



Universidad de Valladolid

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS
AGRARIAS**

Titulación

Grado en enología

**Evaluación del germoplasma de vid para su
conservación**

Alumno: Miguel Muñoz Cantera

Tutora: Elena Hidalgo Rodríguez

JUNIO 2021

ÍNDICE

1.RESUMEN	1
2.INTRODUCCIÓN	2
3. JUSTIFICACIÓN	9
4.OBJETIVOS	10
5. MÉTODOS Y MATERIALES	10
5.1 Búsqueda y recopilación de información	10
5.2 Elaboración de la revisión bibliográfica	11
6.REVISIÓN DE PUBLICACIONES	11
6.1 Riesgos y amenazas de la diversidad en vid	11
6.1.1 Riesgos abióticos: Cambio climático.....	11
6.1.2 Riesgos bióticos: Enfermedades, parásitos y virus	13
6.2 Origen de la diversidad genética de vid y su manejo histórico	15
6.3 Estrategias de conservación	16
6.3.1 ¿Cuándo, cómo y por qué de los bancos?.....	16
6.3.2 Los principales bancos de germoplasma europeos.....	18
6.4 Alternativas de conservación	19
6.4.1 Cultivo in vitro.....	20
6.4.2 Crioconservación.....	20
7.CONCLUSIÓN	22
8.BIBLIOGRAFÍA	23

1.RESUMEN

La vid, a pesar de su alto valor económico, está en riesgo de perder variabilidad genética, lo que se denomina erosión genética, principalmente por causas derivadas del cambio climático, globalización de los mercados o por enfermedades. Para paliar el efecto de esta pérdida de variabilidad, a lo largo de los años se han desarrollado estrategias que nos ayuden a conservar las plantas que puedan poseer rasgos útiles y se han implementado nuevas herramientas, para identificar correctamente este material y así, poder conservarlo de forma idónea. Como estrategia principal se utilizan los bancos de germoplasma, que se suelen apoyar en el uso de las nuevas herramientas de identificación. En países como España todavía hay trabajo por realizar en la protección legal de este recurso. Como los bancos de germoplasma necesitan de un espacio determinado, han surgido nuevas alternativas. Una de ellas es el cultivo in vitro, o los bancos de ADN o los de yemas vegetativas. Pero una técnica alternativa en auge es la crioconservación en la cual se han desarrollado una serie de protocolos, basados en la vitrificación, mediante la exposición del material a temperaturas de congelación. Con todo ello, en esta revisión se pretende informar del estado actual del germoplasma de vid, e informar de las técnicas existentes para la conservación de vid.

Palabras clave: Vid, erosión genética, bancos de germoplasma, crioconservación, cambio climático, estrategias de conservación, peligros cambio climático, conservación ex situ.

ABSTRACT

Grapevine is an important crop worldwide of high economic value. It is at risk of losing genetic variability, this is known as genetic erosion. Some of its causes are climate change, globalisation of the markets or diseases. To ease the effect of losing this variability, throughout the years, new strategies have been developed, that help us to preserve those plants with usefull traits. Besides new tools have been implemented to characterize properly this genetic material, and thereby store it correctly. As a main strategy, germplasm banks are used, these banks are supported with the new techniques of identification. In countries like Spain with scarce legal protection, there is work to do. Genebanks needs a lot of Surface therefore new techniques have arise. One of them is the in vitro culture, the DNA banks, or bud banks. Cryopreservation is in trend, in wich new protocols vitrification-based have been developed. To sum up, this review aims to inform about the current status of the grapevine germplasm, and report the existing techniques to conserve vines.

2.INTRODUCCIÓN

El actual patrimonio genético de la vid abarca una gran cantidad de variedades, clones y variantes que merece la pena conservar. Se estima, que hay unas 10.000 variedades de uva en todo el mundo (OIV,2017).

Este patrimonio está disminuyendo, sufriendo erosión genética. Una parte de, los riesgos a los que nos enfrentamos se derivan del cambio climático, tales como la sequía debida al incremento de las temperaturas y la ausencia de precipitaciones o los causados por las plagas y enfermedades. También influye el comportamiento humano, como el abandono de tierras agrícolas, la globalización de los mercados, o el hecho de que los consumidores solo conozcan un pequeño número de variedades, en perjuicio de las variedades menores (Di Vecchi-Staraz et al., 2009)

Por otro lado, estas variedades y clones en riesgo de desaparición constituyen un reservorio de genes y alelos de la especie "*Vitis vinifera*", aún muy poco conocidos, que pueden resultar útiles para mejorar la vid en el futuro. Además, dentro del género *Vitis* hay una gran diversidad de especies, muy cercanas a la vid cultivada, por lo que conservar el genotipo de diferentes vides, puede constituir un recurso importante de variabilidad. Los genotipos conservados pueden ser utilizados directamente para su propagación o para ser incluidos en procesos de selección clonal. Las selecciones clonales se llevaron a cabo para mejorar la salud y los rasgos de producción como el rendimiento, el sabor, o el color entre otros (van Houten et al., 2020). Además, los genes que contienen pueden ser utilizados en procesos de mejora por la vía clásica (cruzamiento y selección de descendientes) o por técnicas de transgénesis o de edición de genes como la CRISPR- CAS.

La vid es una especie vegetal que, de forma tradicional, se ha multiplicado por la vía vegetativa, sin intervenir en el proceso los cruzamientos de la vid sexual. Esto hace que los antiguos cultivares que han sido propagados durante cientos o incluso miles de años pueden haber cohabitado con cultivares recientes generados por diversos cruzamientos.

De las 10.000 variedades registradas, solo un pequeño número son actualmente cultivadas de forma significativa en el mundo. En la **Figura 1** se recogen las diez variedades que mayor superficie cultivada ocupan y marcan las tendencias del mercado y de los consumidores, perjudicando la utilización más masiva de otras variedades menos conocidas. De las restantes no todas se utilizan en la viticultura actual, pero constituyen una fuente importante de variabilidad genética que debe ser conservada.

Variety ¹⁵	Colour	Destination	Area (ha)
Kyoho	Black	Table	365 000
Cabernet Sauvignon	Black	Wine	341 000
Sultanina	White	Table, drying and wine	273 000
Merlot	Black	Wine	266 000
Tempranillo	Black	Wine	231 000
Airen	White	Wine, Brandy	218 000
Chardonnay	White	Wine	210 000
Syrah	Black	Wine	190 000
Red Globe	Black	Table	159 000
Garnacha Tinta / Grenache Noir	Black	Wine	163 000
Sauvignon Blanc	White	Wine	123 000
Pinot Noir / Blauer Burgunder	Black	Wine	112 000
Trebbiano Toscano / Ugni Blanc	White	Wine, Brandy	111 000

Figura 1: Variedades de vid cultivadas que ocupan más de 100.000 hectáreas de cultivo. (OIV (International Organisation of Vine and Wine), 2017). Se indican el nombre de la variedad, el color de la baya, el uso prioritario y la superficie de viñedo que ocupan (datos de 2017).

La pérdida de variedades de vid se suele asociar, aunque no siempre se cumple, a la pérdida de superficie de viñedo causada por aspectos antropológicos, o por el abandono de tierras y el posterior arrancado de viñedo. En la **figura 2** se refleja cómo ha decrecido la superficie plantada de vid desde el año 2000, independientemente de si su uso es para elaboración de vinos o para consumo en fresco, como uva de mesa. En estos 20 años la superficie de viñedo del mundo ha bajado de las 7,8 a los 7,4 millones de hectáreas.

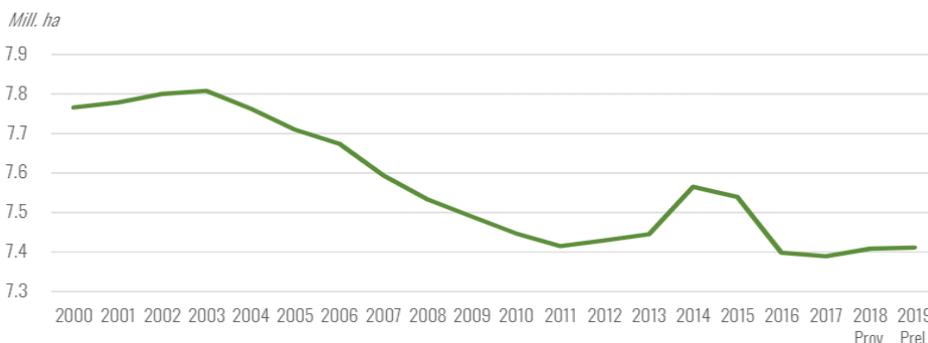


Figura 2: Evolución de la superficie de viñedo mundial (en millones de hectáreas) (Fuente: informe de la coyuntura del sector vitivinícola mundial de la OIV, abril 2020).

Para comprender la importancia de la pérdida de variedades de vid, es necesario entender de donde procede esa variabilidad, para lo cual nos debemos remontar al neolítico, cuando se inició la viticultura, con la domesticación de la planta de vid.

La domesticación de la vid es un proceso que consiste en seleccionar y propagar los individuos silvestres con los rasgos más favorables para su uso en cultivo como la uniformidad, el alto contenido en azúcares, el color o el tamaño de la baya, o la presencia de flores hermafroditas que aseguran el desarrollo del fruto y con ello mayor cantidad de alimento obtenido. El proceso de domesticación dio lugar a cambios genéticos en las vides cultivadas que no suponen ninguna ventaja evolutiva y que solo resultan interesantes para su cultivo. Entre ellas, las más importantes son el hermafroditismo de las flores ya que al poseer todas las plantas órganos masculinos y femeninos, son capaces de producir fecundación y dar lugar al fruto (Peiró et al., 2018), lo que permite obtener un mayor rendimiento del cultivo. La otra característica crítica es la uniformidad.

En la **Tabla 1** se recogen las principales diferencias entre las poblaciones naturales y las variedades cultivadas, incluyendo las más útiles en viticultura. Estas diferencias se han generado a partir de los eventos ocurridos en la domesticación de la vid.

El proceso de domesticación se realizó a lo largo de los años entre el séptimo milenio y el cuarto milenio a.C. en la zona transcaucásica, lo que en la actualidad pertenece a Georgia, Armenia y Azerbaiyán (Cunha et al., 2020), aunque más recientemente se han descrito otros.

Hay varios centros de domesticación según lo que se ha documentado recientemente. El que ya se conocía en la zona transcaucásica y otros en el mediterráneo occidental y mediterráneo central (Pagnoux et al., 2021).

Por otro lado con la expansión de las diferentes civilizaciones por el mediterráneo, se produjeron intercambios y nuevas prácticas de cultivo. Prueba de ello es que se han hallado vasijas, recipientes y tamices usados en los procesos fermentativos del mosto. En el artículo de Arroyo García y otros autores del 2006, estudiaron por medio del uso de microsatélites las relaciones genéticas entre "*Vitis vinifera ssp sylvestris*" y "*Vitis vinifera ssp sativa*". Con estos microsatélites, se pueden analizar sus relaciones genéticas, además ayuda a afianzar la idea de que el germoplasma de vid silvestre de Oriente próximo al oeste de Europa ha contribuido a la creación de muchos cultivares euroasiáticos. En el artículo de Sancho-Galán y otros autores de 2020 los autores utilizaron 22 marcadores moleculares lo que permitió documentar una sinonimia entre las variedades Castellano y Mantúo de Pilas, utilizadas en la zona sur de España y Portugal de donde es originaria la variedad Mantúo de Pilas (Sancho-Galán et al., 2020)

El uso de marcadores moleculares SSR, es una herramienta de identificación. Analizar las variedades con esta herramienta, permite tener una imagen única de esta variedad, y tenerla como referencia.

Tabla 1. Caracteres diferenciales entre la vid silvestre y de la vid cultivada (Prado Villar & Martínez de Toda Fernández, 2018)

Vid silvestre “ <i>Vitis vinifera ssp sylvestris</i> ”	Vid cultivada “ <i>Vitis vinifera ssp sativa</i> ”
Ecotipo típicamente mesofítico (flora nana)	Ecotipo mesofítico y xerofítico
Brotos y sarmientos poco vigorosos con porte caído	Brotos y sarmientos de mayor vigor con porte erecto o caído *
Hoja generalmente glabra, entera o trilobulada (con seno peciolar muy abierto o abierto)	Hoja glabra, grande, que tiene 7 lóbulos con seno peciolar de abierto a cerrado con superposición de los bordes
Flores unisexuales en plantas dioicas.	Flores hermafroditas *
Racimos de poca dimensión con la baya pequeña y esférica.	Racimos de mayor dimensión con la baya más grande, esférica u ovoidal *
Baya muy pigmentada (raramente blanca)	Bayas no pigmentadas a poco pigmentadas o muy pigmentadas *
Perfil antociánico, a veces, libre de esterificación	Perfil antociánico con forma esférica (salvo Pinot noir)
Baya con mosto poco azucarado	Baya con bajo contenido en azúcar a alto contenido en azúcar
Pepita pequeña, corta y rechoncha, sin pico	Pepita con pico distinguible
Superficie ventral de la semilla lisa, chalaza distinguible y en relieve	Superficie ventral de la semilla con el margen en relieve, chalaza indistinguible
Relación anchura/longitud de la semilla x100 comprendida entre 54 y 83 (Stummer, 1911) comprendida entre 64 y 83 (Schiemann, 1953)	Relación anchura/longitud de la semilla x100 comprendida entre 44 y 75 (Stummer, 1911) comprendida entre 54 y 70 (Schiemann, 1953)

Nota: Los * indican las características más relevantes para la viticultura.

Los parámetros que se indican con un asterisco en la **Tabla 1**, tienen interés para los distintos usos que se pueden dar a la vid y en particular con el rendimiento en kg de fruta que se pueden obtener.

El alto **vigor** de la planta hace que la producción de fruto sea mayor. Esta es una característica muy interesante desde las primeras etapas de la domesticación, ya que nuestros antepasados buscaban obtener una fuente de alimento mayor, en vez de sólo una producción escasa. Esta mayor producción de fruta está también relacionada con el tamaño mayor del racimo. Además, otra característica útil, es que la vid cultivada permite obtener mayor cantidad de fruta porque los racimos que se producen son de mayor tamaño. Por ello, de una única planta se puede conseguir mayor alimento frente a la vid silvestre, que producía racimos más pequeños.

Sin embargo, lo que se busca actualmente es un equilibrio en el vigor, ya que va asociado a la calidad final del producto, y por ende a la posibilidad de elaborar vinos de calidad.

En cuanto a la coloración del fruto, en la actualidad se sabe que no es un factor primordial en la fecundación (polinización) de las flores. Ya que se ha visto que la vid no es una planta que dependa de insectos para su polinización, (polinización entomófila) sino que, depende de otros agentes (polinización anemófila) para favorecer la

polinización. Por ello, en la vid cultivada, no se busca seleccionar bayas muy pigmentadas como eran las de las poblaciones silvestres, sino que se prima que haya más diversidad en su coloración.

La importancia de la pigmentación hoy en día radica en la posibilidad de obtener un amplio abanico de tipos de vinos.

La cantidad de azúcar también es un parámetro que comentar, ya que una fruta más dulce facilitaba la obtención de un zumo con sabor más dulce. Por lo tanto, mejoraba el sabor de las bayas finales obtenidas. Por último, hay que comentar que la cantidad de azúcar es importante en enología, dado que será la cantidad de grado alcohólico que tendrá la bebida final. Las características actuales, provocadas por el cambio climático, hacen que las uvas tengan una mayor cantidad de azúcar. Hay que añadir que, durante las diferentes civilizaciones, los rasgos fueron variando según las diferentes culturas.

En la conservación de germoplasma, con vistas a su utilización, es vital documentar el origen de las variedades cultivadas, así como la diversidad que contienen y las relaciones filogenéticas que presentan con sus ancestros silvestres. Sin embargo, en el caso de la vid, no existen registros documentales sobre estos aspectos, por lo que resultan muy necesarios los estudios basados en las características genéticas del ADN los microsatélites y las diferencias del ADN cloroplástico. Entre estos estudios hay dos el de Arroyo, 2006 y el de Myles, 2011 que merecen una atención particular.

Se ha comprobado (Myles et al., 2011) que las relaciones filogenéticas entre variedades de uva mesa son más cercanas entre sí, con respecto a variedades utilizadas en elaboración de vino. En términos de porcentaje esto corresponde a un 89,3% de todas las variedades. En cuanto a diferentes regiones solo el 6,1% de los cultivares del este tienen conexiones con los cultivares del oeste. En la muestra obtenida, los autores descubrieron que el 74,8% de los cultivares están emparentados con al menos un cultivar en relaciones de primer grado.

Con este análisis con microsatélites se pudo identificar ocho clorotipos diferentes, pero realmente hubo cuatro clorotipos que superaban el 5% de frecuencia. A estos se les denominó con las letras A; B; C y D. De estos clorotipos los más abundantes fueron el A, el B y el D en las muestras de "*Vitis vinifera ssp sylvestris*" y el A, el C y el D en las muestras de "*Vitis vinifera sativa*". El clorotipo A tenía el doble de presencia en las uvas dedicadas a la elaboración de vino y en uva de mesa, mientras que el clorotipo C tuvo el doble de frecuencia en uva de mesa. Los clorotipos B y D tuvieron presencias similares tanto en uva de mesa como en uva para elaboración de vino (Arroyo-García et al., 2006).

Las relaciones de los clorotipos se estudiaron en un modelo de red de Jakobsen y Easteal, descrito en la **figura 3** (Arroyo-García et al., 2006). Los resultados indican que los clorotipos con una mayor frecuencia corresponden a tres descendencias principales de "*Vitis vinifera ssp sativa*" (A, C y D). En el diagrama el clorotipo B se coloca en una posición central; los clorotipos G y H mostraron fuertes relaciones de proximidad con el clorotipo A, mientras que el clorotipo E estaba muy relacionado con el clorotipo D, y muy poco relacionado con los clorotipos asociados al clorotipo A. El clorotipo F se acerca en las características al clorotipo B que como tiene relaciones intermedias con el resto puede considerarse como el clorotipo ancestral de "*Vitis vinifera*".

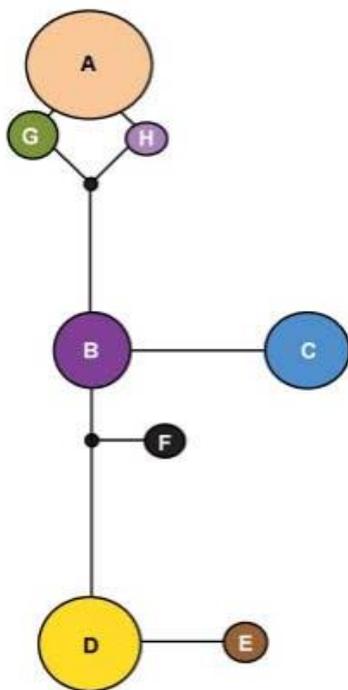


Figura 3: Diagrama de relaciones aproximadas de los clorotipos encontrados en vid. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia encontrada en la muestra global (Arroyo-García et al., 2006).

En la **Figura 4** podemos observar la distribución geográfica de los ocho clorotipos distintos descritos en vid. En ella podemos ver que en la península Ibérica el clorotipo predominante es el A, como también lo es en el viñedo centro europeo. En oriente medio, por el contrario, no se han descrito variedades con clorotipo A, siendo predominante el clorotipo C. Oriente próximo es la única zona geográfica con los clorotipos menos frecuentes, que son el F, el G y el H. Estos resultados cuadran con la hipótesis actual de que la península de Anatolia y la zona Transcaucásica fueron los primeros centros de domesticación de la vid.

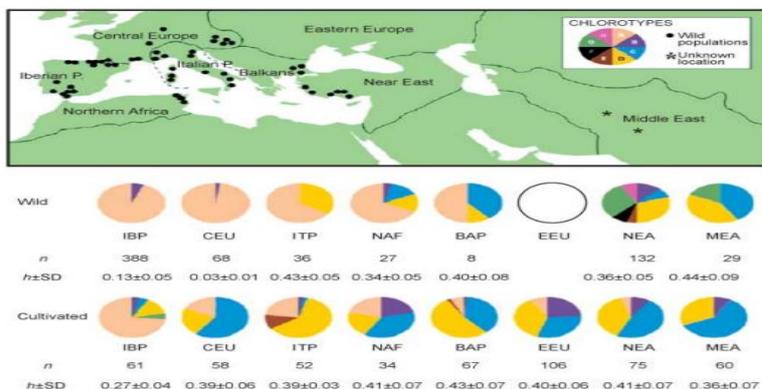


Fig. 4: Distribución de clorotipos en grupos de poblaciones silvestres y “*Vitis vinifera subsativa*”. Los fragmentos negros del diagrama no señalan poblaciones específicas de vid silvestre, pero sí zonas donde se ha recolectado muestras. El asterisco indica que la localización específica de la colección en el área se desconoce. La imagen muestra los valores imparciales de clorotipos y el número de población considerado (Arroyo-García et al., 2006).

Por un lado muchas de estas actuales variedades, utilizadas en distintas zonas durante largos periodos de tiempo, actualmente ya no se cultivan o sólo se utilizan de forma residual, por no estar bien adaptadas a las condiciones y necesidades actuales (Biasi & Brunori, 2015). Esto provoca una fuerte erosión genética, que es la pérdida de diversidad de vid, lo que implica una pérdida del patrimonio vitícola heredado a lo largo de los años (Prado Villar & Martínez de Toda Fernández, 2018). Originalmente, la vid silvestre (*Vitis vinifera ssp sylvestris*) tenía una distribución restringida a lo largo de la cuenca mediterránea, como se indica en la **Figura 5**. En España ha habido distintas prospecciones en busca de restos de vid silvestre, para así poder encontrar material útil y restos que nos sirvan como ayuda en el entendimiento del desarrollo de la vid a lo largo de los años. Estas prospecciones se llevan a cabo, para intentar hallar restos de poblaciones silvestres; determinar su posible extensión territorial; caracterizar los ejemplares y registrar los peligros en los que se ve expuesta. Con estas diferentes prospecciones, Jiménez y Ocete en 2017 ampliaron el mapa de las zonas de España en donde aún se encuentran poblaciones de vid silvestre (**Figura 6**) (Prado Villar & Martínez de Toda Fernández, 2018).

Este escenario hace que sea muy necesario recurrir a las vides silvestres, que pueden ser una interesante reserva de genes de interés. En general, se trata de poblaciones residuales que se suelen encontrar cerca de zonas húmedas como la ribera de los ríos o bosques cercanos. Como ya indicamos más arriba (**Tabla 1**), esta subespecie silvestre difiere de las viníferas domesticadas en la forma de las semillas, que suelen tener un aspecto redondeado, con un pico casi inexistente. Por el contrario, en la vinífera domesticada adquieren formas ovoides o elongadas, y con un pico bastante notable. Estos rasgos nos permiten así diferenciar las variedades silvestres de las domesticadas en las prospecciones realizadas en busca de germoplasma con fines de conservación (Pagnoux et al., 2021). Además, y aunque no es el objetivo principal de estas prospecciones, pueden ayudar a recuperar variedades. Un ejemplo de esto es la recuperación de cuarenta y cinco variedades minoritarias en La Rioja, que actualmente se encuentran almacenadas en el banco de germoplasma La Grajera (La Rioja), como resultado de un proyecto que comenzó en 1988. Cabe añadir que en las prospecciones que se llevaron a cabo durante dicho proyecto, se encontraron dos genotipos que no han podido identificarse en las bases de datos europeas y españolas. Esto refuerza la importancia de realizar proyectos de recuperación y conservación (Balda et al., 2014).

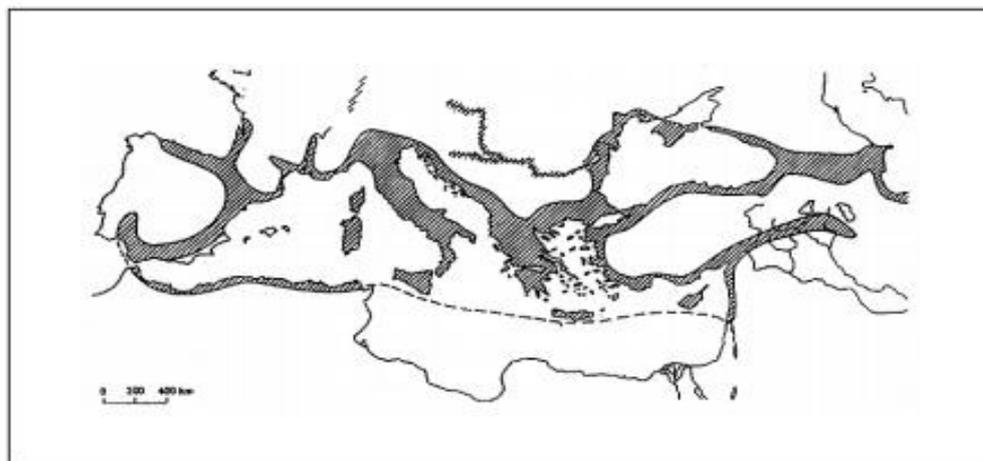


Fig. 5. Mapa de distribución de *Vitis vinifera ssp sylvestris* tras la última expansión postglacial en el ámbito del Mediterráneo y Oriente Próximo, según Zohary y Spiegel-Roy, 1975 (Ocete et al., 2007).



Figura 6: Provincias de España(en morado) con restos de vides silvestres encontrados en España (Jiménez & Ocete, 2017).

Las primeras colecciones de germoplasma con fines de conservación se realizaron tras la gran pérdida de material genético provocada por la llegada a España de la filoxera en 1878, un insecto proveniente de viñedos americanos. Anteriormente solo existían algunas colecciones de vides que tenían como fin el estudio de la vid. Estas colecciones, han constituido el germen del banco de germoplasma de “El Encín” (www.madrid.org/coleccionvidencin), que actualmente es el banco de germoplasma más importante de España, y posteriormente el banco de germoplasma de “Rancho de la Merced”(IFAPA) (En Jerez de la Frontera) (<https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/web/>) (Balda et al., 2014), que son los dos bancos de germoplasma más importantes de España.

En general, para la conservación de germoplasma vegetal se utilizan las semillas. Sin embargo, en la vid al ser una planta leñosa y muy heterocigótica (que presenta alelos diferentes procedentes de sus padres), las plantas procedentes de semilla no mantienen las características de los progenitores. Por consiguiente, el germoplasma de vid se debe conservar en forma de planta viva, generalmente en parcelas de conservación, que constituyen los bancos de germoplasma (Dal Bosco et al., 2015) .Su mantenimiento resulta caro y costoso. Por eso, en los últimos años, se están desarrollando nuevas estrategias más baratas y seguras, como la conservación de plantas en cámaras de cultivo in vitro, con unas condiciones ambientales adecuadas, o de embriones somáticos en congeladores.

3. JUSTIFICACIÓN

La vid es uno de los cultivos frutales más importantes económicamente hablando. Además, posee gran valor de variabilidad genética debido a que la uva se lleva utilizando desde milenios, y con el paso del tiempo se han ido creando cultivares adaptados a diferentes características, ya sean tipos de suelo o diferentes climatológicas, que merece la pena conservar.

Debemos conservar la vid puesto que está expuesta a agentes que causan pérdida de diversidad, como el oídio (“*Uncinula necator*”) o el mildiu (“*Plasmopara viticola*”). Todas

estas enfermedades causaron la pérdida de mucha diversidad dañando seriamente el cultivo de vid en millones de hectáreas. Por ello se crearon lugares destinados a la conservación y estudio de material vegetal para su identificación, caracterización y almacenamiento. Estos lugares son los bancos de germoplasma que forman parte de las estrategias de conservación de plantas, no solo de vid. Los estudios a los que se someten las plantas de los bancos de germoplasma se han incrementado, gracias al desarrollo de la biología molecular de plantas, que ha permitido utilizar sofisticadas técnicas para la caracterización del germoplasma y para documentar el origen, la diversidad y la distribución de las poblaciones silvestres y de los cultivares.

Además de los peligros provocados por microorganismos e insectos, también es importante destacar que la globalización de los mercados y el uso de variedades muy conocidas, junto a los efectos adversos provocados por el cambio climático, afectan de manera perjudicial al presente y futuro de muchas variedades que pueden ser útiles.

La pérdida de diversidad de vid es un tema que además de preocupar a los investigadores, también preocupa a la sociedad. Encontramos artículos como el del país escrito por Antonio Castillo en 1990 sobre el descubrimiento de vid en el valle del Roncal en Navarra, en el que un grupo de ingenieros riojanos explicaron los hallazgos que se habían encontrado un año anterior a la fecha de publicación del artículo. Estos hallazgos consistían en el descubrimiento de variedades de vid silvestre, y vivencias de los habitantes de aquella zona en las que contaban que ya antes se consumían las bayas de las vides encontradas, teniendo naturaleza amarga y bayas pequeñas, sirviendo como alimento en tiempos de penurias. En la **Figura 5** se muestra la distribución de la vid silvestre en Europa después de la última glaciación.

4. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliográfica es

- Revisar las estrategias para documentar la variabilidad genética de las vides silvestres y cultivadas
- Revisar las estrategias de conservación más habituales y las alternativas actualmente disponibles.

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5.1 Búsqueda y recopilación de información

Esta revisión bibliográfica ha sido elaborada con información recopilada de buscadores académicos, tales como, Web of Science (WOS), anteriormente conocido como Web of Knowledge (WOK), science direct o reserchgate, entre otros.

La información hallada se ha obtenido de artículos científicos recogidos en el SCI, teniendo en cuenta diversos criterios de inclusión y exclusión, con el fin de seleccionar aquellos artículos más adecuados en relación con el tema tratado en este trabajo.

Como criterios de inclusión se tuvo en consideración el idioma de los artículos (castellano o inglés), eliminando muchos otros por estar en otros idiomas. Finalmente, también se ha tenido en cuenta la fecha de publicación de estos, siempre de los últimos veinte años, aunque ello no ha sido el motivo principal, ya que se cuenta con información actualmente reciente en este aspecto.

El criterio de exclusión establecido fue para las lecturas en otros idiomas (francés, portugués...) y publicaciones con fechas muy antiguas.

Para la búsqueda de información se han utilizado las palabras que hemos considerado clave con respecto a este trabajo, tanto en inglés como en castellano, con el fin de optimizar la búsqueda y filtrar la información obtenida. Como he dicho anteriormente en la justificación de este trabajo, también se han encontrado y utilizado algunos artículos de divulgación periodística.

5.2 Elaboración de la revisión bibliográfica

Cuando ya he recopilado toda la información he clasificado los artículos según el tema abordado en cada uno de ellos, o según el contenido tratado en el resumen.

Con ello he clasificado la información en estas categorías:

- Artículos sobre erosión genética y amenazas sobre la diversidad de la vid.
- Artículos sobre conservación de germoplasma de vid.
- Artículos sobre estrategias de recuperación de la vid.

La presente revisión bibliográfica se ha realizado siguiendo las normas recogidas en el documento “Normas de Estilo y Formato de TFG Enología” así como, en la nueva propuesta aprobada por la Junta de Centro y el Comité del Grado de Enología que entró en vigor en el curso 2018/2019, en formato de “Normas de Revisión bibliográfica para Enología”.

Los artículos hallados tienen fechas de publicación relativamente recientes, siendo por lo general situados en un rango del año 2000 al 2020, si bien hay alguno algo anterior. En todos los casos he combinado la información de distintas fuentes, teniendo en cuenta la fecha de publicación y en el caso de que coincida la información he tomado la publicación más reciente.

6. REVISIÓN DE PUBLICACIONES

6.1 Riesgos y amenazas de la diversidad en vid

6.1.1 Riesgos abióticos: Cambio climático

El clima es una variable para tener en cuenta en el cultivo de vid. Tiene un papel muy importante en el “terroir”, concepto de origen francés, que trata de poner en valor las características tanto climáticas como edafológicas de una región vitivinícola determinada. El clima influye en la fisiología de la planta, lo que afecta tanto a los rendimientos posibles (Kg uva / ha) como la composición de las bayas, entre otros factores. Es evidente, que, en las últimas décadas, se han observado cambios en la composición de las bayas, debido a cambios en las condiciones atmosféricas, que alteran las distintas fases o estados fenológicos que sufre la planta. Estos cambios, se pueden observar a corto plazo: como ya he dicho, las condiciones atmosféricas regulan los distintos procesos de la vid, siendo particularmente importantes las temperaturas, la intensidad de radiación activa y los niveles de agua disponible. Con ello podemos predecir los rendimientos en la época de vendimia. A largo plazo vemos que estos parámetros, que han afectado durante décadas a las distintas localidades, han definido la adecuación de unas variedades u otras (Santos et al., 2020).

La temperatura influye en muchas etapas del desarrollo de la vid: temperaturas por debajo de 13°C suelen darse en periodo de maduración en zonas donde las variedades de vid desarrollan ciclos cortos con un número pequeño de horas de luz solar recibidas, y con integrales térmicas limitadas. Temperaturas elevadas pueden causar estrés hídrico y, si vienen acompañadas de condiciones de alta humedad relativa, pueden causar enfermedades parasitarias (Santos et al., 2020).

Al igual que la temperatura, el agua tiene un papel muy importante en el desarrollo de la vid, y en el balance hídrico del suelo. Las carencias de agua en ciertos estados fenológicos pueden llevar a un aumento de calidad de la baya, como en el envero. Si hay mucha agua disponible habrá mayor vigor en la planta, y con ello mayor cantidad de hojas de la planta. Esto conlleva menor iluminación en los racimos al igual que pueden desencadenar mayor riesgos de enfermedades (Santos et al., 2020).

La radiación solar es fundamental para la realización de la fotosíntesis. Esta radiación da lugar a la síntesis y acumulación de azúcar y a otros compuestos que influyen en las características organolépticas de las uvas, y por consiguiente en el vino producido. La planta en regiones de baja radiación solar contrapone las bajas concentraciones con doseles ampliamente extendidos, y con ello se optimiza la cantidad de radiación recibida. Esto conlleva una mayor demanda hídrica. Altas concentraciones de radiación harán que la planta disminuya la cantidad de vegetación expuesta para así evitar posibles quemaduras y asurados, y concentraciones más bajas de azúcares y otros compuestos orgánicos como los antocianos, o la degradación de ácidos orgánicos (Santos et al., 2020).

Estos parámetros potencialmente adelantarán la fecha de maduración. Las bayas, en algunas zonas, contarán con mayor grado alcohólico, lo que supone un desafío para tener en cuenta en la elaboración de vinos de calidad. El histórico de temperaturas muestra la tendencia global de que en las principales regiones vitivinícolas la temperatura media ha aumentado 1,3°C entre 1950 y 1999 y 1,7 entre 1999 y 2004. Pero todos estos cambios no son negativos en todas partes. En algunas zonas puede tener efectos favorables para la viticultura. Pueden aparecer nuevas zonas de cultivo de vid que antes no tenían las características idóneas para ello. Las zonas del sur de Europa van a experimentar una bajada de su idoneidad en el cultivo de vid; menor producción de biomasa, y rendimientos más bajos, debido a condiciones de extrema sequía. Esto conllevará más gasto en la implementación de nuevos sistemas de riego y medidas más eficientes en el uso de agua. Actualmente la vid se cultiva entre los paralelos de 50° LN y 40 ° LS. Se prevé, según los posibles escenarios climáticos estudiados en una serie de modelos, que el cultivo de la vid se extienda hasta el paralelo 55° LN. Los efectos de sequía pueden verse compensados en parte en el rendimiento y en los índices de área foliar en Europa central y el norte, con la cantidad de CO₂ atmosférico (Santos et al., 2020).

Según el informe de negocio de Pro Wein de 2019, es necesario que se apliquen medidas para intentar paliar o ajustar los cambios que se van a producir en el futuro. En algunas zonas se está empezando a plantar viñedo en altitudes que con las condiciones anteriores era impensable. En otras zonas se están produciendo traslados de plantas de zonas calientes a zonas más frías, dado que, con las condiciones actuales y futuras las hacen más idóneas para aquellas zonas. A corto plazo las medidas se centran en prevenir amenazas específicas. Estas medidas se deben centrar en cambios en las prácticas culturales. En cuanto a las medidas a medio plazo, nos podemos centrar en posponer la maduración. Existen muchos artículos que hablan de técnicas para retrasar la maduración. Por ejemplo, cambios en la morfología del dosel, acortando la superficie foliar para reducir el consumo hídrico, o el aclareo de hojas cerca del racimo, mejorando así la iluminación recibida. Estas técnicas no son medidas únicas que sirvan para todas las regiones. En cada zona existirán unas medidas que beneficien y otras que perjudiquen (Santos et al., 2020).

Contra las olas de calor extremas y las mayores cantidades de radiación solar recibidas, se plantea el uso de compuestos como el caolín y redes oscuras. Estas redes y la arcilla caolín hacen que gran parte de la radiación se refleje y no cause problemas de

quemaduras a las plantas (Glenn et al, 2003). En algunas variedades la aplicación de caolín no solo mejora la reflectancia de radiación, sino que afecta a la producción de metabolitos secundarios y produce compuestos de interés organoléptico. Todo esto resulta interesante y es un desafío más para poderse utilizar en la producción de diferentes tipos de vino de calidad, con mayor color y perfil aromático (Santos et al., 2020).

Otra medida que deberá utilizarse contra las olas de calor es el uso de riego, cuando las condiciones hídricas sean desfavorables. En zonas del sur de Europa, esta práctica debería ser muy utilizada porque las olas de calor extremo serán más frecuentes. Para el uso de irrigación, en muchas zonas, deberán producirse cambios, en la normativa de regulación de las prácticas permitidas en las Denominaciones de Origen que se vean afectadas en el futuro. Las olas de calor conllevan mayor evapotranspiración, por lo que habrá mayor carencia de agua en las plantas. Hay variedades que debido a que sus hojas adultas presentan mayor cantidad de tricomas, conocidos como pelos, esta característica les sirve como herramienta de ayuda para paliar dicha pérdida. Por lo que conviene conservar este rasgo para la obtención de nuevas variedades que sean capaces de resistir los efectos adversos del cambio climático (Sancho-Galán et al., 2020).

6.1.2 Riesgos bióticos: Enfermedades, parásitos y virus

Otra amenaza que tiene la vid son las enfermedades y los parásitos. Las condiciones climáticas que muy probablemente se den en un futuro, aumentarán los riesgos de enfermedades en vid. La mayor incidencia de enfermedades, o insectos en el viñedo, como la polilla de la vid, requerirán mayor control y monitorización de poblaciones. El uso de mayores cantidades de fitosanitarios está fuertemente desaconsejado, como medida de control, ya que estos causan gran impacto ambiental (Santos et al., 2020).

Para reducir la posible contaminación ambiental, causada por el uso de productos químicos, se están desarrollando variedades resistentes a patógenos. Hay indicios de que existen genes de resistencia contra oídio y mildiu en las distintas especies de *Vitis*. Recientemente se ha hecho una revisión sobre los distintos factores genéticos identificados en las distintas especies del género *Vitis*, que podrían ser interesantes para controlar estas dos enfermedades (Merdinoglu, Schneider, Prado, Wiedemann-Merdinoglu, & Mestre, 2018). Los factores genéticos son elementos genéticos que pueden dar lugar a una respuesta contra una amenaza, o una predisposición a desarrollar una enfermedad. En el mismo artículo se describe que algunas de estas resistencias son totales (como es el caso de la "*Vitis rotundifolia*" que es totalmente resistente a mildiu y oidio), pero en la mayoría de los casos, se trata de resistencias parciales, que no cubren a las cepas más agresivas. El detalle de estas resistencias se recoge en la **Tabla 2**.

Como se puede apreciar en la **Tabla 2**, la mayoría de los genes identificados se han publicado en los últimos 15-20 años y se han localizado en distintos cromosomas.

Tabla 2: Relación de los factores genéticos de resistencia a oídio y mildiu encontrados en diferentes especies de vid (Merdinoglu et al., 2018).

Factor	Controlled disease	Origin of resistance	Chromosome	Resistance level	Reference
<i>Rpv1</i>	Downy mildew	<i>V. rotundifolia</i>	12	High	Merdinoglu et al., 2003
<i>Rpv2</i>	Downy mildew	<i>V. rotundifolia</i>	18	Total	Wiedemann-Merdinoglu et al., 2006
<i>Rpv3</i>	Downy mildew	<i>V. rupestris</i>	18	Partial	Bellin et al., 2009; Welter et al., 2007
<i>Rpv4</i>	Downy mildew	American <i>Vitis</i>	4	Weak	Welter et al., 2007
<i>Rpv5</i>	Downy mildew	<i>V. riparia</i>	9	Weak	Marguerit et al., 2009
<i>Rpv6</i>	Downy mildew	<i>V. riparia</i>	12	Weak	Marguerit et al., 2009
<i>Rpv7</i>	Downy mildew	American <i>Vitis</i>	7	Weak	Bellin et al., 2009
<i>Rpv8</i>	Downy mildew	<i>V. amurensis</i>	14	High	Blasi et al., 2011
<i>Rpv9</i>	Downy mildew	<i>V. riparia</i>	7	Weak	Moreira et al., 2011
<i>Rpv10</i>	Downy mildew	<i>V. amurensis</i>	9	High	Schwander et al., 2012
<i>Rpv11</i>	Downy mildew	American <i>Vitis</i>	5	Weak	Fischer et al., 2004
<i>Rpv12</i>	Downy mildew	<i>V. amurensis</i>	14	High	Venuti et al., 2013
<i>Rpv13</i>	Downy mildew	<i>V. riparia</i>	12	Weak	Moreira et al., 2011
<i>Rpv14</i>	Downy mildew	<i>V. cinerea</i>	5	-	Ochssner et al., 2016
<i>Run1</i>	Powdery mildew	<i>V. rotundifolia</i>	12	Total	Pauquet et al., 2001
<i>Run 2.1</i>	Powdery mildew	<i>V. rotundifolia</i>	18	Partial	Riaz et al., 2011
<i>Run 2.2</i>	Powdery mildew	<i>V. rotundifolia</i>	18	Partial	Riaz et al., 2011
<i>Ren1</i>	Powdery mildew	<i>V. vinifera</i>	13	Partial	Hoffmann et al., 2008
<i>Ren2</i>	Powdery mildew	<i>V. cinerea</i>	14	Partial	Dalbó et al., 2000
<i>Ren3</i>	Powdery mildew	American <i>Vitis</i>	15	Partial	Welter et al., 2007
<i>Ren4</i>	Powdery mildew	<i>V. romanetii</i>	18	Partial	Riaz et al., 2011
<i>Ren5</i>	Powdery mildew	<i>V. rotundifolia</i>	14	Total	Blanc et al., 2012
<i>Ren6</i>	Powdery mildew	<i>V. piasezkii</i>	9	Total	Pap et al., 2016
<i>Ren7</i>	Powdery mildew	<i>V. piasezkii</i>	19	Partial	Pap et al., 2016
<i>Ren8</i>	Powdery mildew	American <i>Vitis</i>	18	Partial	Zyprian et al., 2016

Los virus son otro factor importante que preocupa a los cultivadores, y están en la base de una parte de la erosión genética, debido a que provocan enfermedades muy difíciles de erradicar. Así, las plantas infectadas suelen eliminarse de los programas de selección clonal y salen de los catálogos de clones y variedades disponibles para la viticultura.

Actualmente el control de enfermedades provocadas por virus o fitoplasmas se centran tanto en medidas profilácticas como en prácticas culturales. Los programas de certificación intentan reducir la incidencia de los virus, buscando reducir las poblaciones de insectos vectores a niveles en los que su población sea inocua para los viñedos. El peligro que tienen los virus se debe a que codifican los mecanismos de defensa natural de las plantas, provocando la encriptación de proteínas del ARN, causando así un silenciamiento genético. Dado que los genes encargados de la respuesta frente a amenazas han sido modificados. En el año 2005 Voinnet y otros autores trabajaron más profundamente en la explicación de los mecanismos de respuesta frente a ataques de microorganismos (Laimer et al., 2009).

Las técnicas de clonación y cribado dan forma al conocimiento del viroma completo, gracias a la información de la secuencia de dicho virus. Con esta información se pueden identificar nuevos virus causantes de enfermedades, de las que aún no hay mucha información disponible. Se detalla las variantes dominantes de las especies de virus y se indican la frecuencia en la que se dan en el material vegetal. La información que aportan los datos podrá ayudar al desarrollo de ensayos de diagnósticos más precisos.

En este artículo los autores hablan del virus de decaimiento de Shyras evaluado con las nuevas técnicas y de otros virus como el provocado por "*Liatris spicata*" en la patata dulce. Estos estudios realizados señalan además la importancia de la gran utilidad de las tecnologías de nueva secuenciación y del enfoque de la metagenómica para identificar virus conocidos y otros nuevos aún desconocidos (Coetzee et al., 2010).

Las pruebas ELISA o la PCR a tiempo real tienen gran precisión en la detección de virus. Pero no siempre son capaces de detectar las variantes del posible virus. Por tanto, se han desarrollado nuevas tecnologías más poderosas, que son aptas para la secuenciación de diversos virus, evitando el paso de la realización de purificaciones de la muestra. Este proceso que alarga la duración de la detección, lo que conlleva mayor carga de trabajo. Además al evitarse este paso se ahorran costes, por lo que se puede utilizar el presupuesto para otras tareas (Coetzee et al., 2010)

El virus del entrenudo corto infeccioso es la mayor enfermedad causada por un virus en el ámbito de la vid. Esta enfermedad se transmite por los insectos de las especies "*Xiphinema index*" y "*Xiphinema italie*" que actúan como vectores de la enfermedad. Este virus provoca malformaciones en las hojas y causa grandes pérdidas económicas al reducir la calidad de la uva. Un ejemplo claro del perjuicio de dicho virus se da en el viñedo francés, donde se estima una pérdida anual de 1,5 billones de dólares (Laimer et al., 2009).

6.2 Origen de la diversidad genética de vid y su manejo histórico

La diversidad es un factor que tiene bastante importancia en las vides silvestres. El flujo de genes puede afectar a las poblaciones, haciendo que esas poblaciones se dirijan a su extinción (Di Vecchi-Staraz et al., 2009). El flujo de genes es un factor que obtuvo mucha importancia en los años 90 y comienzos del 2000. Los riesgos derivados de este flujo se vuelven más peligrosos en aquellas pequeñas poblaciones donde las invasiones de polen procedente de otras especies las hace vulnerables a su decrecimiento (Ellstrand 2003). Según dijo Storer en 1999 y después corroboraron Keller y Waller en el 2002 y más tarde Bailey y McCauley en el 2006, un flujo moderado puede ser beneficioso y puede ayudar al mantenimiento de la variación genética y así restringir la pérdida de variedades autóctonas. También la globalización de las compañías más grandes del sector y la globalización del mercado, al implantar bodegas de su compañía en diferentes países hace que prevalezca el cultivo de variedades como Chardonnay, Cabernet Sauvignon y Syrah, esto provoca erosión genética y suscita la pérdida de variedades autóctonas menos conocidas pero que también pueden tener interés enológico, o servir como reservorio genético para ser utilizado por los investigadores (Di Vecchi-Staraz et al., 2009). Podemos concluir que el flujo de polen está interrelacionado con la distancia existente entre los individuos. Las distancias cercanas favorecen la polinización de la vid, como también se puede observar en otras especies leñosas con polinización anemófila como el pino o el roble (Di Vecchi-Staraz et al., 2009).

La diversidad de haplotipos, que son combinaciones de alelos que provienen de diferentes loci de un cromosoma y son transmitidos conjuntamente, en las viníferas del oeste del Mediterráneo es ligeramente reducida con respecto a las viníferas del este del Mediterráneo. Así se sugiere que la vid experimentó una ligera reducción de diversidad genética en su expansión hacia el oeste del Mediterráneo. Esta reducción es atribuible a la domesticación, pero a escala del genoma estos eventos tienen un efecto mucho más débil en la vid que en otras plantas cultivadas, como el tomate, y probablemente sea mucho más débil que la del maíz, plantas en las que los efectos de la domesticación son más acusados. En el caso de la vid como ya se comentó en otros apartados estos cambios se hicieron notar en los rasgos de la vid domesticada (Myles et al., 2011).

La vid no ha tenido más de 80 generaciones desarrolladas por multiplicación sexual entre parientes silvestres y los cultivares domésticos según Arroyo-García en 2006. Estas posibles afirmaciones pueden explicarse, ya que, en muchos cultivares se tiene el conocimiento suficiente para poder datar su origen miles de años atrás (Barnaud, Laucou, This, Lacombe, & Doligez, 2010).

6.3 Estrategias de conservación

Existen dos tipos de conservación, un método es in situ que en el caso de la vid no se utiliza porque depende de cultivarla en su lugar de origen, y debido a diferentes aspectos no se puede mantener exactamente igual. La protección de los hábitats es una herramienta de conservación in situ, y es lo más efectivo. El segundo método y el más utilizado en vid es el método de conservación ex situ. Las técnicas ex situ son un componente esencial en los programas de conservación y deben de complementarse en estos programas (Conway, 1988; Ashton, 1987). Las técnicas de conservación ex situ se llevan a cabo lejos del hábitat donde se ha originado su desarrollo. Para la conservación ex situ se necesita disponer de una muestra representativa de la especie a conservar. Mediante esta técnica podemos controlar totalmente el material y disponer de él cuando sea preciso, y poder utilizarlo posteriormente en programas de mejora genética o en programas de conocimiento de dicha variedad concreta. Para realizar las técnicas de conservación ex situ se necesitan de dos componentes indispensables. Uno es el almacenamiento de dicho germoplasma y dos las diversas estrategias de propagación. Para poder almacenar el germoplasma adecuadamente se deben utilizar otros elementos también relevantes como la documentación y la caracterización del germoplasma almacenado (Alegria, 2001).

6.3.1 ¿Cuándo, cómo y por qué de los bancos?

La conservación de vid comenzó hace muchos siglos, al principio de la viticultura, cuando se seleccionaron los mejores rasgos de las vides, según los criterios del momento. Estos rasgos, que hacen posible la mejora del cultivo, pueden depender del material disponible en los bancos de germoplasma, como recursos genéticos a utilizar. Este material vegetal, podrá favorecer el desarrollo de mecanismos de defensa, frente a efectos adversos que puedan acontecer, o los que ya existen (Prado Villar & Martínez de Toda Fernández, 2018). Estos centros de conservación proveen a los agricultores germoplasma correctamente identificado, para que, en caso de existencia de problemas, se pueda volver a recolectar dicho germoplasma desde el campo (FAO, 2014). En la conservación de uva, tiene que haber una conservación de especies, tanto domesticadas como las especies salvajes. La conservación de germoplasma de vid necesita de métodos ex situ e in situ, tanto en bancos de germoplasma como, la conservación de tejidos en laboratorio. Con la recolección de germoplasma se garantiza la disponibilidad de material vegetal para multiplicar, y, con ello, generar, más individuos de una misma variedad (Mwamahonje et al., 2020).

La conservación de la variabilidad genética es una herramienta muy importante para asegurar la viticultura durante más años y para que la especie no se extinga, por el cambio climático y otras razones. Gran parte de la diversidad genética se creó de forma natural y fue desarrollándose a lo largo de los siglos. Para las estrategias de conservación, se debe discernir lo que se debe conservar. La conservación debe contener una muestra representativa de diversidad, dentro de las variedades autóctonas. La muestra tiene que contener un tamaño adecuado, de acuerdo con la región. Los mismos autores de este artículo hablan en un artículo de 2012 sobre la existencia de un mínimo de 70 genotipos por cada región. Las variedades debido a la globalización existente ya se cultivan en varias regiones por lo que el tamaño de muestras más utilizado es de 400 o más genotipos. Esta estrategia es utilizada en el

banco portugués de germoplasma PORVID. La conservación la realizan en dos procesos; uno que es la conservación sin otros objetivos inmediatos, y el segundo que es para afianzar esos rasgos importantes, como la resistencia a la sequía. Para el primer método de conservación, se usan macetas únicas por genotipo. El segundo método utiliza la plantación en campo de pruebas. El objetivo de estas pruebas era desarrollar un método de conservación que sirva como guía para futuros procedimientos experimentales (Gonçalves & Martins, 2019).

La biodiversidad y el paisaje son dos rasgos estrechamente ligados, la pérdida de estos dos rasgos en la agricultura tradicional implican la erosión de germoplasma local estimable. La conservación en las fincas de cultivares locales, asegura la continuidad de las interacciones del entorno con el genotipo. A la vez de proteger los recursos genéticos en peligro de extinción, hay que considerar el proceso de determinación del genotipo y predicción del fenotipo, junto a la caracterización de los paisajes relacionados (Brunori et al., 2015).

Los programas de restauración y replantado de variedades usando estrategias de conservación ex situ, tienen que estar distribuidos en tres grupos según el dendrograma de grupos distribuidos por región geográfica. El problema de estas estrategias ex situ, es que las plantas no evolucionan en condiciones naturales en campo. Pero las estrategias in situ, por el contrario, sí que consiguen desarrollarse. Así pues, en estas zonas es mejor utilizar estrategias de mantenimiento del germoplasma en sus hábitats naturales de desarrollo. En este artículo se llegó a la conclusión de que en Oriente Medio, hay mayor diversidad genética que en la cuenca del mediterráneo donde se realizaron los segundos eventos de domesticación de la vid (Doulati-Baneh et al., 2015)

La caracterización del germoplasma autóctono es esencial para prevenir la erosión genética de recursos, tanto como la pérdida de productos enológicos locales fuertemente ligados al territorio. Además el conocimiento de la distribución espacial de la biodiversidad local dentro del territorio puede proveer información a la vez que conocimiento del grado de riesgo de erosión (Brunori et al., 2015).

Los microsatélites o SSR son herramientas utilizadas en la correcta identificación y caracterización de las variedades para mantener los recursos genéticos. Esta herramienta nos permite separar los casos de homonimias y sinonimias y así poder clasificar correctamente el germoplasma; estudiar las relaciones filogenéticas de las variedades y ser posteriormente utilizado (Kui, Tang, Duan, Wang, & Dong, 2020). Estas herramientas pueden ser utilizadas en diagnósticos de virus de los que no hay conocimiento y así se pueden entender un poco más las enfermedades causadas por estos virus (Coetzee et al., 2010). El proceso de detección del genotipo de ADN mediante el uso de marcadores moleculares de microsatélite, es considerado por muchos autores como la mejor herramienta para la identificación y caracterización de los cultivares (Moreno-Sanz et al., 2011).

Las colecciones de plantas están formadas por los jardines botánicos como las colecciones de planta en campo, esta forma es la tradicional en los métodos de conservación ex situ, Ya en la antigüedad se empezaron a formar colecciones de diferentes plantas. Pero no fue hasta que las antiguas potencias coloniales no crearon sus jardines botánicos repartidos por sus colonias. De esta forma países como España trajeron el cacao o el tomate, por ejemplo, a la Península Ibérica. Actualmente hay alrededor de 1.500 jardines botánicos, aunque para la vid, no son los lugares más utilizados. Estos jardines presentan el problema del soporte financiero. En países tropicales, que son grandes refugios de diversas especies, el número de jardines es muy reducido (Alegría, 2001).

Los bancos de germoplasma se dividen en:

- bancos de cultivo in vitro
- bancos de polen
- bancos de genes o bancos de ADN
- bancos de semillas

Sabemos que para la vid los bancos de semillas no se usan, pero son un centro de conservación muy utilizado en otras especies vegetales. Para la conservación de semillas, según decían Maxted y otros autores en 1997, no se necesitan de grandes estructuras; es una alternativa económica en términos de gastos de mantenimiento, y personal necesario. Dado el pequeño tamaño de las semillas, los espacios pequeños, pueden albergar una gran capacidad de semillas con gran diversidad genética. Las semillas cuentan con la propiedad de mantenerse en el tiempo de forma natural y por sí mismas. Pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo (Alegría, 2001).

Las semillas las podemos clasificar como ortodoxas o tolerantes a la desecación, cuando son capaces de ser viables tras perder el 90 o 95% de su contenido en humedad, o como las semillas recalcitrantes que son aquellas que pierden su viabilidad cuando se quedan en el límite de 12 a 30% de humedad. Las semillas ortodoxas se almacenan en los bancos de semillas convencionales a baja temperatura. Las recalcitrantes no pueden almacenarse así. Las encontramos en especies acuáticas o de plantas tropicales (Alegría, 2001).

En ciertas especies surgen problemas de propagación y conservación, lo que hace que los bancos de semillas no sean una solución para su conservación, estas especies son:

- a) Especies con semillas recalcitrantes.
- b) Especies que no producen semilla, o semillas de baja fertilidad, o baja producción de polen.
- c) Clones con alto grado de heterocigosis, seleccionados por sus características en poblaciones naturales.
- d) Especies perennes con largos ciclos de vida, y que hasta cierta edad no hay producción de semillas
- e) Especies con muy pocos individuos en su población, que su recolección provocaría daños en la supervivencia de la población

6.3.2 Los principales bancos de germoplasma europeos

ESPAÑA

En España tenemos el banco de germoplasma en una finca llamada El Encín (www.madrid.org/coleccionvidencin). Este banco tuvo su origen en otro, creado en 1893 por Víctor Cruz Manso de Zúñiga y Enrile en Haro (La Rioja). Se llamaba Estación de Viticultura y Enología de Haro y contaba con trece variedades de origen riojano. En 1914 este banco se trasladó a la comunidad de Madrid, a la localidad de Pinto donde Nicolás García de los Salmones fue director. Tras varias mudanzas, finalmente se estableció en Alcalá de Henares, donde se encuentra actualmente. Esta colección cuenta con 2.726 adhesiones, compuesta por 846 portainjertos; 66 *Vitis* ssp; 1718 variedades de "*Vitis vinifera*"; 23 "*Vitis vinifera sylvestris*" y 71 híbridos productores directos. El número de adhesiones por cada planta no es el mismo en todas las parcelas, aunque lo más común, es que sean 5 individuos por cada variedad. En cuanto a archivos el edificio cuenta con 3.476 fotografías de diferentes partes de la hoja o de los racimos producidos por las variedades a color y 441 a blanco y negro (Cabello et al., 2003).

También se encuentra el banco de germoplasma de IFAPA (Rancho de la Merced) (<https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/web>). Se encuentra en Jerez de la frontera en Cádiz. Se creó en 1980 en lo que era la Granja agrícola creada en 1940. Está dividida en seis parcelas donde las plantas se multiplican a razón de cinco cepas por cada adhesión. El tamaño de la colección es de 2683 entradas de las que 1.376 son adhesiones; 104 portainjertos; 16 ssp; 53 híbridos productores directos; 1.064 nuevas viníferas producidas por cruzamiento y 70 adhesiones sylvestris.

FRANCIA

El CRBVIGNE (INRAE) (www6.montpellier.inrae.fr/vassal). Nació en 2001 como INRA, actualmente se llama INRAE debido a que se fusionó con el IRSTEA. El objetivo es el común de todos los bancos de germoplasma, es decir, luchar contra el cambio climático; aumentar la seguridad de los alimentos; el uso del suelo etc... El INRAE realmente es el instituto de investigación de agricultura y alimentos nacional que cuenta con dieciocho centros distribuidos por toda Francia. El que nos interesa a nosotros es el que se encuentra en Montpellier el CRBVIGNE. Este banco de germoplasma está basado en la Escuela de Montpellier fundada en 1876, pero se creó en 1949. Cuenta con 7.800 adhesiones con material vegetal proveniente de 50 países de los que 2.700 son variedades; 1.100 híbridos interespecíficos 60 especies de la familia vitaceae y 400 portainjertos. Este banco se nutre de viticultores, criaderos y distintas prospecciones por todo el país. Su actividad se desarrolla junto el instituto francés de la viña y el vino. Se eligió esta zona para su establecimiento, debido a que posee suelos arenosos y con algo de arcilla. Esto hizo que no se desarrollara la filoxera y otros nematodos como "*Xiphinema index*".

ITALIA

El CRA-VIT (<https://www.crea.gov.it/en/web/viticultura-e-enologia>) se fundó en 1923 en Conegliano. Cuenta con 3.600 adhesiones de 45 países. Gracias a intercambios de material con otros bancos de germoplasma este repositorio ha ido creciendo hasta su colección actual, siendo uno de los centros de conservación más importantes a nivel mundial. Es una de las colecciones más antiguas existentes y posee 20 especies diferentes del género vitis. La conservación es realizada ex situ con 5 adhesiones por planta, y algunas están conservadas in vitro, en condiciones de desarrollo lento. A la vez la colección está dividida en otras colecciones. La mayor colección del banco se encuentra en Susegana. Hay otra en Spresiano con cultivares menores propios de Italia (Gardiman & Bavaresco, 2015)

ALEMANIA

El VIVC (www.julius-kuehn.de/en/) se creó en 1984 en el instituto de la vid en Geilweilerhof. Posee alrededor de 2.300 cultivares y su objetivo es común al resto de bancos de germoplasma ya descritos. Este banco no posee ningún registro fotográfico de diferentes partes de las hojas o de racimos (Maul et al., 20140).

6.4 Alternativas de conservación

Los bancos de ADN son una alternativa que está comenzándose a utilizar, gracias a los avances en ingeniería genética. Se puede utilizar en especies amenazadas o especies ya extintas si se toman las muestras de especímenes de herbario. Una de sus ventajas es que no se necesita mucho material vegetal para su almacenamiento. Pero por el contrario solo se puede usar en especies o géneros donde su genoma ha sido ampliamente estudiado (Alegría, 2001).

Otros bancos que se pueden utilizar son los bancos de polen y los bancos de yemas vegetativas. Su almacenamiento es a bajas temperaturas con el uso de técnicas de crioconservación, se usan para especies con los dos tipos de semillas y no requiere de mucho espacio de almacenamiento. Estas alternativas tienen la desventaja de que el polen tricelular resulta muy difícil de almacenar. Necesita de una colección en campo complementaria y solo conservan la mitad del genoma. Los bancos de yemas se usan en la conservación de clones de especies frutales y requieren injerto sobre planta que sirva como patrón (Wang et al., 1993).

6.4.1 Cultivo in vitro

La conservación de plantas en campo tiene el inconveniente de que depende mucho de las condiciones climáticas del lugar en donde se va a establecer, y de las enfermedades criptogámicas de la zona. Los bancos de planta en campo necesitan de gran cantidad de superficie para establecer los individuos y realizar investigación sobre sus cualidades potenciales. Esta herramienta es costosa y se necesita de mucho tiempo, debido a que se necesitan realizar tareas de manejo del cultivo, como la aplicación de fungicidas, pesticidas etc... Las técnicas de conservación in vitro han permitido desarrollar distintas estrategias para la conservación de germoplasma. Estas técnicas permiten la eliminación de microorganismos parásitos, por lo que es un buen método para la obtención de plantas libres de virus y enfermedades. Para la conservación se utilizan meristemos de las plantas y se les realizan terapias con calor y quimioterapia para la eliminación de los virus, después se les introduce en tubos con un medio de cultivo determinado y se les almacena con unas condiciones controladas de humedad y temperatura. Cuando se almacenan las plantas de esta forma surge el problema de que las estaquillas adquieren colores amarillentos, este problema se soluciona agregando agentes antioxidantes al medio de cultivo en las primeras fases del desarrollo del meristemo en el que se va a desarrollar dicho explanto (Dal Bosco et al., 2015).

La conservación in vitro ralentiza el ritmo de crecimiento. Para conseguir esta disminución en las tasas de desarrollo naturales se utilizan retardantes como el Alar (B9) o Ácido abscísico (ABA), o las mismas condiciones de baja temperatura, a su vez, provocan estas respuestas en las plantas. Cuando desciende la temperatura se guardan reservas de lípidos en la membrana celular, lo que provoca que la membrana celular espese porque reduce el potencial hídrico de la célula, y con esto frenan la división y la elongación celular. La técnica del cultivo in vitro es utilizada en muchos árboles frutales como técnica de almacenamiento de genotipos. Ha quedado bien establecida, por lo que está claro que es un método fiable para la conservación de frutales. Para disminuir las tasas de crecimiento también se usan agentes osmóticos de "*Drosophyllum lusitanicum*" o "*Podophyllum peltatum*". La conservación de germoplasma in vitro tiene el inconveniente de que está más orientada a corto o a medio plazo, (unos 12 meses como máximo), por lo que haría falta otra serie de técnicas más adecuadas como la criopreservación o crioconservación (Hassanen et al., 2013).

Para el cultivo de vid in vitro se deben seguir unos pasos determinados que son: obtención del explanto; un establecimiento del cultivo. Para ello necesitamos de un medio de cultivo adecuado; almacenamiento bajo unas condiciones determinadas de temperatura y humedad; y una recuperación de un cultivo viable y por último una regeneración de las plantas (Alegría, 2001).

6.4.2 Crioconservación

El prefijo crio viene del griego Kryos que significa frío glacial. Esta técnica consiste en añadir nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ o en vapor de nitrógeno líquido (entre $-165\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$) a los explantos, para así conservarlos a bajas temperaturas. Con esta técnica se mantiene la integridad de los bancos de germoplasma, y se minimizan los riesgos

abióticos y bióticos. Con la crioconservación se usa material vegetal proveniente de plantas cultivadas bajo cultivo in vitro, y debido al frío los procesos metabólicos y de división celular se detienen a su mínima expresión (Bettoni, Kretzschmar, Bonnart, Shepherd, & Volk, 2019). Para la crioconservación se necesitan de una serie de técnicas o protocolos para establecer esta forma de conservación. Todos estos protocolos apuntan a que se necesita deshidratar el material antes de introducirlo en nitrógeno líquido. Los protocolos disponibles son la gota vitrificación; la encapsulación-deshidratación; la vitrificación y la encapsulación vitrificación. En el 2019 Bettoni y otros autores confirmaron que la crioconservación no está totalmente implementada en los bancos de germoplasma.

El agua al congelarse cristaliza, y adquiere una estructura ordenada de sus átomos. Se realiza una vitrificación mediante las llamadas sustancias PVS que inhiben la nucleación del agua y con ello cuando se forma el hielo adquiere una forma desordenada. El resultado es un sólido muy viscoso de forma amorfa. Con esto se ayuda a mantener la viabilidad de las células y de los tejidos. La vitrificación es el pilar fundamental por lo que la crioconservación es uno de los métodos más modernos e idóneos para conservar germoplasma vegetal. Las sustancias PVS más utilizadas son el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), la sacarosa y el etilenglicol. Estas sustancias se desarrollaron por el grupo del profesor Sakai en japon (Marković, Chatelet, Sylvestre, Kontić, & Engelman, 2013).

Matsumoto y Sakai en el 2000 y 2003, establecieron un protocolo de vitrificación, que ha sido aplicado a diez especies o cultivares de vid, con una media de 64% de recuperación de brotes. Miaja en 2004 reportó un protocolo de vitrificación para la conservación de embriones somáticos. Las muestras de Muller-Thurgau y Brachetto se deshidratan con PVS2. En este protocolo las tasas de recuperación fueron del 41 o 79% (Bi et al., 2017). Los protocolos de vitrificación se basan en la utilización de las sustancias vitrificadoras (PVS), de las que ya hablé en la descripción de la crioconservación que evitan que se formen cristales de hielo que puedan poner en riesgo el material a conservar (Bi et al., 2017).

La gota vitrificación es una técnica que consiste en un rápido enfriamiento y calentamiento de las puntas de los brotes. Para sumergir los tejidos en nitrógeno líquido hay que tratarlos adecuadamente antes, puesto que estas temperaturas tan extremas provocarían daños por congelación en las células. Esta técnica ha sido aplicada a muchos cultivares de uva de mesa o de elaboración de vino para comprobar su efectividad, y también con varios portainjertos, y vides silvestres. Para la conservación a largo plazo de recursos genéticos, Engelman en 1997 y otros autores como Wang en 2014 han podido afirmar que las puntas de los brotes tienen mayor de mantener rasgos únicos de materiales propagados que, semillas o embriones somáticos ya que son equivalentes a los de la planta madre (Bi et al., 2017).

Lo que se suele realizar en este protocolo, es transferir los brotes deshidratados a una gota con la solución vitrificadora y una tira de aluminio. Después se introduce en nitrógeno líquido para posteriormente transferirlos a tubos y para almacenarlo en frío durante un periodo de tiempo determinado. Para evaluar la estabilidad genética, en el artículo citado se usaron nueve RAPD primers y 15 primers ISSR y se pudo concluir que el protocolo desarrollado es válido para mantener la estabilidad genética puesto que en los análisis no se detectaron ningunas bandas polimórficas. El protocolo se aplicó en diferentes genotipos para evaluar las tasas de regeneración. En la **tabla 3** podemos observar los ocho genotipos de vid evaluados. Este protocolo tuvo éxito en seis genotipos de "*Vitis vinifera*" y dos de "*Vitis pseudoreticulata*", con el 50% de media de brotes regenerados (Bi, Hao, Cui, Volk, & Wang, 2018).

Tabla 3: Aplicación del protocolo de gota-vitrificación en ocho genotipos diferentes de vitis (Bi et al., 2018).

Species and genotypes	Major use or valuable traits	Regrowth level (%)
<i>V. vinifera</i>		
Cabemet Sauvignon	Wine grape	72.0 ± 3.7
Cabemet Gemischt	Wine grape	66.7 ± 3.3
Chardonnay	Wine grape	46.7 ± 4.9
Globe Red	Table grape	58.3 ± 3.1
Kyoho	Table grape	45.0 ± 5.6
LN33	Rootstock	50.0 ± 3.7
<i>V. pseudoreticulata</i>		
Baihe 35-1	Resistant to grapevine powdery mildew	24.3 ± 4.3
Hunan-1		41.7 ± 3.1
Average		50.6

La encapsulación-deshidratación es una técnica que consiste en encapsular los explantos de vid en perlas de alginato de calcio con un medio rico en sacarosa. Estas se han deshidratado osmóticamente en gel de sílice o, en algunos artículos revisados, se deshidratan mediante un flujo de aire laminar, donde el contenido de agua se reduce a un 20% aproximadamente. Una vez encapsuladas y después de haber sido sumergidas en soluciones vitrificantes, se introducen en nitrógeno líquido. Los primeros protocolos de encapsulación fueron descritos y evaluados por Wang y otros autores en el 2000, donde cada perla contenía un brote de una punta y contaba cada una con distintas concentraciones de sacarosa, de 0,25; 0,5; 0,75 y 1 M. En este artículo se ha evaluado la idoneidad del protocolo desarrollado por Wang para el portainjerto LN33 híbrido (1613 Couderc y "*Vitis vinifera Thompson*" sin semillas). En el 2002 Wang repitió su protocolo con la variedad Red Globe. Otros investigadores como Miaja en el 2004 obtuvieron tasas de 52,6 y 58,1 % para la variedad Brachetto y Muller-Thurgau con el protocolo desarrollado por Wang (Bi et al., 2017).

La encapsulación-vitrificación es un protocolo muy similar al de encapsulación deshidratación. Solo que no se utiliza la sacarosa, sino una solución crioprotectora. Es una técnica poco utilizada y con la ventaja de que el desarrollo del protocolo es más rápido. Con el uso de nitrógeno líquido para la conservación de tejidos ha surgido un método para eliminar virus, la crioterapia. Esta técnica consiste en exponer a nitrógeno líquido el material infectado, previo pretratamiento. Con esto lo que ocurre es que las células infectadas por el virus o diferentes patógenos, se eliminan y permiten que se generen nuevas células meristemáticas, para crear plantas sanas.

7.CONCLUSIÓN

La vid es una especie muy diversa que actualmente está amenazada por múltiples causas y en la que cada día desaparecen variedades, clones e individuos cuya importancia puede ser vital. Esto genera un gran problema puesto que este germoplasma puede servir para utilizarse en el futuro. Desde hace unos años ya se está trabajando en la búsqueda de herramientas y técnicas que nos permitan conservar esos rasgos útiles. Existe la necesidad imperiosa de evaluar correctamente y más profundamente el germoplasma existente actual para conservar correctamente el germoplasma. El acervo genético está en peligro constante de desaparición, cada día que pasa puede suponer la pérdida de rasgos genéticos potencialmente útiles. Es por ello por lo que se debe realizar un trabajo conjunto entre las instituciones gubernamentales, los investigadores además de los viticultores y las empresas del sector vitivinícola para paliar estos problemas que nos acontecen. La mejora de los ecosistemas representa una tarea primordial para la agricultura moderna.

El uso de la conservación es importante porque hay que afrontar los efectos del cambio climático. Estos efectos son evidentes desde hace años, no solo para la elaboración de vino, sino también para la conservación del fruto que produce la vid que son las uvas ya sean frescas o fruta pasificada. Esta última es muy utilizada en países con religión musulmana. La conservación de vid es importante puesto que el vino ha sido una bebida fundamental en la socialización, como ya se ha percibido a lo largo de las diversas civilizaciones que se han sucedido a lo largo de la historia del ser humano.

Para realizar una estrategia de conservación correcta, es imprescindible documentar el material genético existente, y las poblaciones remanentes de vid silvestre. Estas poblaciones de vid silvestre merece la pena recopilarlas y estudiarlas con el fin de i) documentar el origen de las variedades sativas y ii) estudiar la presencia de genes de interés, potencialmente interesantes para la utilización en programas de mejora.

Dentro de la conservación es importante discernir lo que se debe conservar: para ello es importante el análisis de los distintos clorotipos existentes. Por ejemplo, si tomamos germoplasma de diferentes zonas pensando que es diverso, y cuando lo analizamos vemos que son los mismos, habríamos realizado una mala conservación. Al igual que el uso de otras técnicas de caracterización e identificación tales como, RAPDS, FLPs, NGS etc...

Existen diferentes estrategias de conservación para los cultivos. En el caso de la vid no existen bancos de conservación "in situ", más bien se suelen utilizar los bancos de planta en campo. Durante las últimas décadas se han desarrollado una serie de técnicas alternativas a la utilización de bancos de planta en campo, o bancos de conservación de tejidos. Estas alternativas son la utilización de cultivo in vitro, con la micropropagación de tejidos y otra alternativa es la crioconservación. En cuanto a la crioconservación hay una serie de protocolos desarrollados como ya se ha descrito en previos apartados, algunos con mayores tasas de recuperación que otros. Pese a tener protocolos utilizados, la crioconservación solo ha resultado efectiva en una serie determinada de especies, siendo un factor limitante para toda la diversidad de especies y variedades existentes. Por lo que todavía queda trabajo por realizar con esta técnica, en el desarrollo de nuevos protocolos, que nos sirvan para especies que aún no hayan sido estudiadas.

Como ya se ha visto la vid es un taxón que está amenazado en Europa, especialmente en los países en los que la protección legal es escasa, los países que mayor riesgo poseen son: España, Italia y Portugal. Por lo que en estos países es más necesario el establecimiento de una normativa de protección y el refuerzo de los lugares destinados a la conservación de vid.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alegría, J. M. I. (2001). *Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión)*. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 16(1), 10–11.

Arroyo-García, R., Ruiz-García, L., Bolling, L., Ocete, R., López, M. A., Arnold, C., ... Martínez-Zapater, J. M. (2006). *Multiple origins of cultivated grapevine (Vitis vinifera L. ssp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms*. *Molecular Ecology*, 15(12), 3707–3714.

Balda, P., Ibáñez, J., Sancha, J. C., & De Toda, F. M. (2014). *Characterization and identification of minority red grape varieties recovered in Rioja, Spain*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(1), 148–152.

- Barnaud, A., Laucou, V., This, P., Lacombe, T., & Doligez, A. (2010). Linkage disequilibrium in wild French grapevine, *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris*. *Heredity*, 104(5), 431–437.
- Bettoni, J. C., Kretzschmar, A. A., Bonnart, R., Shepherd, A., & Volk, G. M. (2019). Cryopreservation of 12 *Vitis* species using apical shoot tips derived from plants grown in vitro. *HortScience*, 54(6), 976–981.
- Bi, W. L., Hao, X. Y., Cui, Z. H., Volk, G. M., & Wang, Q. C. (2018). Droplet-vitrification cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(6), 590–599.
- Bi, W. L., Pan, C., Hao, X. Y., Cui, Z. H., Kher, M. M., Marković, Z., ... Teixeira da Silva, J. A. (2017). Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.)—a review. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 53(5), 449–460.
- Biasi, R., & Brunori, E. (2015). The on-farm conservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) landraces assures the habitat diversity in the viticultural agro-ecosystem. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 54(June), 265–269.
- Brunori, E., Cirigliano, P., & Biasi, R. (2015). Sustainable use of genetic resources: The characterization of an Italian local grapevine variety ('Grechetto rosso') and its own landscape. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 54(January), 261–264.
- Cabello, F., Rodríguez-Torres, I., Muñoz-Organero, G., Rubio, C., Benito, A., & García-Beneytez, S. (2003). La Colección de variedades de vid "El Encín."
- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., & Burger, J. T. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400(2), 157–163.
- Cunha, J., Ibáñez, J., Teixeira-Santos, M., Brazão, J., Fevereiro, P., Martínez-Zapater, J. M., & Eiras-Dias, J. E. (2020). Genetic Relationships Among Portuguese Cultivated and Wild *Vitis vinifera* L. Germplasm. *Frontiers in Plant Science*, 11(March), 1–14.
- Dal Bosco, D., Sinski, I., Comachio, V., Maia, J. D. G., Ritschel, P. S., & Quecini, V. (2015). In vitro techniques for grapevine germplasm conservation. *Acta Horticulturae*, 1082, 201–206.
- Di Vecchi-Staraz, M., Laucou, V., Bruno, G., Lacombe, T., Gerber, S., Bourse, T., ... This, P. (2009). Low level of pollen-mediated gene flow from cultivated to wild grapevine: Consequences for the evolution of the endangered subspecies *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris*. *Journal of Heredity*, 100(1), 66–75.
- Doulati-Baneh, H., Mohammadi, S. A., Labra, M., De Mattia, F., Bruni, I., Mezzasalma, V., & Abdollahi, R. (2015). Genetic characterization of some wild grape populations (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*) of Zagros mountains (Iran) to identify a conservation strategy. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 13(1), 27–35.
- Gardiman, M., & Bavaresco, L. (2015). The *Vitis* germplasm repository at the CRA-VIT, Conegliano (Italy): Conservation, characterization and valorisation of grapevine genetic resources. *Acta Horticulturae*, 1082(April 2015), 239–244.
- Gonçalves, E., & Martins, A. (2019). Methods for conservation of intra-varietal genetic variability in ancient grapevine varieties. *BIO Web of Conferences*, 15, 01029.
- Hassanen, S. A., Abido, A. I. A., Aly, M. A. M., & Rayan, G. A. (2013). In vitro Preservation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria and Black Monukka

Cultivars as Genetic Resource. African Journal of Basic & Applied Sciences, 5(2), 55–63.

Jiménez, G., & Ocete, C. (2017). *La vid silvestre. Un importante recurso fitogenético sin protección legal en España. Revista Iberoamericana de Viticultura, Agroindustria y Ruralidad*, 4(12), 46–69.

Kui, L., Tang, M., Duan, S., Wang, S., & Dong, X. (2020). *Identification of Selective Sweeps in the Domesticated Table and Wine Grape (Vitis vinifera L.)*. *Frontiers in Plant Science*, 11(May), 1–11.

Laimer, M., Lemaire, O., Herrbach, E., Goldschmidt, V., Minafra, A., Bianco, P., & Wetzl, T. (2009). *Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: A review. Journal of Plant Pathology*, 91(1), 7–23.

Marković, Z., Chatelet, P., Sylvestre, I., Kontić, J. K., & Engelmann, F. (2013). *Cryopreservation of grapevine (Vitis vinifera L.) in vitro shoot tips. Central European Journal of Biology*, 8(10), 993–1000.

Maul, E., Sudharma, K. N., Ganesh, A., Hundemer, M., Walk, M., vom Weg, S., ... Schreiber, T. (2014). *30 Years VIVC - Vitis International Variety Catalogue (www.vivc.de). XI International Conference on Grapevine Breeding and Genetics*, 8.

Merdinoglu, D., Schneider, C., Prado, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., & Mestre, P. (2018). *Breeding for durable resistance to downy and powdery mildew in grapevine. Oeno One*, 52(3), 189–195.

Moreno-Sanz, P., Loureiro, M. D., & Suárez, B. (2011). *Microsatellite characterization of grapevine (Vitis vinifera L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain). Scientia Horticulturae*, 129(3), 433–440.

Mwamahonje, A., Maseta, Z., Mlalila, F., & Feyissa, T. (2020). *Application of genomic and genetic engineering tools for improvement of grapevines. Journal of Animal and Plant Sciences*, 30(5), 1058–1070.

Myles, S., Boyko, A. R., Owens, C. L., Brown, P. J., Grassi, F., Aradhya, M. K., Buckler, E. S. (2011). *Genetic structure and domestication history of the grape. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), 3530–3535.

OIV (International Organisation of Vine and Wine). (2017). *Distribution of the world's grapevine varieties. Focus OIV2017*.

Pagnoux, C., Bouby, L., Valamoti, S. M., Bonhomme, V., Ivorra, S., Gkatzogia, E., Terral, J. F. (2021). *Local domestication or diffusion? Insights into viticulture in Greece from Neolithic to Archaic times, using geometric morphometric analyses of archaeological grape seeds. Journal of Archaeological Science*, 125(May 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jas.2020.105263>

Peiró, R., Soler, J. X., Crespo, A., Jiménez, C., Cabello, F., & Gisbert, C. (2018). *Genetic variability assessment in 'Muscat' grapevines including 'Muscat of Alexandria' clones from selection programs. Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(2), 0–15.

Prado Villar, E., & Martínez de Toda Fernández, F. (2018). *Distribución territorial, caracterización paisajística y peligros y amenazas a los que está expuesta la única población de vid salvaje (Vitis vinifera L.) del Valle del Najerilla (La Rioja). Zubía*, (30), 161–186.

Sancho-Galán, P., Amores-Arrocha, A., Palacios, V., & Jiménez-Cantizano, A. (2020).

Identification and characterization of white grape varieties autochthonous of a warm climate region (Andalusia, Spain). Agronomy, 10(2).

Santos, J. A., Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., Dinis, L. T., Correia, C., ... Schultz, H. R. (2020). A review of the potential climate change impacts and adaptation options for European viticulture. Applied Sciences (Switzerland),

van Houten, S., Muñoz, C., Bree, L., Bergamín, D., Sola, C., & Lijavetzky, D. (2020). Natural genetic variation for grapevine phenology as a tool for climate change adaptation. Applied Sciences (Switzerland), 10(16).