

DETERMINACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

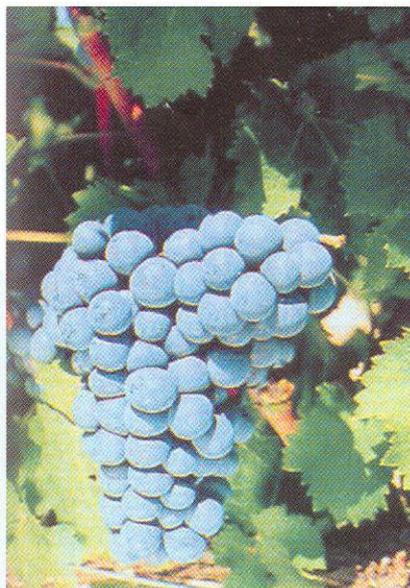
OPTIMIZACIÓN DE LA PUREZA VARIETAL DE LOS VIÑEDOS BASADA EN ANÁLISIS GENÉTICO

Claudio Narváez H.
Bioquímico

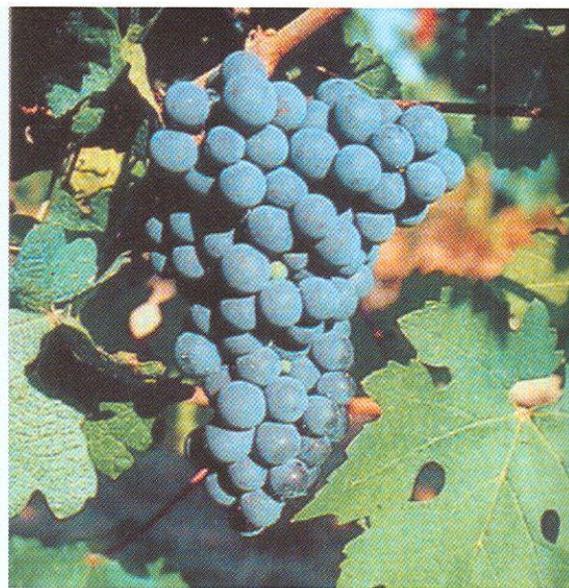
Patricio Hinrichsen R.
Bioquímico, Dr.
phinrich@platina.inia.cl
INIA La Platina

En los últimos años, en diversos países viticultores se ha constatado que existe un cierto grado de confusión en la identidad de las cepas plantadas, encontrándose dos o más cepas presentes en un mismo cuartel. Este hecho, sugerido por métodos ampelográficos, ha sido confirmado con métodos moleculares. En el valle de Casablanca se realizó una prospección genética en cepas blancas y tintas, encontrándose cuarteles correctamente indexados, mientras que otros presentaban hasta tres cultivares diferentes confundidos bajo una misma denominación. Esta información es de gran utilidad para que los viticultores establezcan un proceso de homogeneización de sus cuarteles, a partir de viveros de plantas certificadas genéticamente.

En la viticultura mundial se ha hecho evidente que existe un problema relacionado a la identidad de los cepajes plantados, lo que se traduce en cuarteles completos mal identificados, o heterogeneidad genética dentro de un determinado cuartel. En diversas ocasiones se ha sugerido que en Chile este problema tiene particular relevancia (P. Pczolkowski, comunicación personal), y aunque se desconoce la causa, podría deberse en parte al origen y forma de multiplicación de las plantas usadas para establecer cada viña. En este sentido, son numero-



Cabernet Franc.

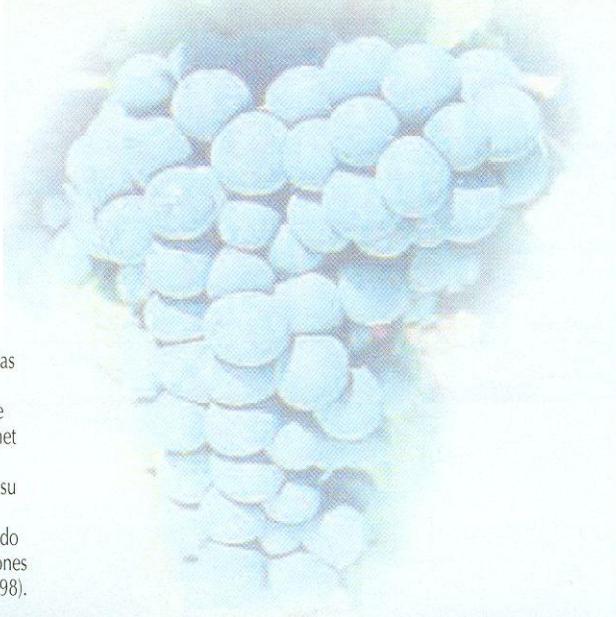


Cabernet Sauvignon.

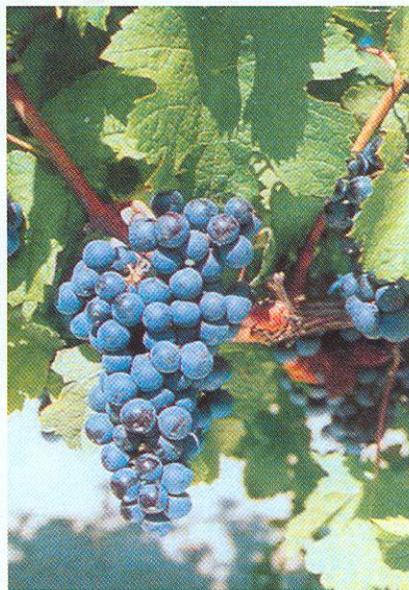
sos los predios que se aprovisionan de plantas multiplicadas en sus propios viveros, existiendo una carencia de un servicio de certificación (oficial) que garantice la identidad genética de las cepas. Por otra parte, desde un punto de vista enológico, históricamente se ha considerado más relevante el producto final que la homogeneidad de las plantas o la exacta identificación del cultivar que originó el vino. Sin embargo, este panorama ha cambiado y actualmente es deseable disponer de cuarteles homogéneos con plantas genéticamente identificadas, aún hasta el nivel de la uniformidad clonal. Las causas que generan esta situación van más allá de las ciencias y artes enológicas: se enmarcan en el fenómeno del mercadeo, el concepto de calidad total, la oferta de productos certificados en toda la cadena producti-

va, etc., todos aspectos de alta consideración en el mundo actual. La identificación de cultivares se ha efectuado tradicionalmente mediante técnicas ampelográficas, las que en la actualidad son complementadas con técnicas moleculares dirigidas al análisis del ADN de la planta. La más usada de estas técnicas es el análisis de los "marcadores de microsatélites" (o SSR), que son secuencias de ADN que presentan una gran variabilidad alélica, lo que resulta de mucha utilidad para discriminar cultivares de vid, demostrando tener una alta capacidad diagnóstica. Los SSR se analizan mediante una reacción bioquímica denominada PCR, a través de la cual se pueden identificar una o dos bandas de ADN que son separadas por electroforesis y que corresponden a los alelos de un determinado locus genético.

Aspectos del racimo y hojas de las cuatro cepas de vino tinto más comúnmente cultivadas en Chile (de izquierda a derecha): Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Carménère y Merlot. Se destaca su gran similitud morfológica, que dificulta su diferenciación (tomado de "Catalogue des variétés et clones de vigne cultivés en France", 1998).



Carménère.



Merlot.

Una forma de eliminar confusiones

La aplicación más importante de los SSR en vides ha sido la identificación de genotipos, incluyendo cultivares de vid de mesa, cepas de vinificación y portainjertos. Además, se han podido identificar los progenitores de varios de los cultivares de

mayor relevancia en la enología actual, pero de origen ancestral desconocido. Por ejemplo, Cabernet Franc y Sauvignon Blanc serían los progenitores de Cabernet Sauvignon, el cultivar más plantado en el mundo, mientras que Pinot Noir y Gouais serían los ancestros directos de más de 15 cultivares

tradicionales de Francia, entre ellos Chardonnay y Gamay. También basado en el uso de SSR, se han detectado numerosos casos de homonimia (diferentes genotipos con el mismo nombre) y de sinonimia (materiales supuestamente diferentes que corresponden a la misma cepa). Un caso reciente se describió en California, donde plantas consideradas Petit Syrah, correspondían realmente a Durif y Peloursin. Esta situación se debe en la mayoría de los casos a una alta similitud morfológica (apariencia casi idéntica) entre cepas. Tal es el caso de los cultivares Cabernet Franc, Merlot y Carménère, particularmente importante en Chile, donde recientemente se ha comprobado por medio de estos marcadores de SSR que existe un porcentaje importante de Carménère que estaba confundido por Merlot. Los alcances de este descubrimiento puede alcanzar niveles insospechados, pues muchos opinan que Carménère se transformará en el producto distintivo de los vinos nacionales.

Situación del valle de Casablanca

Trabajos realizados en INIA La Platina han demostrado que el uso de cuatro marcadores de SSR de alto valor predictivo permiten diferenciar todas las cepas de vino más comúnmente usadas en el país. En estos trabajos, se han usado dichos marcadores (denominados VVMD-5, VVMD-6, VVMD-7 y VVMD-28) para estimar la "situación genética" de los viñedos del valle de Casablanca, dentro del proyecto FDI 98 C3-AT-01, siendo el primer ejemplo en Chile de "prospección genética molecular" de un valle

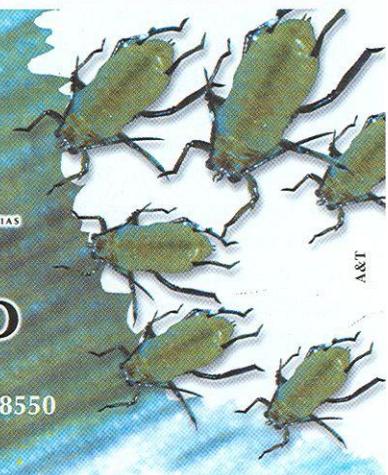
¡Qué no se lo Coma la Competencia!

Revista Tierra Adentro
7.200 suscriptores
28.000 contactos de negocio



Publique en

INIA INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
T **TIERRA ADENTRO**
Ventas y Publicidad
Tel. 223 8664 - Fax. 223 8550
Santiago - Chile.



dedicado a la viticultura. Además, dado que se trata de un valle joven en esta actividad (no más de 12 años), resulta de gran valor disponer de la información que permitirá confirmar la identidad de los genotipos, así como diseñar un proceso de replantación en aquellos casos donde se identifique un problema significativo de errores en la identificación de las cepas plantadas.

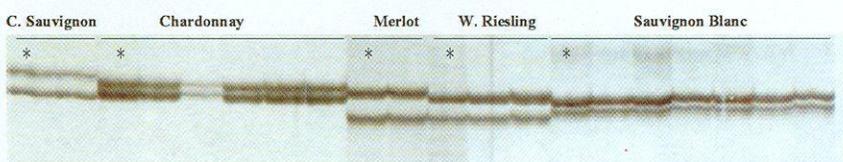
Para la selección de las plantas analizadas, se consideraron dos criterios: primero, se analizaron plantas que morfológicamente correspondieran a lo que se consideraba que estaba plantado ("true-to-type"); segundo, se analizaron plantas que escapaban al tipo ampelográfico de una determinada variedad. En algunos casos se analizaron diferentes clones de una determinada variedad. En total se analizaron cerca de 220 plantas, provenientes de ocho viñedos. Para todas las cepas se contó con patrones de referencia o estándares de ADN provenientes de repositorios de Francia (Burdeos o Montpellier) o de EE.UU. (Foundation Plant Materials Service, FPMS, Davis, California).

Un ejemplo de separación electroforética de los alelos (bandas de DNA) se muestra en la figura 1, donde se han analizado plantas individuales de cinco cultivares, usando el marcador VVMD-5. Se aprecia la alta capacidad discriminativa entre un cultivar (cv.) y otro que tienen estos marcadores. En el cuadro 1 se presenta un resumen de los resultados del análisis de identidad ordenado de acuerdo a los cultivares analizados, mientras que el cuadro 2 entrega los resultados ordenados de acuerdo a las viñas analizadas (los nombres reales han sido reemplazados por siglas).

Casos críticos

Como se deduce de estos resultados, en casi todos los cultivares y viñedos estudiados, tanto de cepas blancas como tintas, hay algún grado de error de identificación, o de mezcla de genotipos que no corresponden a lo que se supone está plantado. Esta situación es crítica para el cv. Merlot, donde un 66% de los genotipos estudiados están confundidos con Carménère, especialmente en la viña AA. Por el contrario, los cuarteles de Carménère mostraron una mínima confusión, aunque

Figura 1. Separación electroforética de los alelos del locus VVMD-5 de plantas de vid de viñas del valle de Casablanca. El tamaño de los alelos (fragmentos de ADN, expresado en pares de bases) determinado para cada cultivar es de 242/232 (Cabernet Sauvignon), 240/232 (Chardonnay), 236/226 (Merlot), 234/226 (White Riesling) y 232/228 (Sauvignon Blanc). La primera muestra de cada cultivar es un genotipo auténtico(*), es decir, una planta certificada por un centro repositorio internacional (patrones de referencia de EE UU y Francia). Las otras muestras corresponden a las colectadas en el campo.



GLOSARIO

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico; es la molécula que guarda la información genética hereditaria en su mayor parte en el núcleo de las células. También se conoce por su sigla en inglés: DNA.
- **Ampelografía:** es el estudio para realizar la caracterización e identificación de las cepas o cultivares de vid sobre la base de una serie de características morfológicas, destacando la forma de las hojas. Existen numerosos tratados sobre este tema, muy desarrollado en centros europeos de larga tradición, como INRA–Montpellier. Sus resultados se complementan bien con los datos moleculares.
- **Cepa:** un sinónimo de cultivar que —en plantas— se usa particularmente para denominar distintas vides de vinificación, tales como Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay, etc.
- **Cultivar (cv.):** aparte de su significado corriente, en agronomía también se refiere a una variedad mejorada creada por el hombre y que ha sido registrada. Pese a este sentido específico, suele utilizarse como sinónimos las palabras cultivar y variedad; por ejemplo, duraznero cv. Elegant Lady, o variedad de trigo Huañil INIA.
- **Electroforesis:** método fisicoquímico que consiste en aplicar un campo eléctrico en una matriz porosa (un gel) que permite mover moléculas biológicas, tales como proteínas o fragmentos de ADN, separándolas de acuerdo a su tamaño.
- **Genotipo:** la combinación de alelos que presenta un cv. o cepa determinada, común a todos los individuos multiplicados clonalmente.
- **Indexar:** clasificar especímenes de acuerdo a un catálogo; en este caso también se entiende como la identificación que se le asigna a una parra o grupo de ellas, supuestamente idénticas.
- **Índice de exclusión:** valor matemático que representa la capacidad de un método (en este caso, de los marcadores de microsatélites) para diferenciar o identificar distintos genotipos (cepas o cv.).
- **Locus genético:** en términos generales, es un punto o segmento específico ubicable físicamente en el genoma o cromosoma de una especie.
- **Marcadores de microsatélites:** fragmentos de ADN distribuidos en distintas partes de los cromosomas de una especie que tienen la particularidad de ser más variables que el resto del genoma por presentar repeticiones cortas repetidas; para usarlos como marcadores genéticos, se recurre al PCR (reacción bioquímica) que reconoce secuencias laterales de las secuencias repetidas.
- **Mutación somaclonal:** cada modificación genética espontánea que puede surgir en una especie de multiplicación vegetativa (como la vid), tanto durante su manipulación en cultivo in vitro como en manejo convencional de campo.
- **Prospección genética:** análisis de la diversidad genética en una determinada población, para lo cual se analizan individualmente plantas que representen toda la población.
- **Uniformidad clonal:** se refiere a que los clones plantados en una viña o multiplicados en un vivero tengan una completa homogeneidad genética.
- **Variabilidad alélica:** son las distintas formas que se conocen para un locus genético específico. En una cepa determinada, no debiera haber más que una combinación de alelos en cada locus, ya sea homocigoto o heterocigoto para ese locus.

su análisis ha sido menos extendido. Otro caso donde también parece haber una situación particular es en el cv. Sauvignon Blanc, de cuyas plantas analizadas casi el 50% no coincidió con ninguna cepa fina conocida. Sin embargo, en este caso podría tratarse de clones que provienen de semillas o selecciones locales chilenas, algunos de larga data en el país, puesto que hubo una cierta coincidencia alélica en varios marcadores de SSR con la referencia auténtica de este cultivar. Otra explicación es que estas diferencias genéticas correspondan a mutaciones somaclonales de la misma variedad, lo que de hecho ha originado numerosas líneas en viticultura.

Un caso similar se detectó entre las 52 plantas analizadas del cv. Chardonnay, de las cuales un 31% no coincidió con los patrones moleculares estándares de la cepa. La gran mayoría de estas "muestras atípicas" encontradas en los cuarteles de Chardonnay difirieron en

Cuadro 1

Cepas de *V. vinifera* caracterizadas en el valle de Casablanca y su estado de pureza varietal

Cepa plantada	Total de plantas analizadas (N°)	Plantas mal identificadas N° (%)	Otros genotipos identificados (*)
Chardonnay	52	16 31	ND
Sauvignon blanc	21	10 48	ND
Semillon	5	- -	
Riesling	5	- -	
Gewürztraminer	11	3 27	Carménère (2), ND (1)
Viognier	5	- -	
Merlot	73	48 66	Carménère (43), Cabernet Franc (2), Cabernet Sauvignon (2)
Carménère	7	1 14	Merlot
Pinot Noir	21	3 14	Cabernet Franc
Cabernet Sauvignon	8	1 12	ND
Syrah	5	- -	
Mourvedre	5	1 20	Pinot Noir
Total	218	83 38	

*ND: el patrón genético no coincide con cepas conocidas. Entre paréntesis se indica el número de plantas encontradas

ambos alelos de cada marcador respecto del patrón conocido para el cultivar, lo que indicaría que no están genéticamente relacionados (al menos, no en relación filial directa). Aún no es posible determinar a qué cultivar corresponden estas muestras "atípicas", ya que no coinciden

con ningún patrón de las 20 variedades de vinificación más usadas en Chile.

Respecto de las viñas, es evidente que algunas presentan un adecuado nivel de control de sus plantas en campo, como las viñas BB, CC y EE, con sólo una o dos plantas equivocadas. Sin embargo, las otras cinco viñas consideradas presentan problemas de diversa consideración, aunque debe consignarse que, en la mayoría de los casos, se trata de la confusión de Carménère, plantado como Merlot. Esta situación llega hasta el extremo de lo observado en la viña AA, donde tanto Merlot como Chardonnay y Sauvignon Blanc alcanzan hasta un 80% de plantas de identidad desconocida o equivocada (cuadro 2).

Los resultados del estudio podrían ser de utilidad para el manejo futuro de estos viñedos, considerando una planificación apropiada de los sistemas de multiplicación de plántulas al nivel de viveros y estableciendo material vegetal genéticamente certificado. ♦

Cuadro 2

Catastro de la pureza genética de las cepas plantadas en algunas viñas del valle de Casablanca

Viña	Plantas analizadas (N°)	Identificación incorrecta (% de plantas)	Comentarios
AA	75	80	Cepas tintas y blancas mal identificadas; requeriría urgente enmienda
BB	31	6	Porcentaje de mezcla "aceptable"
CC	29	3	Ídem; sólo una planta mal identificada
DD	26	15	Requiere ampliar el muestreo aleatorio
EE	13	8	Aceptable; sólo una planta mal identificada
FF	16	25	No corresponden a plantas de Merlot; parecen tener distintos orígenes
GG	13	54	Un ejemplo de la confusión entre Merlot y Carménère que existe en Chile
HH	15	27	Plantas de Cabernet Franc confundidas por Pinot Noir

Cada siembra...

...Tiene su Cosecha

Publique en

INIA INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

TIERRA ADENTRO

Ventas y Publicidad
Tel. 223 8664 - Fax. 223 8550
Santiago - Chile.

Revista Tierra Adentro
7.200 suscriptores
28.000 contactos de negocio