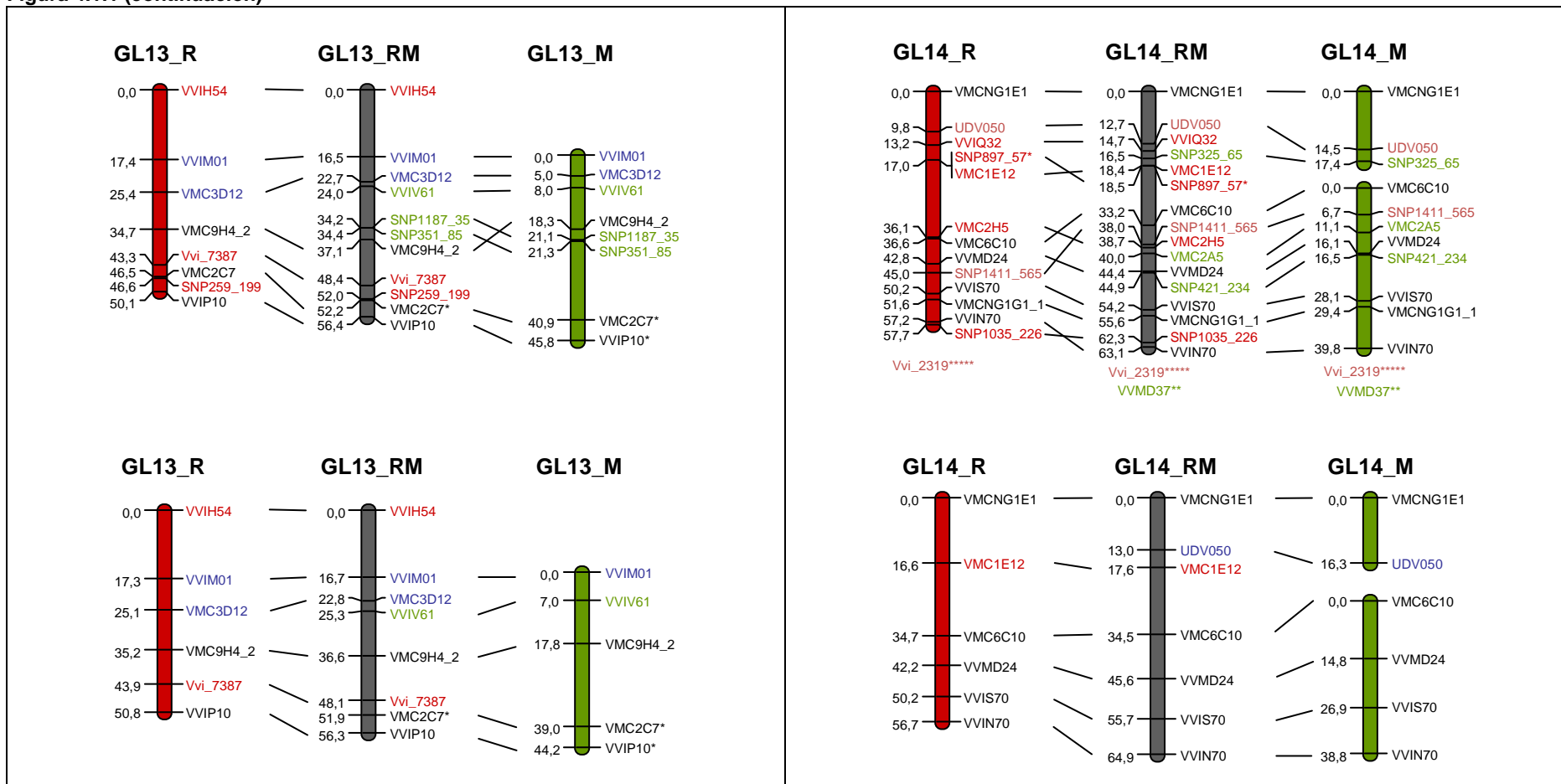


Figura 4.1.1 (continuación)

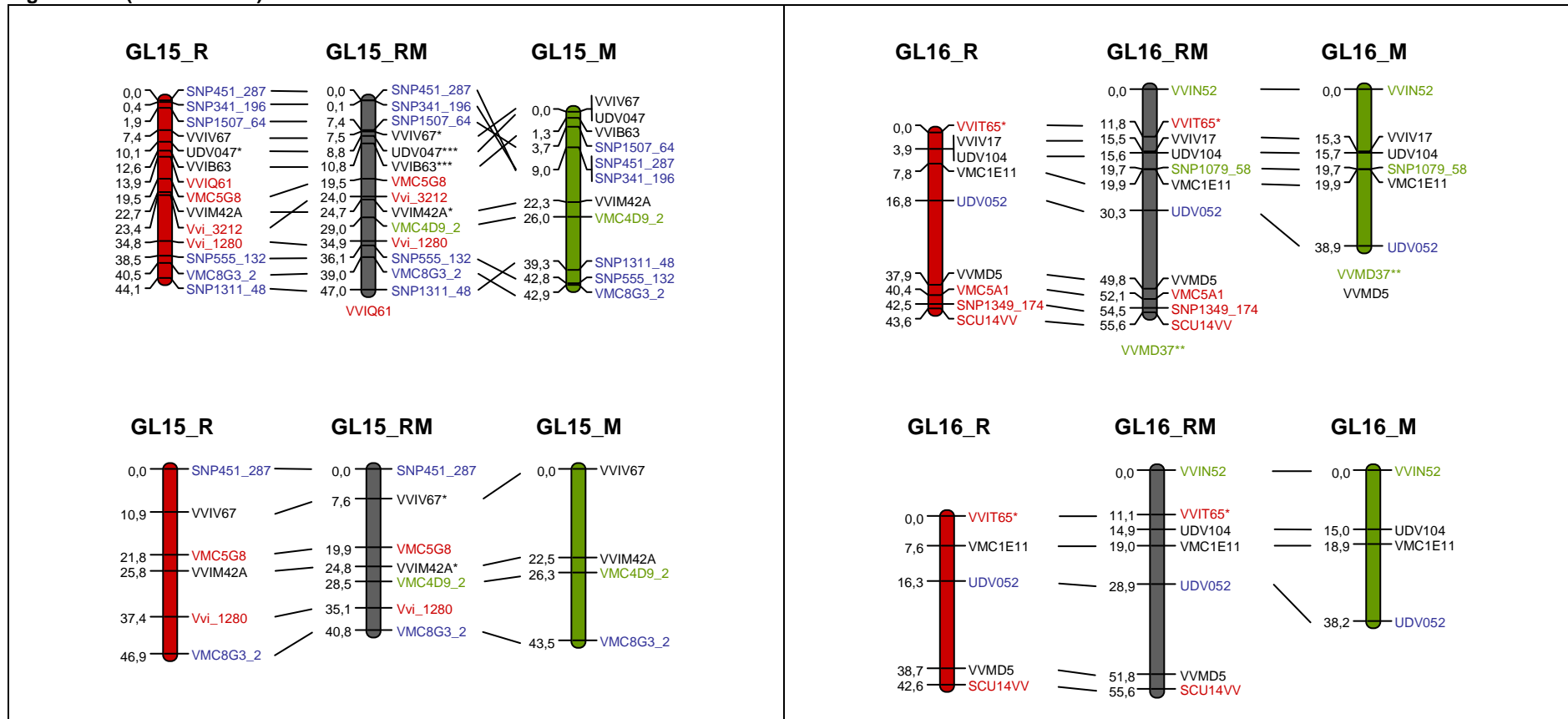


Figura 4.1.1 (continuación)

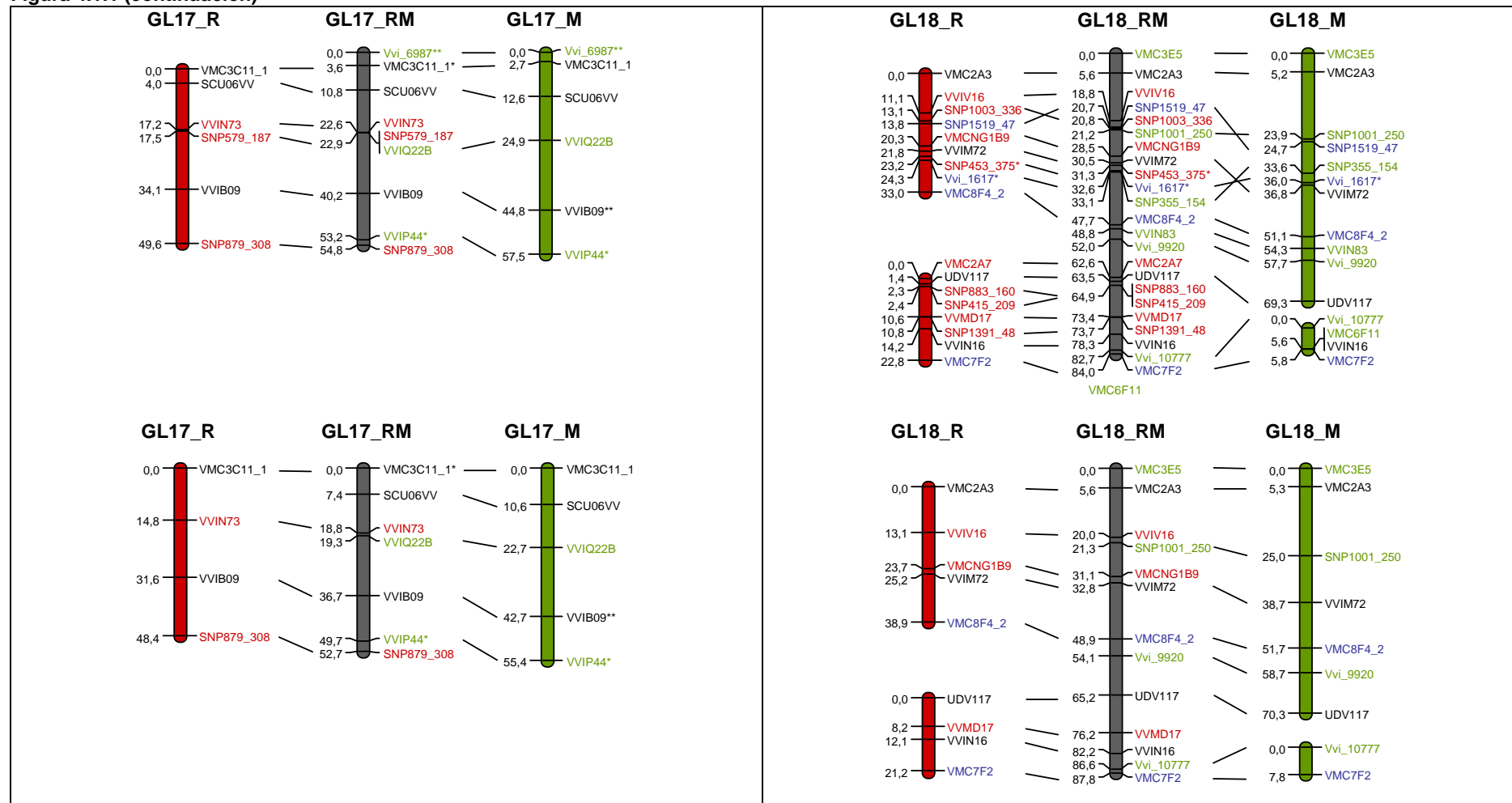
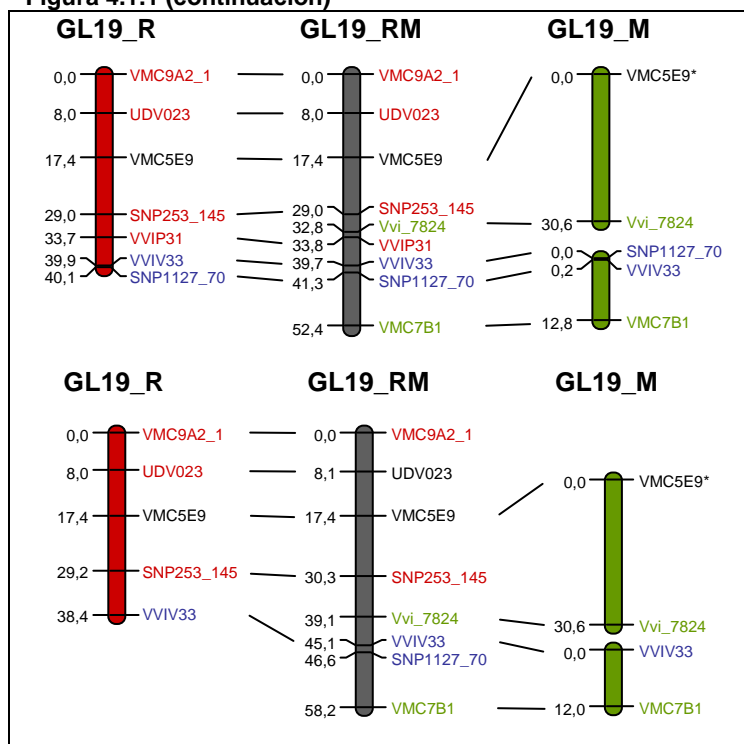


Figura 4.1.1 (continuación)



4.2. Análisis de los determinantes genéticos que controlan los caracteres de interés en uva de mesa

4.2.1. Distribución de los caracteres fenotípicos

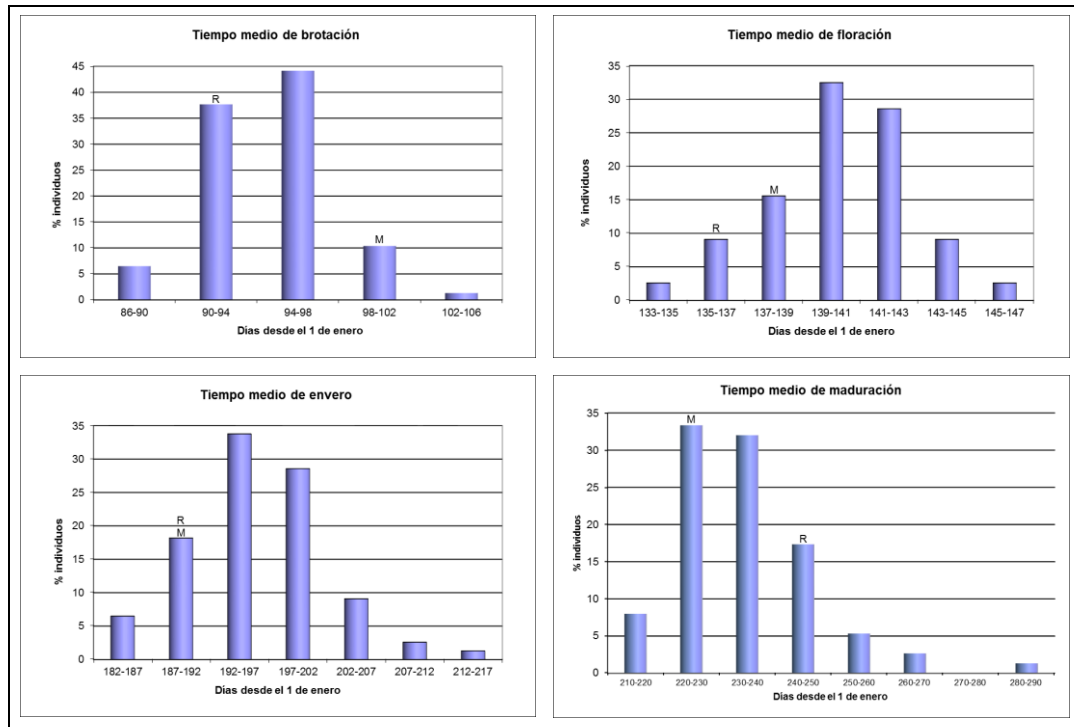
Durante las campañas 2005, 2006, 2007 y 2008 (en adelante 05, 06, 07 y 08) se evaluaron caracteres relacionados con la fenología, productividad y calidad del fruto en la progenie del cruzamiento Ruby Seedless x Moscatuel y en los parentales, tal y como se describe en la sección 3.5 de Materiales y Métodos. Dado que para el análisis cuantitativo de un carácter se asume la distribución normal de los datos del mismo (Feingold, 2002; Goh y Yap, 2009), se estudió el ajuste de los distintos datos fenotípicos a una distribución de este tipo. Los datos que presentaron una distribución no asimétrica se intentaron ajustar a una distribución normal, transformándolos mediante una escala de potencias (Tabla 3.1 en Materiales y Métodos).

4.2.1.1. Caracteres fenológicos

En la figura 4.2.1 se representa la distribución media (05-08) de la población para los caracteres fenológicos de brotación, floración, envero y maduración. Los datos obtenidos se expresan en días transcurridos desde el 1 de enero hasta que

cada planta alcanzó el correspondiente estado fenológico (ver Materiales y Métodos). Para la mayoría de estos caracteres encontramos híbridos más precoces y más tardíos que los parentales. En la tabla 4.2.1 se resume el valor medio, máximo y mínimo de la población para los caracteres fenológicos estudiados, y su variación en los distintos años. Todos los caracteres presentaron diferencias interanuales para el valor medio poblacional. En el caso de la brotación, solo el valor medio de la población en 07 mostró una diferencia significativa respecto al resto de los años evaluados, frente al envero que mostró diferencias significativas entre todos los años evaluados (Tabla 4.2.1).

Figura 4.2.1. Distribución media de los caracteres fenológicos estudiados (05-08). Para cada variable estudiada, se indica la posición de los parentales: Ruby Seedless (R) y Moscatuel (M).



El **tiempo medio de brotación** se produce entre finales de marzo y la primera quincena de abril. La amplitud media entre el híbrido más precoz y el más tardío fue de 19 días, brotando Ruby Seedless 7 días antes que Moscatuel (Tabla 4.2.1). El 70% de los híbridos brotaron entre ambos parentales, frente a un 25% que brotó antes que Ruby Seedless, y un 5% que lo hizo más tarde que Moscatuel (Figura 4.2.1). Los datos de 05 y 07 se ajustaron a una distribución normal, mientras que los de 06 lo hicieron tras ser transformados con la raíz cuadrada.

El **tiempo medio de floración** tiene lugar desde la segunda semana de mayo hasta los tres primeros días de junio, transcurriendo una media de 44 días

tras la brotación. La amplitud media entre el híbrido más temprano y el más tardío fue de 16 días (Tabla 4.2.1). Ambos parentales florecieron muy próximos entre sí, siendo Ruby Seedless el parental más precoz. El 73% de la progenie floreció más tarde que ambos parentales, y un 5% lo hizo más temprano (Figura 4.2.1). Los datos de 08 presentaron una distribución normal sin necesidad de transformación, los de 06 lo hicieron tras ser transformados mediante la raíz cuadrada, y los de 07 tras elevarlos al cuadrado. Los datos de 05 no pudieron ser ajustados a la normalidad.

El **tiempo medio de envero** se produce entre principios de julio y principios de agosto, con una amplitud media de 31 días entre el híbrido más temprano y el más tardío (Tabla 4.2.1). El valor medio de los días transcurridos desde la brotación fue de 99 días, y de 55 días desde la floración. A diferencia de los caracteres fenológicos anteriores, Moscatuel alcanzó el tiempo medio de envero 2 días antes que Ruby Seedless. El 83% de la progenie presentó una distribución transgresiva hacia fechas de envero más tardías, de manera que el valor medio de la población fue superior al valor medio de los parentales (Tabla 4.2.1). Mientras que los datos de 05 no pudieron ser ajustados a la normalidad, los de 07 sí cumplieron esta condición, y los de 08 lo hicieron tras su transformación con la raíz cuadrada.

Tabla 4.2.1. Parámetros principales de los caracteres fenológicos evaluados.

Carácter	Año	Parentales ¹		Progenie ¹			
		Rb.S.	Mosc.	Media población	Valor mínimo	Valor máximo	
Brotación	2005	92	n	89,76	a	85	94
	2006	92	89	92,74	a	79	111
	2007	92	109	104,96	b	96	113
	media	92	99	95,82		86,7	106,0
Floración	2005	142	n	138,03	ab	133	143
	2006	136	139	139,59	b	130	154
	2007	142	142	145,71	c	137	150
	2008	127	133	136,54	a	126	143
	media	136,8	138	139,97		131,5	147,5
Envero	2005	187	n	190,41	a	178	200
	2007	191	190	199,33	c	185	222
	2008	193	186	194,70	b	182	216
	media	190,3	188	194,81		181,7	212,7
Maduración	2005	N	228	223,33	a	207	270
	2006	242	216	230,47	ab	208	289
	2007	242	234	240,56	c	213	295
	2008	243	233	234,94	bc	209	267
	media	242,3	227,8	232,33		209,3	280,3

¹: Días transcurridos desde el 1 de enero. n: dato no disponible. Análisis de la varianza de Kruskal-Wallis y separación de medias realizadas con el test múltiple de Dunn. Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

El **tiempo medio de maduración** se alcanzó desde finales de julio hasta finales de septiembre, madurando algunos híbridos a mediados de octubre en los años 06 y 07. La duración media del ciclo completo de los distintos estados fenológicos (brotación-maduración) fue de 136 días, transcurriendo hasta la maduración 92 días desde la floración, y 37 días desde el envero (Tabla 4.2.1). La amplitud media entre el híbrido de maduración más precoz y el de maduración más tardía fue de 71 días. Moscatuel maduró una media de 15 días antes que Ruby Seedless. Solo el 15% de los híbridos maduraron más tarde que Ruby Seedless, situándose la maduración del mayor porcentaje de los híbridos entre ambos parentales. La distribución de los datos en 08 se ajustó a la normalidad, así como en 06 tras ser transformados con la raíz cuadrada. Sin embargo, la distribuciones de los datos de 05 y 07 no se pudieron ajustar a la normalidad.

4.2.1.2. Caracteres de productividad y calidad

En la figura 4.2.2 se representa la distribución media de la población para los caracteres de productividad y calidad evaluados en las distintas campañas (ver Materiales y Métodos), y en la tabla 4.2.2 se resume el valor medio, máximo y mínimo de la población para dichos caracteres, y su variación en los distintos años. Se observaron diferencias significativas entre los distintos años evaluados para el índice de fertilidad, peso y diámetro de las bayas, y número total de semillas y/o esbozos seminales por baya.

Dentro de los parámetros utilizados para estimar la productividad, se sabe que la fertilidad correlaciona altamente con la misma (Fanizza y col., 2005). En este sentido, Ruby Seedless fue más productiva que Moscatuel en todas las campañas, con un **índice de fertilidad** medio de 1,50 frente a 1,16, respectivamente (Tabla 4.2.2). El 52% de la población presentó una distribución transgresiva hacia valores bajos de fertilidad, inferiores al valor del parental menos fértil, Moscatuel (Figura 4.2.2), de manera que el valor medio de la población fue significativamente inferior al valor medio de los parentales (Tabla 4.2.2). Todos los híbridos fueron productivos en alguna de las campañas evaluadas, aunque en todas las campañas hubo algún híbrido sin producción, por distintos motivos. La fertilidad más baja se dio en 05, con un máximo de 1,8 racimos por sarmiento del año, y la más alta en 08, con un máximo de 2,5. La distribución de los datos se ajustó a la normalidad en todas las campañas, aunque los datos de 05 fueron transformados con la raíz cuadrada para corregir cierta asimetría positiva.

El **peso medio de los racimos** fue muy similar en ambos parentales, con solo una diferencia media de 127 g. Sin embargo, el peso medio de los racimos en

la progenie varió desde 139 g hasta 1553 g, con un valor medio de la población de 578 g (Tabla 4.2.2). Más del 70% de los híbridos tuvieron racimos con un peso fuera del rango establecido por los parentales, siendo esta transgresión de mayor magnitud hacia racimos de peso inferior (Figura 4.2.2). La distribución en las tres campañas presentó cierta asimetría positiva, que pudo ser ajustada a la normalidad transformando los datos con la raíz cuadrada (05 y 07) o con el logaritmo decimal (06 y 08).

Igualmente, el **peso medio de las bayas** de ambos parentales fue muy similar (3-3,6 g), e inferior al valor medio de la población (3,9 g) que presentó un rango desde 1,4 a 8,7 g (Tabla 4.2.2). El 49% de los híbridos presentó un peso medio de las bayas superior al de los parentales, frente al 31% que presentó bayas con un peso inferior al de los mismos (Figura 4.2.2). La distribución de los datos presentó cierta asimetría positiva, que pudo ser ajustada a la normalidad transformando los datos con la raíz cuadrada (05 y 07) o con el logaritmo decimal (06 y 08). El peso medio de la progenie fue inferior en 08, al igual que en los parentales.

El **diámetro medio de las bayas** en la progenie osciló entre 13 y 24 mm, con valores muy próximos entre Ruby Seedless y Moscatuel (16 y 18 mm, respectivamente). Un 35% de los híbridos presentó valores dentro del rango establecido por los parentales, y el 47% presentó valores superiores (Figura 4.2.2). Al igual que sucedió con el peso de las bayas, el diámetro también fue sensiblemente inferior en 08, tanto en la progenie como en los parentales. Aunque los datos se ajustaron a la normalidad en las cuatro campañas estudiadas, los de 06 y 07 fueron transformados con la raíz cuadrada, ya que con ello aumentaba el poder estadístico del análisis Shapiro-Wilk.

La **textura de las bayas** de Ruby Seedless osciló entre media (6,7 N en 07) y crujiente (9,18-10,9 N en el resto de campañas), mientras que Moscatuel siempre presentó consistencia blanda (3,65-4,28 N). La progenie mostró consistencia predominantemente blanda (3-6 N) y media (6-9 N), siendo de textura crujiente (9-12 N) alrededor de un 10% de los híbridos, que además fueron más crujientes que Ruby Seedless. La asimetría positiva de los datos pudo ser ajustada a la normalidad en todos los casos mediante la transformación con la raíz cuadrada.

Figura 4.2.2. Distribución media de los caracteres de productividad y calidad estudiados (05-08). Para cada variable estudiada, se indica la posición de los parentales: Ruby Seedless(R) y Moscatuel (M).

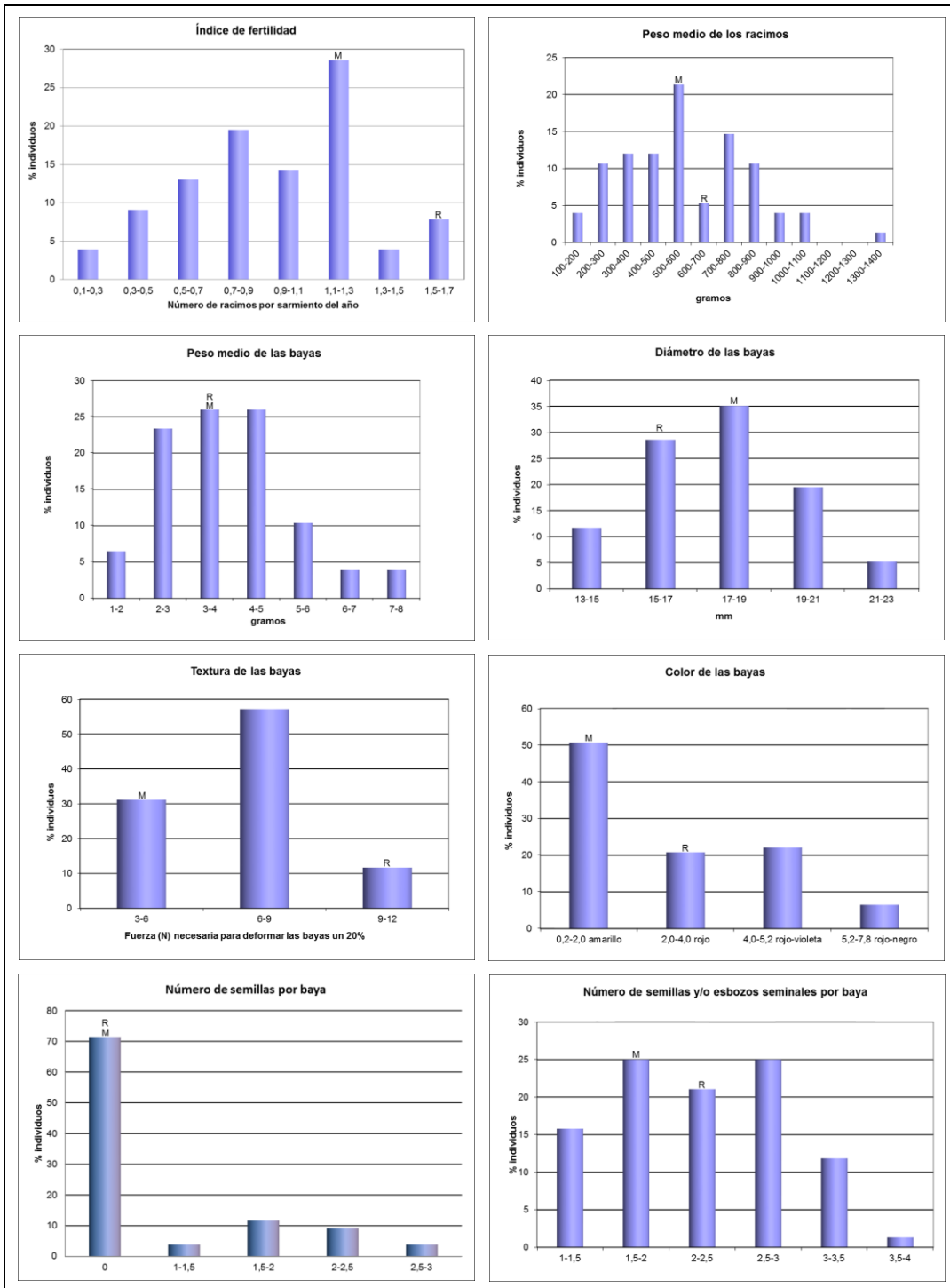
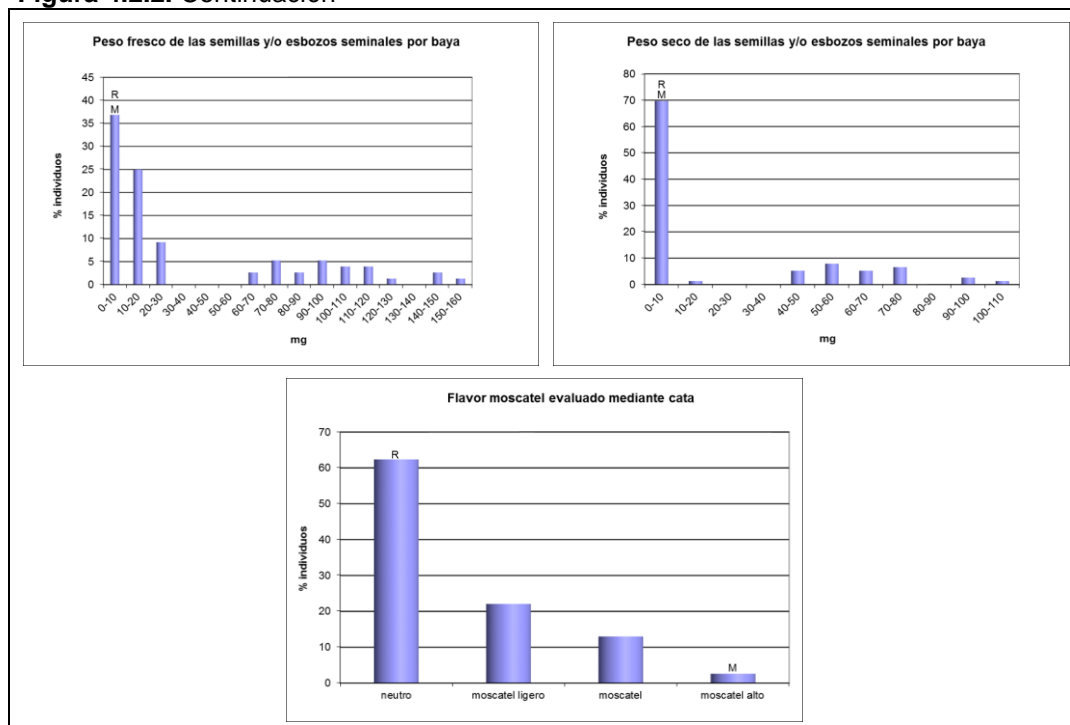


Figura 4.2.2. Continuación



El **color de las bayas** de Ruby Seedless es rojo, con valores medios de CIRG de 3,2, mientras que las bayas de Moscatuel son amarillas, con un valor medio de CIRG de 1,3 (Tabla 4.2.2). La mitad de los híbridos fueron amarillos como Moscatuel, y la otra mitad presentaron bayas coloreadas. Entre los híbridos de color, el 58% presentó colores más oscuros que Ruby Seedless (valores de CIRG > 3,2), con un 13% de los mismos con valores de CIRG superiores a 5, que se correspondieron con un color visual violeta y negro (Figura 4.2.2). En ningún caso se ajustaron los datos a la normalidad.

El grado de **apirenia** se evaluó empleando distintas variables (número de semillas, número de semillas y/o esbozos seminales, y peso fresco y seco de las semillas y/o esbozos seminales). A diferencia de los padres, que no presentan **semillas** completamente formadas o lignificadas, un 29% de los híbridos sí presentaron semillas, en un rango que osciló entre 1 y 3 semillas por baya, frente a un 71% que no presentaron semillas pero sí esbozos seminales más o menos desarrollados (Figura 4.2.2). Esta variable no se ajustó a una distribución normal. El valor medio del **número total de semillas y/o esbozos seminales por baya** osciló entre 0,6 y 3,7, con un promedio de 2,2 en la población (Tabla 4.2.2). Ruby Seedless presentó un promedio de 2,4 rudimentos seminales frente a 1,5 de Moscatuel. Aunque todos los híbridos presentaron un número variable de esbozos seminales, incluidos los que contenían semillas, hubo híbridos en los que se observó ausencia total de rudimentos seminales en algunas de sus bayas. Esta

variable se ajustó a una distribución normal en 06 y 07, mientras que en 05 se ajustó a la normalidad tras elevar los datos al cuadrado.

Tabla 4.2.2. Parámetros principales de los caracteres de productividad y calidad evaluados.

Carácter	Año	Parentales		Progenie			
		Rb.S.	Mosc.	Media (*)	Valor mínimo	Valor máximo	
Índice fertilidad	2005	n	n	0,69	a	0	1,75
	2006	1,69	1,33	1,12	c	0	2
	2007	1,12	0,56	0,86	b	0	1,88
	2008	1,7	1,6	1,03	c	0	2,47
	media	1,50	1,16	0,93		0	2,03
Peso racimo (gr)	2005	675	315	562,35	a	112	1172
	2006	727,5	470	534,15	a	122,66	2031
	2007	661,73	896,81	636,89	a	183,36	1457,36
	media	688,08	560,60	577,80		139,34	1553,45
	Peso bayas (gr)	2005	3,77	3,82	4,23	b	1,86
2006		3,25	3,86	4,13	ab	0,98	8,4
2007		3,13	3,76	3,82	ab	1,43	9,61
2008		2,53	3,19	3,46	a	1,32	7,97
media		3,17	3,66	3,91		1,40	8,66
Diámetro bayas (mm)	2005	15,28	18,02	18,06	b	14,2	23,16
	2006	15,39	17,67	17,72	b	13	25,46
	2007	16,34	17,82	17,44	ab	13	23,95
	2008	15,78	17,33	16,89	a	12,89	21,79
	media	15,70	17,71	17,53		13,27	23,59
Textura bayas (N)	2005	10,9	3,65	6,69	a	2,88	11,83
	2006	9,18	3,7	7,02	a	2,99	12,73
	2007	6,7	4,19	6,68	a	2,84	13,57
	2008	10,2	4,28	6,81	a	2,99	12,88
	media	9,25	3,96	6,8		2,93	12,75
Color bayas (CIRG)	2005	2,04	1,24	2,59	a	0,2	6,24
	2006	3,63	1,36	2,63	a	0,23	6,24
	2007	3,91	1,23	2,80	a	1,03	6,24
	media	3,19	1,28	2,67		0,49	6,24
	NS_B ¹	2005	0	0	0,56	a	0
2006		0	0	0,56	a	0	3,2
2007		0	0	0,54	a	0	3
media		0	0	0,55		0	2,98
NT_SE_B ²		2005	3,4	2,5	2,55	b	0,9
	2006	3,2	1,2	2,03	a	0,5	3,6
	2007	0,7	0,65	2,08	a	0,5	3,9
	media	2,43	1,45	2,22		0,63	3,73
	PF_SE_B ³ (mg)	2005	13,81	5,82	34,83	a	0,37
2006		2,76	4,37	33,80	a	0,44	167,62
2007		5,36	7,29	39,92	a	0,44	195,52
media		7,31	5,83	36,18		0,42	169,05
PS_SE_B ⁴ (mg)		2005	3,79	1,35	20,29	a	0,13
	2006	0,56	1,14	19,94	a	0,11	110,42
	2007	1,76	2,18	22,78	a	0,11	122,84
	media	2,04	1,56	21,00		0,12	110,09

(*) Análisis de la varianza ANOVA para fertilidad y diámetro de bayas (distribución normal de los datos). Separación de medias realizadas con el test múltiple de Duncan. Análisis de la varianza de Kruskal-Wallis para el resto de caracteres, con separación de medias realizadas con el test múltiple de Dunn. Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$).

n: No hay dato. ¹: Número de semillas por baya. ²: Número total de semillas y/o esbozos seminales por baya. ³: Peso fresco de las semillas y/o esbozos seminales por baya. ⁴: Peso seco de las semillas y/o esbozos seminales por baya.

El **peso medio fresco y seco de las semillas y/o esbozos seminales por baya** osciló entre 0,4-169 mg y 0,12-110 mg, respectivamente (Tabla 4.2.2), con un valor medio en la población de 36 y 21 mg. El proceso de secado de las semillas y/o esbozos seminales provocó una disminución media del peso de los mismos de 15 mg. Hay que señalar la gran diferencia del peso fresco entre ambos tipos de componentes seminales, de manera que el peso medio de los esbozos por baya puede suponer un máximo de 36 mg, mientras que las semillas suponen un peso mínimo de 52 mg por baya. Los valores medios de estas dos variables no variaron significativamente entre campañas, aunque Ruby Seedless en 05 presentó unos esbozos manifiestamente más grandes que en los demás años (Tabla 4.2.2). La distribución de los datos no pudo ser ajustada a la normalidad en ningún caso.

El **flavor moscatel (olor + aroma)** se evaluó mediante la cata de bayas maduras, empleando una escala ordinaria con cuatro categorías que cubren el intervalo desde bayas con flavor neutro a bayas con flavor moscatel alto. Entre el 50 y el 70% de los híbridos presentaron flavor neutro como Ruby Seedless, mientras que menos de un 5% de la progenie mostró flavor moscatel fuerte como Moscatuel (Figura 4.2.2). El resto de la población se distribuyó entre flavor moscatel ligero (17%) o moscatel (10%). Los datos no pudieron ser ajustados a la normalidad en ningún caso.

4.2.2. Análisis de correlación de los caracteres fenotípicos

En la selección de un carácter influye tanto la variación genética del mismo dentro de la población de mejora, como su correlación genética con otros caracteres de interés presentes en la población. Igualmente, es importante tener en cuenta la estabilidad de un mismo carácter en los distintos años evaluado.

En la Tabla 4.2.3 se muestran los resultados obtenidos del análisis de correlación de un mismo carácter en los distintos años en que fue evaluado. Los caracteres fenológicos presentan una mayor variación entre las distintas campañas, indicando una mayor influencia de las condiciones ambientales en estos caracteres. Los caracteres de producción y calidad, en cambio, correlacionaron significativamente en los distintos años en que fueron evaluados, a excepción de los datos de fertilidad de 05 y 08.

Por otro lado, en las Tablas 4.2.4 y 4.2.5 se muestran los resultados obtenidos del estudio de correlación entre los distintos caracteres fenológicos y entre los caracteres de producción y calidad, respectivamente, dentro de cada año evaluado. Algunos caracteres presentaron una correlación significativa con los datos de todos los años en que fueron evaluados (en adelante correlación

constante), mientras que otros caracteres correlacionaron en al menos dos campañas (en adelante correlación *consistente*). Las correlaciones detectadas con los datos de una sola campaña no se han tenido en consideración.

Tabla 4.2.3. Matriz de correlación de Pearson del mismo carácter entre las distintas campañas.

Carácter	05-06	05-07	05-08	06-07	06-08	07-08
Brotación	0,472**	NS	n	NS	n	n
Floración	0,344**	0,432**	0,319*	0,418**	NS	0,303*
Envero	n	0,598**	0,544**	n	n	0,782**
Maduración	0,399*	0,737**	NS	0,622**	NS	0,587**
Fertilidad	0,386**	0,402**	NS	0,496**	0,442**	0,417**
Peso racimo	0,607**	0,504**	0,483**	0,527**	0,511**	0,530**
Peso bayas	0,804**	0,800**	0,748**	0,854**	0,796**	0,794**
Diámetro bayas	0,745**	0,804**	0,717**	0,824**	0,751**	0,775**
Textura bayas	0,612**	0,470**	0,508**	0,664**	0,638**	0,753**
Color bayas	0,830**	0,888**	n	0,909**	n	n
NS_B ¹	0,914**	0,942**	n	0,968**	n	n
NT_SE_B ²	0,671**	0,510**	n	0,675**	n	n
PF_SE_B ³	0,912**	0,948**	n	0,950**	n	n
PS_SE_B ⁴	0,930**	0,957**	n	0,963**	n	n
Flavor moscatel	0,679**	0,581**	0,688**	0,563**	0,730**	0,706**

** : Correlación positiva ($P = 0,01$). * : Correlación positiva ($P = 0,05$).

NS: Correlación no significativa. n : Carácter no evaluado en alguna de las campañas. ¹: Número de semillas por baya. ²: Número total de semillas y/o esbozos seminales por baya. ³: Peso fresco de las semillas y/o esbozos seminales por baya. ⁴: Peso seco de las semillas y/o esbozos seminales por baya.

Atendiendo a los caracteres fenológicos, se detectaron correlaciones positivas y constantes de la fecha de floración con brotación y envero, y de esta última con maduración (Tabla 4.2.4). Los valores de los coeficientes de correlación solo fueron superiores a 0,5 para brotación y floración (0,855) en 06, y para envero y tiempo de maduración (0,664 y 0,585) en 07 y 08, respectivamente.

Respecto al análisis de correlación entre los caracteres de productividad y calidad, como era de esperar, las correlaciones constantes más significativas se obtuvieron entre los distintos parámetros utilizados para evaluar un mismo carácter, con coeficientes de Pearson superiores a 0,9 para un nivel de significación de 0,01 (Tabla 4.2.5): correlación positiva entre el *peso* y el *diámetro de las bayas* (tamaño de las bayas); correlación positiva entre *peso fresco* y *peso seco de semillas y/o esbozos seminales*, y *número de semillas* por baya (grado de apirenia).

Tabla 4.2.4. Matriz de correlación de Pearson de los caracteres fenológicos en las distintas campañas evaluadas.

	Año	Brotación	Floración	Envero	Maduración
Brotación	2005	1			
	2006	1			
	2007	1			
	2008	n	--		
Floración	2005	0,401**	1		
	2006	0,855**	1		
	2007	0,438**	1		
	2008	n	1	--	
Envero	2005	NS	0,418**	1	
	2006	n	n	n	
	2007	NS	0,259*	1	
	2008	n	0,347**	1	--
Maduración	2005	NS	NS	0,464**	1
	2006	0,331*	0,394**	n	1
	2007	NS	NS	0,664**	1
	2008	n	NS	0,585**	1

** : Correlación significativa ($P = 0,01$). * : Correlación significativa ($P = 0,05$). n : No se evaluó alguno de los dos caracteres en esa campaña.

Las variables relacionadas con el tamaño de las bayas correlacionaron también de manera constante y moderada (con coeficientes superiores a 0,5 y $P < 0,01$) con el peso del racimo y con las variables relacionadas con el grado de apirenia, y de manera débil pero constante (con coeficientes inferiores a 0,5 y $P < 0,01$) con la textura de las bayas. Finalmente, las variables relacionadas con el grado de apirenia correlacionaron de manera débil pero constante con el peso del racimo, y de manera débil y consistente con la textura (Tabla 4.2.5).

Los únicos parámetros que no correlacionaron con otros fueron el índice de fertilidad, el color de las bayas (índice CIRG), y el flavor moscatel (Tabla 4.2.5).

Además, el análisis de correlación de los caracteres fenológicos con los caracteres de productividad y calidad reveló una correlación moderada-débil del envero con las variables relacionadas con el grado de apirenia, en las dos campañas en las que todas las variables fueron evaluadas (Tabla 4.2.6).

Tabla 4.2.5. Matriz de correlación de Pearson de los caracteres de productividad y calidad en las distintas campañas evaluadas.

Carácter	Año	IF ¹	PM_R ²	PM_B ³	DM_B ⁴	TEX_B ⁵	CIRG ⁶	NS_B ¹⁰	NT_SE_B ⁷	PF_SE_B ⁸	PS_SE_B ⁹	Flavor
IF ¹	2005	1										
	2006	1										
	2007	1										
	2008	1	--									
PM_R ²	2005	NS	1									
	2006	NS	1									
	2007	NS	1									
	2008	NS	1	--								
PM_B ³	2005	NS	0,603**	1								
	2006	NS	0,621**	1								
	2007	-0,283*	0,487**	1								
	2008	NS	0,631**	1	--							
DM_B ⁴	2005	NS	0,596**	0,964**	1							
	2006	NS	0,527**	0,932**	1							
	2007	-0,226*	0,508**	0,963**	1							
	2008	NS	0,596**	0,952**	1	--						
TEX_B ⁵	2005	NS	NS	0,311**	0,353**	1						
	2006	NS	NS	0,404**	0,359**	1						
	2007	NS	NS	0,346**	0,350**	1						
	2008	-0,232*	NS	0,431**	0,421**	1	--					
CIRG ⁶	2005	NS	NS	NS	NS	NS	1					
	2006	NS	NS	NS	NS	NS	1					
	2007	NS	NS	NS	NS	NS	1					
	2008	n	n	n	n	n	n	--				
NS_B ⁷	2005	NS	0,330**	0,556**	0,504**	NS	NS	1				
	2006	NS	0,495**	0,666**	0,599**	0,293**	NS	1				
	2007	NS	0,406**	0,706**	0,681**	NS	NS	1				
	2008	n	n	n	n	n	n	n	--			
NT_SE_B ⁸	2005	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1			
	2006	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1			
	2007	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1			
	2008	n	n	n	n	n	n	n	n	--		
PF_SE_B ⁹	2005	NS	0,376**	0,614**	0,569**	NS	NS	0,949**	NS	1		
	2006	NS	0,466**	0,706**	0,627**	0,308**	NS	0,967**	NS	1		
	2007	NS	0,389**	0,775**	0,742**	0,277*	NS	0,965**	0,234*	1		
	2008	n	n	n	n	n	n	n	n	n	--	
PS_SE_B ¹⁰	2005	NS	0,360**	0,608**	0,559**	NS	NS	0,961**	NS	0,995**	1	
	2006	NS	0,477**	0,698**	0,619**	0,299**	NS	0,980**	NS	0,994**	1	
	2007	NS	0,393**	0,767**	0,727**	0,255*	NS	0,982**	NS	0,992**	1	
	2008	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	--
Flavor	2005	0,297*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1
	2006	NS	-0,284*	NS	NS	-0,289*	NS	NS	0,253*	NS	NS	1
	2007	0,270*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1
	2008	NS	NS	NS	NS	NS	n	n	n	n	n	1

** : Correlación significativa ($P = 0,01$). * : Correlación significativa ($P = 0,05$). NS : Correlación no significativa. n : No se evaluó al menos uno de los dos caracteres en esa campaña. ¹ : Índice de fertilidad. ² : Peso medio de los racimos. ³ : Peso medio de las bayas. ⁴ : Diámetro de las bayas. ⁵ : Textura de las bayas. ⁶ : Color de las bayas. ⁷ : Número de semillas por baya. ⁸ : Número total de semillas y/o esbozos seminales por baya. ⁹ : Peso fresco de las semillas y/o esbozos seminales por baya. ¹⁰ : Peso seco de las semillas y/o esbozos seminales por baya.

Tabla 4.2.6. Matriz de correlación de Pearson del envero con variables relacionadas con el grado de apirenia.

Carácter	Año	Envero
PF_SE_B ¹	2005	0,484**
	2006	n
	2007	0,450**
	2008	n
PS_SE_B ²	2005	0,492**
	2006	n
	2007	0,458**
	2008	n
NS_B ³	2005	0,488**
	2006	n
	2007	0,463**
	2008	n

** : Correlación significativa ($P = 0,01$). * : Correlación significativa ($P = 0,05$). n : No se evaluó alguno de los caracteres en esa campaña. 1 : Peso fresco de las semillas y/o esbozos seminales por baya. 2 : Peso seco de las semillas y/o esbozos seminales por baya. 3 : Número de semillas por baya.

4.2.3. Identificación y localización de QTLs

Los resultados expuestos a continuación corresponden a los QTLs detectados mediante el mapeo de QTLs múltiples (MQM) sobre los mapas marco de los parentales y el integrado del cruzamiento. Este análisis se realizó para cada carácter cuando se detectó un QTL mediante mapeo simple de intervalos (MI) en una región del genoma con los datos de al menos dos campañas. Debido a la mayor exigencia del análisis MQM respecto al MI, los QTLs que son detectados con MI no son necesariamente detectados con el MQM. Este análisis permitió establecer un modelo de control del carácter en cada campaña, definido por los QTLs detectados con los datos de ese año.

Aquellos QTLs en los que el LOD del cofactor (ver Materiales y Métodos) superó a nivel genómico un umbral de significación mínimo de $\alpha = 0,20$, se denominaron *QTLs significativos*, y los que superaron dicho umbral a nivel de grupo de ligamiento (GL) se denominaron *QTLs sugerentes*.

La nomenclatura empleada para los GLs incluye subíndices para identificar los subgrupos de los GLs que resultaron fragmentados. Los subíndices siguen orden alfabético ordenado a partir de la parte superior del GL (ej. GL 7_a, GL 7_b...). En las respectivas tablas (Tabla 4.2.7 a Tabla 4.2.21), se muestran los QTLs identificados para cada carácter, señalando el mapa, año y GL en el que se detectaron los mismos. Junto con el nivel de significación obtenido con el análisis Kruskal-Wallis (KW), se indica el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80% ($\alpha=0,20$), 95% ($\alpha=0,05$) y 99% ($\alpha=0,01$), en cada caso. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1 y cofactor óptimo. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.) y, en negrita, el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

Brotación. En el mapa de Ruby Seedless se identificaron 4 QTLs de efecto menor, en los GLs 3, 7_b, 12 y 15, que explicaron entre el 5,2 y el 22,2% de la variación fenotípica (Tabla 4.2.7). El efecto aditivo del QTL del GL 12 (positivo) contribuyó al retraso de la brotación, mientras que el efecto aditivo del resto de QTLs (negativo) contribuyó a un adelanto de la brotación. El modelo de control del carácter en 06, que engloba tres QTLs (GL 3, 7_b, y 12), explicó el 27,6% de la variación fenotípica total. Todos los QTLs detectados son sugerentes, excepto el detectado en el GL 12 en 05. Aunque en 06, el cofactor óptimo para el QTL del GL 12 no coincide con el

cofactor del QTL detectado en 05 en ese mismo GL, los intervalos de confianza LOD -1 de ambos QTLs solaparon, por lo que se trataría del mismo QTL.

En el mapa de Moscatuel, tras el análisis MQM, solo se detectó una nueva región en la parte superior del GL 8 (GL 8_a) en 05. Esta región o QTL sugerente, contribuyó a un adelanto de la brotación y explicó el 9% de la variación fenotípica total (Tabla 4.2.7).

Tabla 4.2.7. Descripción de los QTLs detectados para el tiempo de brotación.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma			LOD max.	cM	Intervalo LOD-1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				80	95	99	80	95	99							
R	05	12	7	0,9	1,4	1,9	2,2	2,7	3,4	3,87	0,0	0,0-15,1	TT251F02	3,87	22,2	0,88
R	06	3	4	0,8	1,4	2,1	2,2	2,8	3,6	1,24	40,3	22,8-42,1	VVIN54	1,21	5,2	-0,23
R	06	7b	4	0,6	1,1	2	2,2	2,8	3,6	2,15	0,0	0,0-13,3	SNP1015_67	2,15	12,3	-0,33
R	06	12	1	1	1,6	2,2	2,2	2,8	3,6	1,65	10	0,0-35,5	SNP189_131	1,51	7,8	0,26
R	06	Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL3, GL7b y GL12): 27,6%														
R	07	15	3	0,8	1,5	2,3	2,1	2,9	3,4	1,53	21,8	0,0-46,9	VMC5G8	1,53	9,7	-0,91
M	05	8a	4	0,8	1,6	2,1	2,1	2,7	3,5	1,45	25,5	13,7-37,5	VMC5G6_1	1,45	9	-0,56
I	05	12	4	1,8	2,6	3,1	3,4	4,2	4,9	4,05	0,0	0,0-16,4	TT251F02	4,05	23,1	
I	06	3	2	1,7	2,5	3,5	3,5	4,2	5,2	2,48	44,4	30,4-44,4	VVIN54	2,48	14	

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P (1 = 0,1; 2 = 0,05, 3 = 0,01; 4 = 0,005; 5 = 0,001; 6 = 0,0005; 7 = 0,0001), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa integrado se identificaron dos QTLs (sugerente en GL 3 y significativo en GL 12), previamente detectados en el mapa de Ruby Seedless (Tabla 4.2.7). El porcentaje de la variación explicada (% var. expl.) por estos QTLs fue del 14 y 23,1%, respectivamente.

Floración. En el mapa de Ruby Seedless se identificaron 5 QTLs de efecto menor relacionados con la floración (GL 2, 5_b, 12, 14 y 18_b), que explicaron entre el 5,1 y el 37,7% de la variación fenotípica. A excepción del QTL del GL 12, con efecto aditivo positivo, el resto de QTLs provocaron un adelanto de la floración (Tabla 4.2.8). En 05 se estableció un modelo de control del carácter que explicó el 45,8% de la varianza total (tres QTLs significativos), y en 07 el 45,7% (dos QTLs, uno significativo y otro sugerente). Los QTLs de los GLs 5_b (5,1% var. expl.), 12 (16,9% var. expl.) y 18_b (14,1% var. expl.) solo se mantuvieron en una campaña tras el análisis MQM.

En el mapa de Moscatuel se identificaron dos nuevos QTLs (GLs 15 y 18_a), no detectados en el mapa de Ruby Seedless, de manera que el efecto aditivo del QTL localizado en el GL 15 (10,3% var. expl.) contribuyó al retraso de la floración, mientras que el del GL 18_a contribuyó al adelanto de la misma (Tabla 4.2.8). El QTL del GL 18_a (8,7-12,5% var. expl.) se detectó de manera consistente en tres

campañas, aunque fue significativo solo con los datos de la campaña 08. En 08 se estableció un modelo de control del carácter (un QTL sugerente en GL 15 y otro significativo en GL 18_a) que explicó el 24,4% de la varianza total.

Tabla 4.2.8. Descripción de los QTLs detectados para el tiempo de floración.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma			LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				80	95	99	80	95	99							
R	05	12	2	0,9	1,6	2,2	2,2	2,8	3,4	4,67	10,0	2,3-17,7	SNP189_131	3,76	16,9	1,01
R	05	14	4	0,9	1,6	2,4	2,2	2,8	3,4	4,52	34,7	30,6-41,3	VMC16C10	4,52	19,7	-1,08
R	05	18b	2	0,7	1,3	2	2,2	2,8	3,4	3,33	8,2	0,0-10,7	VVMD17	3,33	14,1	-0,93
R 05 Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL12, GL14 y GL18b): 45,8%																
R	06	14	2	0,9	1,4	2,3	2	2,6	3,3	1,42	34,7	16,6-49,7	VMC16C10	1,42	8,5	-0,19
R	07	2	7	0,8	1,4	2,2	2,1	2,7	3,2	8,1	15,0	7,6-32,4	SNP437_129	7,87	37,7	-23,30
R	07	5b	2	0,8	1,5	2,1	2,1	2,7	3,2	1,41	12,4	0,5-20,5	VMC6E10	1,41	5,1	-8,51
R 07 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL2 y GL5b): 45,7%																
R	08	2	0	0,8	1,4	2,1	2,1	2,8	3,4	1,33	10,0	0,0-39,0	SNP437_129	1,27	8,2	-1,45
M	06	18a	3	1	1,6	2,1	2,1	2,7	3,5	1,43	25,0	11,5-33,6	SNP1001_250	1,43	8,7	-0,20
M	07	18a	2	0,9	1,6	2,2	2,1	2,8	3,5	2,31	15,3	4,1-34,9	SNP1001_250	2,03	12,5	-13,37
M	08	15	4	0,7	1,3	1,8	2,1	2,7	3,6	2,04	0,0	0,0-15,7	VVIV67	2,04	10,3	1,63
M	08	18a	2	0,9	1,6	2,2	2,1	2,7	3,6	2,19	25,0	0,0-35,3	SNP1001_250	2,19	11,7	-1,74
M 08 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL15 y GL18a): 24,4%																
I	05	14	6	2	2,7	3,6	3,6	4,3	5	5,43	32,6	25,3-38,8	VMC6C10	5,17	23,6	
I	05	18	2	2,1	2,8	3,6	3,6	4,3	5	2,77	70,2	51,8-82,8	VVMD17	2,59	13,4	
I 05 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL14 y GL18a): 41,4%																
I	06	2	1	1,9	2,8	3,5	3,4	4,1	4,8	2,60	18,8	15,7-23,8	VVIB23	2,60	12,8	
I	06	15	1	1,8	2,6	3,6	3,4	4,1	4,8	2,75	28,5	13,0-36,4	VMC4D9_2	2,75	14,0	
I 06 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL 2 y GL 15): 28,2%																
I	07	2	0	1,8	2,6	3,4	3,5	4	4,8	7,47	25,0	7,1-34,2	VMC6F1	25,0	39,8	
I	08	15	1	1,8	2,5	3,4	3,5	4,3	5,1	2,22	0,0	0,0-28,2	SNP451_287	2,22	11,0	
I	08	18	2	2,2	2,9	3,8	3,5	4,3	5,1	3,98	21,3	9,9-29,3	SNP1001_250	3,98	18,7	
I 08 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL 15 y GL 18): 36,1%																

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P (1 = 0,1; 2 = 0,05, 3 = 0,01; 4 = 0,005; 5 = 0,001; 6 = 0,0005; 7 = 0,0001), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa integrado se identificaron 5 QTLs (GL 2, 14, 15 y dos en el GL 18), que explicaron entre el 11 y el 39,8% de la variación fenotípica. Los intervalos de confianza LOD -1 muestran que los QTLs identificados en los GLs 2 y 14 coinciden con los detectados en el mapa de Ruby Seedless, y que el QTL detectado en el GL 15 coincide con el detectado en el mapa de Moscatuel. En el GL 18 se podrían identificar dos QTLs, uno en la campaña 05 coincidente con el identificado en el mapa de Ruby Seedless, y otro en 08 coincidente con el identificado en el mapa de Moscatuel (Tabla 4.2.8). En 05, 06 y 08, se establecieron modelos de control del carácter que explicaron el 41,4, 28,2 y el 36,1% de la varianza total, respectivamente.

Envero. El análisis con el mapa de Ruby Seedless estableció 5 QTLs (GL 3, 4_b, 5_a, 7_c y 18_b) de efecto aditivo positivo, contribuyendo a un retraso en el tiempo de envero (Tabla 4.2.9). Todos los QTLs detectados fueron sugerentes, excepto el detectado en el GL 3 en 07 que fue significativo ($\alpha=0,20$). La variación fenotípica explicada varió entre el 6,8 y el 13,6%. El QTL del GL 5_a se detectó de manera

consistente en las tres campañas, explicando el 8,3-13,6% de la varianza fenotípica. El QTL del GL 3, significativo en 07 (10,7% var. expl.) y sugerente en 08 (9,2% var. expl.), presentó en ambas campañas cofactores diferentes que distan 20,3 cM (Tabla 4.2.9; Figura 4.1.1). Sin embargo, los intervalos de confianza LOD -1 solaparon, por lo que en principio podrían considerarse el mismo QTL. Otros QTLs se mantuvieron solo en una campaña tras el análisis MQM. Así, en 05 se identificó una región en el GL 7_c, que junto con la detectada en el GL 5_a, explicaron un 22,8% de la varianza fenotípica total. En 07 se detectó un QTL en el GL 18_b, que junto con los detectados en los GL 3 y 5_a, explicaron el 37,2% de la varianza. Por último, en 08 se identificó una región en el GL 4_b, que contribuyó, junto con los QTLs de los GL 3 y 5_a, a explicar el 35,5% de la varianza total.

Tabla 4.2.9. Descripción de los QTLs detectados para el tiempo de envero.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD						LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma									
R	05	5a	3	0,6	1,1	1,7	2,2	2,9	3,8	1,79	69	0,0-6,9	SNP1027_69	1,79	13,6	2,09
R	05	7c	3	0,6	1,2	1,9	2,2	2,9	3,8	1,52	8,1	0,0-8,1	VVIN56	1,52	9,6	1,76
R 05 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL5a y GL7c): 22,8%																
R	07	3	4	0,8	1,4	2,2	2,1	2,7	3,5	2,45	0,0	0,0-38,0	SNP613_315	2,45	10,7	2,53
R	07	5a	2	0,5	1,1	1,7	2,1	2,7	3,5	1,70	6,9	0,0-6,9	SNP1027_69	1,70	8,3	2,25
R	07	18b	6	0,7	1,2	1,8	2,1	2,7	3,5	1,60	21,2	0,0-13,1	VMC7F2	1,60	7,8	2,25
R 07 Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL3, GL5a y GL18b): 37,2%																
R	08	3	3	0,7	1,3	2,1	2,1	2,7	3,3	1,98	18,4	1,0-42,1	UDV043	1,9	9,2	0,29
R	08	4b	4	0,7	1,2	1,9	2,1	2,7	3,3	1,53	0,0	0,0-12,2	VVMD32	1,53	6,8	0,26
R	08	5a	4	0,5	1,1	1,7	2,1	2,7	3,3	2,00	0,0	0,0-6,9	SNP1053_81	2,00	11,1	0,31
R 08 Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL3, GL4b y GL5a): 35,5%																
M	05	1	2	0,9	1,6	2,6	2,2	2,9	3,5	1,21	20,5	6,0-38,6	VrZAG29	1,21	7,7	-1,57
M	05	17	3	0,8	1,5	2,4	2,2	2,9	3,5	1,39	47,7	27,5-55,4	VVIB09	1,32	9,1	1,75
M 05 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL1 y GL17): 19,2%																
M	07	1	7	0,9	1,6	2,2	2,1	2,7	3,4	3,72	20,5	16,6-36,7	vrZAG29	3,72	17,4	-3,14
M	07	18b	6	0,5	1,1	1,8	2,1	2,7	3,4	1,93	7,8	0,0-7,8	VMC7F2	1,93	10,9	-2,44
M 07 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL1 y GL18b): 33,1%																
M	08	7b	3	0,5	1,1	1,5	2,1	2,6	3,4	1,73	5	0,0-6,7	VVIV04	1,72	10,4	0,30
M	08	17	4	0,9	1,5	2,4	2,2	2,9	3,4	2,41	52,7	26,0-55,4	VVIP44	2,26	13	0,34
M 08 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL7b y GL17): 22,7%																
I	05	5a	1	1,2	2,1	3	4,2	5,1	6	2,22	0,0	0,0-6,9	SNP1053_81	2,22	17,1	
I	05	7c	3	1,3	2	2,8	4,2	5,1	6	3,07	0,0	0,0-7,4	VVIV04	3,07	13,3	
I	05	18	4	2,1	2,9	3,8	4,2	5,1	6	3,12	87,8	83,7-87,8	VMC7F2	3,12	11,2	
I 05 Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa integrado (GL5a, GL7c y GL18): 55,1%																
I	07	3	4	1,8	2,5	3,3	3,5	4,3	5,2	3,62	0,0	0,0-5,4	SNP613_315	3,62	17,9	
I	07	18	5	2,2	3	4,2	3,5	4,3	5,2	3,33	87,8	74,2-87,8	VMC7F2	3,33	13,9	
I 07 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL3 y GL18): 39,5%																
I	08	3	0	1,7	2,5	3,5	3,4	4,2	5	2,71	15,4	10,0-31,8	SNP497_281	2,71	15,3	
I	08	18	4	2,1	2,8	3,9	3,4	4,2	5	3,48	87,8	85,6-87,8	VMC7F2	3,48	13,9	
I 08 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL3 y GL18): 36,6%																

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P (1 = 0,1; 2 = 0,05, 3 = 0,01; 4 = 0,005; 5 = 0,001; 6 = 0,0005; 7 = 0,0001), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa de Moscatuel se detectaron dos QTLs consistentes nuevos (GL 1 y 17), y dos QTLs sugerentes previamente detectados en el mapa de Ruby Seedless (GL 7_b y 18_b), que se mantuvieron solo en una campaña (08 y 07, respectivamente). El QTL del GL 1 fue sugerente en 05 ($\alpha=0,20$) y significativo en 07 ($\alpha=0,01$), contribuyendo al adelanto del envero y explicando el 7,7 y el 17,4% de

la variación fenotípica, respectivamente (Tabla 4.2.9). Por el contrario, el QTL del GL 17 contribuyó al retraso del envero, explicando el 9,1% (05) y el 13% (08) de la varianza total. Tuvo carácter sugerente en 05 y significativo en 08, para un nivel de significación del 80% en ambos casos. Aunque los cofactores seleccionados fueron diferentes, los intervalos de confianza LOD -1 solaparon en ambas campañas (Tabla 4.2.9). En 07 se identificó una región sugerente en el GL 18_b (10,9% var. expl.) que contribuyó al adelanto del envero, al contrario que en el mapa de Ruby Seedless. El modelo de control del carácter que conformó junto con el del GL 1, explicó el 33,1% de la varianza total. Finalmente, en 08 se detectó un QTL sugerente en el GL 7_b, (10,4% var. expl.) que contribuyó al retraso del envero al igual que en el mapa de Ruby Seedless. Junto con el citado QTL del GL 17, ambos explicaron el 22,7% de la varianza fenotípica.

En el mapa integrado se identificaron QTLs previamente detectados en ambos mapas parentales (GL 7_c y 18), y en el mapa de Ruby Seedless (GL 3 y 5_a), que explicaron entre el 11,2 y el 17,9% de la variación fenotípica (Tabla 4.2.9). Los modelos de control del tiempo de envero que se establecieron en 05 (tres QTLs sugerentes), 07 (dos QTLs, uno significativo y otro sugerente) y 08 (dos QTLs, uno significativo y otro sugerente), explicaron el 55,1, 39,5 y 36,6% de la varianza fenotípica total, respectivamente. Los QTLs sugerentes del GL 5_a (17,1% var. expl.) y 7_c (13,3% var. expl.), se mantuvieron solo en 05 tras el análisis MQM. El QTL detectado en la parte inferior del GL 18 fue sugerente en 05 y 07 ($\alpha=0,05$), y significativo en 08 ($\alpha=0,20$), explicando el 11,2-13,9% de la variación fenotípica total. Por otro lado, la región detectada en el GL 3 presentó diferentes cofactores en 07 (SNP613_315) y 08 (SNP497_281), cuyos intervalos de confianza LOD -1 no solaparon, por lo que en principio podría tratarse de dos QTLs diferentes. La región detectada en 07 (17,9% var. expl.) fue significativa ($\alpha=0,20$), coincidiendo el cofactor seleccionado con el del mapa de Ruby Seedless para el mismo año. La región detectada en 08 (15,3% var. expl.) fue sugerente ($\alpha=0,05$), y podría coincidir con la detectada en el mapa de Ruby Seedless con los datos del mismo año, ya que los cofactores óptimos posicionan a 5 cM en el mapa integrado y, si se comparan ambos mapas, los intervalos de confianza LOD -1 solapan (Tabla 4.2.9; Figura 4.1.1).

Maduración. Cuando los componentes genéticos de este carácter se estudiaron en el mapa de Ruby Seedless, tras el análisis MQM solamente se detectó un QTL consistente en el GL 12 de efecto menor (Tabla 4.2.10), cuyo efecto aditivo en ambas campañas contribuyó a adelantar la fecha de maduración. En 06 (11,8% var.

expl.) fue sugerente y en 08 (12,2% var. expl.) significativo, para un nivel de significación del 80% en ambos casos. Este QTL conformó en 06 un modelo de control del carácter, junto con el QTL significativo de efecto menor del GL 7_b, que explicó el 25,7% de la varianza fenotípica. El QTL del GL 7_b también contribuyó al adelanto de la maduración. En 08, el QTL del GL 12 conformó un modelo de control del carácter junto al QTL sugerente ($\alpha=0,01$) del GL 7_c, que explicó el 21,4% de la varianza total. Este QTL del GL 7_c, al contrario que el del GL 12, contribuyó a un retraso de la maduración (Tabla 4.2.10). En 07 se estableció un modelo de control del carácter, formado por tres QTLs detectados en los GLs 3, 5_a y 18_b, que explicaron el 45,7% de la varianza total. Las regiones de los GLs 3 (14,9% var. expl.) y 5_a (9,7% var. expl.), detectadas de forma significativa y sugerente respectivamente, contribuyeron al retraso de la maduración. Sin embargo, el QTL sugerente del GL 18_b (9,4% var. expl.), contribuyó al adelantando de la maduración.

Tabla 4.2.10. Descripción de los QTLs detectados para el tiempo de maduración.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD									LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				Umbral LOD GL			Genoma												
R	06	7b	2	0,6	1,3	2,1	2,1	2,7	3,4	1,51	0,0	0,0-18,1	SNP1015_67	1,51	13,9	-0,69			
R	06	12	4	0,9	1,6	2,4	2,1	2,7	3,4	1,48	59,5	46,5-76,1	VVIV05	1,48	11,8	-0,62			
R	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL7b y GL12): 27,5%																	
R	07	3	4	0,9	1,4	2	2,1	2,7	3,5	2,59	0,0	0,0-7,9	SNP613_315	2,59	14,9	0,61			
R	07	5a	3	0,5	1	1,7	2,1	2,7	3,5	1,77	0,0	0,0-6,9	SNP1053_81	1,77	9,7	0,52			
R	07	18b	6	0,7	1,2	1,7	2,1	2,7	3,5	1,36	21,2	0,3-21,2	VMC7F2	1,36	9,4	-0,51			
R	07	Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL3, GL5a y GL18b): 45,7%																	
R	08	7c	1	0,5	1	1,5	2	2,6	3,2	1,62	8,1	0,0-8,1	VVIN56	1,62	9,5	3,52			
R	08	12	2	1	1,5	2,2	2	2,6	3,2	2,06	59,5	38,0-74,8	VVIV05	2,06	12,2	-3,93			
R	08	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL7c y GL12): 21,4%																	
M	05	1	2	1	1,5	2,2	2,1	2,7	3,3	1,85	20,5	10,8-39,4	vrZAG29	1,85	19,1	-6,79			
M	06	8a	2	0,8	1,3	2,2	2,1	2,8	3,6	1,76	25,5	20,5-37,5	VMC5G6_1	1,76	13,4	-0,76			
M	06	14b	2	0,8	1,4	2	2,1	2,8	3,6	1,81	0,0	0,0-8,6	VMC6C10	1,81	13,7	0,68			
M	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL8a y GL14b): 25,7%																	
M	07	1	2	0,9	1,6	2,2	2,1	2,7	3,3	5,12	15,5	12,4-27,8	SNP129_237	5,12	30,1	-0,87			
M	07	14a	3	0,6	1,1	1,6	2,1	2,7	3,3	2,06	0,0	0,0-16,3	VMCNG1E1	2,06	9,4	0,49			
M	07	19b	2	0,5	1,1	1,7	2,1	2,7	3,3	1,97	12	0,0-12,0	VMC7B1	1,97	9,4	0,48			
M	07	Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Moscatuel (GL1, GL14a y GL19b): 49,8%																	
M	08	1	2	1	1,5	2,3	2	2,7	3,2	1,72	20,5	0-75,7	vrZAG29	1,72	10,4	-3,63			
M	08	14a	2	0,5	1	1,7	2	2,7	3,2	1,27	0,0	0,0-16,3	VMCNG1E1	1,27	7,5	3,08			
M	08	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL1 y GL14a): 17,9%																	
I	06	12	4	2	2,7	3,5	3,6	4,2	4,9	2,52	62,1	46,6-73,6	VVIV05	2,52	34,7				
I	07	1	2	2	2,9	3,4	3,4	4,1	4,8	5,65	16,4	13,4-31,9	SNP129_237	5,65	29,9				
I	07	14	3	1,9	2,8	3,5	3,4	4,1	4,8	3,06	0,0	0,0-8,9	VMCNG1E1	3,06	14,3				
I	07	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL1 y GL14): 49,1%																	
I	08	14	3	2	2,7	3,6	3,4	4,2	4,9	2,67	0,0	0,0-7,6	VMCNG1E1	2,67	17,0				

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P ($1 = 0,1$; $2 = 0,05$, $3 = 0,01$; $4 = 0,005$; $5 = 0,001$; $6 = 0,0005$; $7 = 0,0001$), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa de Moscatuel se identificaron dos nuevas regiones consistentes en los GLs 1 (05, 07 y 08) y 14_a (07 y 08), que contribuyeron al adelanto y retraso de la maduración, respectivamente (Tabla 4.2.10). El QTL localizado en la parte superior del GL 1 (10,4-30,1% var. expl.) fue sugerente en 05 y 08 ($\alpha=0,05$) y significativo en 07 ($\alpha=0,01$), mientras que el localizado en el GL 14_a (7,5-9,4% var.

expl.) fue sugerente en ambas campañas ($\alpha=0,01$ y $\alpha=0,05$, respectivamente). Ambas regiones conformaron un modelo de control del carácter en 08, que explicó el 17,9% de la varianza fenotípica, y otro en 07 junto al QTL sugerente del GL 19_b, que explicó el 49,8% de la varianza fenotípica. Este nuevo QTL en el GL 19_b (9,4% var. expl.) contribuyó al retraso de la maduración. El modelo de control del carácter en 06 estuvo formado por dos nuevos QTLs sugerentes ($\alpha=0,05$) en los GLs 8_a (13,4% var. expl.) y 14_b (13,7% var. expl.), que contribuyeron al adelanto y retraso de la maduración, respectivamente.

En el mapa integrado se localizaron tres QTLs, previamente identificados en el mapa de Ruby Seedless (GL 12) y en el mapa de Moscatuel (GL 1 y 14), que explicaron el 14,3-34,7% de la variación fenotípica (Tabla 4.2.10). Solo el QTL sugerente del GL 14 (14,3-17% var. expl.) se mantuvo en más de una campaña (07 y 08) tras el análisis MQM, presentando el mismo cofactor que el QTL del GL 14_a en el mapa de Moscatuel (VMCNG1E1). En 07 conformó un modelo de control del carácter junto al QTL significativo del GL 1 ($\alpha=0,01$), que explicó el 49,1% de la varianza fenotípica. El QTL sugerente ($\alpha=0,20$) del GL 12 (34,7% var. expl.) presentó el mismo cofactor que el QTL detectado en el mapa de Ruby Seedless en 06 y 08 (VVIV05).

Fertilidad. En el mapa de Ruby Seedless se detectaron 4 QTLs sugerentes ($\alpha=0,05$) de efecto menor relacionados con este carácter, de manera que dos de ellos contribuyeron al incremento de la fertilidad (GL 5_a y 18_a), y otros dos a la disminución de la misma (GL 7_a y 13). La variación fenotípica explicada osciló entre el 7,8 y el 11,5% (Tabla 4.2.11). En 06 se estableció un modelo de control del carácter que explicó el 21% de la varianza total, al igual que en 07. El QTL del GL 5_a (9,3-11,5% var. expl.) fue el único que se mantuvo tras el análisis MQM en dos campañas (05 y 07).

En el mapa de Moscatuel se identificaron cuatro nuevos QTLs, no detectados en el mapa de Ruby Seedless, que contribuyeron a incrementar el número de racimos producidos por brote (GL 9_a, 12, 14_a, y 14_b). Excepto el QTL localizado en el GL 14_a en 05, que fue sugerente para un nivel de significación del 99%, el resto fueron significativos para un nivel de significación del 95%. La variación fenotípica explicada osciló entre el 8,9 y el 22,6% (Tabla 4.2.11). En 06 se estableció un modelo de control del carácter (QTLs GLs 14_a, y 14_b) que explicó el 21,9% de la varianza fenotípica. El QTL localizado en el GL 14_a se mantuvo en las campañas 05 y 06, explicando el 22,6% y el 12,9% de la varianza fenotípica, respectivamente (Tabla 4.2.11).

Tabla 4.2.11. Descripción de los QTLs detectados para la fertilidad.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma			LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				80	95	99	80	95	99							
R	05	5a	3	0,5	1	1,8	2,1	2,7	3,6	1,64	0,0	0,0-6,9	SNP1053_81	1,64	11,5	0,08
R	06	13	4	0,8	1,4	2,1	2,1	2,9	3,7	1,79	25,1	0,0-39,8	VMC3D12	1,79	10,8	-0,15
R	06	18a	4	0,7	1,3	2,1	2,1	2,9	3,7	1,68	23,7	15,4-38,9	VMCNG1B9	1,68	7,8	0,14
R 06 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL13 y GL 18a): 21,0%																
R	07	5a	4	0,5	1,1	1,7	2,1	2,7	3,4	1,67	0,0	0,0-6,9	SNP1053_81	1,67	9,3	0,14
R	07	7a	2	0,7	1,2	1,9	2,1	2,7	3,4	1,86	6,8	0,0-24,8	Vvi_2623	1,86	9,3	-0,14
R 07 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL5a y GL 7a): 21,0%																
M	05	14a	2	0,5	2,1	2,8	3,4	1	1,6	3,35	16,3	0,0-16,3	UDV050	3,35	22,6	0,11
M	06	14a	4	0,6	2,1	2,9	3,8	1,2	1,9	1,84	15,0	0,0-16,3	UDV050	1,82	12,9	0,17
M	06	14b	2	0,8	2,1	2,9	3,8	1,4	2,1	1,88	38,8	23,9-38,8	VVIN70	1,88	10,7	0,15
M 06 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL14a y GL 14b): 21,9%																
M	07	9a	2	2,2	2,8	3,6	0,6	1,2	2	1,62	21,2	0,0-21,2	SNP1211_166	1,62	10,3	0,15
M	08	12	2	2,1	2,8	3,3	0,7	1,3	2	1,54	0,0	0,0-29,1	TT251F02	1,54	8,9	0,16
I	05	8	0	3,5	4,3	5,1	2,1	2,7	3,4	3,75	36,6	30,8-56,1	SNP853_312	3,75	20,2	
I	05	14	0	3,5	4,3	5,1	1,9	2,7	3,7	4,89	17,6	12,5-24,7	VMC1E12	4,89	27,2	
I 05 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL8 y GL 14): 44,4%																
I	06	14	4	3,5	4,3	5,2	1,9	2,7	3,6	3,49	17,6	4,8-31,3	VMC1E12	3,50	19,9	
I	07	3	0	3,5	4,4	5,1	1,7	2,6	3,3	2,70	20,4	12,8-39,0	UDV043	2,70	17,4	
I	08	8	2	3,4	4,3	4,8	2,1	3	3,7	2,30	71,9	67,5-73,2	VMC2H10	2,30	13,3	

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P ($1 = 0,1$; $2 = 0,05$, $3 = 0,01$; $4 = 0,005$; $5 = 0,001$; $6 = 0,0005$; $7 = 0,0001$), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa integrado se detectaron 4 QTLs, tres de ellos no detectados en los mapas parentales (uno en el GL 3 y dos en el GL 8), y el del GL 14 presumiblemente detectado en el mapa de Moscatuel (GL 14_a), ya que los intervalos LOD -1 solaparon (Tabla 4.2.11). Estos 4 QTLs explicarían entre el 13,3 y 27,2% de la variación fenotípica total. En 05 se estableció un modelo de control del carácter (QTLs GLs 8 y 14) que explicó el 44,4% de la varianza fenotípica. El QTL sugerente del GL 14 (19,9-27,2% var. expl.) se mantuvo durante dos campañas (05 y 06) tras el análisis MQM. Las dos regiones detectadas en el GL 8 (13,3-20,2% var. expl.), de forma sugerente en 05 y significativa en 08 para un nivel de significación del 80% en ambos casos, se consideran QTLs distintos ya que los intervalos de confianza LOD -1 no fueron solapantes. El QTL del GL 3 (07) fue significativo para un nivel de significación del 95%, y explicó el 17,4% de la variación fenotípica.

Peso del racimo. En el mapa de Ruby Seedless se detectaron 3 regiones relacionadas con este carácter (GL 11, 16 y 18_b), que contribuyeron a la disminución del peso del racimo, y explicaron entre el 8,4 y el 14,9% de la variación fenotípica (Tabla 4.2.12). El QTL del GL 16 se detectó en las tres campañas estudiadas (8,8-14,9% var. expl.), siendo significativo solo en la campaña de 07 para un nivel de significación del 80%. Aunque el cofactor óptimo seleccionado fue diferente en las tres campañas, los intervalos de confianza LOD -1 solaparon. El

QTL del GL 18_b se mantuvo en dos de las campañas evaluadas, siendo sugerente en 05 (12,4% var. expl.) y significativo en 06 (13,3% var. expl.). En 05 se estableció un modelo de control del carácter que explicó el 23% de la variación fenotípica total (2 QTLs sugerentes), y el 33,9% en 06 (un QTL sugerente y dos significativos).

Tabla 4.2.12. Descripción de los QTLs detectados para el peso medio del racimo.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD						LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				Umbral LOD GL			Genoma									
R	05	16	1	0,8	1,4	2,2	2,1	2,8	3,8	1,35	21,3	1,6-42,6	UDV052	1,30	8,4	-1,70
R	05	18b	4	0,7	1,3	1,9	2,1	2,8	3,8	1,69	21,2	0,7-21,2	VMC7F2	1,69	12,4	-2,11
R 05 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL16 y GL18b): 23,0%																
R	06	11	2	0,9	1,5	2	2,1	2,8	3,6	2,41	25,2	7,0-33,0	VVIB19	2,12	9,8	-0,08
R	06	16	2	0,8	1,4	2,1	2,1	2,8	3,6	1,78	42,6	29,3-42,6	SCU14VV	1,78	8,4	-0,07
R	06	18b	4	0,7	1,3	2	2,1	2,8	3,6	2,77	17,1	1,5-21,2	VMC7F2	2,42	13,3	-0,09
R 06 Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL11, GL16 y GL18b): 33,9%																
R	07	16	6	0,8	1,4	2	2,1	2,9	3,6	2,64	36,3	22,1-42,6	VVMD5	2,63	14,9	-2,36
M	05	5	4	1,1	1,7	2,5	2,2	2,8	3,8	1,43	21,9	0,0-35,4	VVMD27	1,21	5,9	-1,47
M	05	8a	4	0,8	1,4	2,4	2,2	2,8	3,8	1,73	12,9	0,0-27,0	Vvi_6936	1,73	8,7	-1,88
M	05	15	3	0,8	1,5	2,2	2,2	2,8	3,8	1,31	26,3	0,0-43,5	VMC4D9_2	1,31	6,4	1,49
M 05 Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Moscatuel (GL5, GL8a y GL15): 29,5%																
M	06	5	2	1,1	1,8	2,7	2,2	2,8	3,6	1,42	11,9	0,0-30,8	SNP1431_584	1,42	7,4	-0,07
M	06	18b	4	0,5	1	1,6	2,2	2,8	3,6	1,56	5,0	0,0-7,8	VMC7F2	1,49	10,2	-0,08
M 06 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL5, y GL18b): 20,9%																
M	07	5	4	1	1,6	2,5	2,1	2,8	3,4	2,34	5,5	0,0-22,5	VVC6	2,34	11,4	-2,14
M	07	18b	4	0,5	1,1	1,8	2,1	2,8	3,4	1,64	5,0	0,0-7,8	VMC7F2	1,45	8,8	-1,81
M 07 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL5, y GL18b): 22,0%																
I	05	5b	4	2,3	3,5	4,4	3,7	4,7	5,9	2,94	16,5	0,0-25,4	VVMD27	2,78	14,7	
I	05	18	3	2,1	3	3,9	3,7	4,7	5,9	3,11	86,6	75,3-87,8	VMC7F2	2,89	14,4	
I 05 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL5b, y GL18): 29,9%																
I	06	18	4	2,1	2,8	3,6	3,7	4,5	5,2	3,76	86,6	80,5-87,8	VMC7F2	3,40	20,3	
I	07	5b	5	2,1	3	4	3,5	4,3	5,3	2,94	0,0	0,0-12,0	SNP1431_584	2,49	12,8	
I	07	18	4	2,1	2,9	3,8	3,5	4,3	5,3	3,76	75,2	66,0-87,8	VMC7F2	2,85	14,2	
I 07 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL5b, y GL18): 28,4%																

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P ($1 = 0,1$; $2 = 0,05$, $3 = 0,01$; $4 = 0,005$; $5 = 0,001$; $6 = 0,0005$; $7 = 0,0001$), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa de Moscatuel se identificaron 3 QTLs nuevos (GL 5, 8_a y 15), y un QTL previamente detectado en el mapa de Ruby Seedless (GL 18_b). Todos los QTLs detectados, excepto el del GL 15, produjeron una disminución del peso del racimo (Tabla 4.2.12). El QTL del GL 5 se detectó en las tres campañas estudiadas (5,9-11,4% var. expl.), siendo significativo solo en la campaña de 07, para un nivel de significación del 80%. El QTL sugerente del GL 18_b se mantuvo en dos de las campañas evaluadas (06 y 07), explicando entre el 8,8 y el 10,2% de la variación fenotípica. En 05 se estableció un modelo de control del carácter que explicó el 29,5% de la variación fenotípica total (3 QTLs sugerentes), el 20,9% en 06 (dos QTLs sugerentes), y el 22% en 07 (un QTL sugerente y otro significativo).

En el mapa integrado se detectaron 2 QTLs sugerentes, previamente detectados en los mapas parentales (GL 5_b y 18). El QTL del GL 5_b (12,8-14,7% var. expl.) se mantuvo en dos campañas (05 y 07), y se identificó también en el mapa de Moscatuel, mientras que el QTL del GL 18 (14,2-20,3% var. expl.) se mantuvo en las tres campañas evaluadas, y se identificó previamente en ambos

mapas parentales (Tabla 4.2.12). En 05 se estableció un modelo de control del carácter que explicó el 29,9% de la variación fenotípica total, y el 28,4% en 07.

Peso de las bayas. En los tres mapas de ligamiento se identificó un QTL significativo y consistente en todas las campañas evaluadas, en la región inferior del GL 18, claramente relacionado con este carácter, que explicó entre el 10,4 y el 43,3% de la varianza fenotípica (Tabla 4.2.13). En todos los casos este QTL contribuyó a la disminución en el peso de las bayas, con un nivel de significación del 99%, excepto en 05 y 07 en el mapa de Ruby Seedless que presentó un nivel de significación del 95%. El análisis KW mostró una asociación significativa de este carácter con el marcador SSR VMC7F2 ($P = 0,0001$), excepto en la campaña de 08 en el mapa integrado que se asoció con el SSR VVIN16, situado a 5,6 cM de VMC7F2.

Tabla 4.2.13. Descripción de los QTLs detectados para el peso medio de las bayas.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD									LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma												
R	05	5b	2	0,8	1,4	2	2	2,7	3,4	1,38	32,8	6,8-47,8	Vvi_10383	1,33	9,1	0,05			
R	05	18b	7	0,7	1,2	1,7	2	2,7	3,4	3,04	21,2	14,0-21,2	VMC7F2	3,04	17,6	-0,07			
R	05	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL5b y GL18b): 29,4%																	
R	06	18b	7	0,6	1,2	2	2,1	2,7	3,2	3,50	21,2	15,9-21,2	VMC7F2	3,50	24,9	-0,20			
R	07	12	4	0,9	1,5	2,2	2,1	2,8	3,6	1,74	16,5	4,8-43,2	SNP189_131	1,74	8,4	-0,05			
R	07	18b	7	0,7	1,2	1,9	2,1	2,8	3,6	3,43	21,2	14,0-21,2	VMC7F2	3,43	21,8	-0,09			
R	07	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL12 y GL18b): 32,1%																	
R	08	18b	7	0,7	1,2	1,8	2,1	2,8	3,2	4,11	21,2	14,6-21,2	VMC7F2	4,11	26,3	-0,09			
M	05	5	4	1,1	1,7	2,4	2,1	2,8	3,5	2,04	5,5	0,0-31,3	VVC6	2,04	5,7	-0,04			
M	05	15	3	0,8	1,4	2,1	2,1	2,8	3,5	2,57	41,3	28,8-43,5	VMC8G3_2	2,53	9,9	0,06			
M	05	18b	7	0,5	1	1,6	2,1	2,8	3,5	5,27	7,8	1,5-7,8	VMC7F2	5,27	23	-0,08			
M	05	Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Moscatuel (GL5, GL15 y GL18b): 49,5%																	
M	06	5	1	1,1	1,8	2,7	2,1	2,8	3,6	1,75	11,9	1,5-30,2	SNP1431_584	1,75	7,4	-0,11			
M	06	18b	7	0,5	1,1	1,6	2,1	2,8	3,6	7,72	7,8	3,6-7,8	VMC7F2	7,72	38,9	-0,25			
M	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL5 y GL18b): 47,8%																	
M	07	15	3	0,8	1,3	2,2	2,1	2,8	3,6	1,46	43,5	26,0-43,5	VMC8G3_2	1,46	7,6	0,05			
M	07	18b	7	0,5	1	1,6	2,1	2,8	3,6	4,39	7,8	2,6-7,8	VMC7F2	4,39	24,5	-0,09			
M	07	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL15 y GL18b): 37,4%																	
M	08	18b	7	0,5	1	1,6	2,1	2,8	3,8	5,73	7,8	3,4-7,8	VMC7F2	5,73	34	-0,10			
I	05	5b	4	2,1	2,7	3,4	3,6	4,3	5,1	5,44	0,0	0,0-10,1	VVC6	5,44	44,4				
I	05	18	7	2,1	2,9	3,8	3,6	4,3	5,1	7,67	87,8	86,9-87,8	VMC7F2	7,67	28,5				
I	05	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL5b y GL18): 77,9%																	
I	06	5b	1	2,1	2,9	3,6	3,5	4,2	5,1	2,68	6,5	0,0-19,4	SNP1431_584	2,68	11,5				
I	06	18	7	2,1	2,9	3,8	3,5	4,2	5,1	10,3	87,5	87,2-87,8	VMC7F2	10,34	26,2				
I	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL5b y GL18): 56,3%																	
I	07	5b	1	2,1	2,8	3,8	3,5	4,3	5,1	2,35	5,0	0,0-17,0	VVC6	2,30	14				
I	07	18	7	2,1	2,8	3,6	3,5	4,3	5,1	8,14	87,8	87,0-87,8	VMC7F2	8,14	10,4				
I	07	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL5b y GL18): 52,2%																	
I	08	18	7	2	2,8	3,8	3,5	4,2	4,9	9,55	82,2	75,7-84,0	VVIN16	9,55	43,3				

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P ($1 = 0,1$; $2 = 0,05$, $3 = 0,01$; $4 = 0,005$; $5 = 0,001$; $6 = 0,0005$; $7 = 0,0001$), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa de Ruby Seedless, y durante una sola campaña, se detectaron además dos QTLs sugerentes en el GL 5_b (9,1% var. expl.) y GL 12 (8,4% var. expl.), cuyos efectos fueron el de incrementar y disminuir, respectivamente, el peso de las bayas. De esta manera, en 05 se estableció un modelo de control del

carácter que explicó el 29,4% de la varianza fenotípica, y el 32,1% en 07 (Tabla 4.2.13).

En el mapa de Moscatuel, además del QTL del GL 18, se identificaron dos nuevos QTLs consistentes no detectados en el mapa de Ruby Seedless, en el GL 5 (5,7-7,4% var. expl.) y en el GL 15 (7,6-9,9% var. expl.), con efecto aditivo de disminución e incremento del peso de las bayas, respectivamente (Tabla 4.2.13). En 05 se estableció un modelo de control del carácter que explicó el 49,5% de la varianza fenotípica, el 47,8% en 06 y el 37,4% en 07.

En el mapa integrado, además del QTL del GL 18, se detectó de manera consistente un QTL en el GL 5_b (11,5-44,4% var. expl.), que coincidió con el ya descrito en ese mismo GL en el mapa de Moscatuel (Tabla 4.2.13; Figura 4.1.1). Este QTL fue significativo en 05 ($\alpha=0,01$) y sugerente en 06 y 07 ($\alpha=0,20$). Se estableció un modelo de control del carácter en 05 que explicó el 77,9% de la variación fenotípica, el 56,3% en 06, y el 52,2 % en 07.

Diámetro de las bayas. Al igual que con el peso de las bayas, en los tres mapas de ligamiento se identificó un QTL significativo y consistente en todas las campañas evaluadas, en la región inferior del GL 18, claramente relacionado con este carácter, que explicó entre el 17,2 y el 46,2% de la varianza fenotípica (Tabla 4.2.14). En todos los casos este QTL contribuyó a la disminución en el diámetro de las bayas, con un nivel de significación del 99%, excepto en 05 ($\alpha=0,20$) y 06 ($\alpha=0,05$) en el mapa de Ruby Seedless. De nuevo, el análisis KW mostró una asociación significativa de este carácter con el SSR VMC7F2 ($P = 0,0001$) en los mapas de Ruby Seedless y Moscatuel, excepto en la campaña de 05 en ambos mapas, donde se asoció con una $P = 0,0005$. En el caso del mapa integrado, el marcador asociado con una $P = 0,0001$ fue VMC7F2 en 06, y VVIN16 en 08, situado este último a 5,6 cM de VMC7F2.

En el mapa de Ruby Seedless, se detectó además un QTL sugerente ($\alpha=0,20$) y consistente (06 y 07) en el GL 12 (6,3-6,8% var. expl.), cuyo efecto aditivo fue el de disminuir el diámetro de las bayas (Tabla 4.2.14). Este QTL, junto con el del GL 18_b, conformó un modelo de control del carácter en 06 que explicó el 33,1% de la variación fenotípica, y el 33,2% en 07.

En el mapa de Moscatuel, además del QTL del GL 18_b, se identificaron dos nuevos QTLs consistentes no detectados en el mapa de Ruby Seedless, en el GL 1 (5,7-8,4% var. expl.) y en el GL 5 (8,7-9,4% var. expl.), con efecto aditivo de disminución del diámetro de las bayas (Tabla 4.2.14). De esta manera, en 05 se estableció un modelo de control del carácter (tres QTLs significativos) que explicó el

43,7% de la varianza fenotípica, el 51,5% en 06 (dos QTLs, uno sugerente y otro significativo), y el 41,2% en 07 (dos QTLs, uno sugerente y otro significativo).

Tabla 4.2.14. Descripción de los QTLs detectados para el diámetro medio de las bayas.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD						LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				Umbral LOD GL			Genoma									
R	05	18b	6	0,7	1,2	1,9	2,1	2,8	3,4	2,57	21,2	13,7-21,2	VMC7F2	2,57	17,2	-0,91
R	06	12	3	0,9	1,6	2,4	2,2	2,8	3,3	1,55	16,5	2,2-76,1	SNP189_131	1,55	6,3	-0,08
R	06	18b	7	0,7	1,3	2,1	2,2	2,8	3,3	3,28	21,2	16,2-21,2	VMC7F2	3,28	22,9	-0,14
R	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL12 y GL18b): 33,1%														
R	07	12	3	1	1,6	2,6	2,2	2,9	3,7	1,53	16,5	3,8-44,0	SNP189_131	1,53	6,8	-0,08
R	07	18b	7	0,7	1,3	1,9	2,2	2,9	3,7	3,93	21,2	14,4-21,2	VMC7F2	3,93	23,9	-0,13
R	07	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL12 y GL18b): 33,2%														
R	08	18b	7	0,7	1,3	1,9	2,1	2,8	3,6	4,55	21,2	15,2-21,2	VMC7F2	4,55	28,5	-1,10
M	05	1	4	1	1,6	2,4	2,1	2,8	3,6	2,30	8,8	0,0-29,0	VMC8A7	2,30	8,4	-0,65
M	05	5	4	1,1	1,7	2,4	2,1	2,8	3,6	2,33	5,5	0,0-31,5	VVC6	2,33	9,4	-0,65
M	05	18b	6	0,5	1,1	1,8	2,1	2,8	3,6	4,18	7,8	0,0-7,8	VMC7F2	4,18	20,5	-0,98
M	05	Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Moscatuel (GL1, GL5 y GL18b): 43,7%														
M	06	1	3	1	1,6	2,2	2,1	2,8	3,5	1,83	8,8	0,8-18,0	VMC8A7	1,83	5,7	-0,07
M	06	18b	7	0,5	1	1,5	2,1	2,8	3,5	8,22	7,8	0,0-7,8	VMC7F2	8,22	40,2	-0,18
M	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL1 y GL18b): 51,5%														
M	07	5	2	1	1,7	2,4	2,1	2,8	3,6	1,62	5,5	0,0-29,3	VVC6	1,62	8,7	-0,07
M	07	18b	7	0,5	1	1,7	2,1	2,8	3,6	5,60	7,8	0,0-7,8	VMC7F2	5,60	34,3	-0,16
M	07	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL5 y GL18b): 41,2%														
M	08	18b	7	0,5	0,9	1,6	2,1	2,7	3,3	5,97	7,8	0,0-7,8	VMC7F2	5,97	35,3	-1,21
I	05	5b	3	2,1	2,9	3,8	3,5	4,3	5,5	4,62	6,5	1,3-17,3	SNP1431_584	4,62	28,3	
I	05	18	4	2,1	2,8	3,9	3,5	4,3	5,5	6,91	76,2	70,8-81,7	VVMD17	6,91	24,0	
I	05	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL5b y GL18): 64,2%														
I	06	1	2	2	2,9	3,9	3,4	4,2	5,1	2,32	8,8	2,2-14,3	VMC8A7	2,32	7,2	
I	06	18	7	2,1	3	3,7	3,4	4,2	5,4	9,37	87,8	86,9-87,8	VMC7F2	9,37	36,2	
I	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL1 y GL18): 52,1%														
I	07	1	2	2	2,8	3,5	3,5	4,2	4,9	2,33	8,8	0,6-14,3	VMC8A7	2,33	6,8	
I	07	18	5	2,1	2,9	3,9	3,5	4,2	4,9	8,87	76,2	70,8-84,2	VVMD17	8,87	38,3	
I	07	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL1 y GL18): 52,9%														
I	08	18	7	2,2	3	3,9	3,6	4,2	5,1	10,3	82,2	77,3-83,9	VVIN16	10,36	46,2	

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P (1 = 0,1; 2 = 0,05, 3 = 0,01; 4 = 0,005; 5 = 0,001; 6 = 0,0005; 7 = 0,0001), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa integrado se detectaron tres QTLs ya descritos anteriormente (GL 1 y 5_b en el mapa de Moscatuel, y GL 18 en ambos mapas parentales). El QTL del GL 1 fue sugerente en ambas campañas (06 y 07) para un nivel de significación del 80%, y explicó el 6,8-7,2% de la variación fenotípica (Tabla 4.2.14). El QTL significativo del GL 5_b se mantuvo solo la campaña de 05 tras el análisis MQM, y explicó el 28,3% de la variación fenotípica. Los QTLs detectados permitieron establecer un modelo de control del carácter en 05 que explicó el 64,2% de la varianza fenotípica, el 52,1% en 06, y el 52,9% en 07.

Textura de las bayas. En el mapa de Ruby Seedless se detectaron dos regiones en el GL 7 (7_a y 7_b) implicadas en el control de la textura, y una tercera en el GL 11. Las tres regiones fueron sugerentes y presentaron un efecto aditivo de incremento de la consistencia de las bayas (Tabla 4.2.15). El QTL consistente del GL 7_a (9,5-9,8 var. expl.) se detectó en la parte inferior de este subgrupo, mientras que el QTL

del GL 7_b (10,3% var. expl.) se detectó en la parte superior de este subgrupo (Figura 4.1.1), por lo que no podemos predecir con seguridad si se trata o no del mismo QTL. El QTL del GL 11 se detectó solo en 07 y explicó el 10,3% de la varianza fenotípica. En este caso, solo se detectó un QTL en las cuatro campañas evaluadas, por lo que no se pudo establecer ningún modelo de control del carácter.

Tabla 4.2.15. Descripción de los QTLs detectados para la textura de las bayas.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD									Intervalo LOD -1	Cofactor	Lod cofactor	% var.	E.Ad.
				Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma			Lod max.	cM						
R	05	7a	2	0,6	1,2	1,8	2,1	2,7	3,4	1,71	24,8	13,4-24,8	VVIS58	1,71	9,8	0,12	
R	06	7b	2	0,6	1,2	1,9	2,1	2,7	3,1	1,98	0,0	0,0-18,1	SNP1015_67	1,35	10,3	0,11	
R	07	11	2	0,8	1,4	2,2	2,1	2,7	3,3	1,83	55,6	36,1-55,6	VVIP36B	1,83	10,3	0,13	
R	08	7a	4	0,7	1,6	2	2,2	2,8	3,5	1,50	24,8	7,0-24,8	VVIS58	1,50	9,5	0,12	
M	05	10	3	0,8	1,3	2	2,1	2,8	3,6	1,55	0,0	0,0-15,6	VMC3D7	1,79	10,4	-0,12	
M	06	11	3	0,8	1,3	2	2,1	2,8	3,6	1,55	0,0	0,0-8,7	VVMD25	1,55	7,5	-0,10	
M	06	18b	2	0,5	1	1,6	2,1	2,8	3,6	2,07	7,8	3,8-7,8	VMC7F2	2,07	12,2	-0,12	
M	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL11 y GL18b): 20,5%															
M	07	5	2	1	1,7	2,5	2,1	2,8	3,6	3,25	21,9	0,6-33,2	VVMD27	2,93	14,1	-0,15	
M	07	11	3	0,8	1,3	2	2,1	2,8	3,6	1,58	36,4	18,4-36,4	SNP1423_265	1,58	7,6	-0,11	
M	07	13	1	0,8	1,5	2,3	2,1	2,8	3,6	3,16	0,0	0,0-9,6	VVIM01	3,16	13,6	-0,16	
M	07	Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Moscatuel (GL5, GL11 y GL13): 33,5%															
M	08	8a	2	0,8	1,4	2,3	2,1	2,7	3,3	1,78	12,9	0,0-19,1	Vvi_6936	1,78	8,2	-0,12	
M	08	9a	2	0,6	1	1,7	2,1	2,7	3,3	1,69	15,0	0,0-21,2	SNP1211_166	1,60	7,8	-0,11	
M	08	18a	4	1	1,6	2,2	2,1	2,7	3,3	2,35	15,3	1,5-30,3	VMC2A3	1,92	8,8	0,12	
M	08	Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa de Moscatuel (GL8a, GL9a y GL18a): 28,5%															
I	05	13	4	1,8	2,6	3,7	3,5	4,3	5,2	3,04	56,3	42,6-56,3	VVIP10	3,04	13,8		
I	05	18	1	2,2	3,1	3,7	3,5	4,3	5,2	2,99	15,6	0,0-25,5	VVIV16	2,97	14,4		
I	05	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL13 y GL18): 13,4%															
I	06	11	2	1,9	2,6	3,5	3,4	4,2	4,9	3,52	5,0	0,0-12,2	VMC3E12	3,01	24,5		
I	06	18	2	2	2,8	3,7	3,4	4,2	4,9	4,01	81,2	72,3-86,9	VVMD17	3,77	21,1		
I	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL13 y GL18): 42,2%															
I	07	9	3	2	2,7	3,7	3,5	4,1	4,7	2,78	19,5	11,5-35,1	SNP1211_166	2,78	11,7		
I	07	11	2	1,8	2,5	3,4	3,5	4,1	4,7	2,30	54,1	35,7-58,8	VVIP36B	2,25	13,4		
I	07	18	1	2,1	2,9	3,7	3,5	4,1	4,7	2,46	15,6	3,1-26,7	VVIV16	2,42	10		
I	07	Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa integrado (GL9a, GL11 y GL18): 44,8%															
I	08	1	0	2	2,9	3,7	3,5	4,3	4,9	2,27	0,0	0,0-18,5	VMC4F8	2,27	14,1		
I	08	9	2	1,9	2,7	3,6	3,5	4,3	4,9	3,54	19,0	7,3-25,6	SNP1211_166	3,53	15,1		
I	08	18	0	2,1	2,8	3,5	3,5	4,3	4,9	3,79	15,6	5,9-27,7	VVIV16	3,66	14,9		
I	08	Varianza total explicada por los tres QTLs del mapa integrado (GL1, GL9 y GL18): 51,9%															

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P ($1 = 0,1$; $2 = 0,05$, $3 = 0,01$; $4 = 0,005$; $5 = 0,001$; $6 = 0,0005$; $7 = 0,0001$), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (Lod max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa de Moscatuel se detectaron 9 regiones relacionadas con este carácter (GL 5, 8_a, 9_a, 10, 13, 18_a, 18_b, y dos en el GL 11), que contribuyeron a la disminución de la consistencia de la baya, excepto la región del GL 18_a (08) que contribuyó al incremento de la textura (Tabla 4.2.15). En 05 solo se detectó un QTL sugerente en el GL 10 para un nivel de significación del 95% ($\alpha=0,05$), que explicó el 10,4% de la variación fenotípica. En el GL 11 se detectaron dos QTLs sugerentes ($\alpha=0,05$) que localizaron en los extremos del GL. En 06 se detectó en la parte superior del GL, con un intervalo LOD -1 de 0-8,7 cM, y explicó el 7,5% de la variación fenotípica. En 07 se detectó en la parte inferior del GL, con un intervalo LOD -1 de 18,4-36,4 cM, y explicó el 7,6% de la varianza fenotípica total. Comparando los mapas y los intervalos LOD -1, este QTL podría coincidir con el

identificado en el mapa de Ruby Seedless, y tendrían un efecto aditivo opuesto en cada mapa (Tabla 4.2.15; Figura 4.1.1). En 07 se identificaron además dos QTLs significativos ($\alpha=0,20$) en los GLs 5 (14,1% var. expl.) y 13 (13,6% var. expl.) que, junto con el descrito en la parte inferior del GL 11, conformaron un modelo de control del carácter que explicó el 33,5% de la varianza fenotípica. En el GL 18 se detectaron dos QTLs (18_a y 18_b) de carácter sugerente con efectos aditivos opuestos. En 06 se localizó en el GL 18_b (disminución de la consistencia de la baya) y explicó el 12,2% de la variación fenotípica, y en 08 en el GL 18_a (incremento de la consistencia de la baya) y explicó el 8,8% de la variación fenotípica. El QTL del GL 18_b y el detectado en la parte superior del GL 11 conformaron un modelo de control del carácter en 06, que explicó el 20,5% de la varianza fenotípica. Finalmente, en 08 se identificaron dos nuevos QTLs sugerentes ($\alpha=0,05$) en los GLs 8_a (8,2% var. expl.) y 9_a (7,8% var. expl.), además del descrito en el GL 18_a, que conformaron un modelo de control del carácter que explicó el 28,5% de la varianza fenotípica.

En el mapa integrado se identificaron dos QTLs nuevos sugerentes, localizados en el GL 13 en 05 (13,8% var. expl.) y en el GL 1 en 08 (14,1% var. expl.), y cinco QTLs sugerentes ya identificados previamente (GL 9, y dos en los GLs 11 y 18). El QTL del GL 13, con un intervalo LOD -1 de 36,9-56,3 cM, no coincide con el descrito en 07 en el mapa de Moscatuel, con un intervalo LOD -1 de 0-9,6 cM (Tabla 4.2.15; Figura 4.1.1). En el GL 18 se identificaron dos QTLs, uno en la región superior del GL (05, 07 y 08) que coincidió con del GL 18_a de Moscatuel (08), y que explicó entre el 10-14,9% de la variación fenotípica. El QTL identificado en la región inferior (06) coincidió con el del GL 18_b de Moscatuel en el mismo año, y explicó el 21,1% de la variación fenotípica (Tabla 4.2.15; Figura 4.1.1). En el GL 11 se identificaron dos QTLs, uno en la región superior del GL en 06 (24,5% var. expl.), y otro en la región inferior del GL en 07 (13,4% var. expl.) que coincidió con el descrito en el mapa de Ruby Seedless en el mismo año (Tabla 4.2.15; Figura 4.1.1). No se puede afirmar con seguridad que estas dos regiones del mapa integrado se correspondan con las detectadas en el mapa de Moscatuel, porque los cofactores usados en el mapa integrado están ausentes en el de Moscatuel. Sin embargo, la posición relativa y los años coinciden en ambos mapas (Tabla 4.2.15; Figura 4.1.1). El QTL identificado en el GL 9 (07 y 08) explicó el 11,7-15,1% de la variación fenotípica, y coincidió con el descrito en el mapa de Moscatuel en 08 (GL 9_a). Los QTLs identificados conformaron un modelo de control del carácter en 05 que explicó el 13,4% de la varianza fenotípica, un 42,2% en 06, un 44,8% en 07, y un 51,9% en 08.

Color de las bayas. En el mapa de Ruby Seedless se estableció 1 QTL significativo (99% nivel significación) y de efecto mayor en el GL 2, detectado todas las campañas, y otro sugerente (99% nivel signif.) en el GL 17, relacionados con el color de la baya (Tabla 4.2.16). El QTL del GL 2 explicó entre el 52,1 y el 67,1% de la variación fenotípica, provocando un descenso en el valor de CIRG, como indica su efecto aditivo negativo. Su cofactor óptimo (el SSR VMC2C10_1) presentó una alta correlación de KW en las tres campañas evaluadas ($P = 0,0001$). Con los datos de 05 se pudo incluir en el modelo de control del carácter el QTL del GL 17, con lo que se explicaría el 62,4% de la variación fenotípica.

Tabla 4.2.16. Descripción de los QTLs detectados para el color de las bayas.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD					LOD max.	cM	Intervalo LOD-1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.	
				Umbral LOD GL			Genoma									
R	05	2	7	0,8	1,5	1,9	2,1	2,9	3,5	16,87	45,9	43,7-46,9	VMC2C10_1	14,55	52,1	-1,25
R	05	17	2	0,8	1,3	1,8	2,1	2,9	3,5	2,09	5,0	0,0-17,6	VMC3C11_1	2,00	4,8	0,38
R	05	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL2 y GL17): 62,4%														
R	06	2	7	0,8	1,5	2,3	2,1	2,8	3,6	22,33	45,9	45,2-47,1	VMC2C10_1	14,64	58,3	-1,19
R	07	2	7	0,9	1,6	2,3	2,2	2,9	3,5	27,73	45,9	45,3-46,7	VMC2C10_1	18,57	67,1	-1,38
I	05	2	7	1,8	2,8	3,7	11	12	13	19,34	43,9	42,3-44,5	VMC2C10_1	16,12	65,2	
I	06	2	7	1,9	2,6	3,5	9,2	10	11	21,03	43,9	43,1-44,5	VMC2C10_1	14,29	53	
I	06	16	0	1,8	2,8	4	9,2	10	11	2,22	55,6	45,8-55,6	SCU14VV	2,22	6,2	
I	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL2 y GL16): 67,3%														
I	07	2	7	1,9	2,8	3,7	13	15	16	28,15	43,9	43,4-44,3	VMC2C10_1	18,80	68	

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P ($1 = 0,1$; $2 = 0,05$, $3 = 0,01$; $4 = 0,005$; $5 = 0,001$; $6 = 0,0005$; $7 = 0,0001$), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa integrado se detectó, con los datos de las tres campañas en las que se evaluó el carácter, el mismo QTL significativo en el GL 2 que se detectó en el mapa de Ruby Seedless (Tabla 4.2.16). Explicó entre el 53 y el 68% de la varianza fenotípica total, y su cofactor óptimo (el SSR VMC2C10_1) presentó de nuevo una alta correlación de KW ($P = 0,0001$). Además, con los datos de 06 se detectó un QTL de tipo sugerente en el GL 16 (6,2% var. expl.), no detectado en ningún parental, con el que se pudo establecer un modelo de control del carácter que explicó el 67,3% de la varianza total.

En el mapa de Moscatuel no se encontró ningún QTL relacionado con el color de la baya (Tabla 4.2.16).

Apirenia. En las tablas 4.2.17 a 4.2.20, se describen los QTLs identificados para los distintos parámetros evaluados relacionados con el grado de apirenia: número de semillas por baya (NS_B), peso fresco y seco de las semillas y/o esbozos seminales por baya (PF_SE_B y PS_SE_B) y número total de semillas y/o esbozos seminales por baya (NT_SE_B).

Tabla 4.2.17. Descripción de los QTLs detectados para el número de semillas.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma			LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				80	95	99	80	95	99							
R	05	18b	7	0,7	1,3	1,9	2,1	2,9	3,8	4,68	21,2	14,1-21,2	VMC7F2	4,68	28,9	-0,49
R	06	18b	7	0,7	1,3	2	2,1	2,8	3,6	5,09	21,2	15,6-21,2	VMC7F2	5,09	28,1	-0,50
R	07	18b	7	0,6	1,1	1,8	2,1	2,7	3,4	4,54	21,2	14,7-21,2	VMC7F2	4,54	26,2	-0,50
M	05	18b	7	0,5	1	1,7	2,1	2,8	3,2	7,37	7,8	3,8-7,8	VMC7F2	7,37	47	-0,63
M	06	18b	7	0,5	1	1,6	2,1	2,8	3,5	7,84	7,8	3,9-7,8	VMC7F2	7,84	44,3	-0,63
M	07	18b	7	0,5	1,1	1,5	2,1	2,7	3,4	7,01	7,8	0,0-7,8	VMC7F2	7,01	41,3	-0,63
I	05	18	7	2,1	3	3,8	>20	>20	>20	21,92	86,6	85,9-87,8	VMC7F2	22,72	74,3	
I	06	18	7	2,1	2,9	4,3	>20	>20	>20	22,72	87,5	87,2-87,8	VMC7F2	22,72	74,3	
I	07	18	7	2,2	3,2	4,2	>20	>20	>20	31,27	86,6	86,3-86,7	Vvi_10777	31,27	91	

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P ($1 = 0,1$; $2 = 0,05$, $3 = 0,01$; $4 = 0,005$; $5 = 0,001$; $6 = 0,0005$; $7 = 0,0001$), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

En el mapa de Ruby Seedless se detectaron 3 QTLs relacionados con la apirenia: en el GL 7 (para NT_SE_B), en el GL 16 (para PF_SE_B y PS_SE_B), y en el GL 18_b (para todos los parámetros evaluados). El efecto de estos QTLs provocó una reducción de las distintas variables evaluadas. El QTL sugerente del GL 7, explicó el 6,8% de la variación fenotípica del NT_SE_B en 06 (Tabla 4.2.20). Por otro lado, el QTL sugerente del GL 16 explicó entre el 5,4 y 5,8% de la variación fenotípica del PF_SE_B (Tabla 4.2.18), y el 5,4% del PS_SE_B (Tabla 4.2.19). Finalmente, el QTL del GL 18_b se mantuvo en todas las campañas y parámetros de manera significativa (99% significación), excepto para el NT_SE_B (sugerente para un nivel de significación del 95%). El cofactor óptimo de este QTL (el SSR VMC7F2), presentó una alta correlación de KW ($P = 0,0001$) con los distintos parámetros. Este QTL explicó el 26,2-28,9% del NS_B (Tabla 4.2.17), el 31,4-37,6% del PF_SE_B (Tabla 4.2.18), el 29,5-33,7% del PS_SE_B (Tabla 4.2.19) y el 10,3-12,7% del NT_SE_B (Tabla 4.2.20). Con todos estos resultados, se establecieron dos modelos de control del PF_SE_B, que explicaron el 39,6% (06) y el 41,5% (07) de la varianza fenotípica, un modelo para PS_SE_B en 07 (29,5% var. expl.), y otro modelo para NT_SE_B en 06 (23% var. expl.).

En el mapa de Moscatuel, se detectó en el GL 18_b un QTL significativo (99% nivel signif.) de efecto mayor para el NS_B (41,3-47% var. expl.), PF_SE_B (40,2-47,7% var. expl.) y PS_SE_B (41,2-47,6% var. expl.), previamente identificado en el mapa de Ruby Seedless. Al igual que en el mapa de Ruby Seedless, su efecto aditivo fue el de disminución de las distintas variables, y el cofactor óptimo seleccionado (el SSR VMC7F2) presentó una alta correlación de KW ($P = 0,0001$) con los distintos parámetros evaluados.

Tabla 4.2.18. Descripción de los QTLs detectados para el peso fresco de las semillas y/o esbozos seminales por baya.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma			LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				80	95	99	80	95	99							
R	05	18b	7	0,7	1,4	2,2	2,1	2,8	3,4	7,19	21,2	16,4-21,2	VMC7F2	7,19	37,6	-25,75
R	06	16	0	0,8	1,3	1,9	2,1	2,7	3,2	1,20	16,3	0,0-37,5	UDV052	1,20	5,8	-10,62
R	06	18b	7	0,7	1,3	2,2	2,1	2,7	3,2	6,37	21,2	15,6-21,2	VMC7F2	6,37	31,4	-24,92
R 06 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL16 y GL18b): 39.6%																
R	07	16	0	0,8	1,3	2,1	2,1	2,7	3,3	1,20	16,3	0,0-42,6	UDV052	1,20	5,4	-11,35
R	07	18b	7	0,7	1,2	1,7	2,1	2,7	3,3	6,88	21,2	16,0-21,2	VMC7F2	6,88	33,4	-28,04
R 07 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL16 y GL18b): 41.5%																
M	05	18b	7	0,5	1,1	1,8	2,1	2,8	3,5	8,51	7,8	4,4-7,8	VMC7F2	7,8	47,7	-28,99
M	06	18b	7	0,5	1	1,6	2,1	2,7	3,3	7,20	7,8	4,1-7,8	VMC7F2	7,20	40,2	-27,85
M	07	18b	7	0,5	0,9	1,7	2,1	2,7	3,4	8,05	7,8	4,3-7,8	VMC7F2	8,05	44,8	-32,15
I	05	18	7	2,1	2,9	3,8	16	18	20	24,39	87,8	87,4-87,8	VMC7F2	24,39	77,2	
I	06	16	0	1,9	3,1	6,3	10	14	17	2,35	55,6	45,4-55,6	SCU14VV	2,35	5,5	
I	06	18	7	2,1	2,9	4	10	14	17	20,95	87,8	87,5-87,8	VMC7F2	20,95	67,4	
I 06 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL16 y GL18): 73.7%																
I	07	16	0	1,8	2,8	4,5	9,3	11	13	2,20	55,6	43,1-55,6	SCU14VV	2,20	4,2	
I	07	18	7	2,1	3	4,1	9,3	11	13	22,16	87,8	87,5-87,8	VMC7F2	22,16	66,4	
I 07 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL16 y GL18): 76.5%																

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P (1 = 0,1; 2 = 0,05, 3 = 0,01; 4 = 0,005; 5 = 0,001; 6 = 0,0005; 7 = 0,0001), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

Sin embargo, el control del NT_SE_B en Moscatuel se relacionó con nuevos QTLs localizados en los GLs 2_a (10,8-15% var. expl.), 8_a (12,6% var. expl.), 8_b (6,5% var. expl.), 13 (11,8% var. expl.) y 19_a (13,8% var. expl.) (Tabla 4.2.20), que provocaron una disminución del NT_SE_B, excepto los localizados en el GL 8, que incrementaron el mismo. El QTL detectado en el GL 8_a fue de carácter significativo (80% nivel signif.), y el del GL 8_b fue sugerente (80% nivel signif.) y, debido a la proximidad de ambos QTLs y a su efecto análogo sobre el carácter, no se descarta que puedan tratarse del mismo QTL. Con estos resultados se establecieron tres modelos de control del NT_SE_B que explicarían el 20,1% de la varianza en 05, el 30,4% en 06, y el 22,4% en 07.

Tabla 4.2.19. Descripción de los QTLs detectados para el peso seco de las semillas y/o esbozos seminales por baya.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma			LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				80	95	99	80	95	99							
R	05	18b	7	0,7	1,2	1,9	2,1	2,7	3,4	6,24	21,2	15,8-21,2	VMC7F2	6,24	33,7	-16,70
R	06	18b	7	0,6	1,2	1,8	2,1	2,7	3,4	5,76	21,2	15,8-21,2	VMC7F2	5,76	31,2	-16,54
R	07	16	0	0,8	1,3	1,9	2	2,7	3,4	1,19	16,3	0,0-42,6	UDV052	1,19	5,4	-7,78
R	07	18b	7	0,6	1,3	2	2	2,7	3,4	5,90	21,2	15,3-21,2	VMC7F2	5,90	29,5	-17,87
R 07 Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL16 y GL18b): 29.5%																
M	05	18b	7	0,5	1	1,6	2	2,7	3,3	8,26	7,8	4,4-7,8	VMC7F2	7,8	47,6	-19,87
M	06	18b	7	0,5	1,1	1,8	2,1	2,7	3,3	7,31	7,8	4,1-7,8	VMC7F2	7,31	41,2	-18,93
M	07	18b	7	0,5	1,1	1,7	2,1	2,7	3,4	7,82	7,8	4,1-7,8	VMC7F2	7,82	44,1	-21,58
I	05	18	7	2,1	3	3,8	>20	>20	>20	24,33	87,8	87,4-87,8	VMC7F2	24,23	77	
I	06	18	7	2,1	2,9	4,3	>20	>20	>20	20,90	87,8	87,6-87,8	VMC7F2	20,90	71,8	
I	07	18	7	2,2	3,2	4,2	>20	>20	>20	22,25	87,8	87,5-87,8	VMC7F2	22,25	74	

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P (1 = 0,1; 2 = 0,05, 3 = 0,01; 4 = 0,005; 5 = 0,001; 6 = 0,0005; 7 = 0,0001), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

Finalmente, en el mapa integrado se identificaron 3 QTLs relacionados con la apirenia: en el GL 9 (para NT_SE_B), GL 16 (PF_SE_B), y GL 18 (para todas las variables analizadas). El QTL sugerente del GL 9 (95% nivel signif.) explicó el 13,3% de la varianza fenotípica del NT_SE_B (Tabla 4.2.20). Este QTL, junto con el QTL significativo detectado en 05 en el GL 18, permitió establecer un modelo de control que explicó el 46,7% de la varianza fenotípica. El QTL sugerente del GL 16, explicó el 4,2-5,5% de la variación fenotípica del PF_SE_B (Tabla 4.2.18). Es difícil determinar si este QTL corresponde al detectado en el mapa de Ruby Seedless, ya que los cofactores óptimos distan en este mapa más de 34 cM, y solo los intervalos de confianza LOD -1 de la campaña 07 solaparon parcialmente. En 06 se estableció un modelo de control del PF_SE_B (QTLs GL 16 y 18) que explicó el 73,7% de la variación fenotípica, y el 76,5% en 07. El QTL identificado en el GL18 fue previamente identificado en los mapas parentales, y explicó el 74,3-91% del NS_B (Tabla 4.2.17), el 66,4-77,2% de la variación fenotípica del PF_SE_B (Tabla 4.2.18), el 71,8-77% del PS_SE_B (Tabla 4.2.19) y el 29,7-37,2% del NT_SE_B (Tabla 4.2.20). En todas las campañas y para todos los parámetros, el cofactor óptimo seleccionado fue el SSR VMC7F2, excepto para el NS_B en 07, cuyo cofactor óptimo fue el SNP Vvi_10777. Ambos cofactores presentaron de nuevo una alta correlación de KW ($P = 0,0001$) con las respectivas variables evaluadas.

Tabla 4.2.20. Descripción de los QTLs detectados para el número total de semillas y/o esbozos seminales por baya.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD									Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				Umbral LOD GL			Umbral LOD Genoma			LOD max.	cM						
R	05	18b	4	0,7	1,2	1,7	2,1	2,7	3,4			1,46	21,2	13,2-21,2	VMC7F2	1,46	10,5
R	06	7b	2	0,6	1,1	1,8	2,2	2,9	3,6	1,18	6,7	0,0-18,1	SNP241_201	1,18	6,8	-0,21	
R	06	18b	7	0,7	1,3	1,9	2,2	2,9	3,6	1,66	21,2	14,9-21,2	VMC7F2	1,66	10,3	-0,26	
R	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Ruby Seedless (GL7b y GL18b): 23,0%															
R	07	18b	7	0,7	1,3	2	2,1	2,8	3,5	1,54	21,2	13,8-21,2	VMC7F2	1,54	12,7	-0,29	
M	05	8a	2	0,8	1,5	2,3	2,1	2,8	3,6	2,34	17,9	4,0-37,5	VVIP04	2,2	12,6	1,30	
M	05	8b	2	0,7	1,4	2,6	2,1	2,8	3,6	1,46	14,4	5,7-19,5	SNP1055_141	1,26	6,5	0,91	
M	05	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL8a y GL8b): 20,1%															
M	06	2a	6	0,7	1,3	1,8	2,1	2,9	4	2,98	24,7	21,5-24,7	VMC6F1	2,98	15	-0,29	
M	06	13	5	0,8	1,3	1,9	2,1	2,9	4	2,37	44,2	40,3-44,2	VVIP10	2,37	11,8	-0,27	
M	06	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL2a y GL13): 30,4%															
M	07	2a	2	0,7	1,3	2	2,2	2,9	3,6	1,94	24,7	18,2-24,7	VMC6F1	1,94	10,8	-0,26	
M	07	19a	2	0,6	1,1	1,9	2,2	2,9	3,6	2,30	30,6	7,5-30,6	Vvi_7824	2,30	13,8	-0,29	
M	07	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa de Moscatuel (GL2a y GL19a): 22,4%															
I	05	9	3	2	2,8	3,4	3,5	4,3	5,2	3,11	9	0,2-56,0	SNP311_198	3,09	13,3		
I	05	18	7	2,2	2,9	3,8	3,5	4,3	5,2	6,99	87,8	86,7-87,8	VMC7F2	6,99	29,7		
I	05	Varianza total explicada por los dos QTLs del mapa integrado (GL9 y GL18): 46,7%															
I	06	18	7	2,1	3	4	3,6	4,5	5,7	6,97	87,8	86,2-87,8	VMC7F2	6,97	37,2		
I	07	18	7	2,1	2,9	4	3,6	4,5	5,7	6,12	87,8	85,2-87,8	VMC7F2	6,12	32,4		

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P ($1 = 0,1$; $2 = 0,05$, $3 = 0,01$; $4 = 0,005$; $5 = 0,001$; $6 = 0,0005$; $7 = 0,0001$), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

Flavor moscatel. En el mapa de Ruby Seedless se detectaron 2 QTLs sugerentes de efecto menor (GL 7_a y 9), relacionados con el flavor moscatel, de manera que el del GL 7_a (12,3% var. expl.) produciría una disminución del flavor moscatel, mientras que el del GL 9 (7,9-8,9% var. expl.), detectado en dos campañas, produciría un incremento del mismo (Tabla 4.2.21).

En el mapa de Moscatuel se localizaron 4 QTLs nuevos (GL 5, 9_a, 10 y 19_a) que produjeron un incremento del flavor moscatel, excepto el del GL 19_a (Tabla 4.2.21). El QTL del GL 5 (8,8-38,3% var. expl.) fue de carácter significativo en tres de las cuatro campañas estudiadas. Dicho QTL constituyó un modelo de control del carácter en 05 (50,6% var. expl.) y 07 (20,4% var. expl.), junto con el QTL detectado en el GL 9_a de carácter significativo y sugerente, respectivamente. En la campaña 06, el QTL del GL 5 constituyó un modelo de control (50,3% var. expl.) junto con el del GL 10 de carácter sugerente, y otro modelo en 08 (25,2% var. expl.) junto al QTL sugerente del GL 19_a. El QTL detectado en el GL 9_a no coincide con el detectado en el mapa de Ruby Seedless en dicho GL.

En el mapa integrado se identificó un QTL (GL 5_b) de efecto mayor (54,5-76,7% var. expl.), previamente descrito en el mapa de Moscatuel. Se detectó significativamente en 05 (95% nivel signif.) y 08 (80% nivel signif.), y de manera sugerente en 07 para un nivel de significación del 95% (Tabla 4.2.21).

Tabla 4.2.21. Descripción de los QTLs detectados para el flavor moscatel.

Mapa	Año	GL	KW	Umbral LOD									LOD max.	cM	Intervalo LOD -1	Cofactor	LOD cofactor	% var.	E.Ad.
				Umbral LOD GL			Genoma			80	95	99							
R	05	9	2	0,9	1,5	2,4	2,2	2,9	3,8	1,25	56,4	30,5-56,4	VMC2E11	1,25	8,9	0,23			
R	06	7a	2	0,6	1,2	2,2	2,1	3	3,9	1,63	11,8	0,0-24,8	Vvi_2623	1,56	12,3	-0,34			
R	08	9	2	0,9	1,5	2,4	2,2	2,9	3,8	1,22	56,4	21,0-56,4	VMC2E11	1,22	7,9	0,24			
M	05	5	6	1,1	1,8	2,7	2,1	2,9	3,5	6,04	21,9	15,6-26,8	VVMD27	5,10	26,8	0,39			
M	05	9a	2	0,6	1,1	2,2	2,1	2,9	3,5	4,83	10	0,0-21,2	VMC1C10	4,50	27,5	0,41			
M	06	5	7	1,1	1,7	2,4	2,2	2,9	3,5	8,65	21,9	14,1-26,8	VVMD27	7,68	38,3	0,61			
M	06	10	3	0,8	1,5	2,2	2,2	2,9	3,5	1,94	0	0,0-26,6	VMC3D7	1,94	7,8	0,27			
M	07	5	2	1,1	1,6	2,3	2	2,6	3,4	1,40	11,9	0,0-33,8	SNP1431_584	1,40	8,8	0,23			
M	07	9a	1	0,6	1	1,7	2	2,6	3,4	1,20	0	0,0-21,2	VMC1C10	1,20	8,4	0,22			
M	08	5	4	1,1	1,7	2,4	2,1	2,7	3,5	2,20	26,5	9,4-39,2	VVMD27	2,20	12	0,30			
M	08	19a	4	0,7	1,2	1,7	2,1	2,7	3,5	1,60	10	0,0-30,6	VMC5E9	1,43	7,6	-0,25			
I	06	5b	7	5,5	6,7	8	7	8,3	10	12,47	11,5	10,5-17,7	VVMD27	9,05	54,5				
I	07	5b	2	5,8	9,6	>20	17	>20	>20	10,92	6,5	3,8-13,4	SNP1431_584	10,92	76,7				
I	08	5b	4	4,3	7,8	13	9,1	14	18	10,42	11,5	9,8-18,3	VVMD27	10,42	66,6				

En cada QTL se muestra el mapa (R, Ruby Seedless; M, Moscatuel; I, integrado del cruzamiento), año, grupo de ligamiento (GL), nivel de significación del análisis de Kruskal-Wallis (KW) dado por el valor de P (1 = 0,1; 2 = 0,05, 3 = 0,01; 4 = 0,005; 5 = 0,001; 6 = 0,0005; 7 = 0,0001), y el valor umbral de LOD a nivel de GL y de genoma para un nivel de significación del 80%, 95% y 99%. La posición del QTL se indica en el punto en que su LOD es máximo (LOD max.) en centimorgans (cM), así como con su intervalo de confianza LOD -1, cofactor óptimo y su correspondiente LOD. También se indica el porcentaje de la variación fenotípica explicada (% var.), el efecto aditivo (E.Ad.), y en negrita el nivel umbral de significación superado por el LOD del cofactor.

5. DISCUSIÓN

5.1. Construcción de los mapas de ligamiento

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de los determinantes genéticos que controlan algunos de los caracteres más interesantes de cara a la mejora genética de la uva de mesa. Para abordar este objetivo, se construyeron mapas genéticos de las dos variedades de uva de mesa apirenas Ruby Seedless y Moscatuel, empleando marcadores moleculares SSR (Simple Sequence Repeat) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism). En primer lugar, los mapas genéticos ordenan los marcadores moleculares en grupos de ligamiento, en base a su co-segregación en una población de mapeo. Posteriormente, la asociación de dichos marcadores con caracteres heredables nos permitirá predecir el fenotipo en estadios tempranos del desarrollo de las plantas y, por tanto, llevar a cabo una selección asistida por marcadores más eficaz y rápida de nuevas variedades de este cultivo.

5.1.1. Heterocigosis y distorsión de los marcadores analizados

La vid es una especie con un genoma altamente heterocigoto, y esta característica permite construir mapas genéticos utilizando poblaciones F_1 . El grado de heterocigosis de un genoma, que puede ser estimado mediante el análisis con marcadores moleculares, determina la eficiencia en la construcción de los mapas de ligamiento.

El nivel de heterocigosis de los microsatélites (SSRs) analizados en Ruby Seedless (62%) y Moscatuel (59%) fue inferior al observado en otras variedades utilizando el mismo tipo de marcadores, excepto para Moscatel Ottonel, cuya heterocigosis fue la más baja observada (Tabla 5.1.1). El mayor grado de homocigosis de nuestros parentales puede deberse a un incremento de la endogamia producido por el uso continuado de fondos genéticos comunes en el proceso de selección. El carácter estenospermocárpico de ambos proviene del fondo genético aportado por la variedad Sultanina, presente en el pedigrí de ambos en al menos una ocasión (Anexo 1). Es mucha la información que se desconoce del árbol filogenético de ambas variedades, por lo que no es descartable que Sultanina participara más de una vez en el mismo, incrementando así la endogamia. Además, en el pedigrí de Moscatuel figura en dos ocasiones Moscatel de Alejandría, lo que podría explicar en parte el mayor grado de homocigosis de este parental (Tabla 4.1.2). El menor nivel de heterocigosis encontrado en este trabajo, indica la existencia de determinadas regiones en homocigosis en los progenitores utilizados. Este hecho es importante en la estrategia de mapeo utilizada, ya que al estudiar la segregación de los marcadores en una población F_1 , aquellos que están en

homocigosis en uno de los progenitores no podrán incluirse en el mapa genético de ese progenitor.

Tabla 5.1.1. Grado de heterocigosis de los SSRs analizados en distintos fondos genéticos del género *Vitis*.

Variedad / Híbrido	Heterocigosis (%)	Autor
MTP2223-27	90	Doligez y col. (2002)
Regent	89	Welter y col. (2007)
MTP2121-30	84	Doligez y col. (2002)
Merzling	78,2	Salmaso y col. (2008)
Riesling	78	Riaz y col. (2004)
Teroldego	76	Salmaso y col. (2008)
Cabernet Sauvignon	75	Riaz y col. (2004)
Dominga	73	Cabezas (2004)
Lemberger	71	Welter y col. (2007)
Garnacha	69,6	Adam-Blondon y col. (2004)
Siraz	69,3	Adam-Blondon y col. (2004)
Riesling	69,2	Adam-Blondon y col. (2004)
Autumn Seedless	67	Cabezas (2004)
Ruby Seedless	62	Carreño (2012)
Moscatuel	59	Carreño (2012)
Moscatel Ottonel	56	Duchêne y col. (2009)

La gran diferencia de heterocigosis entre los dos tipos de marcadores usados (62% y 59% para SSRs, 26% y 25% para SNPs, apartado 4.1.2), probablemente se deba a que, mientras que los SSRs son el tipo de secuencias con la tasa de mutación más alta (Moxon y Wills, 1999; Oliveira y col., 2006), los SNPs fueron desarrollados a partir de ESTs (Lijavetzky y col., 2007), con una tasa de mutación muy inferior a los SSRs. Aunque hay que mencionar que el 23% de los ESTs fueron intrones, más susceptibles de mutación que los exones, y que por tanto contribuyen a incrementar el nivel de heterocigosis.

Por otro lado, es frecuente encontrar marcadores con segregación distorsionada en estudios similares, especialmente en especies frutales o forestales (Bradsaw y Settler, 1994; Grattapaglia y Sederoff, 1994; Lanaud y col., 1995; Viruel y col., 1995; Barrenche y col., 1998; Paglia y Morgante, 1998; Cervera y col., 2001; de la Rosa y col., 2003; Lambert y col., 2004).

En este estudio, considerando todos los marcadores polimórficos, los niveles de distorsión encontrados en la segregación de los alelos aportados por Ruby Seedless fue del 15%, y por Moscatuel del 14%. El 15,4% de los marcadores útiles para la construcción del mapa integrado presentaron distorsión en la segregación de los genotipos. Estos valores están comprendidos en el rango presentado por otros fondos genéticos del género *Vitis* (Tabla 5.1.2). Por su parte, en los mapas saturados se observaron regiones que contenían al menos dos marcadores distorsionados adyacentes. Localizaron en los GLs 1_a, 7_b, 12 y 18_a del mapa de Ruby Seedless, en el GL 8 del mapa de Moscatuel, y en los GLs 1, 7_b, 8, 15, 17 y

Tabla 5.1.2. Porcentaje de marcadores con segregación distorsionada en mapas desarrollados a partir de distintos fondos genéticos de *Vitis*. Se señalan con una “X” los GLs en los que hubo al menos dos marcadores contiguos distorsionados. n: sin datos.

Autor	Mapa	%	Grupo de ligamiento																		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Doligez y col. (2002)	MTP2223-27	9	X			X				X	X							X	X		
Doligez y col. (2002)	MTP2121-30	4							X						X						
Grando y col. (2003)	Moscato Bianco	7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Grando y col. (2003)	<i>Vitis Riparia</i>	17	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Adam-Blondon y col. (2004)	Siraz	10,8				X					X							X			
Adam-Blondon y col. (2004)	Garnacha	7,2	X															X			
Adam-Blondon y col. (2004)	Consenso	9,9				X												X			
Adam-Blondon y col. (2004)	Riesling	8																			
Doucleff y col. (2004)	D8909-15	15								X		X	X								
Doucleff y col. (2004)	F8909-17	7					X														
Doucleff y col. (2004)	Consenso	9	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Riaz y col. (2004)	Riesling	6	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Riaz y col. (2004)	C. Sauvignon	11	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Cabezas y col. (2006)	Dominga	6,8																			
Cabezas y col. (2006)	A. Seedless	10,1																		X	
Doligez y col. (2006 b)	MTP2687-85	7,3																	X		
Doligez y col. (2006 b)	Moscatoel Hamburgo	12,3	X				X					X	X								
Doligez y col. (2006 b)	Consenso	11,7	X				X					X							X		
Lowe y Walker (2006)	Ramsey	10			X	X	X														
Lowe y Walker (2006)	Riparia Gloire	13				X	X												X		
Lowe y Walker (2006)	Consenso	16			X	X	X								X				X		
Riaz y col. (2006)	D8909-15	14	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Riaz y col. (2006)	F8909-17	7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Riaz y col. (2006)	Consenso	17					X	X							X						
Di Gaspero y col. (2007)	Chardonnay	3,6	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Di Gaspero y col. (2007)	Bianca	13,3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Di Gaspero y col. (2007)	C. Sauvignon	13,1	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Di Gaspero y col. (2007)	20/3	3,1	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Welter y col. (2007)	Regent	n										X				X			X	X	
Welter y col. (2007)	Lemberger	n	X									X				X				X	
Welter y col. (2007)	Consenso	n										X								X	
Costantini y col. (2008)	Italia	17,4	X						X	X	X										
Costantini y col. (2008)	Big Perlon	16,9	X						X	X	X			X	X				X	X	
Costantini y col. (2008)	Consenso	n							X	X	X		X	X	X				X	X	
Salmaso y col. (2008)	Merzling	19,9	X				X			X					X		X		X	X	
Salmaso y col. (2008)	Teroldego	19	X						X	X				X	X				X	X	
Salmaso y col. (2008)	Consenso	19,4	X				X		X	X				X	X				X	X	
Duchêne y col. (2009)	Moscatoel Ottonel	42		X		X	X			X				X		X	X		X	X	
Doligez y col. (2010)	MTP2223-27	n	X			X				X									X	X	
Doligez y col. (2010)	MTP2121-30	n	X			X				X	X				X						
Doligez y col. (2010)	Consenso	n								X					X						
Doligez y col. (2010)	MTP2687-85	n																		X	
Doligez y col. (2010)	Moscatoel Hamburgo	n	X			X							X						X		
Doligez y col. (2010)	Consenso	n	X			X							X	X							
Promedio		12,2																			
Suma agrupaciones			14	1	2	7	11	2	9	7	6	1	8	4	5	11	3	2	12	9	7

18 del integrado. Se puede observar en la Tabla 5.1.2 que los diez GLs más susceptibles de presentar agrupamientos de marcadores distorsionados son, por orden decreciente, los GLs 1, 17, 5, 14, 7, 18, 11, 4, 8 y 19. Existen indicios de que la presencia de estas regiones distorsionadas pueda deberse a que se encuentren en ellas genes que, bajo ciertas combinaciones alélicas, provoquen un fuerte efecto deletéreo, o una resistencia a un patógeno o enfermedad, de modo que solo unos determinados genotipos se desarrollan a plantas adultas. Duchêne y col. (2009), observaron que todos los GLs en los que detectaron QTLs para contenido en terpenol, excepto en dos de ellos, estaban afectados por la distorsión en la segregación de los marcadores. Argumentaron que los efectos negativos de los terpenos sobre la germinación de las semillas o el crecimiento de las plántulas podría haber amplificado la depresión por endogamia, ya que utilizaron dos poblaciones obtenidas por retrocruzamiento de un parental. Welter y col. (2007) detectaron un QTL de efecto mayor para resistencia a oídio en una región del GL 15 con un agrupamiento de marcadores distorsionados. Finalmente, Cabezas (2004, 2006) detectó un QTL de efecto mayor para la apirenia en la parte inferior del GL 18 del mapa de Autumn Seedless, en la que los marcadores implicados presentaron distorsión. Este autor discutió una posible relación entre la presencia del QTL y la distorsión, de modo que podría deberse al aborto de un número elevado de embriones de genotipo apireno. No obstante, en el presente trabajo también detectamos un QTL de efecto mayor para apirenia en la misma región, en la cual no posicionaron marcadores distorsionados, indicando una selección de viabilidad muy baja, al igual que se ha observado en otras progenies segregantes para apirenia (Doligez y col., 2002; Costantini y col., 2008).

5.1.2. Alineamiento y comparación de los mapas de ligamiento obtenidos

En primer lugar, es necesario resaltar que la comparación entre mapas desarrollados por distintos grupos de investigación ha de considerarse con la debida cautela, ya que el ajuste de los distintos parámetros (LOD, REC, etc.), así como los programas informáticos empleados para su construcción (JoinMap, Mapmaker, Cartographer, Carthagene, R/qtl,...), pueden influir mucho sobre el resultado final del mapa.

El tamaño de la población utilizada para la construcción de los mapas de ligamiento ($n = 78$), se encuentra por debajo del promedio de individuos utilizados por el resto de autores (Tabla 5.1.3). Esto fue debido a que, dado el carácter apireno de ambos parentales, los híbridos fueron obtenidos mediante rescate *in vitro* de embriones. Sin embargo, el elevado grado de segregación de los

caracteres estudiados en esta población, sugiere que el tamaño de la misma es adecuado para un estudio de este tipo.

En general, un mayor número de marcadores posicionados suele ocasionar un mayor tamaño de mapa (Tabla 5.1.3). Igualmente en nuestra población, el tamaño observado (G_{ob}) del mapa integrado saturado y marco fue superior al correspondiente de cada parental (Tabla 4.1.4). No obstante, esta es una tendencia que, como tal, no siempre se cumple, como sucede con los mapas de Doligez y col. (2006b y 2010) (Tabla 5.1.3), y con nuestros mapas parentales (Tabla 4.1.4). Así, aunque en los mapas de Ruby Seedless hay posicionados un mayor número de marcadores que en los de Moscatuel, los tamaños de mapa obtenidos son inferiores (Tabla 4.1.4). Esto puede deberse a la presencia de un mayor número de regiones distorsionadas (cuatro frente a una), que provocan el acortamiento del mapa saturado y marco de Ruby Seedless debido a la variación que causan en las tasas de recombinación (Doligez y col., 2002; Costantini y col., 2008).

El tamaño observado (G_{ob}) de los mapas parentales y del integrado está dentro del rango establecido por otros mapas publicados (Tabla 5.1.3), si bien es algo inferior, especialmente en los mapas parentales. Este menor tamaño es debido al mayor grado de homocigosis observado en Ruby Seedless y Moscatuel, comparado con otros fondos genéticos del género *Vitis* (Tabla 5.1.1). Dicha homocigosis está patente en algunas regiones del genoma en las que fue imposible incorporar marcadores, ya que éstos siempre resultaban homocigotos. Estas regiones “desiertas” dificultaron el ligamiento de marcadores que se encuentran en el mismo GL, ocasionando un número final de GLs superior a la dotación haploide de 19 cromosomas de la vid (Tabla 4.1.3), además de un tamaño de mapa inferior. Asimismo, algunas regiones teloméricas tampoco fueron representadas en nuestros mapas. No obstante, los valores de las coberturas de mapa observadas y estimadas son comparables a las de los demás mapas publicados. El escaso número de intervalos entre marcadores superiores a 25 cM, indica que nuestros mapas se encuentran a un buen nivel de saturación para los objetivos propuestos.

El orden en que posicionaron los marcadores, generalmente estuvo bien conservado entre los tres mapas (apartado 4.1.5). Las diferencias en el orden de los marcadores pueden estar causadas por variaciones locales en la frecuencia de recombinación, por la segregación de marcadores específicos en un solo parental y por rupturas en la sintenia de los parentales (Salmaso y col., 2008). Los cambios de posición en nuestros mapas se encuentran en los puntos del genoma en los que son más probables: presencia de marcadores con segregación distorsionada, o que

son del tipo parcialmente informativos (abxab), además de agrupaciones de marcadores en una franja muy estrecha (en torno a 1 cM).

Comparando la posición de los SSRs de los mapas saturados con el del mapa de referencia (Doligez y col., 2006a), se observaron algunas discrepancias que fueron comprobadas atendiendo a la secuencia de la vid (Grape Genome Browser). En todos los casos, la posición de los marcadores del mapa de referencia coincide con la mostrada en la secuencia del genoma de la vid, con excepción de un caso en el GL 15, que se mencionará más adelante. En primer lugar, los SSRs VVMD32 y VMC2E10 del GL 4 posicionaron invertidos en los mapas de los parentales, pero no en el integrado (Figura 4.1.1). VVMD32 presentó distorsión en el mapa de Moscatuel y VMC2E10 en los tres mapas, siendo parcialmente informativo (abxab), y por tanto un buen candidato para ocasionar problemas de orden. Esta zona del GL presentó otros tres marcadores parcialmente informativos, presentando además uno de ellos una segregación distorsionada, lo que puede afectar al orden de los marcadores circundantes. Se encontró otra discrepancia en el GL 14 del mapa integrado, en la posición de VMC6C10 y VMC2H5 que aparecieron invertidos. Si bien estos marcadores son totalmente informativos (abxac y abxaa, respectivamente), la presencia entre ambos de un marcador de tipo parcialmente informativo, el SNP1411_565, además de la gran densidad de marcadores en la zona, podría estar causando algún tipo de inconsistencia que cause esta inversión. En el GL 15, los marcadores VVIV67, UDV047 y VVIB63 aparecieron con posiciones distintas al mapa de referencia, aunque la ubicación en este mapa de los tres marcadores no es segura a LOD 2,0. Atendiendo a la secuencia de la vid, la posición de VVIV67 y VVIB63 en nuestros mapas es correcta. No se pudo establecer el emplazamiento exacto de UDV047, ya que no figuraba en el Grape Genome Browser. En cualquier caso, los tres marcadores presentaron distorsión en la segregación de los genotipos, y posicionaron en una franja muy estrecha. En el GL 16, los SSRs VVIT65, VVIV17 y UDV104 presentaron una posición distinta al mapa de referencia. VVIT65 presentó segregación distorsionada en el mapa de Ruby Seedless y en el integrado, lo que pudo haber ocasionado inconsistencia tanto en su posición como en la de VVIV17 y UDV104, que aparecieron invertidos respecto al mapa de referencia. Además, estos dos marcadores posicionaron a 0,1 cM en nuestros mapas saturados, por lo que su ubicación es poco fiable estadísticamente. Por último, la discrepancia en la posición de VVIQ22B y VVIN73 en el GL 17 del mapa integrado se puede explicar porque en nuestro mapa localizaron muy próximos (0,3 cM).

Tabla 5.1.3. Características de los mapas de vid publicados hasta el momento. Los tamaños y coberturas de mapa (observadas y estimadas), fueron calculados por cada autor empleando diferentes fórmulas, la mayoría de ellas descritas en Materiales y Métodos. n: no hay dato.

Autor	Mapa	Nº indivs.	nº marcadores posicionados	Tamaño observado (cM)	Tamaño estimado (cM)	Cobertura observada (%)	Cobertura estimada (%)
Lodhi y col. (1995)	Cayuga White	60	214	1196	n	n	n
Lodhi y col. (1995)	Aurore	60	225	1477	n	n	n
Dalbó y col. (2000)	Horizon	58	153	1199	n	n	n
Dalbó y col. (2000)	Illinois	58	179	1470	n	n	n
Doligez y col. (2002)	MTP2223-27	139	157	767	1639	59	88
Doligez y col. (2002)	MTP2121-30	139	144	816	1908	60	84
Doligez y col. (2002)	consenso	139	301	1002	n	n	n
Grando y col. (2003)	Moscato Bianco	81	338	1639	n	n	n
Grando y col. (2003)	Vitis Riparia	81	429	1518	n	n	n
Adam-Blondon y col. (2004)	Siraz	97	177	1172	1708	78,8	94,6
Adam-Blondon y col. (2004)	Garnacha	97	178	1361	1778	82,3	93,8
Adam-Blondon y col. (2004)	consenso	97	220	1406	2786	62,3	96,9
Adam-Blondon y col. (2004)	Riesling	96	110	1192	2154	56,8	78,7
Doucleff y col. (2004)	D8909-15	116	105	756	1370	62	84
Doucleff y col. (2004)	F8909-17	116	111	1082	2478	49	77
Fischer y col. (2004)	Regent	153	265	1277	n	n	n
Fischer y col. (2004)	Lemberger	153	164	1158	n	n	n
Riaz y col. (2004)	Riesling	153	140	1469	2130	69	91
Riaz y col. (2004)	C. Sauvignon	153	135	1431	2331	61	89
Cabezas y col. (2006)	Dominga	118	353	1173	1461	80	100
Cabezas y col. (2006)	Autumn Seedless	118	329	1131	1602	71	99
Doligez y col. (2006b)	MTP2687-85 (marco)	174	96	935	n	n	n
Doligez y col. (2006b)	M.Hamburgo (marco)	174	105	1365	n	n	n
Doligez y col. (2006b)	Consenso (marco)	174	119	1267	n	n	n
Lowe y Walker (2006)	Ramsey	188	172	1245	1469	84,8	95,7
Lowe y Walker (2006)	Riparia Gloire	188	126	1096	1588	69	92,4
Lowe y Walker (2006)	Consenso	188	192	1305	1296	100,7	96
Riaz y col. (2006)	D8909-15	181	162	865	1647	75	94
Riaz y col. (2006)	F8909-17	181	158	1055	2040	70	91
Riaz y col. (2006)	Consenso	181	210	1154	1706	>100	97
Di Gaspero y col. (2007)	Chardonnay	46	299	1210	n	n	n
Di Gaspero y col. (2007)	Bianca	46	349	1425	n	n	n
Di Gaspero y col. (2007)	C. Sauvignon	46	376	1254	n	n	n
Di Gaspero y col. (2007)	20/3	46	344	1418	n	n	n
Mejía y col. (2007)	Ruby Seedless	144	90	906	1576	57,5	82,3
Mejía y col. (2007)	Thompson Seedless	144	108	1000	1762	56,8	86,4
Mejía y col. (2007)	Consenso	144	n	1340	1755	76,4	96,3
Troggio y col. (2007)	Siraz	94	596	1113	n	n	n
Troggio y col. (2007)	Pinot Noir	94	634	1204	n	n	n
Troggio y col. (2007)	Consenso	94	994	1245	n	n	n
Welter y col. (2007)	Consenso	144	398	1631	n	n	n
Costantini y col. (2008)	Italia	163	276	1353	n	n	n
Costantini y col. (2008)	Big Perlon	163	210	1130	n	n	n
Costantini y col. (2008)	Consenso	163	341	1426	n	n	n
Salmaso y col. (2008)	Merzling	89	166	914	n	n	n
Salmaso y col. (2008)	Teroldego	89	168	1174	n	n	n
Salmaso y col. (2008)	Consenso	89	247	1309	n	n	n
Duchêne y col. (2009)	Moscatel Ottonel	212	84	569	n	n	n
Doligez y col. (2010)	MTP2223-27	139	187	1079	n	n	n
Doligez y col. (2010)	MTP2121-30	139	199	1143	n	n	n
Doligez y col. (2010)	Consenso	139	233	1204	n	n	n
Doligez y col. (2010)	MTP2687-85	174	96	935	n	n	n
Doligez y col. (2010)	Moscatel Hamburgo	174	105	1365	n	n	n
Doligez y col. (2010)	Consenso	174	119	1267	n	n	n
Duchêne y col. (2011)	Consenso	188	153	1131	n	n	n
Promedio		128	232	1195	1818	69	91

Todas estas inconsistencias, excepto la del GL 17, fueron subsanadas durante la construcción de los mapas marco mediante la eliminación de los marcadores que podían ocasionarlas, así como de las agrupaciones en los que la posición no era estadísticamente fiable, dejando únicamente el marcador más informativo y con menos distorsión. En el caso del GL 17, no fue posible modificar manualmente la ubicación de los marcadores en el mapa integrado, ya que con ello no posicionaba VVIQ22B. Al no existir distorsión en la segregación de los marcadores, podría pensarse en la existencia de una inversión cromosómica en

alguno de los parentales respecto de las variedades utilizadas para la construcción del mapa de referencia (Doligez y col., 2006 a), así como de la secuencia de Pinot Noir.

5.2. Análisis de los determinantes genéticos que controlan los caracteres de interés en uva de mesa

La disección de los componentes genéticos que regulan un determinado carácter, se realizó mediante el análisis de los datos fenotípicos del mismo sobre los mapas de ligamiento desarrollados. El programa informático empleado (MapQTL) analiza la asociación estadística entre la segregación del carácter y la segregación de los marcadores genéticos (que conforman el mapa) en la población (Jensen, 1989), de modo que si ésta es significativa, aparecerá reflejada en el mapa genético correspondiente como una región de máxima probabilidad denominada QTL (Quantitative Trait Loci). Los marcadores moleculares que configuran estas regiones son capaces de predecir un porcentaje de la variación fenotípica del carácter. Dichas regiones, especialmente aquellas que son detectadas de forma consistente o que han sido identificadas en otros fondos genéticos, habrán de ser acotadas mediante la incorporación en las mismas de más marcadores moleculares, a fin de identificar el marcador que maximice la predicción de la variación fenotípica, con el objeto de poder ser usado en programas de mejora genética. También se podrán desarrollar marcadores útiles a partir de secuencias de genes candidatos implicados en el carácter estudiado que, gracias a la información disponible en las bases de datos de la secuencia del genoma de la vid, y de anotaciones previas en la literatura, sabemos que posicionan en los intervalos de confianza de nuestros QTLs.

El estudio de la distribución de los caracteres fenotípicos en la progenie muestra la variabilidad generada mediante la hibridación de variedades, y permite estudiar el control genético de los caracteres en estudio. Dado que el mapeo simple de intervalos (MI) y el mapeo de QTLs múltiples (MQM) son test paramétricos, es decir, parten de una distribución normal de los datos fenotípicos, se realizaron las transformaciones pertinentes para ajustar los datos a este tipo de distribución, aunque no siempre se consiguió (apartado 4.2.1). También se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para la detección de QTLs, implementado en el programa MapQTL.

La desviación (transgresión) de los datos fenotípicos de la progenie respecto del rango establecido por los parentales, ofrece información acerca de la naturaleza

dominante de los genes que controlan la expresión del carácter (Eibach, 1990). Así, en una representación gráfica de la distribución fenotípica en la población, desviaciones con la misma intensidad hacia ambos lados del rango parental, indican que hay un porcentaje relativamente alto de efectos genéticos aditivos. Por el contrario, si existe una clara desviación en la distribución hacia uno de los lados de la gráfica, se puede afirmar que el carácter está controlado principalmente por genes dominantes. Es importante diferenciar aquí el significado del efecto aditivo de los genes que controlan un carácter, del *efecto aditivo* de un QTL. Tras el análisis MQM, se obtiene el *efecto aditivo* de cada marcador, que indica el efecto que tendría sobre el fenotipo la sustitución de los alelos del marcador. Este valor representa el efecto positivo o negativo que tiene el QTL sobre el carácter.

El estudio de las correlaciones fenotípicas entre caracteres permite, por un lado, reducir el número de caracteres que tienen que ser evaluados y, por otro lado, conocer el posible efecto que tiene la selección de un determinado carácter en el resto de caracteres. Pocas correlaciones entre caracteres fueron significativas, con coeficientes de Pearson (r) superiores a 0,5. Muchas de ellas se dieron entre parámetros del mismo carácter.

Dado que un limitado tamaño de la progenie puede ocasionar que el número de QTLs detectados esté infraestimado (Vales y col., 2005), se decidió establecer el 80% ($\alpha = 0,20$) como umbral mínimo de significación para la detección de QTLs. Por otro lado, un pequeño tamaño poblacional puede causar sobreestimación del efecto de los QTLs, por lo que los resultados serán considerados con la debida cautela.

Como punto de partida para la selección de genes candidatos implicados en los QTLs detectados, se revisaron en la literatura aquellos genes anotados que tuvieran función relacionada con el carácter, y cuya posición cromosómica estuviera dentro del intervalo de confianza LOD -1 de nuestros QTLs (Anexo 3), lo que fue determinado con las bases de datos del genoma de la vid (Grape Genome Browser; NCBI Map Viewer). No obstante, la disponibilidad de la secuencia del genoma de la vid permite establecer, como estrategia de futuro, la búsqueda masiva de genes candidatos en la región delimitada por cada QTL de interés. Los genes identificados tanto en la búsqueda preliminar como en la masiva, se emplearían para desarrollar marcadores y analizar el efecto de su variación genotípica sobre el fenotipo de éste y otros fondos genéticos. En caso de que resulten implicados en el carácter, se estudiaría la conveniencia de su inclusión en un pool de marcadores para programas de mejora genética, y se realizarían estudios de expresión de los mismos (mediante PCR cuantitativa o microarrays) en distintos puntos del

desarrollo o condiciones ambientales, con el fin de entender mejor los mecanismos genéticos implicados en el carácter.

5.2.1. Caracteres fenológicos

El efecto interanual del ambiente sobre los caracteres fenológicos se estudió a través de los análisis de separación de medias y de correlación (Tablas 4.2.1 y 4.2.3, respectivamente). Mientras que el primer análisis muestra las diferencias en la fecha promedio en que la población alcanza el correspondiente estado fenológico (desde el 1 de enero), el segundo pone de manifiesto las diferencias en el comportamiento de los híbridos. Todos los caracteres presentaron diferencias interanuales en el promedio poblacional, dejando patente la existencia de variaciones ambientales interanuales. Aunque los híbridos estuvieron sometidos a las mismas condiciones climáticas durante la misma campaña, no respondieron del mismo modo ante dichos cambios, de modo que podían adelantar o retrasar la entrada en cada estado fenológico con respecto al resto de individuos. Esto dio lugar a los bajos coeficientes de correlación (r) observados, en comparación con los caracteres de calidad.

El análisis de correlación entre los distintos caracteres fenológicos (Tabla 4.2.4) puso de manifiesto que solamente correlacionaron de forma constante (aunque con bajos valores de r) aquellos que se encontraban de forma más inmediata en el tiempo (ej. brotación vs floración, floración vs envero). Esto podría ser explicado porque, debido al tiempo que requieren los procesos fisiológicos para llevarse a cabo, es lógico que a corto plazo se comporten de un modo similar, es decir, que los híbridos que brotan los últimos, también tiendan a florecer los últimos, además de la similitud de las condiciones ambientales durante procesos fisiológicos correlativos.

El incremento de la temperatura producido por el cambio climático hace conveniente desarrollar variedades con una maduración más tardía, de modo que los parámetros de calidad no se vean afectados por las altas temperaturas (Duchêne y col., 2011; Bayo-Canha y col., 2012). Esto se consigue seleccionando híbridos de interés que además presenten maduración tardía para usarlos como parentales en futuros cruzamientos. Asimismo, la obtención de estas nuevas variedades incrementaría la competitividad a corto plazo, debido que se obtendrían producciones fuera del rango comercial. En nuestro caso, tras el análisis de QTL se detectaron regiones implicadas en el retraso de la maduración, una de ellas de forma consistente (GL 14).

Brotación. Nuestros resultados sugieren, coincidiendo con lo observado en dos progenies de vinificación (Duchêne y col., 2011; Bayo-Canha y col., 2012), que este carácter parece estar sujeto a un control genético mayoritariamente aditivo. La falta de consistencia en los QTLs detectados puede deberse al hecho de que solo existiera correlación significativa entre los datos de dos campañas (05-06), y con un valor de r inferior a 0,5 (Tabla 4.2.3). Esta situación probablemente se deba a que en esta última fase de la dormición invernal, la ecodormición, la brotación depende totalmente de las condiciones ambientales, a diferencia de la endodormición o la paradormición (Lang y col., 1987). De ahí que los productores de uva recurran al uso de productos químicos, como la cianamida de hidrógeno, para regular la brotación, adelantándola y haciéndola más uniforme.

Hay estudios que han identificado una gran cantidad de genes implicados en la salida de la dormición (apartado 1.3.1), pero todavía queda por dilucidar cuáles tienen más relevancia, así como el modo y el momento en que actúan muchos de ellos. Los resultados del MQM muestran dos regiones candidatas para la búsqueda de genes involucrados en la brotación, localizadas en los GLs 7_b y 12 (Tabla 4.2.7). La del GL 7_b, detectada en el mapa de Ruby Seedless de forma sugerente en 06, localizó muy próxima al QTL detectado por Duchêne y col. (2011). Esta región, a pesar de no haber sido detectada de forma consistente, merece una atención especial porque QTLs detectados en distintos fondos genéticos pueden indicar la expresión de los mismos genes en condiciones climáticas distintas, eliminando así el factor ambiental. Estos genes comunes podrían ser factores de transcripción a partir de los cuales se desarrolla el proceso metabólico implicado en la brotación. Finalmente, la relevancia de la región del GL 12, detectada en el mapa de Ruby Seedless (05 y 06) y el integrado (05), radica en su consistencia. No obstante, debido a la distancia de los cofactores óptimos (16,5 cM), y a que ambos presentaron distorsión, es preciso incorporar nuevos marcadores en la región para confirmar la presencia de un único QTL.

Floración. La distribución de los datos fenotípicos indica un control genético con carácter dominante, al igual que observaron Bayo-Canha y col. (2012) en una progenie de uva de vinificación. Aunque nueve de los once QTLs detectados en los mapas parentales tuvieron un efecto de adelanto en la fecha de floración (Tabla 4.2.8), el 73% de la progenie fue más tardía que los progenitores. Habría que estudiar las interacciones entre los genes responsables, así como las combinaciones alélicas en los parentales y en la progenie, para explicar esta circunstancia.

Dos de las regiones del genoma con mayor relevancia en nuestro estudio, por haber sido detectadas consistentemente e identificadas en otros fondos genéticos, localizaron en los GLs 2 y 14 del mapa de Ruby Seedless y del integrado, ambos con carácter significativo a nivel genómico en 07 y 05, respectivamente (Tabla 4.2.8). La región del GL 2 fue detectada de forma consistente en mapas desarrollados a partir de dos variedades de uva de mesa por Costantini y col. (2008), en un punto muy cercano al detectado en nuestros mapas, de modo que uno de los cofactores óptimos del mapa integrado (el SSR VVIB23) coincidió con el de estos autores. Además, Duchêne y col. (2011) también detectaron un QTL en la misma región del mapa consenso obtenido con una población de vinificación. En el intervalo LOD -1 de nuestro QTL localizó el gen *VvSOC1.3* (Díaz-Riquelme y col., 2009; Anexo 3), cuyo homólogo en *Arabidopsis*, *SOC*, se comporta como promotor de la floración, integrando señales de floración desde diferentes rutas. Por otro lado, el QTL del GL 14 localizó en un punto muy cercano al detectado por Duchêne y col. (2011). Este fue uno de sus QTLs de mayor efecto, en el cual encontraron varios genes candidatos implicados en el proceso de floración: *VvFUL-L*, *VvSEP1*, *VvCOL2* y *VvFLC2*. En el fragmento donde los intervalos de confianza de ambos QTLs solaparon, co-localizaron *VvFUL-L* y *VvSEP1* (Anexo 3). *VvFUL-L* se expresa muy pronto en los primordios no diferenciados o *anlagen*, y mantiene su expresión tanto en inflorescencias como en zarcillos (Calonje y col., 2004). *VvSEP1* está implicado en la identidad de los órganos florales (Díaz-Riquelme y col., 2009).

En el GL 15 del mapa de Moscatuel y del integrado se detectó una región cuyos intervalos de confianza LOD -1 solaparon con el QTL detectado por Duchêne y col. (2011) en el mapa de la variedad Riesling. En esta región localizó el gen *VvSOC1.1* (antiguo *MADS8*) (Anexo 3), que fue caracterizado como un regulador en la iniciación floral en vid (Sreekantan y Thomas, 2006).

Finalmente, es destacable el QTL que se detectó en el GL 18_a del mapa de Moscatuel con los datos de tres años, y en el integrado con los de 08, siendo significativo a nivel genómico en ambos mapas (08). Aunque no explicó un alto porcentaje de la varianza (8,7-18,7%), su importancia radica precisamente en su estabilidad entre campañas, teniendo en cuenta la variación interanual de las condiciones ambientales, que dificulta la obtención de QTLs estables para los caracteres fenológicos, especialmente en poblaciones de tamaño reducido como ésta. El gen *VvSVP2* localizó en el límite inferior del intervalo LOD -1 de ambos mapas (Anexo 3). Su homólogo en *Arabidopsis* parece mediar en la ruta de inducción floral dependiente de temperatura, de manera que junto con *FLC* regula a

otros integradores de la ruta de expresión floral, como *SOC1* y *FT* (Lee y col, 2007; Li y col., 2008). Estos datos, junto con la información que se tiene acerca de la expresión en vid de *VvFLC1*, *VvFLC2* y de la familia *VvSOC1*, sugieren un papel similar de estos genes en la vid (ver apartado 1.3.1).

Envero. El 83% de la progenie alcanzó el envero más tarde que los parentales. Esta desviación, también observada en una población de vinificación (Bayo-Canha y col., 2012), indica que el carácter está sujeto a un control genético principalmente dominante (Figura 4.2.1). No es de extrañar que en esta fase, en la que se producen una serie de cambios que afectan a procesos metabólicos muy distintos, predominen mecanismos genéticos con escasa interacción aditiva.

Por otro lado, la constante correlación interanual mostrada por estos datos fenotípicos, con valores de r superiores a 0,5 (Tabla 4.2.3), indica una mayor relevancia del componente genético frente al ambiental, en comparación con otros caracteres fenológicos. Este mayor predominio del factor genético, probablemente es debido a que el envero es una fase muy dependiente de factores de transcripción cuya expresión se debe a una secuencia programada de eventos que forma parte del reloj biológico de las células de las bayas (Robinson y Davies, 2000). Estos factores de transcripción inician rutas metabólicas que darán lugar a una nueva fase del desarrollo de las bayas, la maduración, donde sí cabe pensar en un mayor efecto aditivo de los genes que participan.

No obstante, el hecho de que el promedio poblacional fuera significativamente distinto en los tres años de evaluación, se debe precisamente a las diferencias climatológicas interanuales. Esta fase es la de mayor complejidad del ciclo fenológico por la cantidad de cambios metabólicos que suceden, por lo que cabe esperar que, ante un cambio ambiental, se requiera más tiempo de adaptación que en otros estados fenológicos como la brotación o la floración.

El envero mostró correlación positiva significativa ($P \leq 0,01$), aunque con un coeficiente de Pearson inferior a 0,5, con el número de semillas por baya, así como con el peso fresco y seco de los elementos seminales (Tabla 4.2.6). Esta asociación entre el desarrollo de la semilla y la entrada en envero, sugiere que el gasto energético requerido para el desarrollo de la semilla influye de modo determinante en la entrada a este estado fenológico. Esta correlación viene apoyada a nivel molecular, ya que se detectó un QTL común para estos caracteres, localizado en el mismo punto del GL 18, compartiendo como cofactor óptimo al SSR VMC7F2.

Todos los QTLs de Ruby Seedless y la mitad de los de Moscatuel contribuyeron a retrasar el envero, lo que explica que Ruby Seedless sea el parental más tardío en llegar a este estado fenológico. Uno de los QTLs localizó en la misma región del GL 18 de los tres mapas, de carácter sugerente excepto un año en que fue significativo, y con un efecto aditivo que también corresponde al comportamiento de los parentales. Duchêne y col. (2011) detectaron la misma región de forma constante, cuyos intervalos de confianza solaparon parcialmente con los de nuestros mapas (Tabla 4.2.9, Figura 4.1.1). Estos autores identificaron cuatro genes candidatos en sus intervalos de confianza, dos de los cuales co-localizaron con el QTL de nuestro mapa consenso. Son los factores de transcripción dependientes de ácido abscísico (ABA), *VvMSA* y *VvABF7* (Anexo 3). En concreto, es conocida la función de *VvMSA* como reguladora de la expresión del transportador de hexosas, *VvHT1*, en bayas de vid (Çakir y col., 2003). Existen numerosos indicios que otorgan un papel relevante del ABA sobre el inicio del envero y el resto de la maduración. Coombe y Hale (1973) ya observaron un incremento abrupto de ABA en el inicio del envero, y recientemente se ha observado en esta fase un incremento en la expresión de numerosos genes dependientes de esta hormona (ver apartado 1.3.1). Otro de los genes que subyace a este QTL es el factor de transcripción *VvAGL11* (Anexo 3), cuyo homólogo en *Arabidopsis* se expresa durante el desarrollo de la semilla, así como en el fruto durante el pre- y el post-envero (Mejía y col., 2011), lo que sugiere la influencia de este gen sobre este estado fenológico en vid.

En los tres mapas se detectó un QTL sugerente en la región inferior del GL 7, que siempre contribuyó al retraso del envero. Duchêne y col. (2011) también detectaron un QTL en la parte inferior del GL 7 del mapa de la variedad Riesling, pero no podemos afirmar que se trata del mismo QTL, ya que desconocemos la extensión que tienen sobre la totalidad del GL los intervalos de confianza de los QTLs de ambos trabajos.

La región detectada de forma consistente en el GL 3 del mapa de Ruby Seedless y del integrado, significativa a nivel genómico en 07, habrá de ser saturada con más marcadores para determinar la existencia de uno o dos QTLs, ya que en el mapa integrado los intervalos de confianza LOD -1 no fueron solapantes.

Otros QTLs de interés para la búsqueda de genes candidatos, por haber sido detectados de forma consistente, localizaron en el GL 5_a del mapa de Ruby Seedless (05, 07 y 08) y del integrado (05), y en los GLs 1 y 17 de Moscatuel.

Maduración. Este carácter parece estar sujeto a un control genético aditivo, ya que la transgresión fue más equilibrada hacia ambos sentidos. Una vez iniciados los procesos metabólicos en el envero, con un control genético marcadamente dominante, éstos se desarrollan paulatinamente, con un ritmo que depende en mayor medida de las condiciones climáticas que de factores de transcripción regulados por el reloj biológico intracelular.

A medida que avanza el desarrollo de los distintos estados fenológicos, dentro de cada estado fenológico va aumentando la amplitud entre los híbridos más tempranos y los más tardíos, llegando a ser de más de dos meses en el caso de la maduración (Tabla 4.2.1). El inicio del envero determina de forma crítica la fecha de maduración (Deluc y col., 2007). El carácter dominante de los genes que determinan la entrada en el envero, tiende a acentuar las diferencias entre los individuos que portan alelos que la retrasan, frente a los que portan alelos que la adelantan. No obstante, la amplitud en la población se incrementa más del doble desde el envero hasta la fecha de maduración, por lo que podría haber otros factores que influyen sobre la velocidad de maduración de cada híbrido. Al no existir correlación significativa con otros caracteres evaluados, parece que el proceso de maduración depende en mayor medida de la respuesta de los híbridos frente a los factores climáticos.

En cuanto a los QTLs detectados, el que se detectó de forma sugerente en el GL 18_b del mapa de Ruby Seedless, fue también detectado por Mejía y col. (2007) en la progenie del cruce entre Ruby Seedless y Sultanina, coincidiendo el cofactor óptimo (el SSR VMC7F2). Estos autores discutieron el posible efecto pleiotrópico de la presencia de semillas sobre la fecha de maduración, ya que el QTL detectado para este carácter co-localizó con el identificado para la apirenia, y además los híbridos apirenos maduraron antes que los que tenían semillas. En nuestra progenie se detectó, de forma constante, un QTL en el mismo punto para los parámetros relacionados con la apirenia, aunque no se dio una correlación entre los datos fenotípicos de apirenia y maduración.

Del resto de QTLs, merecen atención los detectados al menos en dos campañas, localizados en los GLs 1 (M, I), 12 (R, I) y 14 (M, I), teniendo los dos primeros carácter significativo a nivel genómico en 07 y 08, respectivamente.

La correlación constante mostrada entre el envero y la maduración (Tabla 4.2.4) se puso de manifiesto en que se detectaron QTLs comunes para ambos caracteres, en los GLs 3 y 5 del mapa de Ruby Seedless, contribuyendo en todos los casos al retraso en la entrada de los dos estados fenológicos (Tablas 4.2.9 y 4.2.10). Asimismo, se detectó la misma región en el GL 1 del mapa de Moscatuel,

siempre adelantando la fecha de ambos estados fenológicos. Por otro lado, la región inferior del GL 18 detectada para el envero en los tres mapas, también fue detectada para la maduración en el de Ruby Seedless, aunque el efecto en este mapa fue opuesto para ambos caracteres. Estas regiones comunes, que sugieren la existencia de genes cuya actividad comienza en el envero y se mantiene durante el proceso de maduración, podrían contener factores de transcripción que regulan el proceso de maduración desde el principio, convirtiéndose en buenas candidatas para la búsqueda de genes posicionales.

Además de los datos presentados, también se estudiaron en la progenie otros parámetros relacionados con la maduración de la uva, como son el contenido de ácidos orgánicos (ácido tartárico y málico) y de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa). Estos parámetros se evaluaron durante dos campañas, en colaboración con la Dra. Pilar Hellín (Equipo de Calidad Alimentaria del IMIDA), y se están analizando junto con los datos genotípicos para localizar las regiones genómicas implicadas (Hellín y col., en preparación).

5.2.2. Caracteres de productividad y calidad

A excepción de la productividad, el promedio poblacional de estos caracteres no varió significativamente entre años, o lo hizo en muy poca extensión como en los casos del peso y diámetro de las bayas, o el número total de elementos seminales por baya (Tabla 4.2.2). Los datos fenotípicos de productividad y calidad mostraron en general unos coeficientes de correlación interanuales superiores a los caracteres fenológicos, siendo los más bajos los de fertilidad y peso del racimo (Tabla 4.2.3). Estos resultados sugieren una menor influencia de los factores ambientales de cada campaña en el fenotipo de estos caracteres, con excepción de la fertilidad. En este carácter, son las condiciones climáticas de la campaña anterior a la evaluación las que influyen en este parámetro (apartado 1.3.2).

La ausencia de correlación entre caracteres indica que genéticamente son independientes, como sucedió en este trabajo con el índice de fertilidad, el color de las bayas, y el flavor moscatel. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la selección de híbridos con bayas de mayor tamaño implica a su vez una selección de híbridos con racimos de mayor tamaño, y con un menor grado de apirenia (Tabla 4.2.5).

Fertilidad. La distribución de los datos fenotípicos en la población (Figura 4.2.2) muestra un modelo dominante hacia valores de baja fertilidad, coincidiendo con otros autores y poblaciones (Eibach 1990; Fanizza y col., 2005; Doligez y col., 2010; Bayo-Canha y col., 2012), lo que pone de manifiesto la dificultad de obtener variedades muy fértiles. La baja correlación estadística interanual pone de manifiesto la influencia que los factores ambientales tienen sobre este carácter (Tabla 4.2.3), siendo los más determinantes la intensidad lumínica y la temperatura que recibieron las yemas durante la campaña anterior a la de la evaluación (apartado 1.3.2). Esta influencia podría explicar que la mayoría de los QTLs detectados para este carácter no sean consistentes y se den con los datos de una sola campaña. La distribución continua del carácter en la población indica que está controlado por un gran número de genes de efecto menor, lo que justificaría que el porcentaje de variación fenotípica explicado por los QTLs detectados en este trabajo sea relativamente bajo, con un promedio del 14% de la variación fenotípica explicada. Algunos de ellos no han sido detectados, probablemente debido al limitado tamaño de la población de mapeo.

La única región relacionada con la fertilidad detectada con datos de más de una campaña en dos mapas, localizó en la parte superior del GL 14 del mapa de Moscatuel y del integrado (Tabla 4.2.11). Resulta llamativo que el efecto de este QTL sea el de incrementar la fertilidad, ya que Moscatuel es el parental menos productivo. En esta región co-localizó un gen homólogo a *GID1a* de *Arabidopsis* (Anexo 3), que en esta especie está implicado en el metabolismo del ácido giberélico, influyendo de modo determinante en la fertilidad. *GID1a* es un receptor de giberelinas que en *Arabidopsis* provoca tanto la pérdida de función como la degradación de las proteínas DELLA, cuya función es reprimir la actividad del ácido giberélico (Boss y Thomas 2002; Ariizumi y col., 2008). En vid, al contrario que en *Arabidopsis*, la disminución de giberelinas provoca un incremento en la fertilidad. La ganancia de función de una de estas proteínas DELLA, en concreto de *VvGAI*, provoca un incremento en el número de racimos por tallo (Boss y Thomas, 2002). Si realmente es el homólogo en vid de *GID1a* (*VvGID1a*) el gen implicado en este QTL, para provocar un incremento en la fertilidad, como es el caso, debería dejar de transcribirse, o ser reprimido de algún modo por otras proteínas, de modo que se permitiera actuar a las proteínas DELLA encargadas de reprimir la acción del ácido giberélico, y por tanto provocar así este incremento de la fertilidad. No obstante, esta hipótesis tendrá que ser investigada en futuros ensayos de expresión génica, y en distintos fondos genéticos. Este QTL fue detectado en un mapa marco, por lo que se hace necesaria la saturación de la región con más marcadores para acotar

el tramo implicado en el carácter, y comprobar si coincide con la posición donde se encuentra *VvGID1a*. Para ello es conveniente desarrollar un marcador molecular a partir de este gen, que por otro lado, debido a la consistencia de los resultados y al relativamente alto porcentaje de varianza fenotípica explicada por este QTL, se perfilaría como un buen candidato para su uso en programas de mejora genética.

En el mapa de Ruby Seedless se detectó de forma consistente un QTL en el GL 5_a, de carácter sugerente, que contribuyó al incremento de la fertilidad. Doligez y col. (2010) identificaron un QTL en la parte superior del GL 5 con datos de dos poblaciones de uva de mesa, mostrando en cada población un efecto aditivo opuesto. Por la localización de los marcadores moleculares, ésta podría corresponder a la región detectada en nuestro mapa, aunque es preciso incorporar marcadores para confirmarlo, ya que esta región se encuentra fragmentada.

El resto de QTLs se detectaron con datos de una sola campaña. Algunos de ellos co-localizaron con genes cuyos homólogos en *Arabidopsis* están relacionados con la fertilidad, y otros cuya relación con este carácter ya ha sido demostrada en vid. Así, el QTL detectado en el GL 7_a del mapa de Ruby Seedless co-localizó con el homólogo del receptor de ácido giberélico de *Arabidopsis* *GID1b* (Anexo 3). Este es uno de los receptores implicados en la degradación de las proteínas DELLA en *Arabidopsis* (Ariizumi y col., 2008), y cuya función podría ser extrapolable a la vid. No obstante, el intervalo de confianza LOD -1 de este QTL ocupa una región de 24,8 cM, en la que hay un número muy alto de genes, por lo que sería conveniente saturarla con más marcadores (entre ellos *VvGID1b*) y realizar un nuevo análisis de QTL con el fin de acotar más la región.

El QTL detectado en el GL 18 del mapa de Ruby Seedless co-localizó con cuatro genes que ejercen distintas funciones en el desarrollo reproductivo de la vid (Anexo 3). Uno de ellos es *VvSVP2*, homólogo a *SVP2* de *Arabidopsis*, cuya función en esta especie es la de regular la inducción floral con dependencia de la temperatura. En vid se expresa en yemas latentes durante el año antes de la brotación, pudiendo tener una función similar (Díaz-Riquelme y col., 2009). Otro gen que co-localizó con este QTL es *VvAGL17.1*, que se expresa principalmente en frutos y en raíces de vid. No obstante, en *Arabidopsis* se ha descrito recientemente a *AGL17* como un promotor de la floración (Han y col., 2008). El tercer gen dentro del intervalo LOD -1 es *VvAP3.1*, que en vid se expresa principalmente en flores (Díaz-Riquelme y col., 2009), y en *Arabidopsis* está implicado en la identidad de órganos florales. Por último, este QTL co-localizó con un gen que codifica para una citoquinina oxidasa (CF404552, anotada por Deluc y col., 2007), que puede tener un efecto significativo sobre la fertilidad, ya que se sabe que las citoquininas son

promotoras de la floración en vid (Srinivasan y Mullins, 1980). De estos cuatro genes, *VvSVP2* es el único directamente implicado en la inducción floral, por lo que cabría esperar que fuera el que mayor influencia tuviera sobre el fenotipo, junto con el gen que codifica para la citoquinina oxidasa. En principio se podría pensar que el efecto sobre la fertilidad de *VvSVP2* y del gen que codifica para la citoquinina oxidasa es el de incrementar el número de racimos por sarmiento. Aun así, sería conveniente saturar esta región con marcadores para determinar si, efectivamente, se detectan dos QTLs independientes y con efecto similar, o por el contrario es un único QTL en el que podría estar implicado tan solo uno de estos genes.

En la parte inferior del GL 14 del mapa de Moscatuel se detectó un QTL con los datos de una campaña (06), de efecto aditivo positivo, que coincidió con el detectado por Doligez y col. (2010), con el mismo efecto sobre la fertilidad. En esta región hay anotado un gen homólogo a *GASA4* de *Arabidopsis* (Anexo 3), que promueve la identidad de los meristemos florales como respuesta al incremento de ácido giberélico (Aubert y col., 1998; Roxrud y col., 2007). En este mapa también se localizó, dentro del intervalo de confianza del QTL del GL 12, el gen *VvAGL12*, cuyo homólogo en *Arabidopsis* está implicado en la promoción de la floración.

Por último, de los dos QTLs detectados en el GL 8 del mapa integrado, el detectado de forma significativa en la parte inferior del mismo podría corresponder al detectado por Fanizza y col. (2005) en la misma región, aunque estos autores usaron una metodología distinta para medir la fertilidad, contando el número de racimos por planta en el momento de la maduración, en lugar del número de racimos por sarmiento durante la floración. En el intervalo de confianza LOD -1 de este QTL localizó el gen *VvAGL15.2*, perteneciente a la misma familia que *VvAGL12*, y en el intervalo de confianza LOD -2 del segundo QTL detectado en este GL, posicionó el gen *VvTFL1B*, relacionado con la determinación de los meristemos florales (Anexo 3).

Peso del racimo. La distribución fenotípica del peso del racimo indica que este carácter está gobernado por un elevado número de genes de efecto menor y carácter aditivo. La transgresión fenotípica fue ligeramente superior hacia racimos de menor tamaño que los progenitores, al igual que se observó en otras poblaciones aunque de manera más acusada (Fanizza y col., 2005; Bayo-Canha y col., 2012). Esta tendencia coincidió con el efecto aditivo negativo presentado por doce de los trece QTLs detectados en los mapas parentales. No obstante, la presencia en la población de racimos de peso superior a los progenitores, sugiere la

presencia en éstos de alelos que contribuyen a incrementar el peso, y que se ponen de manifiesto en la progenie bajo determinadas combinaciones alélicas.

Aunque el peso del racimo está correlacionado con el tamaño de las bayas (Tabla 4.2.5), principalmente está determinado por el número de bayas que se desarrollan en éste tras el cuajado (Smart y col., 1982; Dunn y Martin, 2000; López-Miranda y Yuste, 2004; Fanizza y col., 2005). El número de bayas que quedan en un racimo depende de varios factores, entre los cuales están la correcta fecundación de las flores (que depende en gran medida de las condiciones climáticas), el estado nutricional de la planta antes, durante y después de la fecundación, el flujo de savia hacia los racimillos, o los ataques de patógenos (especialmente el mildiu) durante la floración (Hidalgo, 2002). Este elevado número de factores que pueden afectar de manera individual al peso del racimo de cada planta, explicaría que este carácter muestre los valores de correlación interanuales más bajos dentro de los caracteres de calidad evaluados (Tabla 4.2.3), y en cambio no existan diferencias significativas entre el promedio poblacional de las distintas campañas (Tabla 4.2.2).

El análisis MQM permitió detectar consistentemente una región en la parte inferior del GL 18 de los tres mapas, con el mismo cofactor (el SSR VMC7F2) en todos los casos, que contribuyó a la disminución del tamaño de los racimos. La localización de este QTL coincide con la posición del locus *SDI* (*Seed Development Inhibitor*, ver apartado 1.3.2), causante del carácter estenospermocárpico de las bayas. Desde el punto de vista fisiológico, es bien conocido que las semillas producen ácido giberélico, estimulando la expansión celular y por tanto incrementando el tamaño de las bayas. Así, se espera que los híbridos con semilla tengan unas bayas de mayor tamaño, y por tanto unos racimos más grandes. Esto, junto con la correlación observada entre el peso del racimo y los parámetros relacionados con la apirenia (Tabla 4.2.5), también observada por otros autores (Fanizza y col., 2005; Bayo-Canha y col., 2012), indica un posible efecto pleiotrópico del locus *SDI* sobre la apirenia y el peso del racimo.

Por otro lado, se detectaron dos regiones que cobraron una relevancia especial al haber sido detectadas en otro fondo genético. Localizaron en el GL 5 del mapa de Moscatuel y del integrado, y en el GL 16 del mapa de Ruby Seedless (Tabla 4.2.12). Ambas regiones fueron detectadas para el mismo carácter por Fanizza y col. (2005) en el mapa de las variedades de uva de mesa Big Perlon e Italia, respectivamente. Aunque se desconoce el intervalo de confianza de los QTLs detectados por Fanizza, es probable que se solape con los nuestros, en especial el

del GL 16, ya que los cofactores óptimos de ambos trabajos posicionaron a 8,7 cM en el mapa de Ruby Seedless (Figura 4.1.1).

Peso y diámetro de las bayas. La alta correlación mostrada por el peso (PM_B) y el diámetro (DM_B) de las bayas (Tabla 4.2.5), confirmada por otros autores (Barticevic y col., 2004), se ha traducido en resultados muy similares para ambos caracteres en el análisis de QTL. Es por ello que estos dos caracteres serán tratados de forma conjunta en este apartado, englobados bajo el nombre de *tamaño* de las bayas.

Ambos caracteres segregaron de forma similar en la progenie, con una transgresión predominante hacia valores superiores a los parentales, lo que indica un cierto carácter dominante de los genes implicados en los mismos. El tamaño de las bayas fue inferior en el año 08 tanto en los parentales como en la progenie, llegando a presentar diferencias significativas con algunas campañas (Tabla 4.2.2). La presencia de un mayor número de bayas por racimo en 08 podría explicar el menor tamaño de las mismas, aunque no podemos confirmar esta hipótesis dado que este dato no fue evaluado en ninguna campaña.

El análisis de QTLs puso de manifiesto una región implicada de forma constante en el tamaño de las bayas, localizada en la parte inferior del GL 18 de los tres mapas, donde el cofactor óptimo fue el SSR VMC7F2 en 20 de las 24 ocasiones en que se detectó (Tablas 4.2.13 y 4.2.14). Esta región fue detectada también por otros autores [Doligez y col., 2002 (peso); Cabezas y col., 2006 (peso); Mejía y col., 2007 (peso y diámetro)], y coincide con el QTL detectado para los parámetros relacionados con la apirenia. Las semillas producen ácido giberélico, hormona que incrementa el tamaño de las bayas debido a su efecto sobre la expansión celular. Como se comentó para el peso del racimo, es probable que el locus *SDI* que subyace al QTL relacionado con la apirenia, ejerza un efecto pleiotrópico sobre el tamaño de las bayas. Esta influencia del carácter apireno sobre el tamaño de las bayas, observada en otros fondos genéticos (Barticevic y col., 2004; Cabezas y col., 2006; Mejía y col., 2007), también se puso de manifiesto por la correlación positiva entre estos caracteres (Tabla 4.2.5).

Entre las otras regiones del genoma implicadas en el tamaño de la baya, destaca la detectada en el GL 5 del mapa de Moscatuel y del integrado. En el mapa de Moscatuel explicó el 5,7-9,4% de la varianza fenotípica, y en el mapa integrado el 11,5-44,4%. El hecho de explicar un porcentaje de variación fenotípica significativamente superior en el mapa integrado que en el parental, indica cierto nivel de dominancia de este locus (Doligez y col., 2010).

En el GL 1 se identificó de forma consistente un QTL para el DM_B en el mapa de Moscatuel y en el integrado, siempre con el mismo cofactor óptimo (el SSR VMC8A7). Considerando a los parentales, el hecho de que se haya detectado solo en el mapa de Moscatuel, que tiene bayas con forma esférica-achatada y con un diámetro mayor que el de Ruby Seedless, podría indicar que esta región está relacionada con la forma esférica de la baya, que hace que a pesos similares, el diámetro de Moscatuel sea mayor. En base a estos resultados sería interesante buscar en esta región genes relacionados con la forma de la baya. Costantini y col. (2008) detectaron un QTL para el PM_B en esta región, coincidiendo con nuestros resultados obtenidos con el método MI (datos no presentados).

Todos los QTLs presentaron un efecto de disminución del tamaño de las bayas, excepto las regiones detectadas para PM_B en los GLs 5 y 15 de los mapas de Ruby Seedless y Moscatuel, respectivamente (Tabla 4.2.13). Esto es lógico para el QTL del GL 18, ya que al inhibir el desarrollo de la semilla no se producen las giberelinas necesarias para el crecimiento de la baya. El papel que desempeñan las otras regiones es más discutible, dado que aunque estén influyendo sobre el desarrollo de la baya de forma independiente, en última instancia podrían estar bajo el dominio del locus *SDI*, como postula el modelo de Bouquet y Danglot (1996), o puede que estén actuando de este modo debido precisamente al déficit de giberelinas provocado por este locus. Habría que analizar otras poblaciones derivadas de cruzamientos entre variedades con semilla, y semilla x apirena para comprobar estas hipótesis.

Textura de las bayas. Considerando que las bayas de Moscatuel son muy blandas, la presencia de un 10% de híbridos con textura más crujiente que Ruby Seedless puede deberse a que, del gran número de genes implicados en este carácter (apartado 1.3.2), algunos presenten en ambos parentales alelos que contribuyen al fenotipo crujiente, pudiendo dar lugar a híbridos con textura más consistente que Ruby Seedless.

Los datos de este carácter mostraron una distribución con cierta asimetría positiva en todas las campañas, pero con una mayor transgresión hacia valores de textura superiores al promedio del parental más crujiente, Ruby Seedless. De cualquier modo, el 87% de los híbridos presentaron valores recogidos en el rango establecido por los parentales, indicando que éste es un carácter controlado por genes con efecto fundamentalmente aditivo. Este dato está apoyado por la poca diferencia de varianza fenotípica explicada por los QTLs detectados entre los mapas parentales y el integrado (Doligez y col., 2010).

Los análisis interanuales de varianza y correlación (Tablas 4.2.2 y 4.2.3, respectivamente) muestran una baja incidencia de las condiciones ambientales sobre el carácter. Uno de los mayores condicionantes ambientales para el mismo, la disponibilidad de agua en el suelo, se mantuvo abundante y constante durante las cuatro campañas mediante el programa seguido de fertirrigación. Por otro lado, la textura correlacionó de forma constante y positiva, aunque con valores bajos de r , con el tamaño de las bayas (Tabla 4.2.5). Desde el punto de vista fisiológico, cabe pensar que el requerimiento energético para producir el ablandamiento es mucho mayor en racimos con bayas más grandes, ya que si son tomadas como esferas, cualquier incremento en su radio multiplica el incremento del volumen ($V = 4\pi r^3/3$).

El análisis de QTLs sobre los mapas de los parentales pone de manifiesto una clara relación entre el efecto de los QTLs y el fenotipo mostrado por ellos. Así, todos los QTLs detectados en el mapa de Ruby Seedless, parental con textura más crujiente, presentaron un efecto de incremento de la consistencia de las bayas (Tabla 4.2.15). Del mismo modo, los QTLs del mapa de Moscatuel, excepto el detectado en el GL 18_a (08), presentaron un efecto de ablandamiento del fruto. Era de esperar que se detectaran múltiples QTLs de efecto menor para la textura, debido al gran número de enzimas que intervienen en el proceso de ablandamiento (apartado 1.3.2).

La disponibilidad de información respecto a posibles genes implicados en la textura de las bayas (Terrier y col., 2005; Deluc y col., 2007; Fouquet y col., 2008; Glissant y col., 2008), permitió localizar genes candidatos en los intervalos de confianza de los QTLs detectados, mostrados en el Anexo 3. En el intervalo LOD -1 del QTL detectado en el GL 9 del mapa integrado y de Moscatuel, localizó un gen que codifica para una proteína rica en prolina. Podría tratarse de una extensina, dado que su función putativa está relacionada con la modificación de la pared celular (Deluc y col., 2007). En el mismo QTL del mapa integrado, co-localizó además un gen codificante de acuaporina en el intervalo LOD -1 en 07 y LOD -2 en 08. Las acuaporinas son proteínas de las membranas de las células encargadas de transportar el agua a través de los compartimentos celulares (apartado 1.3.2). Por último, fuera del mapa de Moscatuel (a 309 kb del marcador VMC1C10), se identificó un tercer gen con putativa función pectin-esterasa, y por tanto, implicado en la degradación de la pared celular.

El QTL identificado en la parte inferior del GL 11 con los datos de 07 en los tres mapas de ligamiento (Tabla 4.2.15, Figura 4.1.1), co-localizó con una xiloglucan endotransglicosilasa y una xilosa isomerasa, de la que se publicó el

contig en la que se encuentra, pero no su ubicación exacta dentro del mismo. Además, dentro del intervalo LOD -1 de este QTL en el mapa de Moscatuel (07), y su correspondiente intervalo LOD -2 del mapa integrado y de Ruby Seedless (07), posicionó un gen que codifica para una proteína rica en prolina, que podría tratarse de una extensina. Finalmente, en la parte inferior del SSR VVIP36B (a 474 kb), se encontró otra xilosa isomerasa. Este QTL, acorde con el fenotipo de los parentales, presentó un efecto de incremento de la consistencia en Ruby Seedless, y de disminución en Moscatuel, sugiriendo cierta relevancia de la región sobre la textura en el punto de maduración.

Respecto al QTL detectado en la parte superior del GL 11 del mapa integrado, en su intervalo de confianza LOD -1 co-localizó con un gen que codifica para una pectin-metilesterasa. Relacionados con el metabolismo de la pared celular, también se localizaron una poligalacturonasa y una pectin-metilesterasa, pero fuera del mapa (a 86,5 kb y 462,4 kb por encima del SSR VMC3E12, respectivamente). Para determinar si este QTL corresponde al detectado en la misma zona del mapa de Moscatuel, se ha de ampliar la región con nuevos marcadores en este último mapa, y volver a realizar un análisis QTL.

La región detectada en la parte superior del GL 18 en el mapa integrado (05, 07 y 08) y en el mapa de Moscatuel (08) parece estar relacionada con el metabolismo de la pared celular, ya que en el intervalo LOD -1 co-localizaron una enzima ramificadora de α -1,4 glucanos, una α -expansina, una pectato liasa, dos β -xilosidasas y una proteína codificante de arabinogalactano. Este elevado número de genes sugiere, por un lado, el efecto aditivo de los mismos sobre el carácter, y por otro, la presencia en esta región de uno o varios elementos reguladores que podrían afectar a la expresión de dichos genes estructurales (Mitchell-Olds y Pedersen, 1998). Resulta llamativo que el efecto del QTL en el mapa de Moscatuel sea el de incrementar la firmeza, cuando se trata del parental blando, lo que lleva a pensar que esta región podría ser la responsable del 10% de híbridos con textura más consistente que Ruby Seedless. En lo que a Moscatuel respecta, sería interesante estudiar el comportamiento de los genes implicados en el ablandamiento en diferentes puntos del desarrollo de las bayas. Por otro lado, fuera del intervalo de confianza del QTL identificado en la parte inferior de este GL, se localizó una endo-1,4- β -glucanasa.

El QTL detectado en el GL 7_a del mapa de Ruby Seedless (05 y 08) co-localizó con dos β -glucosidasas, dos pectin-esterasas, una celulasa y una β -xilosidasa, relacionadas con la desestabilización de la pared celular. Si bien la última enzima co-localizó en el intervalo LOD -1 en las dos campañas, el resto lo

hicieron en el intervalo LOD -1 del QTL detectado en 08, y en el intervalo LOD -2 del QTL detectado en 05. El hecho de ser un QTL con efecto positivo (incremento de la firmeza) sugiere que estos genes están sufriendo un proceso de silenciamiento que resulta tener un efecto significativo en la textura firme de Ruby Seedless. Por otro lado, con el QTL del GL 7_b del mapa de Ruby Seedless (06), co-localizaron una xiloglucan endotransglucosilasa, una celulosa sintasa y una α -galactosil-transferasa.

Merecen también una mención los dos QTLs que fueron detectados de forma significativa a nivel genómico en los GLs 5 y 13 del mapa de Moscatuel con los datos de 07. En el primero localizaron seis genes relacionados con la degradación de la pared: una β -xilosidasa, una 1,3- β -glucanasa, una glicoproteína rica en hidroxiprolina, una β -glicosidasa, una poligalacturonasa, y una β -6-xilosil-transferasa. El QTL del GL 13 co-localizó con dos pectato liasas. Ambos QTLs, junto con el detectado en el GL 11 ese año, explicaron el 33,5% de la varianza fenotípica ese año, lo que indica la relevancia de estas regiones. Además de dichas regiones, en los QTLs detectados en los GLs 8_a (08) y 10 (05) de este mapa, co-localizaron una glicosil-transferasa y un gen codificante de arabinogalactano, respectivamente.

Respecto al mapa integrado, en el QTL detectado en la parte inferior del GL 13 (05) co-localizaron una glucano sintasa y una celulosa sintasa, dos enzimas relacionadas con la síntesis de la pared celular. Por otro lado, el QTL detectado en el GL 1 de este mapa (08) co-localizó con una β -glucosidasa y una β -xilosidasa. Los modelos de control del carácter establecidos cada año en este mapa explicaron entre el 42% y el 52% de la varianza fenotípica, excepto con los datos de 05 (13,4%). Este es un porcentaje alto, teniendo en cuenta el perfil especialmente poligénico de este carácter. Aunque el limitado tamaño poblacional podría ocasionar una sobreestimación del efecto de los QTLs (Vales y col., 2005), la gran amplitud en la segregación fenotípica de esta población pudo haber compensado la necesidad de un mayor tamaño poblacional.

No fue posible contrastar estos resultados, puesto que hasta la fecha no tuvimos constancia de ningún trabajo publicado que abordara el estudio de la textura de las bayas de vid mediante análisis de QTLs. Es por ello que, con el objeto de confirmar los QTLs detectados en esta progenie, se hace necesario emplear otras poblaciones segregantes para este carácter, así como realizar análisis de asociación empleando poblaciones naturales (germoplasma), ya que la vid es una especie que muestra una gran variabilidad genética con un alto nivel de desequilibrio de ligamiento (Barnaud y col., 2006).

Color de las bayas. La ausencia de coloración en las bayas está determinada por la presencia en homocigosis del retrotransposón *Gret1* en la zona promotora del gen que codifica para el factor de transcripción *VvmybA1*, denominándose *VvmybA1a* al alelo no funcional responsable de la ausencia de color (Kobayashi y col. 2002, 2004, 2005, 2007). Diferentes estudios han demostrado la dominancia de los alelos funcionales del gen *VvmybA1*, responsables de la síntesis de antocianinas (Kobayashi y col., 2002, 2004, 2005; Lijavetzky y col., 2006; Azuma y col., 2007).

Lijavetzky y col. (2006) mostraron que Ruby Seedless presenta un alelo funcional en heterocigosis con el alelo no funcional de *VvmybA1*, coincidiendo con los resultados obtenidos por nosotros (datos no mostrados), en los que además se comprobó que Moscatuel es homocigota para el alelo no funcional de *VvmybA1*. En nuestra progenie, la mitad de los híbridos presentaron coloración en sus bayas, independientemente de la tonalidad e intensidad de la misma, mientras que la otra mitad tuvo ausencia de color (Figura 4.2.2). Esta distribución fenotípica coincide con la distribución mendeliana esperada para un carácter monogénico, en el que el 'alelo de color' *VvmybA1c* es dominante sobre el 'alelo blanco' *VvmybA1a*. El 30% de la progenie presentó valores de CIRG superiores a los de Ruby Seedless, llegando incluso al negro. La existencia de híbridos más oscuros que Ruby Seedless indica la presencia de otros genes que actúan en la ruta biosintética de antocianos, dando lugar a la variación cuantitativa del color. Fournier-Level y col. (2009) identificaron cinco polimorfismos en los genes *VvmybA1*, *VvmybA2* y *VvmybA3*, responsables del 84% de la variación en la cantidad de antocianos en su población de estudio. Y dedujeron la existencia de otros loci implicados en la biosíntesis de antocianinas, como demuestran Deluc y col. (2008) con la descripción de *Vvmyb5b*, que actúa de forma marginal sobre la expresión de *VvUFGT* (apartado 1.3.2).

El QTL identificado en el GL 2 explicó hasta el 68% de la variación fenotípica del color, co-localizando en esta zona los mencionados genes *VvmybA1*, *VvmybA2* y *VvmybA3* (Anexo 3). Además se detectaron otros dos QTLs que explicaron un bajo porcentaje de variación fenotípica. Uno de ellos localizó en el GL 17 del mapa de Ruby Seedless. El segundo QTL de efecto menor, localizado en el GL 16 del mapa integrado (06), fue detectado en dos campañas mediante MI. El hecho de detectar este QTL únicamente en el mapa integrado, sugiere la presencia de un locus en heterocigosis en ambos progenitores, que solo con determinadas combinaciones alélicas tendría un efecto fenotípico significativo en los híbridos. En este GL se localizó el gen *VvUFGT*, aunque en una posición muy alejada del cofactor óptimo, por lo que no se descarta la existencia en esta región de elementos

reguladores que pudieran intervenir en la expresión del mismo, además de otros genes implicados en la ruta de biosíntesis de antocianinas.

Además de los resultados presentados, en colaboración con la Dra. Pilar Flores se ha llevado a cabo un análisis del contenido de antocianinas en nuestra población de mapeo y en las variedades parentales (datos no mostrados). Durante dos campañas se ha analizado la acumulación de cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina, y con los mismos se está llevando a cabo el correspondiente análisis de QTLs (Flores y col., en preparación).

Apirenia. El desarrollo de la semilla está controlado por el locus dominante *SDI* (*Seed Development Inhibitor*), y el SSR VMC7F2 está estrechamente ligado a este locus, de manera que el alelo amplificado de 198 pb se correlaciona en gran medida con el carácter apireno (Cabezas y col., 2006; Karaagac y col., 2012). Ruby Seedless y Moscatuel presentan para este marcador los alelos de 198 y 200 pb (198/200), y como era de esperar, la progenie muestra tres genotipos para este marcador: 198/198, 198/200 y 200/200, en la proporción 1:2:1, respectivamente. La distribución de individuos sin semilla (198/198 y 198/200) y con semilla (200/200) en nuestra población (71% y 29%, respectivamente), se ajusta a la segregación genotípica esperada (75%:25%, respectivamente).

De los parámetros utilizados para evaluar el grado de apirenia [número de semillas por baya (NS_B), número total de semillas y/o esbozos seminales por baya (NT_SE_B), y peso fresco y seco de las semillas y/o esbozos seminales por baya (PF_SE_B y PS_SE_B)], el NS_B, PF_SE_B y PS_SE_B presentaron transgresión hacia un lado de la gráfica, confirmando el carácter dominante del componente genético que los regula (Figura 4.2.2). Para estos últimos parámetros, se detectó un QTL de efecto mayor en el GL 18, en el que el SSR VMC7F2 fue el cofactor óptimo en 26 de las 27 ocasiones en que fue identificado (Tablas 4.2.17-4.2.19). Este marcador se encuentra a 270 pb de la región promotora del gen *VvAGL11* (Anexo 3). Este gen ha sido identificado por Mejía y col. (2011) como el principal responsable del locus *SDI*, al menos en variedades apirenas descendientes de Sultanina, como es el caso que nos ocupa. Empleando una progenie derivada del cruce entre Ruby Seedless y Sultanina, estos autores describieron otro SSR, p3_VvAGL11, cuyo alelo de 198 pb también mostró estar altamente correlacionado con el carácter apireno (Mejía y col., 2011). La detección de la misma región para NS_B, PF_SE_B y PS_SE_B, junto con el alto grado de correlación estadística que existe entre los datos fenotípicos (Tabla 4.2.5) indica que estos caracteres pueden estar controlados de forma pleiotrópica por dicho locus. Asimismo, el QTL del GL 18

detectado en nuestro mapa integrado explicó un porcentaje de varianza fenotípica mucho mayor que en los mapas parentales, lo que es indicativo de un alto grado de dominancia de los genes que subyacen en dicha zona (Doligez y col., 2010).

Coincidiendo con los resultados obtenidos por Mejía y col. (2007), para PF_SE_B se detectó de forma consistente un QTL de efecto menor en el GL 16 del mapa de Ruby Seedless y del integrado (Tabla 4.2.18). Aunque los intervalos de confianza LOD -1 de 06 fueron solapantes, los puntos de máxima significación estadística se situaron a 26 cM en ambos mapas, por lo que no podemos afirmar que se trate de un mismo QTL. Este QTL se detectó para PS_SE_B en el mapa de Ruby Seedless en una sola campaña (07), aunque con MI fue detectado en tres años, y en el mapa integrado en dos campañas (datos no mostrados). Si bien la correlación entre PF_SE_B y PS_SE_B es muy alta (Tabla 4.2.5), los resultados parecen indicar que el parámetro del PF_SE_B es el más idóneo para el análisis de QTLs.

Por otro lado, el NT_SE_B presentó una distribución en la progenie distinta a los tres parámetros anteriores, no observándose una clara dominancia del componente genético que lo regula (Figura 4.2.2). El análisis de QTLs puso de manifiesto que este carácter está bajo un control genético diferente (Tabla 4.2.20). Aunque también influye la zona inferior del GL 18, ésta lo hace con un menor peso específico, actuando sobre el carácter otras regiones del genoma. Entre éstas, resulta muy interesante la localizada en el GL 2, ya que fue detectada con los datos de dos campañas en el mapa de Moscatuel (06 y 07), haciéndolo de forma significativa a nivel genómico en 06. Además, este QTL también fue detectado para el mismo carácter por Costantini y col. (2008) en la progenie del cruzamiento entre las variedades de uva de mesa Italia y Big Perlon.

El presente trabajo confirma los resultados de otros autores, que señalan al locus *SDI*, localizado en la parte inferior del GL 18, como el principal responsable del control genético de la apirenia estenospermocárpica. Esta región ha sido estudiada a nivel de secuencia mediante la información obtenida a partir de progenies derivadas de cruzamientos entre variedades apirenas (Mejía y col., 2011), por lo que sería interesante llevar a cabo futuros trabajos que manejen otros fondos genéticos en los que se incluyan variedades con semilla. Por otro lado, es obvio que influyen otros factores genéticos minoritarios sobre este carácter, como las regiones detectadas en este trabajo en los GLs 2 y 16, además de ciertos componentes ambientales (Hanania y col., 2007).

Flavor moscatel. El flavor moscatel es un carácter poligénico con un fuerte componente aditivo (Doligez y col., 2006b), de modo que se necesita la expresión de un número mínimo de genes para poder ser detectado por el catador. Igualmente, también influyen los niveles de expresión de dichos genes, que depende en gran medida de las condiciones ambientales, en especial de la intensidad lumínica que incide sobre las bayas (Belancic y col., 1997; Bureau y col., 2000). Todos estos factores contribuyen a que la distinción, mediante cata, entre flavor moscatel ligero o neutro sea muy sutil, y en parte explicaría la oscilación entre campañas en la clasificación del 50% y el 70% de híbridos con flavor neutro.

La región detectada para este carácter en el GL 5 del mapa de Moscatuel y del integrado, coincide con la identificada por otros autores para este carácter, evaluado tanto por cata como mediante el análisis de la presencia en las bayas de compuestos como el linalol, nerol, geraniol, α -terpineol y citronelol, responsables mayoritarios de este aroma (Doligez y col., 2006b; Battilana y col., 2009; Duchêne y col., 2009). Estos compuestos terpénicos han sido también evaluados en nuestra progenie, en colaboración con el Dr. José Fenoll (datos no mostrados), identificándose QTLs para los distintos compuestos analizados en dicha región cromosómica del GL 5 (Ruiz-García y col., 2009; Fenoll y col. en preparación).

Recientemente se ha descrito un gen en esta región, el *VvDXS* (Anexo 3), como principal responsable de la variación en la concentración de geraniol, nerol y linalol (Battilana y col., 2009; Duchêne y col., 2009; apartados 1.3.2 y 1.4.5). *VvDXS* cataliza la primera reacción en la ruta del metil-eritritol-fosfato (MEP), que es la ruta biosintética de monoterpenos más importante en vid (Luan y Wüst, 2002; apartado 1.3.2). La variante alélica N284 del gen *VvDXS* provoca un incremento en la eficiencia de la proteína, favoreciendo la síntesis de estos compuestos (Emanuelli y col., 2010; Battilana y col., 2011). Como en la mayoría de las variedades con aroma moscatel, el alelo N284 probablemente se encuentra en heterocigosis en Moscatuel (Battilana y col., 2011), mientras que Ruby Seedless podría ser homocigota para el alelo “neutro” K284. En nuestra población de mapeo, menos del 5% de los híbridos presentaron un flavor moscatel intenso como el de Moscatuel, sugiriendo la existencia de otros elementos reguladores de la síntesis de monoterpenos, además del gen *VvDXS*, que influyen de modo determinante en la presencia o en los niveles de estos compuestos. Además, aunque la ruta del MEP es la más importante en vid, no hay que descartar la actuación de genes pertenecientes a la ruta de biosíntesis del ácido mevalónico (MVA) (apartado 1.3.2).

En el mapa de Moscatuel se detectó además un QTL en el GL 10 (06), coincidiendo con la región detectada por otros autores para el contenido de linalol

(Battilana y col., 2009; Duchêne y col., 2009) (apartado 1.4.5). Muy cerca del intervalo LOD -1 del QTL detectado por Battilana y col. (2009), se localizaron dos genes que codifican para linalol sintasa, por lo que son buenos candidatos en estudios futuros.

En el mapa de Ruby Seedless se detectó de forma consistente una región en la parte inferior del GL 9, con efecto aditivo positivo, lo que sugiere la existencia en esta región de genes relacionados con la biosíntesis de compuestos que contribuirían de forma significativa al conjunto aromático.

Estos resultados indican que, debido al carácter aditivo del locus *VvDXS* (Duchêne y col., 2009), para obtener híbridos con aroma moscatel intenso es necesario que los dos parentales del cruzamiento presenten flavor moscatel, de modo que la variante alélica N284 aparezca en homocigosis en la progenie. La identificación de otras regiones implicadas en el carácter, que podrían aportar los pequeños matices que constituyen el aroma característico de cada variedad, precisaría de un mayor tamaño poblacional que mejore el poder de detección del análisis de QTLs. Asimismo, debido a la gran complejidad de compuestos que influyen sobre el aroma, el poder de detección de un catador es limitado, de modo que una evaluación fenotípica más precisa requiere del análisis de la presencia y concentración de los terpenos responsables del flavor moscatel. Por otro lado, como se comentó anteriormente, es necesario tener en cuenta la acción de factores ambientales, de los cuales la exposición de los racimos al sol parece ser el más determinante (Belancic y col., 1997; Bureau y col., 2000). La falta de radiación solar sobre los racimos de híbridos aromáticos pudo ocasionar la pérdida de aromas, lo que podría explicar parcialmente los bajos valores de correlación interanual observados (Tabla 4.2.3).

6. CONCLUSIONES

Con objeto de identificar los determinantes genéticos de un carácter fenotípico dado, y poder mejorar así la selección de híbridos de interés dentro de los programas de mejora genética, hemos desarrollado mapas genéticos utilizando un cruzamiento de *V. vinifera* entre dos variedades de uva de mesa apirenas, Ruby Seedless y Moscatuel. Estos mapas se han usado para llevar a cabo la detección de QTLs relacionados con estados fenológicos y caracteres de productividad y calidad del fruto. Nuestros resultados permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Se han desarrollado mapas genéticos completos usando 259 marcadores moleculares informativos (154 SSRs and 105 SNPs). El tamaño observado del mapa de Ruby Seedless, de Moscatuel y del integrado es de 901 cM, 939 cM y 1.190 cM respectivamente, con una cobertura observada de 61%, 56% y 64%. Estos resultados están en el rango de otros mapas desarrollados en vid.
2. Basándonos en marcadores comunes con otros mapas publicados, los GLs obtenidos se han alineado en los 19 cromosomas que componen el juego haploide de la vid. En general, el orden de los marcadores es consistente con el de otros mapas publicados.
3. La mayoría de los parámetros fenotípicos evaluados han mostrado transgresión y variación continua en la progenie, sugiriendo herencia poligénica de acuerdo con estudios previos.
4. El efecto interanual ha sido significativo en todos los caracteres fenológicos, poniendo de manifiesto la influencia de los factores ambientales sobre estos caracteres. Entre los caracteres de productividad y calidad del fruto, la fertilidad muestra el mayor efecto interanual.
5. En cuanto a la correlación interanual de los datos fenotípicos, entre los caracteres fenológicos solo el envero presenta correlación significativa en todos los años evaluados, al igual que todos los caracteres de productividad y de calidad del fruto, excepto la fertilidad.
6. Pocas correlaciones entre caracteres son significativas, con coeficientes de correlación de Pearson (r) superiores a 0,5. Muchas de ellas se dan entre parámetros del mismo carácter. El tamaño de la baya correlaciona con el peso del

racimo ($r > 0,5$) y con el número de semillas y peso de los componentes seminales, sugiriendo un efecto pleiotrópico del locus *SDI*.

7. Se han identificado cinco QTLs para la brotación, pero solo el de mayor efecto (hasta el 23% de la varianza total) detectado en el GL 12 es significativo a nivel genómico. Aunque la región del GL 7 solo se detectó en una campaña y de forma sugerente, fue identificada por otros autores.

8. Hemos detectado cinco regiones responsables de la variación en el tiempo de floración, que explican entre el 5% y el 39,8% de la varianza total. Las regiones de los GLs 2, 14 y 15 son detectadas consistentemente junto con la región superior del GL 18. Se han encontrado cinco genes relacionados con floración en los intervalos de confianza de algunos QTLs: *VvSOC1.3* en el GL 2, *VvFUL-L* y *VvSEP1* en el GL 14, *VvSOC1.1* en el GL 15 y *VvSVP2* en el GL 18 (región superior).

9. Los QTLs relacionados con el envero explican entre el 6% y el 18% de la varianza total. Los QTLs de los GLs 1, 3, 5, 17 y 18 son estables entre campañas. Los genes *VvMSA* y *VvABF7* co-localizan en el intervalo de confianza del QTL detectado en el GL 18.

10. La fecha de maduración resulta bajo el control de doce regiones genómicas, que explican entre el 7% y el 34,7% de la varianza total. Los QTLs de los GLs 1, 12 y 14 son detectados consistentemente de forma sugerente.

11. Para la fertilidad se han identificado once QTLs que explican entre el 7% y el 27% de la varianza total. Los QTLs de los GLs 5 y 14 son detectados consistentemente de forma sugerente y significativa, respectivamente. Ocho genes relacionados con fertilidad co-localizan con los siguientes QTLs: *VvGID1b* en el GL 7_a, *VvAGL12* en el GL 12, *VvSVP2*, *VvAGL17.1*, *VvAP3.1* y un gen codificante de la citoquinina oxidasa CF404552 en el GL 18, y *VvGID1a* y *VvGASA4* en el GL 14.

12. Se han detectado seis QTLs para el peso del racimo, que explican entre el 6% y el 20% de la varianza total. Muchos de ellos son consistentes, con carácter sugerente.

13. Para el peso y el diámetro de las bayas se han detectado tres QTLs comunes, confirmando la correlación entre estos caracteres. El QTL identificado en el GL 18,

consistente y significativo a nivel genómico, tiene el mayor efecto (17%-46% de la varianza total).

14. La textura resulta estar bajo el control de trece regiones, que explican entre el 7% y el 24,5% de la varianza total. Los QTLs de los GLs 7, 9 y 18 se han detectado consistentemente con carácter sugerente. Muchos genes asociados al ablandamiento de las bayas (metabolismo y estructura de la pared celular, y acuaporinas) son localizados en el intervalo de confianza de los distintos QTLs.

15. Se confirma la presencia de un QTL significativo de efecto mayor (52%-67% de la varianza total) para el color de las bayas, localizado en el GL 2. Los factores de transcripción *VvmybA1*, *VvmybA2* and *VvmybA3* localizan en esta región. Además se han detectado QTLs de efecto menor en los GLs 16 y 17.

16. Para los parámetros relacionados con la apirenia se han identificado varios QTLs, de los cuales el único detectado a nivel genómico en el GL 18 tuvo un gran efecto (hasta el 91% de la varianza total), de acuerdo con otros autores. El gen *VvAGL11* localiza en esta región.

17. Para el flavor moscatel se han identificado seis QTLs, siendo el único significativo a nivel genómico el localizado en el GL 5. Este QTL explica hasta el 77% de la varianza, y fue detectado en otras progenies. El gen *VvDXS* localiza en esta región.

7. CONCLUSIONS

In order to identify the genetic determinants for a given phenotypic trait and to improve the selection of hybrids of interest for future breeding programs we developed genetic maps for a *V. vinifera* cross between two seedless table grape cultivars, Ruby Seedless and Moscatuel, and used them to carry out QTL detection for phenological stages and productive and quality fruit traits. Our results allowed us to draw the following conclusions:

1. Complete parental and integrated genetic maps were developed using 259 informative molecular markers (154 SSRs and 105 SNPs). The observed size of the Ruby Seedless, Moscatuel and integrated maps were 901 cM, 939 cM and 1,190 cM respectively, with an observed coverage of 61%, 56% y 64%. These results are in the range of other genetic maps developed for grapevine.
2. Based on common markers with other published maps we were able to align all the LGs to the 19 chromosomes of grape. A general consistence in marker order was found compared with other published maps.
3. Most of the phenotypic parameters evaluated showed transgressive and continuous variation within the progeny, suggesting a polygenic inheritance in agreement with previous studies.
4. Year effect was significant in all phenological traits, highlighting the influence of the environmental conditions on these characters. Among productive and quality traits, fertility showed the largest year effect.
5. Correlation between all studied years was significant only for veraison among phenological traits, and for all productivity and quality traits except for fertility.
6. Few correlations between traits were significant, with Pearson coefficient (r) higher than 0.5. Many of them concerned the parameters of the same character. Moreover, berry size correlated with cluster weight ($r > 0.5$) and also with the number of seeds and weight of seminal components, suggesting a pleiotropic effect of the *SDI* locus.
7. Five QTLs were found for budbreak, but only the QTL on LG 12 was consistently significant at genome-wide level, and had the largest effect (up to 23% of total

variance). Although the region on LG 7 was detected only one year at linkage-group level, it was reported by other authors.

8. We detected five regions responsible for the variation in flowering time, explaining between 5% and 39.8% of total variance. Regions on LGs 2, 14 and 15 were consistently detected along with that identified on the upper part of LG 18. Five genes linked to the flowering process were found within the confidence intervals of detected QTLs: *VvSOC1.3* on LG 2, *VvFUL-L* and *VvSEP1* on LG 14, *VvSOC1.1* on LG 15 and *VvSVP2* on LG 18 (upper part).

9. The QTLs detected for veraison explained between 6% and 18% of total variance. QTLs on LGs 1, 3, 5, 17 and 18 were stable over years. *VvMSA* and *VvABF7* genes were found within the confidence interval of the QTL detected on LG 18.

10. Ripening date resulted under the control of twelve genomic regions, explaining between 7% and 34.7% of total variance. The QTLs on LGs 1, 12 and 14 were consistently detected at linkage-group level.

11. Eleven QTLs were detected for fertility explaining between 7% and 27% of total variance. The QTLs on LGs 5 and 14 were consistently detected at linkage-group and genome-wide level, respectively. Eight genes linked to the fertility process co-located with the following QTLs: *VvGID1b* on LG 7_a, *VvAGL12* on LG 12, *VvSVP2*, *VvAGL17.1*, *VvAP3.1* and a gene coding for citoquinin oxidase CF404552 on LG 18, and *VvGID1a* and *VvGASA4* on LG 14.

12. Six QTLs for cluster weight were detected, explaining between 6% and 20% of total variance. Many of them were consistently significant only at linkage-group level.

13. Three QTLs for both weight and diameter of berries were detected, confirming the phenotypic correlation between these traits. The QTL identified on LG 18 was consistently significant at genome-wide level and had the largest effect (17%- 46% of total variance).

14. Thirteen QTLs for texture were detected on different linkage groups, explaining between 7% and 24.5% of total variance. QTLs on LGs 7, 9 and 18 were

consistently detected at linkage-group level. Many genes associated to berry softening (cell wall structure and metabolism, and aquaporins) were located within the confidence interval of all QTLs.

15. One QTL with major effect (52%- 67% of total variance) was confirmed for berry color on LG 2 at genome-wide level (99%). The transcription factors *VvmybA1*, *VvmybA2* and *VvmybA3* were located within this region. Also two QTLs of minor effects were detected on LG 16 and LG 17.

16. Several QTLs were detected for all seedlessness-related parameters, but the only one identified on LG 18 had a large effect (up to 91% of total variance) at genome-wide level, in agreement with other authors. The *VvAGL11* gene was located within this region.

17. Six QTLs for muscat flavor were detected, being the identified on LG 5 the only one significant at genome-wide level. This QTL explained up to 77% of total variance, and was also detected in other progenies. The *VvDXS* gene was located within this region.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adam-Blondon A.F., Lahogue-Esnault F., Boursiquot J.M., This P. 2001. Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars. *Vitis* 40: 147-155.
- Adam-Blondon A.F., Roux C., Claux D., Butterlin G., Merdinoglu D., This P. 2004. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1017-1027.
- Akkurt M., Welter L., Maul E., Töpfer R., Zyprian E. 2007. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Molecular Breeding* 19: 103-111.
- Almada R., Cabrera N., Casaretto J.A., Ruiz-Lara S., González Villanueva E. 2009. *VvCO* and *VvCOL1*, two CONSTANS homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. *Plant Cell Reports* 28: 1193-1203.
- Antonacci D. 1991. *Le uve apirene da tavola*. Schena editore. 208 pp.
- Ariizumi T., Murase K., Sun T.P., Steber C.M. 2008. Proteolysis-independent downregulator of DELLA repression in *Arabidopsis* by the gibberellin receptor Gibberellin Insensitive DWARF1. *The Plant Cell* 20: 2447-2459.
- Arroyo-García R., Martínez-Zapater J.M. 2004. Development and characterization of new microsatellite markers for grape. *Vitis* 43: 175-178.
- Arroyo-García R., Ruiz-García L., Bolling L., Ocete R., López M.A., Arnold C., Ergul A., Söylemezoglu G., Uzun H.I., Cabello F., Ibáñez J., Aradhya M.K., Atanassov A., Atanassov I., Balint S., Cenis J.L., Costantini L., Gorislavets S., Grando M.S., Klein B.Y., McGovern P.E., Merdinoglu D., Pejic I., Pelsy F., Primikiri N., Risovannaya V., Roubelakis-Angelakis K.A., Snoussi H., Sotiri P., Tamhankar S., This P., Troshin L., Malpica J.M., Lefort F., Martínez-Zapater J.M. 2006. Multiple Origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp *sativa*) based on chloroplastic DNA polymorphisms. *Molecular Ecology* 15: 3707–3714.
- Aubert D., Chevillard M., Dorne A.M., Arlaud G., Herzog M. 1998. Expression patterns of *GASA* genes in *Arabidopsis thaliana*: the *GASA4* gene is upregulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant Molecular Biology* 36: 871-883.
- Azuma A., Kobayashi S., Yakushiji H., Yamada M., Mitani N., Sato A. 2007. *VvmybA1* genotype determines grape skin color. *Vitis* 46: 154-155.
- Baggiolini M. 1952. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Rev. Romande d'Agriculture de Viticulture et d'Arboriculture* 8: 4-6.

- Barnaud A., Lacombe T., Doligez A. 2006. Linkage disequilibrium in cultivated grapevine, *Vitis vinifera* L., Theoretical and Applied Genetics 112: 708-716.
- Barnavon L., Doco T., Terrier N., Ageorgees A., Romieu C., Pellerin P. 2001. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. Phytochemistry 58: 693-701.
- Barrenche T., Bodenes C., Lexer C., Trontin J.F., Fluch S., Streiff R., Plomion C., Roussel G., Steinkellner H., Burg K., Favre J.M., Glössl J., Dremer A. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculata oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, nimisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. Theoretical and Applied Genetics 97: 1090-1103.
- Barrit B.H. 1970. Ovule development in seeded and seedless grapes. Vitis 9: 7-14.
- Barticevic M., Zavala K., De Felice S., Valenzuela J., Muñoz C., Hinrichsen P. 2004. Caracterización fenotípica de segregantes identificados con marcadores de microsatélites, con énfasis en apirenia y respuesta a ácido giberélico en crecimiento de bayas de uva. Agricultura Técnica (Chile) 64: 3-16.
- Battilana J., Costantini L., Emmanuelli F., Sevini F., Segala F., Moser S., Velasco R., Versini G., Grando M.S. 2009. The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major QTL affecting monoterpene content in grapevine. Theoretical and Applied Genetics 108: 653-669.
- Battilana J., Emanuelli F., Gambino G., Gribaudo I., Gasperi F., Boss P., Grando M.S. 2011. Functional effect of grapevine 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase substitution K284N on Muscat flavour formation. Journal of Experimental Botany 62: 5497-5508.
- Baur J.A., Sinclair D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nature Reviews. Drug Discovery. 5: 493-506.
- Bayo-Canha A., Fernández-Fernández J.I., Martínez-Cutillas A., Ruiz-García L. 2012. Phenotypic segregation and relationships of agronomic traits in Monastrell x Syrah wine grape progeny. Euphytica. DOI: 10.1007/s10681-012-0622-3.
- Belancic A., Agosin E., Ibacache A., Bordeu E., Baumes R., Razungles A., Bayonove C. 1997. Influence of sun exposure on the aromatic composition of chilean muscat grape cultivars Moscatel de Alejandría and Moscatel Rosada. American Journal of Enology and Viticulture 48: 181-186.
- Bishop D.T., Canning C., Skolnick S.M., Williamson J.A. 1983. The number of polymorphic DNA clones required to map the human genome. In: Statistical

- Analysis of DNA Sequence Data, ed. B.S. Weir. Marcel Dekker, New York. 181-200.
- Boss P.K., Davies C., Robinson S.P. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology* 111: 1059-1066.
- Boss P.K., Vivier M., Matsumoto S., Dry I.B., Thomas M.R. 2001. A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to *AGAMOUS* and *SHATTERPROOF*, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Molecular Biology* 45, 541-553.
- Boss P.K., Thomas M.R. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* 416: 847-850.
- Boss P.K., Sensi E., Hua C., Davies C., Thomas M.R. 2002. Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science* 162: 887-895.
- Boss P.K., Buckeridge E.J., Poole A., Thomas M.R. 2003. New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology* 30: 593-606.
- Boss P.K., Sreekantan L., Thomas M.R. 2006. A grapevine *TFL1* homologue can delay flowering and alter floral development when overexpressed in heterologous species. *Functional Plant Biology* 33: 31-41.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Bouquet A., Danglot Y. 1996. Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 35: 35-42.
- Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., Meredith C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39: 628-633.
- Bowers J.E., Meredith C.P. 1997. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genetics* 16: 84-87.
- Bowers J.E., Dangl G.S., Meredith C.P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *American Journal of Enology and Viticulture* 50:243-246.
- Bowers J.E., Chapman B.A., Rong J., Paterson A.H. 2003. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422: 433-438.

- Bradsaw H.D., Settler R.F. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II. Segregation distortion due to genetic load. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 551-558.
- Brummel D.A., Harpster M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47: 311-340.
- Bureau S.M., Razungles A.J., Baumes R.L. 2000. The aroma of Muscat of Frontignan grapes: effect of the light environment of vine or bunch on volatiles and glycoconjugates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 2012-2020.
- Cabezas J.A. 2004. Análisis de diversidad genética, construcción de mapas de ligamiento y mapeo de QTLs en *Vitis vinifera*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología. 189 pp.
- Cabezas J.A., Cervera M.T., Ruiz-García L., Carreño J., Martínez-Zapater J.M. 2006. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome* 49: 1572-1585.
- Cabezas J.A., Ibáñez J., Lijavetzky D., Vélez D., Bravo G., Rodríguez V., Carreño I., Jermakow A.M., Carreño J., Ruiz-García L., Thomas M.R., Martínez-Zapater J.M. 2011. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BioMed Central Plant Biology* 11: 153.
- Cain D.W., Emershad R.L., Tarailo R.E. 1983. In-ovulo embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.) *Vitis* 22: 9-14.
- Çakir B., Agasse A., Gaillard C., Saumoneau A., Delrot S., Atanassova R. 2003. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 15: 2165-2180.
- Calonje M., Cubas P., Martínez-Zapater J.M., Carmona M.J. 2004. Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiology* 135: 1491-1501.
- Carmona M.J., Cubas P., Martínez-Zapater J.M. 2002. *VFL*, the grapevine *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiology* 130: 68-77.
- Carmona M.J., Cubas P., Calonje M., Martínez-Zapater J.M. 2007a. Flowering transition in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Canadian Journal of Botany* 85: 701-711.
- Carmona M.J., Calonje M., Martínez-Zapater J.M. 2007b. The *FT/TFL1* gene family in grapevine. *Plant Molecular Biology* 63: 637-650.

- Carmona M.J., Chaïb J., Martínez-Zapater J.M., Thomas M.R. 2008. A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 59: 2579-2596.
- Carpita N.C., Gibeaut D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1-30.
- Carreño J., Martínez A., Almela L., Fernández-López J.A. 1995. Proposal of an index for the objective evaluation of the colour of red table grapes. *Food Research International* 28: 373-377.
- Carreño J., Martínez A., García E., Ortiz M., Pinilla M.F., García M.G. 1997. Cultivo de embriones de vid (*Vitis vinifera* L.) para la obtención de nuevas variedades de uva de mesa sin semillas. *Viticultura y Enología Profesional* 52: 37-45.
- Carreño J. 1997. El color de la uva Don Mariano. Factores influyentes en su pigmentación. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología.
- Castellarin S.D., Di Gaspero G. 2007. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BioMed Central Plant Biology* 7: 46.
- CeGen. Centro Nacional de Genotipado. <http://www.cegen.org/>
- Cervera M.T., Storme V., Ivens B., Gusmao J., Liu B.H., Hostyn V., Van Slycken J., Van Montagu, Boerjan W. 2001. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoids*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics* 158: 787-809.
- Chakravarti A., Lasher L.K., Reefer J.E. 1991. A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* 128: 175-182.
- Chatelet P., Laucou V., Fernandez L., Sreekantan L., Lacombe T., Martinez-Zapater J.M., Thomas M.R., Torregrosa L. 2007. Characterization of *Vitis vinifera* L. somatic variants exhibiting abnormal flower development patterns. *Journal of Experimental Botany* 58: 4107-4118.
- Chervin C., El-Kereamy A., Roustan J.P., Latché A., Lamon J., Bouzayen M. 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science* 167: 1301-1305.
- Chloupek O., Hrstkova P., Schweigert P. 2004. Yield and its stability, crop diversity, adaptability and response to climate change, weather and fertilisation over

- 75 years in the Czech Republic in comparison to some European countries. *Field Crops Research* 85: 167-190.
- Churchill G.A., Doerge R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Di Gaspero G., Pfeiffer A., Morgante M., Testolin R. 2008. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. *BioMed Central Plant Biology* 8: 127.
- Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Conde C., Silva Paulo., Fontes N., Dias A.C.P., Tavares R.M., Sousa M.J., Agasse A., Delrot S., Gerós H. 2007. Biochemical changes throughout grape Berry development and fruit and wine quality. *Food* 1: 1-22.
- Coombe B.G. 1960. Relationship of growth and development to changes in sugars, auxins and gibberellins in fruit of seeded and seedless varieties of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology* 35: 241-250.
- Coombe B.G. 1973. The regulation of set and development of the grape berry. Symposium on growth regulators in fruit production. *Acta Horticulturae* 34: 261- 273
- Coombe B.G., Hale C.R. 1973. The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology* 51:629-634.
- Coombe B.G. 1992. Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture* 43:101-110.
- Cosgrove D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews* 6: 850-861.
- Costantini L., Battilana J., Lamaj F., Fanizza G., Grando M.S. 2008. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): From Quantitative Trait Loci to underlying genes. *BioMed Central Plant Biology*. 8:38.
- Dalbó M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Steinkellner H., Sefc K.M., Reisch B.I. 2000. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* 43: 333-340.
- Dalbó M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Wilcox W.F., Reisch B.I. 2001. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. *Journal of American Society of Horticulture Science* 126: 83-89.
- Davies C., Boss P.K., Robinson S.P. 1997. Treatment of crape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiology* 115: 1155-1161.

- De Andrés M.T., Benito A., Perez-Rivera G., Ocete R., Lopez M.A., Gaforio L., Muñoz G., Cabello F., Martínez-Zapater J.M., Arroyo-García R. 2011. Genetic diversity of wild grapevine populations in the Iberian Peninsula and genetic relationship with cultivated grapevine and naturalized rootstocks. *Molecular Ecology* 21: 800-816.
- De Bodt S., Maere S., Van de Peer Y. 2005. Genome duplication and the origin of angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 591-597.
- Decroocq V., Favé M.G., Hagen L., Bordenave L., Decroocq S. 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 912-922.
- De la Rosa R., Angiolillo A., Guerrero C., Pellegrini M., Rallo L., Besnard G., Bervillé A., Martín A., Baldoni L. 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1282.
- Deluc L.G., Grimplet J., Wheatley M.D., Tillett R.L., Quilici D.R., Osborne C., Schooley D.A., Schlauch K.A., Cushman J.C., Cramer G.R. 2007. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BioMed Central Genomics* 8:429-471.
- Deluc L., Bogs J., Walker A.R., Ferrier T., Decendit A., Merillon J.M., Robinson S.P., Barrieu F. 2008. The transcription factor *VvMYB5b* contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiology* 147: 2041-2053.
- De Vienne D. 2003a. Introduction In: *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Editor: Dominique de Vienne. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. páginas 1-2.
- De Vienne D. 2003b. Construction of genetic linkage maps. In: *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Editor: Dominique de Vienne. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. Páginas 47-80.
- De Vienne D., Santoni S., Falque M. 2003. Principal sources of molecular markers. In: *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Editor: Dominique de Vienne. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. Páginas 3-46.
- De Vienne D., Causse M. 2003. Mapping and characterising quantitative trait loci. In: *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Editor: Dominique de Vienne. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. Páginas 89-124.
- Díaz-Riquelme J., Lijavetzky D., Martínez-Zapater J.M., Carmona M.J. 2009. Genome-wide analysis of MIKC^C-Type MADS Box genes in grapevine. *Plant Physiology* 149: 354-369.

- Di Gaspero G., Peterlunger E., Testolin R., Edwards G., Cipriani G. 2000. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 301-308.
- Di Gaspero G., Cipriani G., Marrazzo M.T., Andreetta D., Prado Castro M.J., Peterlunger E., Testolin R. 2005. Isolation of (AC)*n*-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. *Molecular Breeding* 15: 11-20.
- Di Gaspero G., Cipriani G., Adam-Blondon A.F., Testolin R. 2007. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 1249-1263.
- Dimitriadis E., Williams P.J., 1984. The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 35: 66-71.
- Doerge R.W., Churchill G.A. 1996. Permutation test for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142: 285-294.
- Doerge R.W., Rebai A. 1996. Significance thresholds for QTL interval mapping tests. *Heredity* 76: 459-464.
- Doligez A., Bouquet A., Danglot Y., Lahogue F., Riaz S., Meredith C.P., Edwards K.J., This P. 2002. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 780-795.
- Doligez A., Adam-Blondon A.F., Cipriani G., Di Gaspero G., Laucou V., Merdinoglu D., Meredith C.P., Riaz S., Roux C., This P. 2006a. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 369-382.
- Doligez A., Audiot E., Baumes R., This P. 2006b. QTLs for muscat flavor and monoterpenic odorant content in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Molecular Breeding* 18: 109-125.
- Doligez A., Bertrand Y., Dias S., Grolier M., Ballester J.F., Bouquet A., This P. 2010. QTLs for fertility in table grape (*Vitis vinifera* L.). *Tree Genetics & Genomes* 6: 413-422.
- Don R.H., Cox P.T, Wainwright B.J., Baker K., Mattick J.S. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*. 19: 4008.

- Doucleff M., Jin Y., Gao F., Riaz S., Krivanek A.F., Walker M.A. 2004. A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1178-1187.
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P. 2003. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9: 110-121.
- Duchêne E., Schneider C. 2005. Grapevine and climatic changes: a glance at the situation in Alsace. *Agronomy for Sustainable Development* 25: 93-99.
- Duchêne E., Butterlin G., Claudel P., Dumas V., Jaegli N., Merdinoglu D. 2009. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) deoxy-D-xylulose synthase gene colocates with a major quantitative trait loci for terpenol content. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 541-552.
- Duchêne E., Butterlin G., Dumas V., Merdinoglu D. 2011. Towards the adaptation of grapevine varieties to climate change: QTLs and candidate genes for developmental stages. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 623-635.
- Dunn G.M., Martin S.R. 2000. Do temperature conditions at budburst affect flower number in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet sauvignon?. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 116-124.
- Ebeler S.E. 2001. Analytical chemistry: unlocking the secrets of wine flavor. *Food reviews international* 17: 45-64.
- Eibach R. 1990. Investigations about the influence of some physiological and phenological characteristics on quality and their heredity. *Vitis*. Special Issue 149-158 (Proceedings of the 5th International Symposium on Grape Breeding).
- Eibach R., Töpfer R. 2003. Success in resistance breeding: Regent and its steps into the market. In: VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding. *Acta Horticulturae* 603: 687-691.
- Emanuelli F., Battilana J., Costantini L., Le Cunff L., Boursiquot J.M., This P., Grando M.S. 2010. A candidate gene association study on muscat flavor in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BioMed Central Plant Biology* 10: 241.
- Erez A. 1995. Means to compensate for insufficient chilling to improve bloom and leafing. *Acta Horticulturae* 395: 81-95.
- Fanizza G., Lamaj F., Costantini L., Chaabane R., Grando M.S. 2005. QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*). *Theoretical and Applied Genetics* 111: 658-664.

- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
http://www.fao.org/index_es.htm.
- Feingold E. 2002. Regression-based quantitative-trait-locus mapping in the 21st Century. *American Journal of Human Genetics*. 71:217-222.
- Fenoll J., Manso A., Hellín P., Ruiz L., Flores P. 2009. Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening. *Food Chemistry* 114: 420-428.
- Fenoll J., Martínez C.M., Hellín P., Flores P. 2012. Changes of free and glycosidically bound monoterpenes and aromatic alcohols in Moscatuel and Ruby Seedless table grapes during development. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 46: 1.
- Ferreira F.J., Kieber J.J. 2005. Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 518-525.
- Fischer B.M., Salakhutdinov I., Akkur M., Eibach R., Edwards K.J., Töpfer R., Zyprian E.M. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 501-515.
- Fisher, R.A. 1935. *The design of experiments*. Ed 3. Oliver & Boyd Ltd. London.
- Flanzy C. 2003. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. Ed. Mundi Prensa Libros, Madrid. 797 pp.
- Fortes A.M., Agudelo-Romero P., Silva M.S., Ali K., Sousa L., Maltese F., Choi Y.H., Grimplet J., Martínez-Zapater J.M., Verpoorte R., Pais M.S. 2011. Transcript and metabolite analysis in Trincadeira cultivar reveals novel information regarding the dynamics of grape ripening. *BMC Plant Biology* 11: 149.
- Fouquet R., Léon C., Ollat N., Barrieu F. 2008. Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. *Plant Cell Reports* 27: 1541-1550.
- Fournier-Level A., Le Cunff L., Gomez C., Doligez A., Ageorges A., Roux C., Bertrand Y., Souquet J.M., Cheynier V., This P. 2009. Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) berry: a quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study. *Genetics* 183: 1127-1139.
- Franks T., Botta R., Thomas M.R. 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 192-199.
- Galet P. 1967. *Dictionnaire encyclopédique des cépages*. Paris: Hachette.

- Gambetta G.A., Matthews M.A., Shaghasi T.H., McElrone A.J., Castellarin S.D. 2010. Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta* 232: 219-234.
- García-Mas J., Graziano E., Aranzana M.J., Monforte A., Oliver M., Ballester J., Viruel M.A., Arús P. 2000. Marcadores de ADN: concepto, tipos, protocolos. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editores F. Nuez y J.M. Carrillo. Ed. Universidad Politécnica de Valencia. I.S.B.N.: 84-7721-945-1. páginas 93-151.
- Gerber S., Rodolphe F. 1994. An estimation of the genome length of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics* 88: 289-292.
- Glissant D., Dédaldéchamp F., Delrot S. 2008. Transcriptomic analysis of grape berry softening during ripening. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 42: 1-13.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M. y col. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Goh L., Yap V.B. 2009. Effects of normalization on quantitative traits in association test. *BioMed Central Bioinformatics* 10: 415.
- Grando M.S., Bellin D., Edwards K.J., Pozzi C., Stefanini M., Velasco R. 2003. Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1213-1224.
- Grape Genome Browser. <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>
- Grattapaglia D., Sederoff R. 1994. Genetic linkage map of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
- Greenspan M.D., Shackel K.A., Matthews M.A. 1994. Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant, Cell & Environment* 17: 811-820.
- Gunata Y.Z., Bayonove C.L., Baumes R.L., Cordonnier R.E. 1985a. The aroma of grapes 1. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography A* 331: 83-90.
- Gunata Y.Z., Bayonove C.L., Baumes R.L., Cordonnier R.E. 1985b. The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components cv. Muscat during first development and maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 857-862.

- Halaly T., Pang X., Batikoff T., Crane O., Keren A., Venkateswari J., Ogradovitch A., Sadka A., Lavee S., Or E. 2008. Similar mechanisms might be triggered by alternative external stimuli that induce dormancy release in grape buds. *Planta* 228: 79-88.
- Haldane J.B.S. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linkage factors. *Journal of Genetics* 8: 299-309.
- Hale C.R., Coombe B.G., Hawker J.S. 1970. Effects of ethylene and 2-chloroethylphosphonic acid on the ripening of grapes. *Plant physiology* 45: 620-623.
- Han P., García-Ponce B., Fonseca-Salazar G., Alvarez-Buylla E.R., Yu H. 2008. *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a *FT*-independent photoperiod pathway. *Plant Journal* 55: 253-265.
- Hanania U., Velcheva M., Or E., Flaishman M., Sahar N. Perl A. 2007. Silencing of chaperonin 21, that was differentially expressed in inflorescence of seedless and seeded grapes, promoted seed abortion in tobacco and tomato fruits. *Transgenic Research* 16: 515-525.
- Hanania U., Velcheva M., Sahar N., Flaishman M., Or E., Degani O., Perl A. 2009. The ubiquitin extension protein S27a is differentially expressed in developing flower organs of Thompson seedless versus Thompson seeded grape isogenic clones. *Plant Cell Reports* 28: 1033-1042.
- Harbone J.B. 1962. Chemicogenetical studies of flavonoid pigments. En: *The chemistry of flavonoid compounds*. Ed. Geissman TA. Pergamon Press Oxford, páginas 593-617.
- Hidalgo L. 2002. *Tratado de Viticultura General*. Mundi Prensa 3ª Ed.
- Hoaglin D.C., Mosteller F., Tukey J.W. 2000. *Understanding robust and exploratory data analysis*. Ed. Wiley 447 pp.
- Holton T.A., Cornish E.C. 1995. Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1071-1083.
- Hormaza J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 321-328.
- Hulbert S.H., Iltott T.W., Legg E.J., Lincoln S.E., Lander E.S., Michelmore R.W. 1988. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* 120: 947-958.
- Ibáñez J., Vargas A.M., Palancar M., Borrego J., de Andrés M.T. 2009. Genetic relationships among table-grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 35-42.

- INE (Instituto Nacional de Estadística). 2008. Anuario de estadística. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Jaakola L., Maatta K., Pirttila A.M., Torronen R., Karenlampi S., Hohtola A. 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology* 130: 729-739.
- Jackson R.S. 2000. Wine science: principles and applications. 2nd edn, Academic Press San Diego.
- Jaillon O., Aury J, Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Huguene P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyère C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P., The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-467.
- Jansen R.C. 1992. A general mixture model for mapping quantitative trait loci by using molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 252-260.
- Jansen R.C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205-211.
- Jansen R.C. 1994a. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.
- Jansen R.C. 1994b. Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. *Genetics* 138: 871-881.
- Jansen R.C., Stam P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.
- Jensen J. 1989. Estimation of recombination parameters between a Quantitative trait locus (QTL) and two marker gene loci. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 613-618.
- Joly D., Perrin M., Gertz C., Kronenberger J., Demangeat G., Masson J.E. 2004. Expression analysis of flowering genes from seedling-stage to vineyard life of grapevine cv. Riesling. *Plant Science* 166: 1427-1436.

- Karaagac E., Vargas A., De Andrés M.T., Carreño I., Ibáñez J., Carreño J., Martínez-Zapater J.M., Cabezas J.A. 2012. Marker assisted selection for seedlessness in table grape breeding. *Tree Genetics and Genomes*. DOI: 10.1007/s11295-012-0480-0.
- Kaul S., Koo H.L., Jenkins J., Rizzo M., Rooney T., Tallon L.J. y col. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Kearsey M.J., Pooni H.S. 1998. The genetic analysis of quantitative traits. Stanley Thornes (Publishers) Ltd, United Kingdom. 381 pp.
- Keilin T., Pang X., Venkateswari J., Halaly T., Crane O., Keren A., Ogrodovitch A., Ophir R., Volpin H., Galbraith D., Or E. 2007. Digital expression profiling of a grape-bud EST collection leads to new insight into molecular events during grape-bud dormancy release. *Plant Science* 173: 446-457.
- Keller M., Tarara J.M., Mills L.J. 2010. Spring temperatures alter reproductive development in grapevines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 445-454.
- Kobayashi S., Ishimaru M., Ding C.K., Yakushiji H., Goto N. 2001. Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Science* 160: 543-550.
- Kobayashi S., Ishimaru M., Kiraoka K., Honda C. 2002. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* 215: 924-933.
- Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. 2004. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 304, 982.
- Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. 2005: Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin-color mutants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 74: 196-203.
- Konieczny A., Ausubel F.M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4: 403-410.
- Korpás A., Baránek M., Pidra M., Hradilík J. 2009. Behaviour of two SCAR markers for seedlessness within Central European varieties of grapevine. *Vitis* 48: 33-42.
- Kosambi D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics*. 12: 172-175.

- Krivanek A.F., Riaz S., Walker M.A. 2006. Identification and molecular mapping of PdR1, a primary resistance gene to Pierce's disease in *Vitis*. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1125-1131.
- Kruglyak L., Lander E.S. 1995. A nonparametric approach for mapping quantitative trait loci. *Genetics* 139, 1421-1428.
- Lahogue F., This P., Bouquet A. 1998. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 950-959.
- Lambert P., Hagen L.S., Arus P., Audergon J.M. 2004. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) compared with the almond Texas x peach Earlygold reference map of *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 298-305.
- Lanaud C., Risterucci A.M., Ngoran A.K.J., Clement D., Flament M.H., Laurent V., Falue M. 1995. A genetic linkage map of *Theobroma cacao*. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 987-993.
- Lander E.S., Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lander E.S., Green P. 1987. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proceedings of Natural Academic of Sciences* 84: 2363-2367.
- Lander E., Kruglyak L. 1995. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics* 11: 241-247.
- Lang G.A., Early J.D. Martin G.C., Darnell R.L. 1987. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* 22: 371-377.
- Lange K., Boehnke M. 1982. How many polymorphic genes will it take to span the human genome? *American Journal of Human Genetics* 34: 842-845.
- Lavee S., May P. 1997. Dormancy of grapevine buds – facts and speculation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 3: 31-46.
- Lavín A., Gutierrez A., Rojas M.S. 2001. Niveles de carga en viñedos jóvenes cv. Chardonnay y sus efectos sobre producción y calidad del vino. *Agricultura Técnica* 61: 26-34.
- Lee J.H., Yoo S.J., Park S.H., Hwang I., Lee J.S., Ahn J.H. 2007. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 21: 397-402.
- Lehmann E.L. 1975. *Nonparametrics*. McGraw-Hill. New York.

- Li D., Liu C., Shen L., Wu Y., Chen H., Robertson M., Helliwell C.A., Ito T., Meyerowitz E., Yu H. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Developmental Cell* 15: 110-120.
- Lijavetzky D., Ruiz-García L., Cabezas J.A., De Andrés M.T., Bravo G., Ibáñez A., Carreño J., Cabello F., Ibáñez J., Martínez-Zapater J.M. 2006. Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Molecular Genetics and Genomics* 276: 427-435.
- Lijavetzky D., Cabezas J.A., Ibáñez A., Rodríguez V., Martínez-Zapater J.M. 2007. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BioMed Central Genomics* 8: 424-434.
- Lijavetzky D., Carbonell-Bejerano P., Grimplet J., Bravo G., Flores P., Fenoll J., Hellín P., Oliveros J.C., Martínez-Zapater J.M. 2012. Berry flesh and skin ripening features in *Vitis vinifera* as assessed by transcriptional profiling. *PLoS one* 7 (6): e39547.
- Lodhi, M.A., Daly M.J., Ye G.N., Weeden N.F., Reisch B. 1995. A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome* 38: 786-794.
- Lodhi M.A., Reisch B.I. 1995. Nuclear content of *Vitis* species, cultivars and other genera of Vitaceae. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 11-16.
- Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues do Santos J.E., Eiras-Dias J.E., da Camara Machado A. 2009. New insights on the genetic basis of Portuguese grapevine and on grapevine domestication. *Genome* 52: 790–800.
- López-Miranda S., Yuste J. 2004. Influence du Nombre de Fleurs par grappe pourcentage de nouaison et poids de la baie sur le poids de la grappe du cépage Verdejo (*Vitis vinifera* L.). *Journal international des sciences de la vigne et du vin* 38: 41-47.
- Lowe K.M., Walker M.A. 2006. Genetic linkage map of the interspecific grape rootstock cross Ramsey (*Vitis champinii*) x Riparia Gloire (*Vitis riparia*). *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1582-1592.
- Luan F., Wüst M. 2002. Differential incorporation of 1-deoxy-d-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. *Phytochemistry* 60: 451-459.
- Lücker J., Laszczak M., Smith D., Lund S. 2009. Generation of a predicted protein database from EST data and application to iTRAQ analyses in grape (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) berries at ripening initiation. *BioMed Central Genomics* 10: 50.

- Lund S.T., Peng F.Y., Nayar T., Reid K.E., Schlosser J. 2008. Gene expression analyses in individual grape (*Vitis vinifera* L.) berries during ripening initiation reveal that pigmentation intensity is a valid indicator of developmental staging within the cluster. *Plant Molecular Biology* 68: 301-315.
- Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L. y col. 2005. Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature* 437: 376-380.
- Martínez O., Curnow R.N. 1992. Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. 1992. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 480-488.
- Mateo J.J., Jiménez M. 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography* 881: 557-567.
- McGovern P.E., Glusker D.L., Exener L.J., Voigt M.M. 1996. Neolithic resin wine. *Nature* 381: 480–481.
- McGovern P.E. 2003. *Ancient wine: the search for the origins of viticulture*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Mejía N., Hinrichsen P. 2003. A new, highly assertive scar marker potentially useful to assist selection for seedlessness in table grape breeding. *Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding (2002)*, Kecskemét, Hungría. Ed Hadju y E. Borbas. Publicado por ISHS, Leuven, Bélgica Vol. 1 pp. 559-564.
- Mejía N., Gebauer M., Muñoz L., Hewstone N., Muñoz C., Hinrichsen P. 2007. Identification of QTLs for seedlessness, berry size, and ripening date in a seedless x seedless table grape progeny. *American Journal of Enology and Viticulture* 58: 499-507.
- Mejía N., Soto B., Guerrero M., Casanueva X., Houel C., Miccono M.A., Ramos R., Le Cunff L., Boursiquot J.M., Hinrichsen P., Adam-Blondon A.F. 2011. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine. *BioMed Central Plant Biology* 11: 57.
- Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A.F., Decroocq S. 2005. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Molecular Breeding* 15: 349-366.
- Mitchell-Olds T., Pedersen D. 1998. The molecular basis of quantitative variation y central and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Genetics* 149: 739-747.

- Mori K., Sugaya S., Gemma H. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 105: 319-330.
- Mori K., Goto-Yamamoto N., Kitayama M., Hashizume K. 2007. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany* 58: 1935-1945.
- Morton N.E. 1955. Sequentid tests for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics* 7: 227-318. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editores F. Nuez y J.M. Carrillo. I.S.B.N.: 84-7721-945-1. páginas 153-293.
- Moxon R., Wills C. 1999. DNA microsatellites: agents of evolution? *Scientific American*. Enero 1999.
- Mullins M.G., Bouquet A., Williams L.E. 1992. *Biology of the grapevine*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Myles S., Boyko A.R., Owens C.L., Brown P.J., Grassi F., Aradhya M.K., Prins B., Reynolds A., Chia J.-M., Ware D., Bustamante C.D., Buckler E.S. 2011. Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 108: 3530-3535.
- NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- NCBI Map Viewer. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=29760
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1237-1247.
- Nelson C.D., Kubisiak T.L., Stine M., Nance W.L. 1994. A genetic linkage map of longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) based on random amplified polymorphic DNAs. *Journal of Heredity* 85: 433-439.
- Nitsch J.P., Pratt C., Nitsch C., Shaulis M.J. 1960: Natural growth substance in Concord and Concord seedless grapes in relation to berry development. *American Journal of Botany* 47: 566-576.
- Nuez F. 2000. Introducción al análisis del ligamiento y cartografía de marcadores simples. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editores F. Nuez y J.M. Carrillo. I.S.B.N.: 84-7721-945-1. Páginas 153-292.
- Nuez F., Carrillo J.M. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. 579 pp.

- Nuez F., Carrillo J.M., de Ron A.M. 2000. Introducción. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editores F. Nuez y J.M. Carrillo. I.S.B.N.: 84-7721-945-1. Páginas 1-22.
- Nunan K., Sims I.M., Bacic A., Robinson S., Fincher G. 1998. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology* 118: 783-792.
- Nunan K.J., Davies C., Robinson S.P., Fincher G.B. 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* 214: 257-264.
- OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino).
<http://www.oiv.int/oiv/cms/index?lang=es>
- Oliveira E.J., Pádua J.G., Zucchi M.I., Vencovsky R., Vieira M.L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.
- Olmo H.P. 1979. Grapes. En: Simmonds NW, ed. *Evolution of crop plants*. London.
- Olsen A.N., Ernst H.A., Leggio L.L., Skriver K. 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 10: 79-87.
- Ophir R., Pang X., Halaly T., Venkateswari J., Lavee S., Galbraith D., Or E. 2009. Gene-expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy-release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene-ABA interplay and cell enlargement. *Plant Molecular Biology* 71: 403-423.
- Or E., Vilozny I., Eyal Y., Ogradovitch A. 2000. The transduction of the signal for grape bud dormancy breaking induced by hydrogen cyanamide may involve the SNF-like protein kinase GDBRPK. *Plant Molecular Biology* 43: 483-494.
- Or E., Vilozny I., Fennel A., Eyal Y., Ogradovitch A. 2002. Dormancy in grape buds: isolation and characterization of catalase cDNA and analysis of its expression following chemical induction of bud dormancy release. *Plant Science* 162: 121-130.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Genetics* 86: 2766-2770.
- Paglia G., Morgante M. 1998. PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. *Molecular Breeding* 4: 173-177.
- Park S.K., Morrison J.C., Adams D.O., Noble A.C. 1991. Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 514-518.

- Pellerone F.I., Edwards K.J., Thomas M.R. 2001. Grapevine microsatellite repeats: isolation, characterisation and use for genotyping of grape germplasm from Southern Italy. *Vitis* 40: 179-186.
- Pérez F.J., Viani C., Retamales J. 2000. Bioactive gibberellins in seeded and seedless grapes: identification and changes in content during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture* 51: 315-318.
- Pérez F.J., Lira W. 2005. Possible role of catalase in post-dormancy bud break in grapevines. *Journal of Plant Physiology* 162: 301-308.
- Pilati S., Perazzolli M., Malossini A., Cestaro A., Demattè L., Fontana P., Dal Ri A., Viola A., Velasco R., Moser C. 2007. Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. *BioMed Central Genomics* 8: 428
- Poupin M.J., Federici F., Medina C., Matus J.T., Timmermann T., Arce-Johnson P. 2007. Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box TM6, PISTILLATA and APETALA3 genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene* 404: 10-24.
- Rafalski A. 2002a. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 94-100.
- Rafalski J.A. 2002b. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science* 162: 329-333.
- Revilla E., Carrasco D., Benito A., Arroyo-García R. 2010. Anthocyanin composition of several wild grape accessions. *American Journal of Enology and Viticulture*. 61: 536-543.
- Riaz S., Dangl G.S., Edwards K.J., Meredith C.P. 2004. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics* 108:864–872.
- Riaz S., Krivanek A.F., Xu K., Walker M.A. 2006. Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, PdR1, and Sex on an extended genetic map of *Vitis rupestris* x *V. arizonica*. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1317-1329.
- Riaz S., Tensher A.C., Ramming D.W., Walker M.A. 2011. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 122: 1059-1073.
- Ribéreau-Gayon P., Boidron J.N., Terrier A. 1975. Aroma of muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 23:1042-1047.

- Robinson S.P., Davies C. 2000. Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 175-188.
- Roux F., Touzet P., Cuguen J., Le Corre V. 2006. How to be early flowering: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 11: 375-381.
- Roxrud I., Lid S.E., Fletcher J.C., Schmidt E.D.L., Opsahl-Soteberg H.G. 2007. GASA4, One of the 14-Member *Arabidopsis* GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant Cell Physiology* 48: 471-483.
- Royer, C. 1988. Mouvement historiques de la vigne dans le monde. In *La Vigne et le Vin (La Manufacture et la Cité des sciences et de l'industrie, eds)*, pp. 15-25, Graficas.
- Ruiz-García L., Carreño I., Flores P., Hellín P., Martínez M., Molina M., Cava J., Carreño J., Fenoll J. 2009. Mapping QTLs for Muscat flavor content in table grape. 9th IPMB Congress St. Louis, Missouri (USA).
- Salmaso M., Malacarne G., Troggio M., Faes G., Stefanini M., Grando M.S., Velasco R. 2008. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic map integrating the position of 139 expressed genes. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 1129-1143.
- Sax K. 1923. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552-560.
- Scott K.D., Egler P., Seaton G., Rossetto M., Ablett E.M., Lee L.S., Henry R.J. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 723-726.
- Sefc K.M., Regner F., Turetschek E., Glössl J., Steinkellner H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42: 367-373.
- Sevini F., Marino R., Grando M.S. 2004. Mapping candidate genes and QTLs for aroma content in grape. In: *I International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research. Acta Horticulturae* 652: 439-443
- Shen R., Fan J.B., Campbell D., Chang W., Chen J., Doucet D., Yeakley J., Bibikova M., García E.W., McBride C., Steemers F., García F., Kermani B.G., Gunderson K., Oliphant A. 2005. High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 573: 70-82.
- Shulman Y., Nir G., Lavee S. 1983. The effect of cyanamide on release from dormancy of grapevine buds. *Scientia Horticulturae* 19: 97-104.

- Simillion C., Vandepoele K., Van Montagu M.C.E., Zabeau M., Van de Peer Y. 2002. The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A. 99: 13627-13632.
- Simpson G.G., Dean C. 2002. *Arabidopsis*, the Rosetta Stone of Flowering Time? Science 296: 285-289.
- Slinkard K.W., Singleton V.L. 1984. Phenol content of grape skins and the loss of ability to make anthocyanins by mutation. Vitis 23: 175-178.
- Smart R.E., Shaulis N.J., Lemon E.R. 1982. The effect of Concord vineyard microclimate on yield. II. Interrelations between microclimate and yield expression. American Journal of Enology and Viticulture 33: 109-116.
- Sreekantan L., Thomas M.R. 2006. *VvFT* and *VvMADS8*, the grapevine homologues of the floral integrators *FT* and *SOC1*, have unique expression patterns in grapevine and hasten flowering in *Arabidopsis*. Functional Plant Biology 33: 1129-1139.
- Sreekantan L., Torregrosa L., Fernandez L., Thomas M.R. 2006. *VvMADS9*, a class B MADS-box gene involved in grapevine flowering, shows different expression patterns in mutants with abnormal petal and stamen structures. Functional Plant Biology 33: 877-886.
- Srinivasan C., Mullins M.G. 1976. Reproductive anatomy of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): Origin and development of the Anlage and its derivatives. Annals of Botany 38: 1079-1084.
- Srinivasan C., Mullins M.G. 1980. Effects of temperature and growth regulators on formation of anlagen, tendrils and inflorescences in *Vitis vinifera* L. Annals of Botany 45: 439-446.
- Srinivasan C., Mullins M.G. 1981. Physiology of flowering in the grapevine: a review. American Journal of Enology and Viticulture 32: 47-63.
- Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. The Plant Journal 3: 739-744.
- Streemers F.J., Gunderson K.L. 2005. Illumina, Inc. Pharmacogenomics 6: 777-782.
- Symons G.M., Davies C., Shavrukov Y., Dry I.B., Reid J.B., Thomas M.R. 2006. Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape ripening. Plant Physiology 140: 150-158.
- Terrier N., Glissant D., Grimplet J., Barrieu F., Abbal P., Couture C., Ageorges A., Atanassova R., Léon C. Renaudin J.P., Dédaldéchamp F., Romieu C., Delrot S., Hamdi S. 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. Planta 222: 832-847.

- This P., Lacombe T., Thomas M. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 22: 512-519.
- Thomas M.R., Scott N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* 86: 985-990.
- 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 Molecular Biology* 25: 939-949.
- Tobler A.R., Short S., Andersen M.R., Paner T.M., Briggs J.C., Lambert S.M., Wu P.P., Wang Y., Spoonde A.Y., Koehler R.T., Peyret N., Chen C., Broomer A.J., Ridzon D.A., Zhou H., Hoo B.S., Hayashibara K.C., Leong L.N., Ma C.N., Rosenblum B.B., Day J.P., Ziegler J.S., De La Vega F.M., Rhodes M.D., Hennessy K.M., Wenz H.M. 2005. The SNPLex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. *Journal of Biomolecular Techniques* 16: 396-404.
- Troggio M., Malacarne G., Coppola G., Segala C., Cartwright D.A., Pindo M., Stefanini M., Mank R., Moroldo M., Morgante M., Grando M.S., Velasco R. 2007. A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. *Genetics* 176: 2637–2650.
- Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N y col. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596-1604.
- Tyerman S.D., Tilbrook J., Pardo C., Kotula L., Sullivan W., Steudle E. 2004. Direct measurement of hydraulic properties in developing berries of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz and Chardonnay. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 170-181.
- Ubi B.U., Honda C., Bessho H., Kondo S., Wada M., Kobayashi S., Moriguchi T. 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature. *Plant Science*. 170: 571-578.
- Valenzuela J., Lobato A. 2000. Reguladores de crecimiento: Giberelinas. p. 179-193. En J. Valenzuela (ed.), *Uva de mesa en Chile*. Colección Libros INIA N° 5. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.
- Vales M.I., Schön C.C., Capettini F., Chen X.M., Corey A.E., Mather D.E., Mundt C.C., Richardson K.L., Sandoval-Islas J.S., Utz H.F., Hayes P.M. 2005. Effect of population size on the estimation of QTL: a test using resistance to barley stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1260-1270.

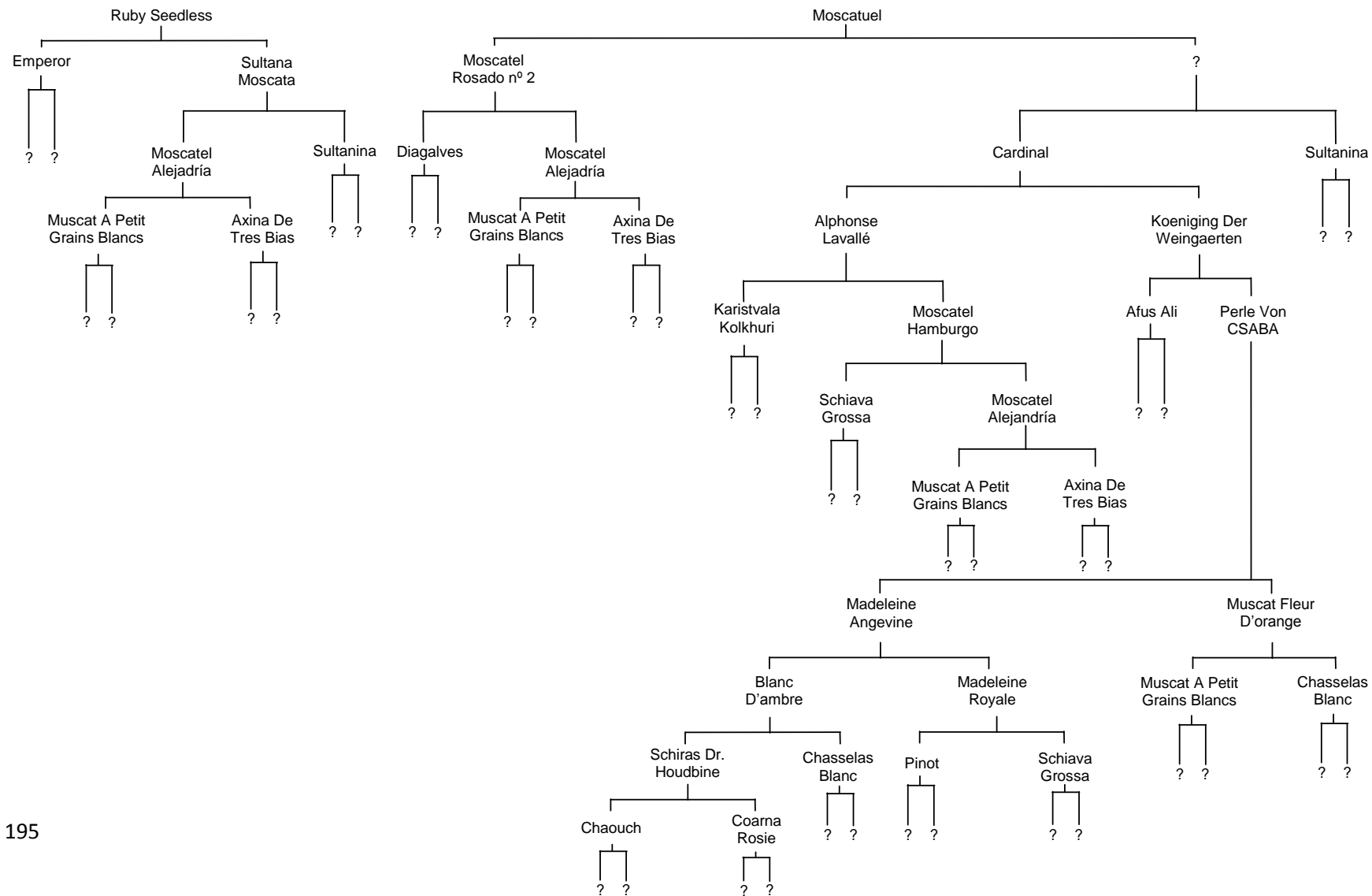
- Van Ooijen J.W., Voorrips R.E. 2001. JoinMap[®] 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps [computer program]. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Van Ooijen J.W., Boer M.P., Jansen R.C., Maliepaard C. 2002. MapQTL[®] 4.0, software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Plant Research Internatinonal. Wageningen, the Netherlands.
- Van Ooijen J.W. 2009. MapQTL 6: Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vargas A.M., de Andrés M.T., Borrego B., Ibáñez J. 2009. Pedigrees of fifty table-grape cultivars. American Journal of Enology and Viticulture 60: 525-532.
- Vázquez J.F., Sánchez-Yélamo M.D., Carillo J.M. 2000. Marcadores morfológicos y bioquímicos. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editores F. Nuez y J.M. Carrillo. I.S.B.N.: 84-7721-945-1. páginas 25-89.
- Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D.A., Cestaro A., Pruss D., Pindo M., FitzGerald L.M., Vezzulli S., Reid J., Malacarne G., Iliev D., Coppola G., Wardell B., Micheletti D., Macalma T.M., Facci M., Mitchell J.T., Perazzolli M., Eldredge G., Gatto P., Oyzerski R., Moretto M., Gutin N., Stefanini M., Chen Y., Segala C., Davenport C., Demattè L., Mraz A., Battilana J., Stormo K., Costa F., Tao Q., Si- Ammour A., Harkins T., Lackey A., Perbost C., Taillon B., Stella A., Solovyev V., Fawcett J.A., Sterck L., Vandepoele K., Grando M.S., Toppo S., Moser C., Lanchbury J., Bogden R., Skolnick M., Sgaramella V., Bhatnagar S.K., Fontana P., Gutin A., Van de Peer Y., Salamini F., Viola R. 2007. High quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS ONE 2: e1326.
- Vezzulli S., Troggio M., Coppola G., Jermakow A., Cartwright D., Zharkikh A., Stefanini M., Grando M.S., Viola R., Adam-Blondon A.F., Thomas M., This P., Velasco R. 2008. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers. Theoretical and Applied Genetics 117: 499-511.
- Vitis International Variety Catalogue. <http://www.vivc.de/>
- Viruel M.A., Messeguer M.C., de Vicente J., García-Mas J., Puigdemènc P. 1995. A linkage map for RFLP and isozyme markers for almond. Theoretical and Applied Genetics 91: 964-971.
- Vogel J., Scolnick P. 1998. Direct amplification from microsatellites: detection of simple sequence repeat-based polymorphisms without cloning. in *DNA*

- markers. Protocols, applications and overviews*. Ed. Caetano Anolles G. y Greshoff P.M. New York: WILEY-VCH p. 133-150.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kulper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 21: 4407-4414.
- Walker A.R., Lee E., Bogs J., McDavid D.A.J., Thomas M., Robinson S.P. 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal* 49: 772-785.
- Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.B., Powell W. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular & General Genetics* 253: 687-694.
- Welsh J., Honeycutt R.J., McClelland M., Sobral B.W.S. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theoretical and Applied Genetics* 82: 473-476.
- Welter L.J., Baydar N.G., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Töpfer R., Zyprian E.M. 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Molecular Breeding* 20:359-374.
- Williams J.G.K., Rubelik A.R., Livak K.J., Rafalski A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wilson B., Strauss C.R., Williams P.J. 1984. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 919-924.
- Wilson B., Strauss C.R., Williams P.J. 1986. The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice, and pulp fractions of some white grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 107-111.
- Winkler A., Cook J., Kliewer N., Lider A. 1974. *General viticulture*. University of California Press, Berkeley. 710 páginas.
- Wolpert J.A., Howel G.S., Mansfiel T.K. 1983. Sampling Vidal Blanc grapes. I. effect of training system, pruning severity, shoot exposure, shoot origin, and cluster thinning on cluster weight and fruit quality. *American Journal of Enology and Viticulture* 34: 72-76.

- Wyman A.R., White R. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77: 6754-6758.
- Xu K., Riaz S., Roncoroni N.C., Jin Y., Hu R., Zhou R., Walker M.A. 2008. Genetic and QTL analysis of resistance to *Xiphinema index* in a grapevine cross. Theoretical and Applied Genetics 116:305-311.
- Yakushiji H., Sakurai N., Morinaga K. 2001. Changes in cell-wall polysaccharides from the mesocarp of grape berries during veraison. Physiologia Plantarum 111: 188-195.
- Yakushiji H., Kobayashi S., Goto-Yamamoto, N., JeonG S.T., Sueta T., Mitani N., Azuma A. 2006: A skin color mutation of grapevine, from black-skinned 'Pinot Noir' to white-skinned 'Pinot Blanc' is caused by the deletion of the functional *VvmybA1* allele. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 70: 1506-1508.
- Yamane T., Seok T.J., Goto-Yamamoto N., Koshita Y., Kobayashi S. 2006. Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. American Journal of Enology and Viticulture, 57, 54-59.
- Zeng Z.Z. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136: 1457-1468.
- Zhang X.Y., Wang X.L., Wang X.F., Xia G.H., Pan Q.H., Fan R.C., Wu F.Q., Yu X.C., Zhang D.P. 2006. A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. Plant Physiology 142: 220-232.
- Zohary D. 1996. The origins and spread of agriculture and pastoralism in Eurasia (ed. Harris DR), pp. 142-147. University College London Press, London.
- Zohary D., Hopf M. 2000. Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe, and the Nile valley, 3rd ed. Oxford University, New York.

9. ANEXOS

Anexo 1. Pedigrí de los parentales. Fuente: Vitis International Variety Catalogue.



Anexo 2. Genotipos de Ruby Seedless (R) y Moscatuel (M) para los 201 microsatélites estudiados. Se muestra el grupo de ligamiento (GL) en que localizan, y la temperatura de anillamiento (Ta) o, en su caso, el intervalo de temperatura empleado (*touchdown*). n: No hubo resultado de amplificación (ver apartado 4.1.1).

Locus	GL	R	M	Ta	Locus	GL	R	M	Ta	Locus	GL	R	M	Ta
1 SCU05	12	n	n	63	68 VMC5G8	15	ab	aa	54	135 VVIM72	18	ab	ac	52-49
2 SCU06VV	17	ab	ac	55	69 VMC5H11	19	aa	ab	55	136 VVIM93	9	aa	aa	55-52
3 SCU14VV	16	ab	aa	61-58	70 VMC6C10	14	ab	ac	60	137 VVIN03	7	aa	aa	51-48
4 TT251F02	12	ab	ac	49	71 VMC6D12	9	ab	aa	61-58	138 VVIN16	18	ab	ac	52
5 UDV_134	16	aa	aa	58	72 VMC6E10	5	ab	cd	58	139 VVIN31	6	aa	ab	54
6 UDV023	19	ab	aa	58	73 VMC6E4	15	aa	aa	54-51	140 VVIN52	16	aa	ab	59
7 UDV027	15	aa	aa	57-54	74 VMC6F1	2	aa	ab	51-48	141 VVIN54	3	ab	ac	50
8 UDV043	3	ab	aa	58	75 VMC6F11	18	aa	ab	57	142 VVIN56	7	ab	ac	57-54
9 UDV047	15	ab	ac	51-48	76 VMC6F11M	18	aa	aa	55	143 VVIN62	8	aa	aa	55-52
10 UDV048	9	n	n	57-54	77 VMC6G1	11	ab	cd	60	144 VVIN70	14	ab	ac	55
11 UDV050	14	ab	ab	57-54	78 VMC6G8	8	aa	ab	55-52	145 VVIN73	17	ab	aa	51-48
12 UDV052	16	ab	ab	56	79 VMC7A4	7	aa	aa	57	146 VVIN75	4	aa	aa	52-49
13 UDV090	6	ab	aa	57	80 VMC7B1	19	aa	ab	59	147 VVIN83	18	aa	ab	55
14 UDV104	16	ab	cd	56	81 VMC7F2	18	ab	ab	56	148 VVIO52	9	ab	aa	55
15 UDV109	2	ab	cd	51-48	82 VMC7G3	2	ab	ac	56	149 VVIO55	2	aa	aa	56
16 UDV117	18	ab	ac	57	83 VMC7G5	1	aa	aa	59-57	150 VVIP02	11	aa	aa	56
17 VMC16D4	5	ab	cd	55-52	84 VMC7H3	4	ab	ac	57	151 VVIP04	8	ab	ab	53
18 VMC16F3	7	ab	ac	55	85 VMC8A7	1	ab	cd	60	152 VVIP10	13	ab	ac	56
19 VMC1A12	7	aa	aa	55	86 VMC8C2	2	ab	ac	54	153 VVIP22	9	aa	aa	55-52
20 VMC1A2	7	aa	aa	58	87 VMC8D1	1	ab	aa	58	154 VVIP31	19	ab	aa	57
21 VMC1B11	8	ab	aa	61	88 VMC8D11	7	aa	aa	58	155 VVIP33	15	aa	aa	55
22 VMC1C10	9	ab	ab	61	89 VMC8D3	10	ab	ac	59	156 VVIP36B	11	ab	aa	54
23 VMC1E11	16	ab	cd	58	90 VMC8F10	3	ab	ac	58	157 VVIP38	9	aa	aa	58-55
24 VMC1E12	14	ab	aa	58	91 VMC8F4_2	18	ab	ab	57-54	158 VVIP44	17	aa	ab	53-50
25 VMC1F10	8	ab	ac	56	92 VMC8G3_2	15	ab	ab	62-59	159 VVIP47A	2	aa	aa	51-48
26 VMC2A10	10	ab	ac	59-56	93 VMC8G6	12	aa	ab	58	160 VVIP60	1	aa	ab	54
27 VMC2A3	18	ab	cd	56	94 VMC8G9	12	aa	ab	55	161 VVIP72	6	aa	aa	55
28 VMC2A5	14	aa	ab	52	95 VMC9A2_1	19	ab	aa	57	162 VVIP77	4	ab	ac	59
29 VMC2A7	18	ab	aa	58	96 VMC9A3_1	7	n	n	53-50	163 VVIQ22B	17	aa	ab	55
30 VMC2c10_1	2	ab	aa	54	97 VMC9B5	5	aa	ab	60	164 VVIQ32	14	ab	aa	57
31 VMC2C7	13	ab	cd	58	98 VMC9H4_2	13	ab	cd	55	165 VVIQ52	9	ab	ac	53
32 VMC2D9	9	ab	aa	52	99 VMCNG1B9	18	ab	aa	58	166 VVIQ57	1	ab	ab	52
33 VMC2E10	4	ab	ab	56	100 VMCNG1D12	13	n	n	61	167 VVIQ61	15	ab	aa	56
34 VMC2E11	9	ab	ac	58	101 VMCNG1E1	14	ab	cd	59	168 VVIQ66	16	aa	aa	56
35 VMC2E7	3	ab	ab	50	102 VMCNG1F1_1	4	aa	ab	55	169 VVIQ67	7	aa	aa	55-52
36 VMC2H10	8	ab	aa	58	103 VMCNG1G1_1	14	ab	cd	54	170 VVIS58	7	ab	aa	56
37 VMC2H4	12	ab	cd	56	104 VMCNG2B6	8	aa	aa	60	171 VVIS70	14	ab	ac	55
38 VMC2H5	14	ab	aa	53	105 VMCNG2C2_1	4	aa	ab	52-49	172 VVIT60	1	ab	aa	55
39 VMC2H9	6	aa	ab	56	106 VrZAG21	4	aa	ab	66	173 VVIT65	16	ab	aa	53
40 VMC3A9	14	n	n	59-56	107 VrZAG25	10	aa	aa	60	174 VVIU37	9	ab	aa	54
41 VMC3B7_2	19	ab	ab	58-55	108 VrZAG29	1	aa	ab	59-57	175 VVIV04	7	ab	ac	61-59
42 VMC3B9	5	aa	ab	54	109 VrZAG47	5	aa	ab	55	176 VVIV05	12	ab	aa	57
43 VMC3C11_1	17	ab	ac	58	110 VrZAG62	7	ab	ac	52	177 VVIV16	18	ab	aa	55
44 VMC3D12	13	ab	ab	56	111 VrZAG64	10	ab	ac	57	178 VVIV17	16	ab	ac	56-53
45 VMC3D7	10	ab	cd	58	112 VrZAG67	10	aa	aa	64	179 VVIV33	19	ab	ab	55
46 VMC3E12	11	ab	aa	54	113 VrZAG79	5	ab	cd	65	180 VVIV35	11	aa	ab	54
47 VMC3E5	18	aa	ab	55	114 VrZAG83	4	ab	ab	64	181 VVIV36	7	aa	aa	55-52
48 VMC3F8	8	aa	ab	57	115 VrZAG93	2	ab	aa	59-56	182 VVIV37	10	ab	ac	52
49 VMC3G8_2	9	ab	aa	59-56	116 VVC6	5	aa	ab	56	183 VVIV61	13	aa	ab	56
50 VMC4C10-DG-C	12	ab	ab	46	117 VVIB01	2	ab	aa	56	184 VVIV67	15	ab	ac	55
51 VMC4C6	5	ab	ac	50	118 VVIB09	17	ab	ac	55	185 VVIV70	19	n	n	55
52 VMC4D4	4	ab	aa	58	119 VVIB19	11	ab	aa	54	186 VVMD17	18	ab	aa	58-55
53 VMC4D9_2	15	aa	ab	60	120 VVIB23	2	ab	ab	60	187 VVMD21	6	ab	ab	56
54 VMC4F3_1	12	ab	aa	56	121 VVIB32	12	ab	aa	50-47	188 VVMD24	14	ab	ac	61-58
55 VMC4F8	1	aa	ab	56	122 VVIB59	3	n	n	56	189 VVMD25	11	ab	ac	63
56 VMC4G6	6	aa	aa	54	123 VVIB63	15	ab	ac	52	190 VVMD27	5	aa	ab	60
57 VMC4H5	6	ab	ab	55	124 VVIB66	8	aa	ab	53	191 VVMD28	3	ab	ac	56
58 VMC4H6	9	ab	ac	56	125 VVIC50	6	n	n	57	192 VVMD31	7	ab	aa	57
59 VMC4H9	12	ab	ab	54	126 VVIF52	1	ab	aa	60	193 VVMD32	4	ab	ac	56
60 VMC5A1	16	ab	aa	60	127 VVIH01	10	aa	ab	61	194 VVMD34	2	aa	aa	58
61 VMC5C1	9	aa	aa	58-55	128 VVIH54	13	ab	aa	60	195 VVMD36	3	aa	ab	60
62 VMC5C5	6	aa	ab	60	129 VVIM01	13	ab	ab	52-49	196 VVMD37	16	aa	ab	61-58
63 VMC5E9	19	ab	cd	54	130 VVIM04	11	aa	aa	55-52	197 VVMD5	16	ab	ac	53
64 VMC5G1_1	6	aa	aa	54	131 VVIM10	18	aa	aa	52	198 VVMD6	2	aa	aa	49-46
65 VMC5G11	7	n	n	51-48	132 VVIM25	1	ab	ac	53	199 VVMD7	7	ab	ab	57
66 VMC5G6_1	8	aa	ab	55	133 VVIM42A	15	ab	ac	54	200 VVMD8	11	aa	aa	52-49
67 VMC5G7	2	ab	ac	53	134 VVIM43	6	ab	ab	55	201 VVS2	11	ab	cd	56

