

# Técnicas moleculares para la identificación varietal y clonal de la vid

La identificación y certificación genética de variedades y clones se traduce en un mejor control de la producción y, por lo tanto, en un incremento de su calidad

Cada variedad de vid es, como un individuo humano, una combinación genética única e irrepetible

*José Miguel Martínez Zapater, Rosa Arroyo-García,  
José Antonio Cabezas y María Teresa Cervera.*  
Departamento de Mejora Genética y Biotecnología del  
INIA y Departamento de Genética Molecular de Plantas.  
Centro Nacional de Biotecnología. CSIC.



Detalle de hoja de vid.  
Consejería de Agricultura.



Clones de garracha tinta seleccionados en el CIDA. / Ch. Diez

La identificación del material vegetal es una cuestión de creciente importancia en la moderna producción agraria. Por un lado, las inversiones necesarias para el desarrollo de nuevas variedades impulsan a los obtentores a disponer de métodos que permitan controlar la comercialización de las variedades que han desarrollado. Por otro, el coste de la planta para el agricultor y sus exigencias de calidad hacen que sea importante asegurar que la planta, o la semilla adquirida, corresponde efectivamente a la variedad deseada. Finalmente, resulta de interés tipificar genéticamente las variedades tradicionales tanto para responder a las necesidades de estandarización del mercado como para decidir sobre la diversidad genética que es necesario conservar en los bancos de germoplasma.

### Identificación varietal en vid

Tradicionalmente, la identificación de las variedades de vid se basa en la evaluación de una serie de caracteres morfológicos descritos por la O.I.V. Sin embargo, esta descripción es necesariamente lenta dado que requiere el seguimiento de estos caracteres a lo largo del desarrollo de la planta, así como una gran experiencia por parte del ampelógrafo que los describe. Otros métodos, basados en el uso de diferencias varietales en la composición de proteínas o en la secuencia del ADN, la molécula que contiene toda la información genética del organismo, se han demostrado más repetibles, rápidos y eficaces. Estos métodos sólo requieren una pequeña muestra de hoja o de leño para el análisis y no precisan de un conocimiento profundo de la vid por parte de la persona que los realiza. En los últimos años, prácticamente todos los

métodos desarrollados para identificar variaciones en la secuencia del ADN han probado su eficacia en la identificación de variedades de vid, desde los ya en desuso RFLPs (polimorfismos para la longitud de los fragmentos de restricción) y RAPDs (polimorfismos en el ADN amplificado al azar) a los actuales SSRs (repeticiones de secuencias simples o microsátélites) y AFLPs (polimorfismos para la longitud de los fragmentos de amplificación). La utilización de uno u otro método dependerá del origen genético de las muestras que se requiera identificar.

Las variedades de vid, como las de otras especies leñosas, se multiplican mediante reproducción vegetativa a través del injerto de yemas en los portainjertos más adecuados. Esta práctica mantiene el alto grado de heterocigosidad que presenta cada variedad e impide la pérdida de vigor que ocasionaría la autofecundación y el establecimiento de líneas puras. En este sentido, podríamos decir que cada variedad de vid es, como un individuo humano, una combinación genética única e irrepetible. La mejora genética de las

variedades de vid es radicalmente distinta dependiendo de que se trate de variedades de uva de mesa o de vinificación. En el caso de la uva de mesa, como en otros frutales, la mejora genética y el desarrollo de nuevas variedades se basa en los cruzamientos entre líneas de mejora y/o variedades ya existentes y en la selección de plantas con caracteres de interés en la siguiente generación filial o F1. Estas plantas seleccionadas constituyen las nuevas variedades que se multiplican vegetativamente.

En el caso de la uva de vinificación, la mayor parte de las variedades cultivadas se mantienen desde hace siglos mediante reproducción vegetativa, siendo su constitución genética la que en parte confiere la tipicidad de los vinos de cada región. Por este motivo, no se contempla como alternativa de mejora la hibridación entre variedades, dado que se perderían las características típicas de cada variedad. La única variación genética disponible para la mejora de las variedades de uva de vinificación son las diferencias genéticas que van acumulando, a lo largo del tiempo, las distintas cepas de la misma variedad como consecuencia de la mutación somática. Estas diferencias son las que trata de explotar la selección clonal cuando confieren una ventaja en las características productivas o de calidad de la variedad. Además, la selección clonal permite reducir o eliminar la carga de virus que se acumula con las sucesivas multiplicaciones vegetativas. Uno de los



Vinedo de tempranillo. / Ch. Diez

problemas de la selección clonal es que los clones seleccionados que difieren en sus características productivas, generalmente no pueden ser diferenciados entre ellos ni morfológica ni genéticamente. Esto significa que la inversión realizada en la selección clonal no se ve recompensada por la posibilidad de proteger la propiedad del material y puede perderse simplemente por un cambio de etiqueta. Por tanto, la situación es muy diferente si necesitamos identificar variedades de vid, se trate de uva de mesa o de uva de vinificación, que si nuestro objetivo es distinguir clones derivados de una misma variedad.

### Identificación varietal mediante microsatélites

Existe un consenso internacional, todavía no reconocido por la O.I.V., de que los marcadores denominados microsatélites o SSR son los de mayor versatilidad y fiabilidad para la identificación de varie-

dades de vid. Los microsatélites son regiones de la secuencia de ADN que presentan repeticiones simples de 2, 3 ó 4 nucleótidos como por ejemplo GAGA-GAGAGA o CATCATCAT. El número de repeticiones de cada una de estas secuencias simples puede variar en distintos individuos de una especie y es un carácter heredable. Por otra parte, el número de repeticiones es fácilmente detectable mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dado que afecta al tamaño del fragmento de ADN amplificado. En el genoma de cada especie existen múltiples sitios o loci genéticos con distintos tipos de repeticiones y cada locus puede presentar numerosas variantes o alelos, de los que cada individuo diploide es portador de dos. La enorme variación que presentan algunos de estos loci permite distinguir prácticamente todas las variedades de vid de manera eficaz. En la Figura 1 se muestran varios ejemplos de análisis de las variedades de

vid aprobadas en la D.O.Ca. Rioja con distintos microsatélites. Cada uno de los microsatélites amplificados permite distinguir todas las variedades de vid analizadas a excepción de Garnacha y Garnacha Blanca que al ser clones de la misma variedad muestran la amplificación de fragmentos idénticos.

Para cada microsatélite, cada individuo contiene dos alelos que pueden ser iguales (se obtiene una sola banda y el individuo se denomina homocigoto para ese locus) o distintos (se obtienen dos bandas y el individuo se denomina heterocigoto). La posibilidad de poder distinguir individuos homocigotos y heterocigotos confiere a estos marcadores una gran utilidad en estudios de parentesco. De hecho gracias a los microsatélites se ha podido determinar el origen genético de algunas variedades de vinificación, como Cabernet Sauvignon o Chardonnay (Bowers y Meredith, 1997; Bowers et al., 1999). La gran reproducibilidad de estos

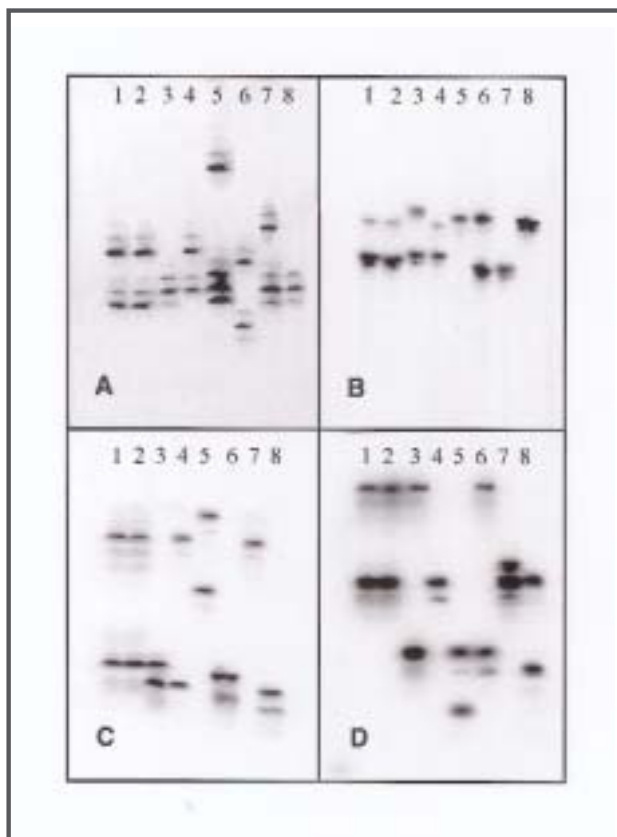


Figura 1

#### Identificación de variedades de vid de la D.O.Ca Rioja mediante el uso de microsatélites.

Cada panel representa el análisis con un microsatélite distinto: A. VVS2 B. VVS4 C. 6E10 D. 2G7. Las variedades analizadas son las siguientes: Garnacha (1), Garnacha Blanca (2), Viura (3), Mazuelo (4), Portainjertos 110 de Richter (5), Malvasia (6), Graciano (7), Tempranillo (8). Cada muestra presenta una o dos bandas principales, siendo las sombras artefactos típicos del proceso de amplificación de microsatélites.

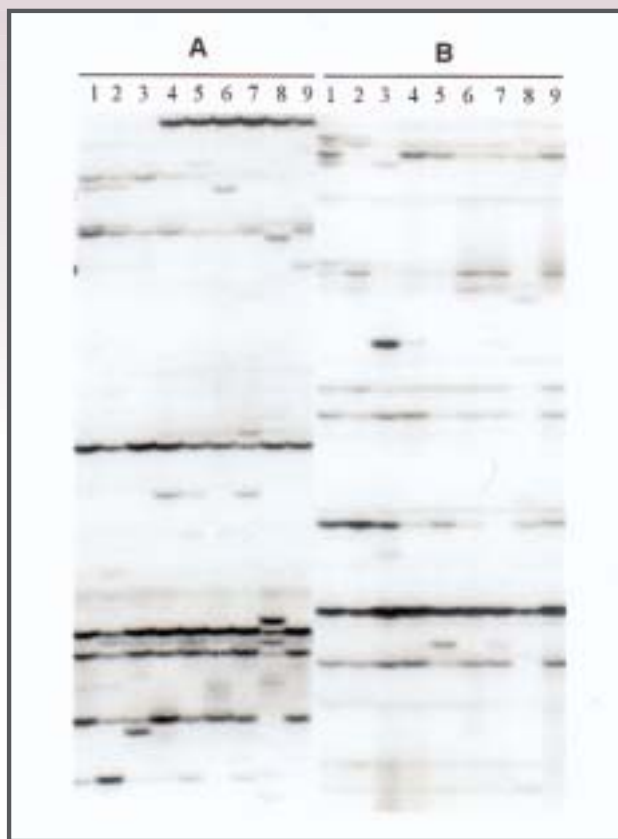


Figura 2

**Identificación de variedades y de clones de vid de la D.O.Ca Rioja mediante el uso de AFLPs.**

Detalle de los patrones de bandas obtenidos en dos reacciones distintas de AFLP (A y B). Las variedades analizadas son las siguientes: Garnacha (1), Garnacha Blanca (2), Graciano (3), Tempranillo (4), Malvasia (5), Mazuelo (6) y Viura (7), junto con el portainjertos 110 de Richter (8) y una muestra de vid silvestre (9). Obsérvese que pueden detectarse diferencias en el patrón de bandas que presentan Garnacha (1) y Garnacha Blanca (2).

marcadores entre distintos laboratorios ha permitido, por otra parte, el desarrollo de estudios complementarios en distintos países y la elaboración de bases de datos que contienen los genotipos de un gran número de variedades de vid para estos loci.

Los microsatélites son también útiles marcadores para la elaboración de mapas genéticos. El mayor inconveniente es que su desarrollo como marcadores requiere un laborioso proceso de identificación de las secuencias, clonación, secuenciación y puesta a punto de las con-

diciones de reacción. Por ello, se ha creado un consorcio internacional para el desarrollo de nuevos microsatélites de vid en el que, por parte española, participa nuestro grupo de investigación. Este consorcio ha desarrollado hasta el momento más de 300 nuevos microsatélites para el género *Vitis*.

**Identificación clonal mediante AFLPs**

Cuando se trata de identificar clones pertenecientes a una misma variedad el problema es más complejo, dado que,

como hemos visto para los microsatélites en el caso de las Garnachas, la mayor parte de los métodos moleculares no tienen la suficiente resolución para asegurar su identificación (Bowers et al., 1993, Botta et al., 1995). En estos casos, se requieren técnicas que permitan analizar de forma rápida cientos o miles de sitios (loci) en la secuencia de ADN del genoma de la especie e identificar aquellos cambios que como consecuencia de la mutación somática hayan podido acumularse durante la divergencia de clones de la misma variedad.

Los marcadores AFLPs identifican cambios en la secuencia nucleotídica del genoma de un individuo o variedad en virtud de la amplificación específica de grupos de fragmentos de restricción del ADN que se producen como consecuencia de su digestión con enzimas de restricción (Vos et al., 1995). Cada reacción de AFLP permite analizar alrededor de 100 loci. Los polimorfismos para la pre-



El mazuelo es una de las variedades identificadas mediante el uso de microsatélites.

Ch. Díez





Parcela experimental de clones de graciano. CIDA / Ch. Díez

sencia o ausencia de las bandas de amplificación generan para cada variedad un código de barras o huella genética que la identifican con absoluta certeza (Cervera et al., 1998). Además, el uso de reacciones adicionales permite identificar suficiente variación entre distintas muestras de la misma variedad como para plantear la posibilidad de que una vez confirmado el origen y la estabilidad de esta variación genética, pueda ser utilizada para diferenciar selecciones clonales derivadas de una misma variedad. La Figura 2 muestra un ejemplo de los perfiles de AFLPs obtenidos para las variedades de la D.O.Ca. Rioja, en los que se pueden apreciar diferencias entre variedades como Garnacha y Garnacha Blanca que tienen un origen clonal y que sólo se distinguen por el color de las uvas.

La complejidad de la detección de los AFLPs no permite pensar que puedan ser utilizados rutinariamente en la identificación varietal como los microsatélites. Sin embargo, los AFLPs pueden servir para identificar cambios en la secuencia de ADN que permitan diferenciar clones de la misma variedad y por tanto el desarrollo de marcadores específicos de clon. Estos marcadores serían muy útiles para la distinción de los clones así como para su protección y certificación.

En conclusión, la utilización de técnicas de identificación de cambios en la secuencia del ADN, tales como los microsatélites o los AFLPs, permite identificar y distinguir rápidamente todas las variedades de vid. En el caso de las variedades de la D.O.Ca Rioja, una sola reacción de microsatélites es suficiente para distinguir todas ellas. Además, los AFLPs pueden resultar muy útiles en la identificación de clones. En última instancia la identificación y certificación genética de variedades y clones se traducirá necesariamente en un mejor control de la producción y por lo tanto en un incremento de su calidad.

### Agradecimientos

Este trabajo ilustra algunos de los resultados de la caracterización de colecciones españolas de variedades de vid mediante AFLP y microsatélites realizada en colaboración con los siguientes investigadores y grupos de investigación: Juan Carlos Sancha y Fernando Martínez de Toda de la Universidad de La Rioja (Logroño, La Rioja), Teodoro Vicente, Juana Martínez y Teresa Martínez del CIDA (La Rioja), Félix Cabello de la Sección de Viticultura y Enología, IMIA (Alcalá de Henares, Madrid). Nuestra investigación en vid está financiada por el proyecto 07B/0010/1997 de la Comunidad Autónoma de Madrid y por el Proyecto PETRI 0282-CT.

### BIBLIOGRAFÍA

- BOTTA, R, N.S. SCOTT, I. EYNARD, Y M.R. THOMAS. 1995. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. *Vitis* 2: 99-102
- BOWERS, J.E., E.B. BANDMAN, Y C.P. MEREDITH. 1993. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:266-274
- BOWERS J.E., Y C.P. MEREDITH. 1997. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genetics* 16:84-7
- BOWERS J, J.M. BOURSICQUOT, P. THIS P, K. CHU K, H. JOHANSSON H, Y C. P. MEREDITH. 1999. Historical Genetics: The Parentage of Chardonnay, Gamay, and Other Wine Grapes of Northeastern France. *Science* 285:1562-1565
- CERVERA, M.-T., J.A. CABEZAS, J.C. SANCHA, F. MARTÍNEZ DE TODA, Y J.M. MARTÍNEZ-ZAPATER. 1998a. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.* 97:51-59
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRUTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER, Y M. ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.