

**Caracterización e identificación molecular de 87 muestras de *Vitis vinifera* L. recolectadas en la isla de El Hierro**

**Carolina Bosch Marín**

**TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA**

**Tutora académica:** Dra. Maria Francesca Fort Marsal

Departamento de Bioquímica y Biotecnología

[mariafrancesca.fort@urv.cat](mailto:mariafrancesca.fort@urv.cat)

**En colaboración con:** Grupo de Investigación en Tecnología Enológica, Área de Biología de la Vid (TECNENOL-ABvid). Departamento de Bioquímica i Biotecnología. Universidad Rovira i Virgili (Tarragona)

Tarragona, junio 2023

Jo, Carolina Bosch Marín, amb DNI 77793612E, soc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 31 de maig de 2023



Carolina Bosch Marín

# ÍNDICE

1. DATOS DEL CENTRO .....	4
2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE .....	4
3. INTRODUCCIÓN .....	5
3.1. Biodiversidad de la especie <i>Vitis Vinifera</i> L.....	5
3.2. Clasificación botánica de la vid.....	6
3.3. <i>Vitis Vinifera</i> L. en las Islas Canarias y la Macaronesia.....	6
3.4. La isla de El Hierro.....	7
3.5. El cultivo de la vid en El Hierro .....	8
3.6. La técnica de los microsatélites o SSR ( <i>Simple Sequence Repeats</i> ).....	9
4. HIPÓTESIS DEL TRABAJO .....	10
5. OBJETIVOS.....	10
6. METODOLOGIA .....	10
6.1. Material vegetal.....	11
6.2. Microsatélites .....	11
6.3. Extracción y purificación de ADN .....	11
6.4. Amplificación del ADN por PCR.....	12
6.5. Medida de longitud de los fragmentos amplificados .....	13
6.6. Análisis de datos.....	13
7. RESULTADOS, DISCUSIÓN Y RELACIÓN CON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	14
7.1 Evaluación de la bondad y eficiencia de los SSR utilizados .....	14
7.2 Clasificación de variedades según el perfil genético hallado .....	17
7.3 Estudio de la estructura poblacional de la población de muestras procedentes de la isla de El Hierro (Singularidad).....	17
7.3.1. Estudio de la población herreña propiamente dicha.....	18
7.3.2. Estudio de los cultivares herreños y su relación con la población de varietales canarios.....	21
7.3.3. Estudio de la colección de vides de la isla de El Hierro y su relación con la población mundial.....	22
7.3.3.1. Estudio de la estructura poblacional basándose en criterios puramente genéticos.....	22
7.3.3.2. Estudio de la estructura poblacional basándose en criterios geográficos/genéticos.....	24
8. CONCLUSIONES.....	26
9. BIBLIOGRAFÍA .....	27
10. AUTOEVALUACIÓN .....	30
ANEXOS .....	31

## 1. DATOS DEL CENTRO

El grupo de investigación de Tecnología Enológica (TECNENOL) integrado por el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili, está situado en la primera planta del Campus Sescelades (Calle Marcel·lí Domingo, 1, 43007 Tarragona).

Las principales líneas de investigación de TECNENOL son en el área de Enología, y el área de Biología de la Viña/Viticultura. Está coordinado por el Dr. Fernando Zamora y tiene como responsable del área de Enología al Dr. Joan Miquel Canals, mientras que del área de Biología de la Viña se encarga la Dra. Maria Francesca Fort.

TECNENOL se formó el año 2001, por lo que tiene una larga trayectoria en el mundo de la investigación. Gracias a los buenos resultados obtenidos por los investigadores y becarios que forman, y han formado parte de este grupo de investigación, el año 2005 la Generalitat de Catalunya otorgó a TECNENOL la acreditación de Grupo de Investigación de Calidad (REF: 2005SGR-00644).

El grupo de investigación de Tecnología Enológica, ha publicado diversos artículos en revistas internacionales y revistas nacionales científicas y de divulgación. Además, sus miembros participan en congresos y conferencias por todo el Estado Español y en el extranjero.

## 2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La isla del Hierro es la más diversa de Canarias para la vid, una de las especies más afectadas por la pérdida de biodiversidad a causa de la plaga de la filoxera, el cambio climático, y la homogenización de los vinos debido al *marketing* y la legislación. El objetivo principal de este trabajo es caracterizar e identificar muestras de *Vitis vinifera* L. procedentes de esta isla. Para ello, se ha utilizado la técnica de los Microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeats*) con 20 Marcadores Moleculares. De las muestras analizadas, se han detectado cultívars conocidos y perfiles moleculares nuevos. Considerando sólo la variabilidad numérica, se han hallado perfiles moleculares distintos mientras que, considerando tanto la variabilidad numérica como la variabilidad de la expresión alélica, se han contabilizado perfiles genéticos diferentes. La variabilidad intravarietal se ha detectado en individuos de esta población.

PALABRAS CLAVE: *Vitis vinifera* L., Microsatélites o SSR, variedades, El Hierro, Canarias, caracterización e identificación

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Biodiversidad de la especie *Vitis vinifera* L.

La biodiversidad de la especie *Vitis vinifera* L., una de las especies más antiguas de la Cuenca del Mediterráneo junto con el olivo, el trigo, la higuera, entre otros, empieza al final de la última glaciación del Periodo Cuaternario (inicio del Holoceno) (Wan y col., 2013). La medida de la variabilidad intervarietal de esta especie desde sus orígenes hasta la actualidad, Wolkovich y col; (2018), la cuantifican en más de 6000 cultivares. Asimismo, estos autores solo registran en su estudio 12 variedades (Cabernet-Sauvignon, Chardonnay, Merlot, Pinot noir, Syrah, Sauvignon blanc, Riesling, Muscat à pequeños grains blancos, Gewürztraminer, Viognier, Pinot blanco y Pinot gris) ocupando entre el 70-90% de la superficie del viñedo actual en el mundo. Este hecho está provocando una importante homogenización de los vinos comerciales, que junto con la legislación del sector vitivinícola mundial (sobre todo las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP), que limitan el número de variedades a cultivar) causa una importante erosión genética de la vid (Marsal y col, 2017). Otros factores responsables de la erosión genética de estos cultivos son la plaga de la filoxera (que arrasó todo el viñedo mundial a finales del siglo XIX y principios del siglo XX) y el cambio climático (que va a provocar la desaparición o desplazamiento de muchas de las áreas vitivinícolas actuales), a la vez que un cambio de encepamiento.

Cansado de las variedades conocidas como internacionales (Cabernet-Sauvignon, Merlot, Chardonnay...), el consumidor del vino embotellado con DOP quiere experimentar nuevas sensaciones organolépticas (experiential marketing). De esta manera, las novedosas tendencias de mercado ponen en valor la búsqueda de la tipicidad en un vino, lo cual repercute de manera directa en la recuperación de la biodiversidad varietal. De la misma manera, una de las posibles soluciones a la mitigación de los efectos del cambio climático pasaría por explorar la biodiversidad intervarietal e intravarietal de *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* (Wolkovich y col; 2018).

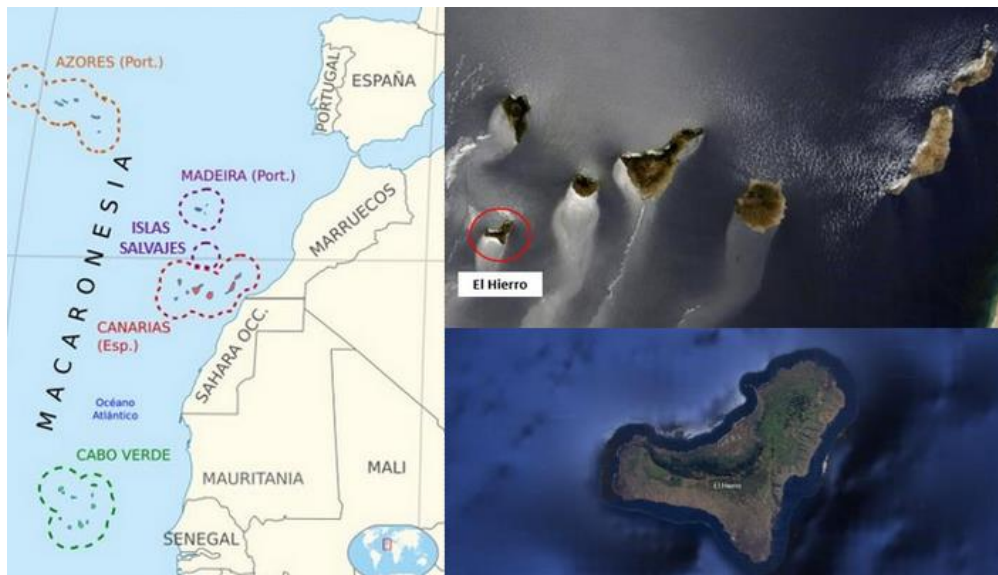
### 3.2. Clasificación botánica de la vid

La vid europea es una liana sarmentosa que pertenece, según la clasificación de Cavalier-Smith, al Reino *Plantae*, División *Anthophyta* (*Magnoliophyta*), Clase *Magnoliopsida* (*Eudicotyledons*), Subclase *Rosids*, Orden *Vitales*, Familia *Vitaceae*, Subfamilia *Viticoideae*, Género *Vitis* y Especie *Vitis vinifera*. Su genoma es diploide con 19 pares de cromosomas y un tamaño estimado de 500 Mbp (This y col; 2006). La taxonomía vegetal de la especie *Vitis vinifera* L. la divide en dos subespecies, *Vitis vinifera ssp sylvestris* (la forma silvestre) y *Vitis vinifera ssp vinifera* (la forma domesticada). La vid silvestre es dioica, con plantas masculinas y femeninas, mientras que la mayoría de los cultivares modernos (que corresponden a la vid domesticada), son plantas hermafroditas. Los cultivares de uva son altamente heterocigotos y requieren de propagación vegetativa para mantener sus características fenotípicas.

La observación de caracteres fenotípicos como criterio a la hora de establecer una clasificación, ha dado como resultado muchas confusiones. Actualmente, el desarrollo de técnicas moleculares (como los marcadores) ha revolucionado el mundo de la Taxonomía, unificando los criterios junto con la ayuda del registro fósil.

### 3.3. *Vitis vinifera* L. en las Islas Canarias y la Macaronesia

Las Islas Canarias forman parte (junto con Azores, Cabo Verde, Madeira y las Islas Salvajes) de la Macaronesia, una zona biogeográfica formada por este grupo de 5 archipiélagos que se extiende desde el suroeste de Europa hasta el noroeste de África (Figura 1). El archipiélago canario es una de las comunidades autónomas de España, situado frente a la zona noroeste del continente africano, a 100 km oeste de la frontera entre Marruecos y el Sáhara Occidental. Está formado principalmente por las islas Tenerife, Fuerteventura, Gran Canaria, Lanzarote, La Palma, La Gomera, El Hierro y La Graciosa. Además, también contiene los islotes Alegranza, Islote de Lobos, Montaña Clara, Roque del Oeste y Roque del Este.



**Figura 1.** A la izquierda, localización de los 5 archipiélagos que forman la Macaronesia (Adaptado de Wikipedia; 2023). En la derecha superior, fotografía de las Islas Canarias captadas desde el espacio, finalista a Imagen del Año de la NASA (Digital El Mundo; 2014). En la derecha inferior, la Isla de El Hierro (Google Earth; 2023).

Los españoles y portugueses colonizaron las islas de la Macaronesia en el siglo XV, y fueron los responsables de introducir las primeras variedades de la vid cultivada (domesticada). Uno de los acontecimientos históricos más relevantes dentro del sector vitivinícola, es que la filoxera (que devastó los viñedos europeos y causó una reducción drástica de las variedades locales) nunca atacó al archipiélago canario, en cambio sí afectó a los archipiélagos de Azores y Madeira. Esto ha permitido la aparición de nuevos fenotipos debido a la acumulación de hibridaciones y/o mutaciones genéticas a lo largo de cinco siglos. Por tanto, muchas de las variedades de *Vitis vinifera L.* en las Islas Canarias, son el resultado de la selección natural, los cruces naturales, la selección antropogénica y las mutaciones.

### 3.4. La isla de El Hierro

El presente trabajo se centra en las variedades de la vid en la isla de El Hierro. La isla de El Hierro es la más occidental y meridional del Archipiélago Canario, situada entre los paralelos 27°38' y 27°51' de latitud norte. Pertenece a la provincia de Santacruz de Tenerife y su capital es Valverde. Cuenta con otros dos municipios: La Frontera y El Pinar. El Hierro es la menor de las siete islas mayores, con una superficie de 268,71 km<sup>2</sup>. También es la menos poblada, con 11.423 habitantes (2022) (exceptuando la Graciosa, ya que se considera una isla menor).

El Hierro es una isla de origen volcánico, con una edad geológica estimada de 1,2 millones de años, siendo la isla canaria más joven. El 22 de enero del año 2000, se declaró Reserva de la

Biosfera por la Unesco. Además, el 27 de junio de 2014 se convirtió en la primera isla del mundo plenamente autosuficiente a partir de fuentes de energía renovables, después de la inauguración de la Central Hidroeléctrica de Gorona del Viento.

La variación climática de cada zona de la isla del Hierro está condicionada por la orografía, pero son las nubes las que juegan un papel determinante. El mar de nubes es un fenómeno natural provocado por vientos alisios, que empujan las nubes contra las cumbres, y dan lugar a una acumulación horizontal de estratocúmulos a baja altura (entre los 500 y 1500 m aproximadamente). Sin embargo, al no existir alturas superiores a 1520 m sobre el nivel del mar en esta isla, las cumbres quedan dentro de la franja óptima del mar de nubes y, en forma de cascada, precipitan sobre la vegetación descargando en ella su humedad. Los vientos alisios, junto con la corriente de las Islas Canarias (bifurcación fría de la corriente del Golfo que se separa en las Azores), hacen que la isla no posea un clima árido como ocurre en el Sáhara, que está en la misma latitud.

### **3.5. El cultivo de la vid en El Hierro**

El Hierro posee todas las características edafológicas y climáticas para poseer una viticultura de calidad.

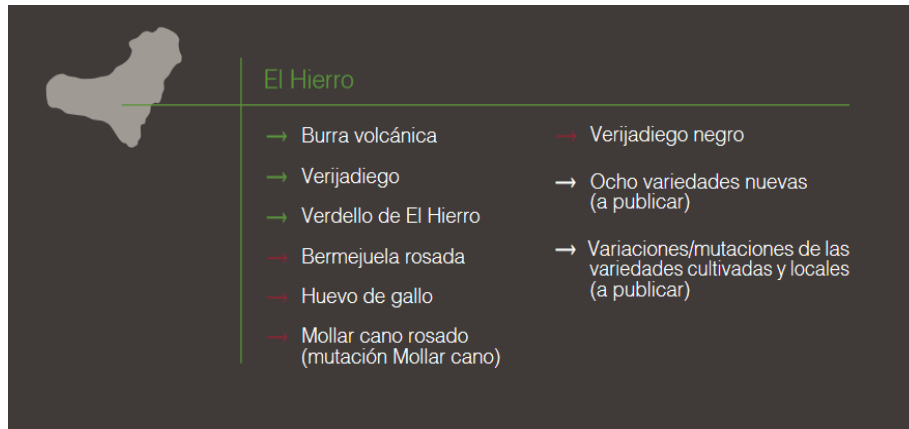
La isla también cumple con los cuatro criterios que se definen para distinguir una “viticultura heroica”, es decir, al cultivo de viñedos bajo unas condiciones de extrema dificultad. Estos criterios son: terreno con más de 30% de desnivel, altitud superior a 500 metros sobre el nivel del mar, viñas en terrazas de cultivo, y viticultura en pequeñas islas. Es propio de la isla el cultivo en terrazas para aprovechamiento del suelo en espacios muy reducidos y sometidos a fuerte erosión.

Las 203 hectáreas de viña del Hierro se distribuyen de la siguiente manera: el 50% se encuentra en el municipio de La Frontera, ocupando las laderas orientadas al norte del Valle del Golfo, y el resto se encuentra distribuido entre los municipios de Valverde (47,5 hectáreas) y El Pinar (51,5 hectáreas). El 86% de la superficie de viña se ubica entre los 200 y 400 metros sobre el nivel del mar (D.O.P. Vinos de El Hierro).

Como se ha mencionado anteriormente, *Vitis vinifera* L. ha evolucionado durante más de 500 años en las Islas Canarias, dando como resultado variedades únicas que permiten calificar el

archipiélago como uno de los principales centros mundiales de biodiversidad de la vid (Marsal y col; 2019).

Cuatro de las variedades locales son comunes en todas las islas (Bermejuela, Listán negro, Malvasía rosada y Listán rosado). La isla del Hierro, además, presenta las variedades locales que se muestran en la Figura 2.



**Figura 2.** Vidueños locales de El Hierro. Variedades blancas remarcadas con flechas en color verde. Variedades tintas y rosadas remarcadas con flechas en color rojo. Según Zerolo y col. (2006), Rodríguez-Torres (2017), Marsal y col. (2019).

Las ocho variedades nuevas, así como las variaciones/mutaciones de las variedades cultivadas y locales a publicar, forman parte de los resultados que se presentan en este trabajo.

### 3.6. La técnica de los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeats*)

Los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeats*) son segmentos cortos de ADN, con una longitud habitual de uno a seis pares de bases, que se repiten múltiples veces en tándem en una ubicación del genoma en particular que, por lo general, no es codificante.

Son muy utilizados como marcadores moleculares para estudios de diversidad genética en plantas, ya que son neutros (las frecuencias de sus diferentes variantes no están sujetas a la selección), codominantes (permiten la distinción de homocigotos y heterocigotos), y poseen una alta tasa de mutación, lo cual los hace muy polimórficos (Ibañez y col. 2003).

Con el objetivo de identificar estos polimorfismos, se diseñan cebadores de PCR marcados con un fluorocromo para la región de ADN que flanquea el microsatélite. Posteriormente, los productos amplificados resultantes de la amplificación por PCR se miden por electroforesis

capilar y se obtiene una gráfica llamada electroferograma, que recoge la cantidad de fluorescencia que emite cada fluorocromo, la cual es directamente proporcional a la cantidad del fragmento de ADN amplificado. Este método permite hacer PCRs múltiples, es decir, con diferentes cebadores a la vez.

#### **4. HIPÓTESIS DEL TRABAJO**

La isla del Hierro es la más diversa de Canarias para la especie *Vitis vinifera* L., pero su biodiversidad aún nos va a sorprender.

#### **5. OBJETIVOS**

Los objetivos fundamentales del presente estudio son:

1. Contribuir al enriquecimiento de la biodiversidad vegetal tanto de la isla de El Hierro, como del archipiélago canario, del Estado Español y de nuestro planeta.
2. Identificar las diferentes variedades locales de la isla de El Hierro existentes entre las 87 accesiones recolectadas por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen de El Hierro.
3. Localizar variantes de variedades crecidas y adaptadas a condiciones de esta isla.

#### **6. METODOLOGIA**

Para cumplir con los objetivos del estudio, se han llevado a cabo diferentes tareas teniendo en cuenta la técnica de los Microsatélites o SSR. Las secuencias cortas y repetitivas de ADN permiten caracterizar individualmente cada una de las muestras y, por lo tanto, identificar diferentes alelos. Este método se divide en tres etapas: la extracción y purificación de ADN, la amplificación de los fragmentos mediante la Polymerase Chain Reaction (PCR) y, finalmente, la medida de longitud de los fragmentos amplificados. Los resultados a analizar se obtienen en forma de electroferograma.

## 6.1. Material vegetal

Ochenta y siete muestras de sarmiento de diferentes plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) fueron recolectadas desde diversos puntos de la isla de El Hierro por viticultores de cada zona. Una vez recolectadas y enviadas a la Universidad Rovira i Virgili, se conservaron a -20°C hasta su procesamiento. En el Anexo 1 se muestra una tabla con información detallada de cada una de las muestras analizadas.

## 6.2. Microsatélites

Las muestras de vid fueron genotipadas utilizando 20 marcadores SSR, que fueron seleccionados previamente por su capacidad de discriminación y polimorfismo teniendo en cuenta estudios ya realizados anteriormente: VVS2, VVS3, VVS29 (Thomas y Scott, 1993); VVMD5, VVMD6, VVMD7 (Bowers et al., 1996); VVMD27, VVMD28, VVMD36 (Bowers et al., 1999b); VrZAG21, VrZAG47, VrZAG62, VrZAG64, VrZAG79, VrZAG83 (Sefc et al., 1999); scu06vv (Scott et al., 2000b); VvUCH11, VvUCH12, VvUCH19 (Lefort et al., 2002); VChr19a (Cipriani et al., 2010). Los Microsatélites VrZAG47 y VVMD27 no son loci independientes, es decir, amplifican la misma zona del genoma. La diferencia entre ambos es el diseño de los primers (Dalbó et al., 2000). De todos los SSR, hay nueve que la comunidad científica internacional (This et al., 2004; Maul y Röckel, 2015) considera que son marcadores genéticos de referencia o internacionales: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79. Se utilizaron siete de ellos, cosa que facilita mucho la interpretación de los resultados. En el Anexo 2 se muestra una tabla con las características específicas de cada microsatélite utilizado.

## 6.3. Extracción y purificación de ADN

Para obtener el tejido para la extracción de ADN, primero se elimina el ritidoma del sarmiento, ya que contiene un alto contenido en lignina (polifenoles). También se retira la médula, que contiene una gran cantidad de glúcidos que podrían interferir en los resultados. Posteriormente, se tritura la muestra cubierta con nitrógeno líquido, y se conserva a -20°C.

Para extraer el material genético de los sarmientos, se ha utilizado el método descrito por Marsal et al. (2011), una adaptación para madera basada en el protocolo de Fort y col. (2008). Éste se ha optimizado haciendo dos lavados con cloroformo, ya que de este modo es más eficaz la descontaminación de proteínas, uno de los principales contaminantes de los ácidos nucleicos. La calidad de cada muestra se ha evaluado con la ayuda del NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer Thermo Fisher® Scientific, que mide con exactitud la concentración y el nivel de pureza de ácidos nucleicos o proteínas. En este caso, teniendo en cuenta que a una longitud de onda de 260 nm absorben ácidos nucleicos, a 280 nm la mayoría de las proteínas y a 230 nm gran parte de polifenoles y polisacáridos, para considerar una muestra correcta se deben cumplir los siguientes parámetros: a) Ratio A260/A280 cerca de 2, b) Ratio A260/A230 cerca de 1,40, aunque cuanto más se aproxime a 2 más pura será la muestra. Este *ratio* no es necesario en la extracción de ADN, pero los resultados son mucho más fiables si la muestra es más pura. En cambio, sí es necesario tenerlo en cuenta en extracción de ARN.

#### 6.4. Amplificación del ADN por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es el paso previo a la medida de longitud de los segmentos amplificados de ADN mediante un secuenciador. Tiene como objetivo la amplificación de zonas concretas del genoma, en este caso se trata de Microsatélites. Para ello se ha utilizado un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. La PCR se realizó con 50 ng de ADN y 1 µM de cada primer con un colorante fluorescente adherido en el primer Forward (Fw) (6-FAM: VVS3, VVMD7, VVMD28, VVMD36, VrZAG47, VrZAG62, VrZAG83, VvUCH11 y VvUCH19; HEX: VVS2, VVS29, VVMD6, VVMD27, VrZAG21, VrZAG79 y VChr19a; NED: VVMD5, VrZAG64, scu06vv, VvUCH12) utilizando el kit AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los SSR se dividieron de acuerdo con las diferentes condiciones de termociclación requeridas en función de su temperatura de annealing (Ta) (48,1°C, 50°C, 52°C, 54,4°C, 56,1°C, 56,6°C y 58°C). El programa fue de 95°C durante 5 min, 40 ciclos (95°C durante 45 seg; Ta durante 30 segundos; 72°C durante 1 min 30 seg) y 72°C durante 7 min.

## 6.5. Medida de longitud de los fragmentos amplificados

Para preparar las placas, los productos de amplificación se mezclaron con 20  $\mu$ L de formamida desionizada y 0,5  $\mu$ L del marcador interno GeneScan ROXTM 500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Éste permite interpolar el valor de cada muestra para obtener el resultado final. El contenido de cada placa se desnaturalizó con un régimen de termociclación a 95°C durante 5 min. Los fragmentos fueron separados por electroforesis capilar con un analizador genético ABI PRISM 3730® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para dimensionar los fragmentos amplificados, se utilizó el Peak Scanner Software (Applied Biosystems, Nueva Jersey, EE.UU.).

## 6.6. Análisis de datos

Para evaluar la fiabilidad de los 20 SSRs utilizados, se ha utilizado el *software* GenAlEx 6.5. Este programa informático permite el estudio de seis parámetros (descritos en la tabla que corresponde al Anexo 3): número de alelos diferentes ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), alelos nulos ( $F$ ) y la probabilidad de identidad ( $PI$ ). Al analizar los datos, estos se consideraron codominantes con el fin de distinguir homocigotos y heterocigotos para cada locus. GenAlEx 6.5 ha permitido descartar identidades, es decir, individuos genéticamente idénticos, así como mutaciones.

El *software* Structure 2.3 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003) se ha utilizado para evaluar la estructura poblacional e identificar individuos mezclados. Este programa informático basado en modelos utiliza un método de agrupamiento bayesiano en que, se supone que varias poblaciones ( $K$ ) están presentes, y cada una se caracteriza por un conjunto de frecuencias alélicas en cada locus. Los individuos de la muestra se asignan a poblaciones (conglomerados), o conjuntamente a más poblaciones si sus genotipos muestran que están mezclados. Todos los loci se asumen independientes, y se supone que cada población  $K$  sigue el equilibrio de Hardy-Weinberg. Las probabilidades posteriores se estimaron utilizando el método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Las cadenas MCMC se ejecutaron con un período de 100.000 quemados, seguido de 1.000.000 de iteraciones utilizando un modelo que permite la mezcla y las frecuencias alélicas correlacionadas. La estructura se ejecutó al menos diez veces estableciendo  $K$  de 1 a 7 (en el caso de las variedades mundiales se ha establecido una  $K$  de 1

a 15), y se calculó un valor de verosimilitud promedio,  $L(K)$ , en todas las ejecuciones para cada  $K$ . Se calculó la probabilidad logarítmica media de los datos para cada  $K$  para determinar el número más apropiado de conglomerados, y se seleccionó el valor de  $K$  para el que esta probabilidad era más alta. El  $\Delta K$  se calculó utilizando el método descrito por Evanno et al. (2005).  $\Delta K$  es una cantidad basada en la tasa de cambio en la probabilidad logarítmica de los datos entre valores  $K$  sucesivos.

La prueba de asignación basada en la frecuencia (Paetkau et al., 1995; Paetkau et al., 2004), también disponible en GenAlEx 6.5, se utilizó por primera vez para asignar las accesiones a cada subpoblación generada por Structure 2.3. Para cada accesión, se calculó un valor de probabilidad logarítmica para cada subpoblación utilizando las frecuencias alélicas de las subpoblaciones respectivas. Se asignó un individuo a la subpoblación con el valor de probabilidad logarítmica más alto.

Finalmente, se utilizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) en GenAlEx 6.5 para examinar más a fondo las relaciones genéticas entre subpoblaciones basadas en los mismos datos de SSR. PCoA se basó en la covarianza estandarizada de las distancias genéticas calculadas para los marcadores codominantes.

## **7. RESULTADOS, DISCUSIÓN Y RELACIÓN CON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS**

### **7.1. Evaluación de la bondad y eficiencia de los SSR utilizados**

La caracterización de la eficiencia de los 20 marcadores SSR estudiados después de analizar las 87 entradas diferentes de *Vitis vinifera* L. procedentes de la isla de El Hierro se muestra en la tabla correspondiente al Anexo 4. Del estudio de caracterización de las 87 entradas, se han obtenido varios perfiles distintos, excluyendo las variantes de un perfil (mutaciones). Sólo estos perfiles, obviando las repeticiones, son los utilizados para el estudio estadístico de evaluación de la eficacia de los 20 marcadores usados en la caracterización. En la tabla ubicada en el Anexo 4 se puede observar que todos los SSR son polimórficos (100%), es decir todos los microsatélites han generado más de un alelo diferente. El número de alelos obtenidos por locus varió desde 3 alelos en el caso del microsatélite VVS3 a 15 en el caso de VVMD27, con un

total de 182 alelos generados para toda la colección. El número medio de alelos por locus ( $N_a$ ) fue de 9,1. Estos resultados encontrados indican que el valor del promedio de  $N_a$  obtenido es un poco más bajo que el que se describe en la mayoría de estudios previos (Sefc et al; 1999, Sefc et al; 2000, Zullini et al; 2002, Ibáñez et al; 2003, Stainer et al; 2011), pero no lo suficiente en relación al número de muestras de este estudio. Este hecho puede significar que, a pesar de que el número de muestras es un poco más bajo, al tener estos un origen ancestral y una elevada antigüedad, la variabilidad genética de la población se ve aumentada. El número efectivo de alelos ( $N_e$ ), parámetro que da una idea de los alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación (efectividad alélica), varió de 1,229, en el locus VVS29, seguido por el VVS3 con 2,067 y por el UCH19 con 2,620, a 10,651 en el locus VVMD27, siendo el marcador con mayor proporción de número de alelos efectivos, es decir, el que mayor número de alelos distintos transmite de una generación a otra. Como se ha señalado anteriormente, la media de alelos obtenida es de 9,1, pero la media de alelos efectivos transmitidos es superior a la mitad, correspondiendo a 5, conservándose, de esta manera, una gran cantidad de alelos de generación en generación. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ), entendida como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los *loci* y que se calcula por cómputo directo, osciló del 0,200 (VVS29) y el 0,533 (VVMD6) al 0,967 o lo que es lo mismo, el 96.7% (VVS2, VVMD7, VVZAG64 y VChr19a). Presentó un valor medio de 0,788. Del mismo modo, la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), definida como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes y catalogada como un buen estimador de la variabilidad, fluctuó entre el 0,186 (VVS29) al 0,906 (VVMD27). La heterocigosidad media esperada fue de 0,743. Los promedios de  $H_o$  y  $H_e$  obtenidos (0,768 y 0,743) resultaron ser superiores (pero bastante semejantes) a los encontrados por otros autores (Sefc et al; 1999, Sefc et al; 2000, Zullini et al; 2002, Ibáñez et al; 2003, Stainer et al; 2011), por lo tanto, la población presenta una mayor diversidad genética en comparación con la de los artículos citados. Debido a la alta endogamia que se da en *Vitis vinifera* L., la prevalencia de los heterocigotos es el mecanismo que la selección natural ofrece para mejorar el rendimiento y calidad de los individuos, así como también es importante en este sentido la selección realizada por el hombre. Así los SSR que presentan mayor heterocigosis observada son SSR VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD36, VVZAG21, VVZAG47, VVZAG64, VVZAG79, UCH11, SCU06 y VChr19a (Sefc et al; 2000). Seis marcadores han dado una heterocigosidad observada menor a la heterocigosidad esperada (VVMD5, VVMD6, VVMD37, VVMD28, VVZAG83, UCH19), en consecuencia, la probabilidad de que estos “loci” den alelos nulos ( $r$ ) es grande (aquí no se muestra este índice ya que se trabaja con  $F$ ). A su vez, estos seis marcadores

VVMD5, VVMD6, VVMD37, VVMD28, VVZAG83, UCH19, muestran un Índice de Fijación (F) positivo, lo que significa que estos microsatélites presentan un déficit de individuos heterocigotos. Ambos parámetros, “r” (que no se muestra) y “F”, están muy relacionados, de tal manera que “locus” con una F negativa muestran una “r” también negativa o muy baja, indicando que la presencia de un solo pico en el electroferograma de secuenciación se corresponde con un homocigoto y no con un heterocigoto con un alelo nulo, y es lo que ocurre en los microsatélites utilizados a excepción de los anteriormente mencionados VVMD5, VVMD6, VVMD27, VVMD28, VVZAG83, UCH19, aunque sus valores de “F” (0,006, 0,254, 0,044, 0,110, 0,044 y 0,030 respectivamente) son lo suficientemente bajos como para tenerlos en cuenta. En el resto de los 14 marcadores SSR usados, el índice de Fijación es negativo, dando valores entre (-0,328) del SSR VChr19a al (-0,011) del microsatélite SCU06. Así, una F negativa o muy baja para un determinado “locus”, es una característica muy importante para la evaluación de la eficiencia del marcador. La estimación del poder discriminatorio de un microsatélite se puede medir con el parámetro conocido como Probabilidad de Identidad (PI). Los valores de PI variaron de 0,016 (VVMD27) o 0,026 (VVZAG47) a 0,669 (VVS29) y la probabilidad de obtener genotipos idénticos utilizando los 20 marcadores, es decir la PI acumulativa, fue de  $6,8 \times 10^{-23}$ . Esta es una probabilidad realmente baja, superada por pocos autores, entre ellos Cipriani y col., 2010, ya que en su estudio trabajan con 31 SSR y 1005 entradas de diferente origen. También fue superada en otro estudio previo, realizado por el Área de Biología de la Vid del grupo de investigación TECNENOL (ABvidTECNENOL), sobre las variedades de la isla de Lanzarote donde las características evolutivas de éstas y el número de la población analizada, son diferentes a las encontradas en la isla de El Hierro. Por lo tanto, la PI acumulativa es lo suficientemente pequeña como para asegurar que dos individuos que presenten el mismo genotipo en todos los “loci” son la misma variedad, siendo la única excepción los “*sports*” (dos individuos con un mismo perfil de SSR, pero fenotípicamente diferentes. Ejemplo: la Garnacha-negra Garnacha-peluda Garnacha-blanca). En resumen, a partir de los resultados estadísticos obtenidos, se puede concluir que trece de los 20 microsatélites proporcionan mayor capacidad de discriminación, pues tienen un valor de PI inferior a 0,10 (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD36, VVZAG21, VVZAG47, VVZAG64, VVZAG79, VVZAG83, UCH11 y SCU06), siendo los marcadores con una mayor eficiencia para esta población de individuos procedentes de la isla de El Hierro, los SSR VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD36, ZAG47, ZAG64, ZAG79, UCH11 y SCU06. Según el valor de “F”, que reafirma el hecho que un homocigoto es homocigoto como tal, y no ha perdido un alelo, estos mismos SSR presentan índices muy

buenos. Por el contrario, los microsatélites que aportan menor información en relación a la Frecuencia alélica observada, al promedio de  $H_o$  y  $H_e$ , y al valor de Probabilidad de Identidad, son VVS29, VVS3 y VVMD6. De todas maneras, y a pesar del menor rendimiento de estos tres últimos marcadores reseñados, queda más que garantizado el poder de discriminación que tienen los microsatélites seleccionados para este estudio.

## 7.2. Clasificación de variedades según el perfil genético hallado

De las accesiones proporcionadas por los viticultores herreños (Tabla 1), diferentes entradas presentaron perfiles genéticos idénticos respecto a otras de la misma colección herreña (repeticiones). Los perfiles genéticos restantes (si se tiene en cuenta tanto las variaciones numéricas como las de expresión alélica), serán únicos y corresponderán a variedades diferentes. Si solamente se tiene en cuenta las mutaciones numéricas, entonces habrá perfiles genéticos diferentes, con lo cual hay que desestimar entradas coincidentes.

**Tabla 1.** Listado total de variedades herreñas con los resultados genéticos. Los SSR que varían se resaltan en la columna SSR-dif. Cuando la variación es numérica (VN) el color es negro. Cuando la mutación es de expresión alélica (VE), el color es verde. Este será intenso cuando el alelo más extendido sea menor a 2/3 de la expresión alélica del que varía. Este será verde pálido cuando el alelo más extendido sea mayor o igual a 2/3 de la expresión del que varía. En Azul marino se muestran los SSR trialélicos. Las columnas VN y VE indican los perfiles moleculares generados.

La distribución de los individuos procedentes de la isla de El Hierro, en perfiles genéticos se muestra en la Figura 3 (empezando por la zona central superior, hacia la derecha).

**Figura 3.** Distribución del grupo de accesiones herreñas en variedades de *Vitis vinifera* L.

**Figura 4.** Electrofenogramas del SSR S2 (universal para la comunidad científica) para las muestras HI-65 y HI-80.

## 7.3. Estudio de la estructura poblacional de la población de muestras procedentes de la isla de El Hierro (Singularidad)

Antes de empezar con este apartado se tiene que informar de que se hallaron perfiles numéricos únicos (tal y como se explica al principio del apartado anterior), contando las mutaciones y

*sports* que determinadas variedades presentan. Pero solamente se puede trabajar este apartado de singularidad de la población herreña desestimando estas mutaciones, ya que estas son perfiles redundantes y estadísticamente no tendríamos resultados consistentes (Cabezas et al; 2011, Marsal et al; 2017, Marsal et al; 2019). Esto quiere decir que para este estudio de singularidad se contará con menos perfiles correspondientes a variedades diferentes. Dicho esto, este apartado se abordará, en primera instancia, bajo dos puntos de vista. El primero será el de estudiar los perfiles moleculares que corresponden a las variedades conocidas más los perfiles nuevos como una población única, para ver cómo se distribuyen por sí solos. El segundo punto de vista será ver cómo se relacionan estos perfiles nuevos y las variedades locales de la isla de El Hierro conocidas (ya que los otros perfiles no serían propios de la isla), con las variedades canarias y con el resto de variedades del mundo que posee el Área de Biología de la Vid del Grupo de Investigación TECNENOL.

### **7.3.1. Estudio de la población herreña propiamente dicha**

Para abordar el estudio de la estructura poblacional de la población de la Isla de El Hierro, se parte de los perfiles moleculares únicos. No todos corresponderán a perfiles patrón (identidad), sino que pueden corresponder también a una mutación de una variedad que no se encuentre en la población que se va a estudiar. Se focalizará la atención en las variedades locales de la Isla de El Hierro, es decir que tienen alguna publicación (Marsal et al; 2019, Rodríguez-Torres y col; 2018), que en este estudio están formadas por representantes conocidos, y las nuevas variedades halladas en este estudio. El análisis de la estructura poblacional se realizó mediante el *software* Structure 2.3 (Falush et al; 2003, Pritchard et al; 2000) el cual permitió encontrar diferentes distribuciones para la población (K). El Anexo 5 muestra (en forma de gráfica) los cálculos que permitieron deducir cual sería la mejor K una vez aplicada la corrección de Evanno (2005). Para esta población la mejor K fue K=3. Esto quiere decir que la mejor manera de dividir la población total de vides herreñas (todas) es en 3 grupos. En la Figura 5 se presenta la distribución K=3 para la colección de los representantes herreños. Las variedades de cada uno de los 3 subgrupos propuestos para K=3, se han ordenado en función de su valor  $q$  (el porcentaje de su genoma inferido que pertenece al subgrupo (Bacilieri et al; 2013) (de mayor a menor)). Esta estrategia permite desestimar las variedades mestizas ( $q < 85\%$ ), las cuales distorsionarían el desarrollo del estudio. En esta ocasión no se desestiman las mestizas, para tener una idea del conjunto, de cómo quedan distribuidas, y cómo se relacionan entre ellas.

**Figura 5.** Distribución  $K=3$  para los individuos de la población de vides herreñas. Con letra de color verde se presentan las variedades locales herreñas, de color azul, los cultívares locales canarios, y los foráneos del archipiélago se presentan de color negro. Resaltados más intensos, todos los individuos puros de cada agrupación, y sin resaltar (normal) los mestizos.

La subPOP 1, está constituida por diversos representantes, de los cuales una parte ( $q > 85\%$ ) serían “puros”, y otros son mestizos ( $q < 85\%$ ). Los componentes conocidos de este grupo, tienen en común, ya sea como progenitor o bien como abuelo una variedad ancestral centroeuropea, que se prevé que entró en la península a través del Camino de Santiago (Casanova et al; 2011). Los representantes restantes son nuevos, pero se podría hipotetizar que también podrían ser descendientes de este vidueño ancestral. El color rojo, asignado por el programa estadístico, bien podría definir la ascendencia centroeuropea de esta agrupación. La subPOP 2, a la cual se le ha asignado el color verde ácido, está compuesta por diversos miembros de los cuales los 5 primeros poseen una  $q > 85\%$  (puros). Como se puede observar, en esta agrupación hay de todo. Este clúster agrupa a varietales que, con un fuerte vínculo centroeuropeo, tienen también mucha relación con los vidueños del este del mediterráneo, incluida la península balcánica (Grecia). Además, están relacionados, como no puede ser de otra manera, con la Península Ibérica y, sobretudo en estas dos primeras subpoblaciones (subPOP1 y subPOP 2), con Portugal. La tercera subpoblación, SubPOP 3 (de color azul), está constituida por componentes. Algunos son puros ( $q > 85\%$ ). Las restantes son mestizas. Esta agrupación, con raíces peninsulares y un poco también del este del Mediterráneo, es la más relacionadas con el Estado Español. Está claro que la combinación de colores de esta Figura 5, da una idea de las raíces de los perfiles genéticos que configuran cada una de las subpoblaciones que conforman la colección de vides herreñas. Esta combinación de la población vinífera herreña en tres grupos ( $K=3$ ), tiene una bondad del 97% (Anexo 6).

En la Figura 6, se presenta la población de la isla de El Hierro dividida en 3 subpoblaciones, tanto por agrupaciones de varietales propiamente dichas (imagen superior izquierda a) en sus correspondientes subpoblaciones, con una fiabilidad acumulativa del 100%), como por individuos (imagen superior derecha b), con una fiabilidad acumulativa del 19,57%) y en la imagen inferior c), se presenta un detalle de la imagen superior derecha con los nombres de los individuos (puros y mestizos). Estas representaciones gráficas son del tipo Coordenadas Principales (PCoA) (específicas para datos binarios y codominantes (GenAlEx 6.5)), y en sus ejes está marcada la fiabilidad de la distribución. Es muy importante tener en cuenta dos aspectos para poder interpretar estos porcentajes de fiabilidad:

1. Como todas las representaciones gráficas, las PCoA llevan asociadas intrínsecamente un error. En este estudio se trabaja con 20 SSR, cada uno genera dos datos numéricos (ya que *Vitis vinifera* L. es diploide), con lo cual las herramientas de discriminación serán 40. Actualmente no hay manera de representar estos resultados en 40 dimensiones. La reducción de las representaciones gráficas a 2 dimensiones es lo que generará las imprecisiones. Imprecisiones que la comunidad científica asume, leyendo los resultados como tendencias.
2. Al aumentar los componentes a representar, hay menor fiabilidad, ya que la representación en 40 dimensiones, es para cada uno de los individuos que configuran las poblaciones o bien, las subpoblaciones, según como se trabaje.

**Figura 6.** Representación mediante Coordenadas Principales (GenAlEx 6.5) población de la isla de El Hierro dividida en 3 subpoblaciones. Gráfica a) representación por subpoblaciones, gráfica b) representación por componentes de cada subpoblación, gráfica c) representación por componentes de cada subpoblación con sus respectivos nombres. Con letra de color verde se presentan las variedades locales herreñas, de color azul, los cultivos locales canarios, y los foráneos del archipiélago se presentan de color negro. Resaltados más intensos, todos los individuos puros de cada agrupación, y sin resaltar (normal) los mestizos.

En la Figura 6 a, se puede observar cómo las subpoblaciones formadas son significativamente distintas entre ellas (cada subpoblación está en un cuadrante distinto), seguramente debido al diferente origen de sus componentes. La coordenada 1 separa a las subpoblaciones que comparten indicios de origen del Este del Mediterráneo (incluida la Península Balcánica) (subPOP 2 y subPOP 3) de la subPOP 1, que queda en solitario en los cuadrantes de la derecha, mientras que la coordenada 2, separa la subpoblación oriental (subPOP 2), de las occidentales subPOP 1 y 3. En la Figura 6 b, se presentan las mismas subpoblaciones, ahora por individuos. En esta imagen se pueden ver como los círculos globales se solapan entre ellos. Esto se debe a la presencia de los mestizos, pero claramente se visualiza como la subPOP1 (correspondiente a la más centroeuropea) está claramente separada de la subPOP 3 (correspondiente a la subpoblación española), mientras la subPOP 2, la más oriental (este del Mediterráneo y Grecia), intersecciona con las anteriores demostrando la gran influencia de los primeros Centros de Domesticación Secundarios de la vid (CDS) sobre los posteriores, que en orden cronológico correspondería al de la Península Ibérica (zona española) y al del Centro de Europa y Francia, que sería el más reciente (dataría de la época de los romanos). La Figura 6 c, es un detalle con los nombres de los varietales de la gráfica anterior. Aquí se han mantenido los mestizos para ver cómo se distribuyen todos los miembros de la colección de vides herreña, y

se ve cómo toma forma la distribución de variedades de la Figura 5 y el porqué de sus ubicaciones en función del color observado en la Figura 5.

### 7.3.2. Estudio de los cultivos herreños y su relación con la población de variedades canarias

Para estudiar la relación de la colección de variedades herreñas respecto al resto de variedades locales canarias, de las que se dispone de su perfil molecular descrito por los mismos 20 SSR, se realizó el mismo procedimiento utilizado anteriormente. La población ascendió. Aquí se incluyen mutaciones de color (sport). De los representantes canarios, aproximadamente la mitad de los vidueños son locales herreños.

La colección de vides locales canarias, se distribuyó en 3 subpoblaciones, con una bondad de buena ubicación del 95%. Tampoco se desestimaron los mestizos, con la finalidad de ver su posición respecto a los otros variedades canarios.

En la Figura 7, se presentan estas subpoblaciones representadas en tres gráficas de coordenadas principales. Al igual que en el caso anterior, se muestran las distribuciones por subpoblaciones, así como por individuos. En la Figura 7 a, se nota una clara dicotomía entre la subPOP del Este del Mediterráneo y el Cáucaso, con las otras poblaciones de variedades canarios. La subPOP correspondiente a las islas occidentales, básicamente El Hierro y, a las islas orientales, el resto, se mantienen alejadas entre ellas, pero compartiendo los cuadrantes de la derecha. El hecho de que la subPOP del Este del Mediterráneo y las islas orientales compartan los cuadrantes superiores, denota una cierta influencia de los CDS más antiguos respecto a los perfiles genéticos de estas.

**Figura 7.** Representación mediante Coordenadas Principales (GenAlEx 6.5) población de las islas Canarias, dividida en 3 subpoblaciones. Gráfica a) representación por subpoblaciones, gráfica b) representación por componentes de cada subpoblación, gráfica c) representación por componentes de cada subpoblación con sus respectivos nombres. Con letra de color azul se presentan las variedades locales herreñas, los cultivos locales canarios se presentan de color negro.

En las Figuras 7 b y c, se presentan las subpoblaciones de variedades canarias por individuos. Aquí se puede observar como a pesar de estar presentes los individuos mestizos, no hay apenas solapamiento en las subpoblaciones. La subpoblación de vides de las islas más orientales está muy concentrada en el cuadrante superior izquierdo, y es mucho más de origen peninsular que las otras. En cambio, la población de las islas occidentales, básicamente El Hierro y La Palma, es mucho más dispersa y exótica. Esta subpoblación está prácticamente constituida por variedades herreños a excepción de 2. En la población de vides mundiales, esta subpoblación quedó ubicada en las islas Canarias, siendo el “nucleo duro” de esta.

### **7.3.3. Estudio de la colección de vides de la isla de El Hierro y su relación con la población mundial**

Este estudio de la estructura poblacional de la población mundial junto con la subpoblación canaria, centrándose especialmente en la colección de vides de la Isla de El Hierro, se va tratar bajo dos puntos de vista:

1. Desde un aspecto puramente genético, usando todas las herramientas que proporciona el programa “Structure 2.3”, que dará una estimación del mejor número de subpoblaciones, en las que se puede agrupar la población mundial estudiada. Además, agrupará los individuos de cada una de ellas en función de la distancia genética, basándose en las frecuencias alélicas de sus perfiles moleculares.
2. Desde un criterio puramente geográfico. Aquí se confeccionará cada subpoblación a partir de su procedencia en la Base de Datos mundial (VIVC). La bondad de asignación a una subpoblación en concreto será más baja que en el caso de la agrupación genética, ya que el mestizaje no tiene nada que ver con los orígenes geográficos.

#### **7.3.3.1. Estudio de la estructura poblacional basándose en criterios puramente genéticos**

Para abordar el estudio de la estructura poblacional de la población de las Islas Canarias incluyendo los variedades herreños, se partirá de los perfiles moleculares únicos procedentes de la base de datos del Área de Biología de la Vid del grupo de Investigación TECNENOL

eliminando todos los mutantes y los “sports” ya que se trata de información redundante (Cabezas et al; 2011, Marsal et al; 2017, Marsal et al; 2019). No todos corresponderán a perfiles patrón (identidad) sino que pueden corresponder también, a una mutación de una variedad que no se encuentre en la población que se va a estudiar. Se focalizará la atención en las variedades locales de las Islas Canarias junto con la población de variedades herreñas.

El análisis de la estructura poblacional se realizó mediante el *software* Structure, el cual permitió encontrar diferentes distribuciones para la población (K). El Anexo 7 muestra los cálculos que permitieron deducir cual sería la mejor K, una vez aplicada la corrección de Evanno (2005). Para la población estudiada la mejor K fue K=2. En la Figura 8 se presenta la distribución K=2 para los representantes. Las variedades de cada uno de los 2 subgrupos propuestos para K=2, se han ordenado en función de su valor  $q$  (el porcentaje de su genoma inferido que pertenece al subgrupo (Bacilieri et al; 2013) (de mayor a menor)). Esta estrategia permitió desestimar las variedades mestizas ( $q < 85\%$ ), las cuales distorsionarían el desarrollo del estudio.

**Figura 8.** Distribución K=2 para los individuos de la población mundial, incluyendo los varietales canarios y los herreños que se ubican en la subPOP 2.

Se desestimaron los mestizos, esto supuso prescindir de estos representantes (mestizos con  $q < 85\%$ ). De esta manera, la población de individuos puros se redujo. Su correspondiente test de asignación le confirió una bondad del 100% (datos no mostrados). La subPOP1 se caracterizaba por incluir mayoritariamente a representantes de la subpoblación de Italia, los Balcanes y Francia-Centro Europa. La subPOP2 poseía todos los varietales canarios (menos el desestimado por mestizo). Esta subpoblación se caracterizaba por tener mayoritariamente individuos de la subpoblación de la península ibérica. La representación gráfica de esta distribución, se presentó también mediante Coordenadas Principales (Figura 9). Para ver y demostrar la singularidad de la subpoblación de varietales del archipiélago, se extrajeron de la subPOP 2 donde estaban ubicados, los varietales canarios para construir una nueva subpoblación. Así las representaciones constaron de 3 subpoblaciones. A su vez, de la subpoblación canaria se extrajeron las variedades herreñas para observar su comportamiento como subpoblación. Se comprobó la bondad de asignación en estas nuevas condiciones (con 4 subpoblaciones), y resultó ser del 90% (datos no mostrados), bondad que se daba por buena.

**Figura 9.** Representación mediante Coordenadas Principales (GenAlEx 6.5) población mundial dividida en 4 subpoblaciones, resaltando las subpoblaciones canaria y herreña. Bondad de ubicación: 90% (según test de Asignación).

En esta figura se puede observar como la coordenada 1 separa la subPOP 1 del resto. Esto tiene su lógica porque las subPOP IC y la subPOP HI, se han extraído de la subPOP 2 que alberga mayoritariamente vides peninsulares. Lo que es remarcable es que mientras la subPOP IC (islas Canarias) está cerca de la subPOP 2 en los cuadrantes superiores, las otras dos están en los cuadrantes inferiores, aunque significativamente alejadas, pero que demuestra una cierta influencia de la subPOP 1 (en ella se ubicaban mayoritariamente vides de Centro Europa, Francia e Italia). Se observa además como la población herreña ocupa un cuadrante por sí sola, esto demuestra la singularidad de sus perfiles genéticos. En la Figura 10, se muestra esta distribución por individuos de la población mundial. En esta imagen se aprecia claramente la dicotomía que existe entre el CDS ubicado en la península ibérica y los ubicados fuera de ella, en el resto del mundo. También se puede observar de manera evidente y general que, siempre bajo la influencia capital de los cultívares peninsulares (así están dentro del círculo verde), la subpoblación de cultívares herreños se desplaza de la población de variedades canarias.

**Figura 10.** Representación mediante Coordenadas Principales (GenAlEx 6.5) población mundial dividida en 4 subpoblaciones con sus correspondientes individuos que la forman. La imagen inferior es un detalle de la superior. Incluye los nombres de los varietales herreños.

**Figura 11.** Representación mediante Coordenadas Principales (GenAlEx 6.5) población mundial dividida en 4 subpoblaciones genéticas con sus correspondientes individuos que la forman. En la imagen superior, se resalta con nombre la subpoblación herreña. En la imagen inferior se remarcan con detalle todos los varietales canarios. Se han intensificado de color negro, los herreños.

### 7.3.3.2. Estudio de la estructura poblacional basándose en criterios geográficos / genéticos

Se trataba de confeccionar subpoblaciones en función del país de origen según la información obtenida en el VIVC. Como algunos grupos poseían un bajo número de representantes, se decidió agrupar a las variedades por áreas geográficas de acuerdo con la bibliografía (Imazio et al; 2006, Arroyo García et al; 2006, Bacilieri et al; 2013, Marsal et al; 2017, Marsal et al; 2019). Se confeccionaron las siguientes 5 subpoblaciones: subPOP EASTMED-CAU (Algeria, Cyprus, Georgia, Israel, Lebanon, Tunisia and Turkey), subPOP BP (Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Greece, Serbia, Slovenia and Montenegro), subPOP ITA (Italy), subPOP

FRA-CEU (Austria, France, Germany, Hungary and Switzerland) and subPOP IP (Spain and Portugal), y además se constituyeron las subpoblaciones IC y la HI. La subpoblación canaria estaba formada por diferentes varietales locales. La subpoblación herreña estaba constituida también por diferentes cultivos locales. Los “sports” se desestimaron por estar representados en la población mundial por las variedades “madre”. Estos individuos de la Base de Datos del Área de Biología de la Vid del Grupo de Investigación TECNENOL, se consiguen por exclusión de los vidueños obtenidos a partir de cruces interespecíficos, cruces de autor y todo tipo de mutaciones. En esta población mundial distribuida en 7 subpoblaciones geográficas, existen especímenes desconocidos que se asignarán a las 7 anteriores, mediante el test correspondiente (datos no mostrados). Este test de asignación tiene una bondad del 59%, esto quiere decir que hay cultivos mal asignados a su grupo geográfico. En otras palabras, el hecho de que un país o región en concreto diga que una variedad es autóctona de este lugar, significa que ese país está incurriendo en una falsedad. No hay variedades autóctonas en la especie *Vitis vinifera* L. ya que durante siglos el mestizaje enmascara este término (autéctono). Sólo hay variedades locales. Otra variedad de origen desconocido ha sido asignada a esta agrupación canaria. La explicación o motivo por el que esta variedad aparecerá a menudo en el grupo canario es, muy probablemente, por la intervención en el linaje de algunos cultivos del archipiélago. En este estudio se ha devuelto al grupo de la Península Balcánica (BP).

En la Figura 12 se muestra la distribución de la población mundial por zonas geográficas, habiendo separado previamente las poblaciones canarias y herreñas.

**Figura 12.** Representación mediante Coordenadas Principales (GenAlEx 6.5) población mundial dividida en 7 subpoblaciones según sus áreas geográficas, resaltando las subpoblaciones canaria y herreña. Bondad de ubicación: 59% (según test de Asignación).

Se puede observar otra vez como las subpoblaciones de origen peninsular quedan colocadas en los cuadrantes de la derecha, demostrando de esta manera la importancia de los datos históricos que hacen constar la introducción de vides de España y Portugal durante la conquista del archipiélago canario (Macías y col; 2005). Serán las subpoblaciones de la Península Ibérica y Canarias las que reciban una mayor influencia de las subpoblaciones ubicadas en los cuadrantes de la izquierda. La población más alejada, una vez más, es la herreña.

En la Figura 13 se presentan los resultados de las subpoblaciones geográficas mundiales por individuos. Otra vez se puede observar la influencia peninsular sobre los varietales canarios en general, obviamente confirmando los datos históricos. Se detecta una mayor influencia de las

subpoblaciones de la Península Balcánica, Italia y de Francia-Centro Europa, en la subpoblación canaria. La colección de vides locales de la Isla de El Hierro se muestra una vez más ligeramente desplazada con respecto a la subpoblación canaria, quedando demostrado, de esta manera, su singularidad. En la imagen inferior se presenta un detalle de la zona donde se emplazan los varietales canarios y herreños, remarcando en color negro intenso los vidueños de la Isla de El Hierro, y dejando sin intensificar los canarios.

**Figura 13.** Representación mediante Coordenadas Principales (GenAlEx 6.5) población mundial dividida en 7 subpoblaciones geográficas con sus correspondientes individuos que la forman. En la imagen superior, se resalta con círculos las diferentes subpoblaciones. En la imagen inferior se remarcan con detalle y nombre todos los varietales canarios. Se han intensificado de color negro, los herreños.

## 8. CONCLUSIONES

1. El “kit” de SSR empleado ha funcionado perfectamente para cumplir con los propósitos. Ha discriminado con eficiencia, llegando a detectar una pequeña variabilidad intravarietal.
2. En las muestras analizadas, se han detectado cultívars conocidos y perfiles moleculares nuevos.
3. En esta población de varietales herreños, se han hallado perfiles moleculares distintos si sólo se considera la variabilidad numérica. Pero si se considera tanto la variabilidad numérica, como la variabilidad de expresión alélica, entonces se contabilizan más perfiles genéticos diferentes.
4. La variabilidad intravarietal se ha detectado en individuos de esta población. (Anexo 8).
5. Se han descubierto diversos errores y confusiones de nombre, seguramente por desconocimiento (Anexo 9).
6. Se ha dado nombre a términos que, ya de entrada, denotaban un desconocimiento por parte del viticultor respecto a la variedad que aportaba (Anexo 10).
- 7.

8. A partir del estudio de singularidad (Estructura Poblacional), se puede deducir que el perfil molecular de las variedades locales herreñas, con sus rasgos canarios fruto de la adaptación, constituirían una población de variedades muy genuina. La singularidad quedaba demostrada.

9. La población de vidueños de la Isla de El Hierro, se puede hipotetizar que tiene un origen mucho más peninsular que el resto de variedades canarios, ya que ha quedado demostrado que recibe menos influencia del resto de poblaciones de cultivos mundiales.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Arroyo-García R, Ruiz-García L, Bolling L, Ocete R, López MA, Arnold C, Ergul A, Söylemezo G, Uzun HI, Cabello F, Ibáñez J, Aradhya MK, Atanassov A, Atanassov I, Balint S, Cenis JL, Costantini L, Gorislavets S, Grandó MS, Klein BY, McGovern PE, Merdinoglu D, Pejic I, Pelsy F, Primikirios N, Risovannaya V, Roubelakis-Angelakis KA, Snoussi H, Sotiti P, Tamhankar S, This P, Troshin L, Malpica JM, Lefort F, Martínez-Zapater JM (2006) Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Mol Ecol* 15:3707–3714
2. Bacilieri R, Lacombe T, Le Cunff L, Di Vecchi-Staraz M, Laucou V, Genna B, Pérois JP, This P, Boursiquot JM (2013) Genetic structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection. *BMC Plant Biol* 13:25
3. Bowers, J.E., Dangl, G.S., & Meredith, C.P. (1999b). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 243-246.
4. 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.
5. Cabezas, 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. *BMC Plant Biology* 11,153
6. Casanova J., Mozas P., O. J. (2011) Ampelography and Microsatellite DNA Analysis of Autochthonous and Endangered Grapevine Cultivars in the Province of Huesca (Spain). *Spanish J Agric Res* 9(3):790–800
7. Cipriani G, Spadotto A, Jurman I, Di Gaspero G, Crespan M, Meneghetti S, Frare E, Vignani R, Cresti M, Morgante M, Pezzotti M, Pe E, Policriti A, Testolin R (2010) The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theor Appl Genet* 121:1569–1585
8. Dalbó, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Steinkellner, H., Sefc, K.M., & Reisch, B.I. (2000). A gene controlling sex in grapevines is placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome*, 43, 333-340.  
diversification during neogene and quaternary climate change. *BMC Evol Biol* 13:141 (2013)
9. DOP vinos de El Hierro. (Consulta: mayo 2023). <http://doelhierro.es/>
10. Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620

11. Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
12. Fort, F., Hayoun, L., Valls, J., Canals, J.M., Arola, L., Zamora, F. (2008) A new and simple method for rapid extraction and isolation of high-quality RNA from grape (*Vitis vinifera*) berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88,179-184
13. Google Earth. (Consulta: mayo 2023). <https://earth.google.com/>
14. Ibañez, J., De Andrés, M.T., Molino, A., & Borrego, J. (2003). Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellite analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 22-30.
15. Imazio S, Labra M, Grassi F, Scienza A, Failla O (2006) Chloroplastmicrosatellites to investigate the origin of grapevine. *GenetResour Crop Evol* 53:1003–1011
16. Lefort, F., Kyvelos, C., Zervou, M., Edwards, K., & Roubelakis-Angelakis, K. (2002). Characterization of new microsatellite *loci* from *Vitis vinifera* and their conservation in some *Vitis* species and hybrids. *Molecular Ecology Resources*, 2, 20-21.
17. Macías A. (2005). El paisaje vitícola de Canarias. Cinco siglos de historia. *Ería* 68:351–364
18. Marsal G, Bota J, Martorell A, Canals JM, Zamora F, Fort F (2017) Local cultivars of *Vitis vinifera* L. in Spanish Islands: Balearic Archipelago. *Scientia Horticulturae* 226,122-132
19. Marsal, G., Baiges, I., Canals, J.M., Zamora, F., Fort, F. (2011) A fast, efficient method for extracting DNA from leaves, stems, and seeds of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture* 62, 376-381
20. Marsal, G., Mendez, J.J., Mateo-Sanz, J.M., Ferrer, S., Canals, J.M., Zamora, F., Fort F. (2019) Molecular characterization of *Vitis vinifera* L. local cultivars from volcanic areas (Canary Islands and Madeira) using SSR markers. *Oeno One* 4, 667-680
21. Maul, E., Röckel, F. (2015) *Vitis* International Variety Catalogue. <http://www.vivc.de> [accessed 25/05/2023]
22. Migliaro, D.; De Nardi, B.; Vezzulli, S.; Crespan, M. (2017) An upgraded core set of 11 SSR markers for grapevine cultivar identification: The case of berry color mutants. *Am. J. Enol. Vitic.*, 68, 496–498
23. Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C. (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4, 347-354
24. Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., Estoup, A. (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13, 55-65
25. Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959
26. Rodríguez-Torres, I. (2018) Variedades de vid cultivadas en Canarias. Descriptores Morfológicos. Caracterización morfológica, molecular, agronómica y enológica. Ed. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Gobierno de Canarias. Santa Cruz de Tenerife.
27. Scott, K.D., Egger, P., Seaton, G., Rosseto, M., Abblet, E.M., Lee, L.S., & Henry, R.J. (2000b). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 723-726.
28. Sefc KM, Lopes MS, Lefort F, Botta R, Roubelakis-Angelakis KA, Ibañez J, Pejic I, Wagner HW, Glossl J, Steinkellner H (2000) Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and

evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 498-505

29. 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.

30. Stajner, N.; Rusjan, D; Koros̃ec-Koruza, Z; Javornik, B.; (2011). Genetic Characterization of Old Slovenian Grapevine Varieties of *Vitis vinifera* L. by Microsatellite Genotyping. *American Journal of Enology and Viticulture* (62:3) 10011

31. This P, Lacombe T, Thomas MR (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet* 22:511–519

32. This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangl, G.S., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibañez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, R., Meredith, C.P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., & Maul, E. (2004). Development of a standard set of microsatellite reference alleles for the identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1448-1458.

33. Thomas, M.R., & Scott, N.S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* 86, 985-990.

34. Una foto de las Islas Canarias captadas desde el espacio, finalista a Imagen del Año de la NASA. Digital El Mundo. (Consulta: abril 2023). <http://www.elmundo.es/ciencia/2014/03/25/533165c5ca474163268b456d.html>

35. Wan, Y., Schwaninger, H., Baldo, A.M., Labate, J.A., Zhong, G.Y., Simon, C.J. A phylogenetic analysis of the grape genus (*Vitis* L.) reveals broad reticulation and concurrent

36. Wikipedia. (Consulta: abril 2023). <https://es.wikipedia.org/wiki/Macaronesia>

37. Wolkovich, E.M., García de Cortázar-Atauri, I., Morales-Castilla, I., Nicholas, K.A., Lacombe, T. (2018) From Pinot to Xinomavro in the world's future wine-growing regions. *Nature Climate Change* 8, 29-37.

38. Zerolo J., Cabello F, Espino A, Borrego J, Ibañez J, Rodríguez-Torres I, et al., 2006. Variedades de Vid de Cultivo Tradicional en Canarias. Ed. Instituto Canario de Calidad Agroalimentaria. Santa Cruz de Tenerife.

39. Zullini L., Russo M. y Peterlunger E. (2002): “Genotyping wine and table grape cultivars from Apulia (Southern Italy) using microsatellite markers”, *Vitis. Journal of Grapevine Research*, 41 (4), 183-187

## 10. AUTOEVALUACIÓN

Realizar el trabajo de fin de grado ha implicado no sólo poner a prueba los conocimientos adquiridos durante mi formación en el grado de Biotecnología, sino que también aprender muchos nuevos. He tenido la oportunidad de practicar la técnica de los microsatélites o SSR e ir perfeccionándola con el tiempo de la mano de una profesional del sector como lo es la Dra. Maria Francesca Fort, lo cual es un privilegio y le estoy muy agradecida. Además, esta experiencia me ha proporcionado un mayor conocimiento sobre la dinámica de trabajo de un grupo de investigación. Se han superado mis expectativas, ya que mi preocupación principal era tener muchas dificultades a la hora de llevar a cabo el trabajo y aplicar lo aprendido en la universidad, por tanto, este TFG me ha proporcionado más seguridad en mí misma.

La técnica de los microsatélites es muy utilizada en el campo de la Biotecnología Vegetal y la Genética Molecular, de manera que el aprendizaje de la misma posiblemente será muy útil para el futuro laboral. Como ya he mencionado, llevar a cabo este trabajo me ha permitido practicar procedimientos que forman parte del grado de Biotecnología, como la PCR y la extracción de ADN, pero también me ha permitido adquirir conocimiento de nuevas prácticas como, por ejemplo, la interpretación de electroferogramas.

He descubierto nuevos programas estadísticos como el *Structure 2.3* y el *GenAlEx*, los cuales he utilizado para tratar los resultados. Mediante estos programas he aprendido y he puesto en práctica los criterios que se aplican a la hora de clasificar poblaciones según su perfil genético y relacionarlas con otras poblaciones originarias de otras zonas.

Finalmente decir que, a través de este estudio, he comprendido la situación de *Vitis vinifera* L. respecto a su pérdida de diversidad debido a diversos factores, lo cual me ha hecho entender la importancia de la gran variedad que presenta la isla de El Hierro.

## ANEXOS

### Anexo 1: Relación de accesiones de la población de la isla de El Hierro. Características.

CODIGO	NOMBRE LOCAL	VITICULTOR	REF. CATASTRAL	PROCEDENCIA	COLOR
HI-1	Uval Negro				Negro
HI-2	Uval Negro				Negro
HI-3	Verijadiego Negro				Negro
HI-4	Verdello				Blanco
HI-5	Baboso Blanco				Blanco
HI-6	Bermajuelo				Blanco
HI-7	Baboso Negro				Negro
HI-8	Baboso Blanco				Blanco
HI-9	Desconocida Negra				Negro
HI-10	Mulata				Negro
HI-11	Bermajuelo Rosada				Rosada
HI-12	Diego				Blanco
HI-13	Huevo Gallo				Blanco
HI-14	Pedro Ximénez				Blanco
HI-15	Burra Blanca				Blanco
HI-16	Moscatel Pequeño				Blanco
HI-17	Negramoll				Negro
HI-18	Negra Muelle				Negro
HI-19	Listan Negro				Negro
HI-20	Moscatel Negro				Negro
HI-21	Listan Blanco				Blanco
HI-22	Verdello del Hierro				Blanco
HI-23	Baboso Negro				Negro
HI-24	Desconocida Negra				Negro
HI-25	Cristal				Blanco
HI-26	Verijadiego Blanco				Blanco
HI-27	Gual				Blanco
HI-28	Verijadiego Blanco				Blanco

<b>CODIGO</b>	<b>NOMBRE LOCAL</b>	<b>VITICULTOR</b>	<b>REF. CATASTRAL</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	<b>COLOR</b>
HI-29	Verijadiego Blanco				Blanco
HI-30	Diego				Blanco
HI-31	Baboso Negro				Negro
HI-32	Baboso Negro				Negro
HI-33	Baboso Blanco				Blanco
HI-34	Baboso Blanco				Blanco
HI-35	Moscatel Blanco				Blanco
HI-36	Baboso Blanco				Blanco
HI-37	Baboso Negro				Negro
HI-38	Desconocida Blanca				Blanco
HI-39	Castellana				Negro
HI-40	Desconocida Mesa				Blanco
HI-41	Desconocida Negra				Negro
HI-42	Tintilla				Negro
HI-43	Madera				Desconocido
HI-44	Forastera				Blanco
HI-45	Desconocida Blanca				Blanco
HI-46	Desconocida Negra				Negro
HI-47	Malvasia				Blanco
HI-48	Bermajuelo				Blanco
HI-49	Torrontes				Blanco
HI-50	Listan Blanco				Blanco
HI-51	Burra Blanca				Blanco
HI-52	Mulata Rosada				Rosada
HI-53	Desconocida Negra				Negro
HI-54	Malvasia Negra				Negro
HI-55	Verijadiego Blanco				Blanco
HI-56	Baboso Negro				Negro
HI-57	Listan Negro				Negro
HI-58	Desconocida				Desconocido
HI-59	Baboso Negro				Negro
HI-60	Verdello del Hierro				Blanco
HI-61	Baboso Blanco				Blanco
HI-62	Bermajuelo				Blanco
HI-63	Mulata				Negro
HI-64	Malvasia				Blanco
HI-65	Uval Blanco				Blanco
HI-66	Eusebia				Desconocido
HI-67	Verijadiego Blanco				Blanco
HI-68	Verijadiego Blanco				Blanco

<b>CODIGO</b>	<b>NOMBRE LOCAL</b>	<b>VITICULTOR</b>	<b>REF. CATASTRAL</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	<b>COLOR</b>
HI-69	<b>Pedro Ximénez</b>				Blanco
HI-70	<b>Tintilla</b>				Negro
HI-71	<b>Verijadiego Blanco</b>				Blanco
HI-72	<b>Bermajuelo</b>				Blanco
HI-73	<b>Bermajuelo</b>				Blanco
HI-74	<b>Baboso Negro</b>				Negro
HI-75	<b>Desconocida</b>				Desconocido
HI-76	<b>Desconocida</b>				Desconocido
HI-77	<b>Desconocida</b>				Desconocido
HI-78	<b>Pedro Ximénez</b>				Blanco
HI-79	<b>Desconocida</b>				Desconocido
HI-80	<b>Desconocida</b>				Desconocido
HI-81	<b>Malvasia</b>				Blanco
HI-82	<b>Baboso Blanco</b>				Blanco
HI-83	<b>Malvasia Negra</b>				Negro
HI-84	<b>Baboso Negro</b>				Negro
HI-85	<b>Mierda Gallina</b>				Desconocido
HI-86	<b>Bermajuelo Rosada</b>				Rosada
H08UVN	<b>Uval negro</b>				Negro

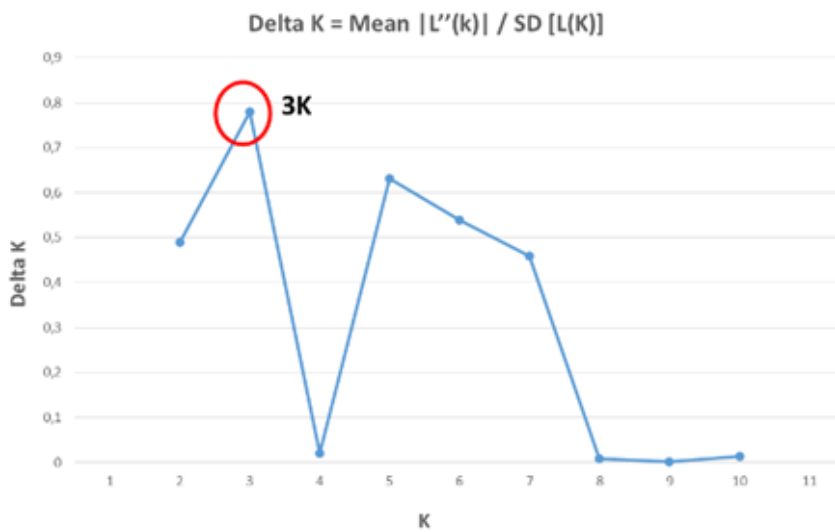
**Anexo 2:** Características específicas de los 20 microsatélites

**Anexo 3:** Parámetros estadísticos utilizados en este estudio.

PARÁMETRO (siglas)	PARÁMETRO (nombre)	FÓRMULA	RANGO	ANOTACIONES
Na	No. of alleles (Codom and Haploid Data)		[1,n]	Determined by direct count. GenAEx also provides the arithmetic mean across loci.
Ne	Effective number of alleles (Haploid Data) (Codom Data)	$N_e = \frac{1}{1-H_t}$ $cN_e = \frac{1}{1-H_t}$	[1,n]	Here Ne represents an estimate of the number of equally frequent alleles in an ideal population. Enables meaningful comparisons of allelic diversity across loci with diverse allele frequency distributions. GenAEx provides two slightly different estimates. The first (Ne) via Frequency is calculated by locus from HE for each population. The second (cNe) via G-statistics is calculated by locus over populations based on HS.
Ho	Observed Heterozygosity (Codom Data)	$H_o = \frac{\text{No. of Hets}}{N}$	[0,1]	Observed heterozygosity for a single locus within a population, where the number of heterozygotes is determined by direct count, N = sample size.
He	Expected heterozygosity (Codom Data)	$H_t = 1 - \sum p_i^2$	[0,1]	HE is the Expected Heterozygosity or Genetic Diversity within a population. Calculated per locus as 1 minus the sum of the squared allele frequencies, $pi^2$ .
PI	Probability of Identity (Codom Data)	$PI = 2 \sum p_i^2 + \sum p_i^4$ <p>for each locus.</p>	[0,1]	multiple loci calculated as the product of individual locus PI's. PI represents the average probability of a match for any genotype, rather than for a specific genotype, as in Genotype Probability. PI is widely used in DNA forensic analysis where it is also called the Match Probability, Matching Probability and Power of Inclusion. 1-PI is called the Exclusion Power, or Power of Discrimination. PI is also used for assessing the number of loci required for genetic tagging.
F	Fixation Index (Codom Data)	$F = \frac{H_t - H_o}{H_t}$	[-1,1]	the arithmetic mean across loci. Values close to zero are expected under random mating, while substantial positive values indicate inbreeding or undetected null alleles. Negative values indicate excess of heterozygosity, due to negative assortative mating, or heterotic selection.

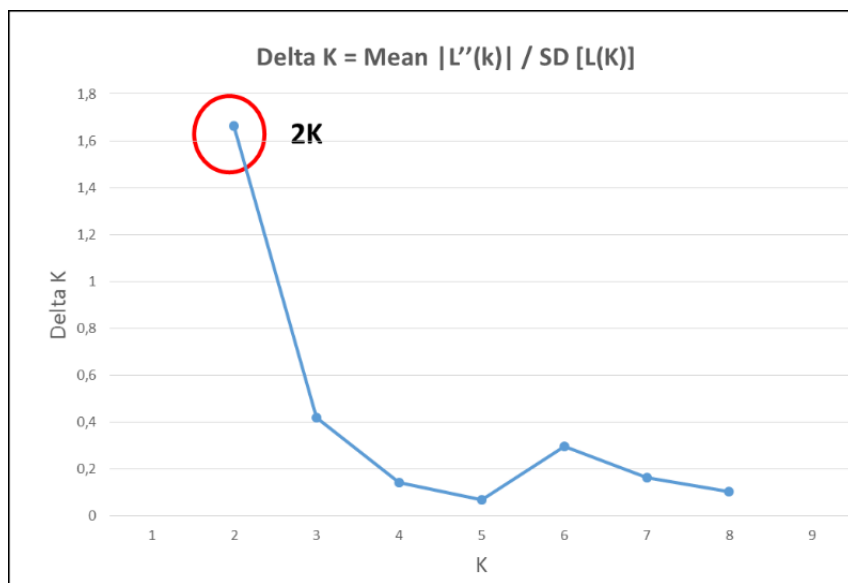
**Anexo 4:** Parámetros estadísticos obtenidos con 20 SSR o microsátélites para los perfiles genéticos (sin variaciones (mutantes)).

**Anexo 5:** El último de los cuatro pasos del método gráfico de Evanno et al. (2005), que permite estimar el número real de grupos K ancestrales para la población de individuos de la colección de la isla de El Hierro, que en este caso particular es de  $k=3$ .



**Anexo 6:** Test de Asignación (programa GenAIEx 6.5) para la distribución de la población de vides herreñas en 3 subpoblaciones, que da una bondad de la buena ubicación en cada subpoblación de los cultivos herreños del orden del 97%.

**Anexo 7:** El último de los cuatro pasos del método gráfico de Evanno et al. (2005), que permite estimar el número real de grupos K ancestrales para la población de individuos de la colección de cultivos mundial, que en este caso particular es de  $k=2$ .



**Anexo 8:** Variabilidad intravarietal.

**Anexo 9:** Errores y confusiones de nombre.

**Anexo 10:** Nombres de las variedades desconocidas.