

Caracterización de variedades y portainjertos de vid (*Vitis vinifera* L.) mediante isoenzimas de las raíces

H.A. Altube, F. Cabello y J.M. Ortiz

RESUMEN

Se eligieron 21 cultivares de *Vitis vinifera* L. y tres portainjertos para la caracterización bioquímica basada en la separación electroforética de las isoenzimas de extractos de raíz. Los sistemas isoenzimáticos estudiados fueron: fosfatasa ácida (ACPH); esterasas (EST); catecol oxidasas (CO); glutamato oxalacetato transaminasas (GOT); malato dehidrogenasas (MDH) y peroxidasas (PER). La separación de los extractos de raíz se llevó a cabo en gel de poliacrilamida con posterior tinción específica para los distintos sistemas enzimáticos. ACPH, CO, EST y MDH fueron los sistemas más adecuados para la caracterización. Se presentan los resultados de los diferentes sistemas y la agrupación de cultivares. Se recomienda el uso de técnicas isoenzimáticas en los estudios que se lleven a cabo para la caracterización del género *Vitis*.

Palabras Clave: ampelografía, quimiotaxonomía, variedades de vid, portainjertos, raíz, análisis, enzimas, proteínas.

H.A. Altube, F. Cabello y J.M. Ortiz, 1992. Characterization of Grape (*Vitis vinifera* L.) Varieties and root stocks by isoenzymes from root parts. Agriscientia IX Nº 2 : 21-29.

SUMMARY

Twenty-one cultivars of *Vitis vinifera* L. and three rootstocks were chosen to study their biochemical characterization on the basis of the electrophoretic separation of isoenzyme systems obtained from root tissue extracts. Acid phosphatases (ACPH), esterases (EST), catechol oxidases (CO), glutamate oxalacetate transaminases (GOT), malate dehydrogenases (MDH) and peroxidases (PER) were separated using polyacrilamide gels and later stained using stains specific to the various isoenzymes systems. ACPH, CO, EST and MDH were found to be the most adequate systems for characterization. The

results of the study of the different systems and the grouping of the cultivars are presented. The use of isoenzymatic techniques for the characterization of *Vitis* genotypes is suggested.

Key words: ampelography, chemotaxonomy, variety of vine, rootstock, root, analysis, enzyme, protein.

H.A. Altube, *Cátedra de Fruticultura. Dep. Producción Vegetal. Fac. Cs. Agropecuarias. U.N.C. CC 509. 5000 Córdoba (R.A.). F. Cabello, J.M. Ortiz. Departamento de Biología Vegetal. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid, España.*

INTRODUCCION

La caracterización de cultivares y portainjertos del género *Vitis* se basa esencialmente en la descripción de sus órganos vegetativos. Sach (1611) emplea el término Ampelografía (Ampelos = vid; graphé= descripción). Desde el siglo XVIII hasta la fecha se han propuesto más de cien métodos de caracterización en vid, lo que demuestra que la taxonomía de esta especie presenta problemas particulares. Los principales sistemas de caracterización en vid pueden ser agrupados en: a) caracterizaciones basadas en caracteres morfológicos y b) caracterizaciones basadas en caracteres bioquímicos. Las caracterizaciones morfológicas presentan dificultades por la falta de uniformidad en la elección de los caracteres estudiados, la variabilidad de los mismos debido al clima, suelo (Dettweiler, 1987), edad de la planta y la vaguedad en las definiciones adoptadas. Con el fin de facilitar y sistematizar las descripciones se han publicado varios descriptores de variedades, siendo los más conocidos el de la Oficina Internacional de la Vid y del Vino (O.I.V. 1983) y el de la Oficina Internacional para los Recursos Genéticos de las Plantas (I.B.P.G.R. 1983) dependiente de la FAO.

Las caracterizaciones bioquímicas son de aplicación más reciente y cada vez más aportan datos complementarios a las caracterizaciones morfológicas. Los principales compuestos utilizados con fines taxonómicos son: proteínas, isoenzimas, aminoácidos, flavonoides, etc; siendo las proteínas e isoenzimas las que por el momento presentan mayores posibilidades.

La aplicación de diferentes técnicas electroforéticas ha permitido caracterizar variedades de vid a partir de extractos de sarmientos (Plakida y Dokuchaeva, 1983; Subden *et al.*, 1987; Bachmann, 1989; Altube *et al.*, 1991), de hojas (Dal Belin Peruffo *et al.*, 1981; Rajasekaran y Mullins, 1983; Benin *et al.*, 1985, 1988, Arulsekhar y Parfitt,

1986; Walters *et al.*, 1989), de bayas maduras (Drawert y Muller, 1973; Wolfe 1976; Nakamura *et al.*, 1981), o de polen (Samaan y Wallace 1981; Stavrakakis y Loukas, 1983, 1985; Cargnello *et al.*, 1988; Ahmedullah y Wolfe, 1981).

Todos los órganos de la planta pueden ser utilizados como fuente de isoenzimas, presentando cada uno sus ventajas e inconvenientes. La raíz, es uno de los órganos al cual se ha prestado poca atención, a pesar de presentar posibilidades (Schaefer, 1982; Mato *et al.*, 1988; Angelakis y Klieber, 1983).

El objetivo del presente trabajo es determinar si la electroforesis en gel de acrilamida de extractos de raíces provee suficiente información para identificar las variedades y portainjertos de vid, completándose el estudio con un análisis multi-variante de los resultados que nos permite establecer relaciones entre los tipos estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal escogido para el presente trabajo proviene de la colección de vides del Departamento de Producción Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid.

Se seleccionaron tres portainjertos y veintiuna variedades de mesa y vinificación con algunos de sus clones (Tabla 1).

Métodos analíticos

Se estudiaron las isoenzimas fosfatasa ácidas (ACPH) (E.C.3.1.3.2); esterasas (EST) (E.C. 3.1.16), catecol oxidasas (CO) (E.C. 1.10.3.1); glutamato oxalacetato transaminasas (GOT)

(E.C.3.1.3.2); malato dehidrogenasas (MDH) (E.C.1.1.1.37) y peroxidasas (PER) (E.C.1.11.1.7).

Las raíces se obtuvieron de estacas forzadas en invernadero.

Los extractos se realizaron homogeneizando 1g. de tejido vegetal con 5 ml de tampón de extracción Tris-citrato pH 8 (Arulsekar y Parfitt, 1986) y 0,30 g de PVPP durante 90s en un homogeneizador Polyttron (Kinemática). La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida de tres capas (gel de mues-

tra 4%; gel de separación 6,3% y gel de resolución 10% de acrilamida), para todas las isoenzimas estudiadas, excepto para MDH, en la que se utilizó un gel de dos capas (siendo la de resolución del 12% de acrilamida). Se colocaron en cada pocillo entre 80 y 100 µl de extracto crudo.

La electroforesis se realizó a 4° C y a una intensidad de 2 mA por pocillo durante la primera media hora para continuar luego a 3 mA por pocillo. Se utilizó un tampón de electrodos de pH 8,6

Tabla 1. Relación de cultivares, clones y portainjertos incluidos en el estudio.

OTU	Nombre común	Tipo	N.de referencia en Banco de Germoplasma	Vivero de procedencia
Cultivares de mesa				
1	Alfonso Lavallée	T	A-M-2-1	1
2	Cardinal	T	A-M-4-1	1
3	Emperador	T	A-M-5-1	1
4	Italia	B	A-M-7-1	1
5	Moscatel de Alejandría	B	A-M-8-1	1
6	Moscatel de Hamburgo	T	A-M-9-1	1
7	Perlette	B	A-M-10-1	1
8	Red Málaga	T	A-M-16-1	4
9	Rosetti	T	A-M-14-1	1
10	Ruby Seedless	B	A-M-15-1	1
11	Thompson Seedless	B	B-M-21-1	2
Cultivares de vinificación				
12	Alicante Bouschet	T	E-V-1-1	4
13	Cabernet Sauvignon	T	A-V-4-1	1
14	Cabernet Sauvignon	T	B-V-4-1	2
15	Carinena	T	A-V-3-1	1
16	Garnacha	T	E-V-9-3	4
17	Garnacha	T	E-V-9-4	4
18	Garnacha	T	A-V-9-1	1
19	Malvasia	B	B-V-12-1	2
20	Palomino	B	D-V-17-1	3
21	Parellada	B	B-V-18-1	2
22	Pedro Ximenez	B	A-V-19-1	1
23	Ruby Cabernet	T	B-V-20-1	2
24	Tempranillo	T	A-V-26-1	1
Portainjertos				
25	110R *		B-P-1-1	2
26	Rupestris du Lot **		A-P-7-1	1
27	41B ***		A-P-3-1	1

OTU = unidades taxonómicas operacionales; T = tintas; B = blancas.

Viveros: 1 = Agrar S.A.; 2 = Agro 2000; 3 = La Cartuja (Sevilla); 4 = Selecciones de *Vitis* Jerez.

* Híbrido Berlandieri-Rupestris. ** *Vitis rupestris*. *** Híbrido Berlandieri-Riparia

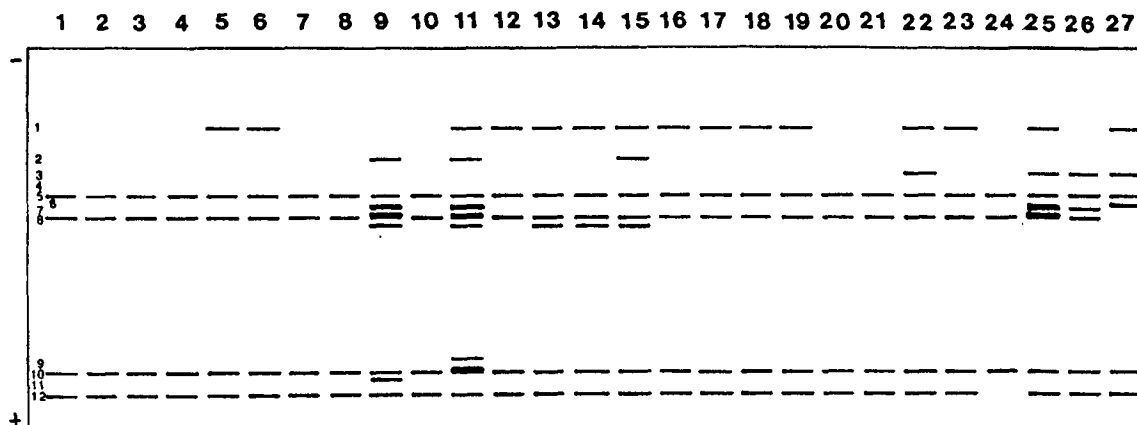


Figura 1

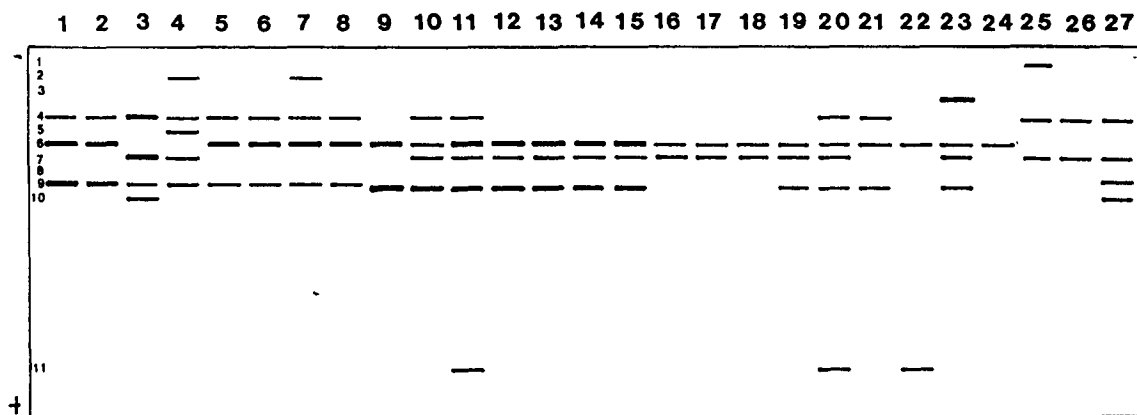


Figura 2

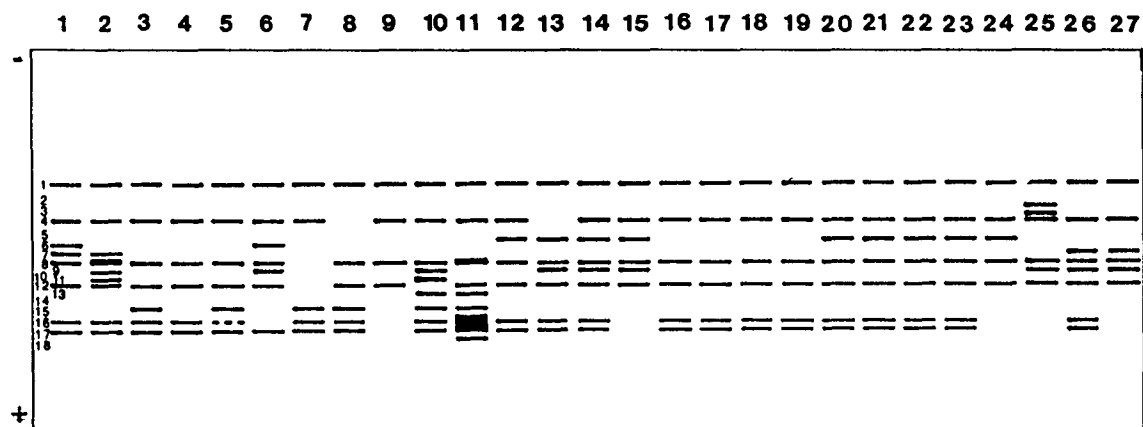


Figura 3

Fig. 1. Esquema del zimograma de ACPH de los diferentes cultivares y portainjertos de *Vitis*. Números de la fila superior: cultivares y portainjertos, como en Tabla 1 y números verticales: banda isoenzimática.

Fig. 2. Esquema del zimograma de CO de los diferentes cultivares y portainjertos de *Vitis*. Números de la fila superior: cultivares y portainjertos, como en Tabla 1 y números verticales: banda isoenzimática.

Fig. 3. Esquema del zimograma de EST de los diferentes cultivares y portainjertos de *Vitis*. Números de la fila superior: cultivares y portainjertos, como en Tabla 1 y números verticales: banda isoenzimática.

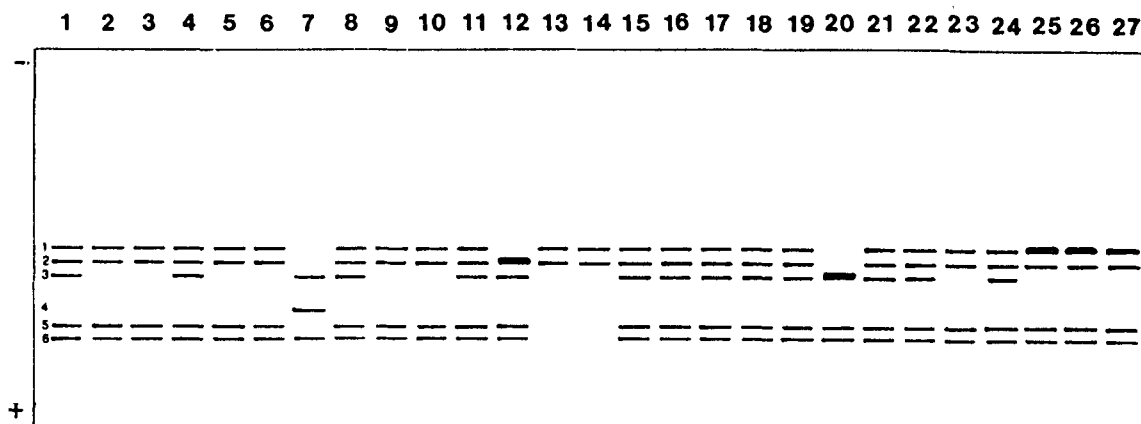


Figura 4

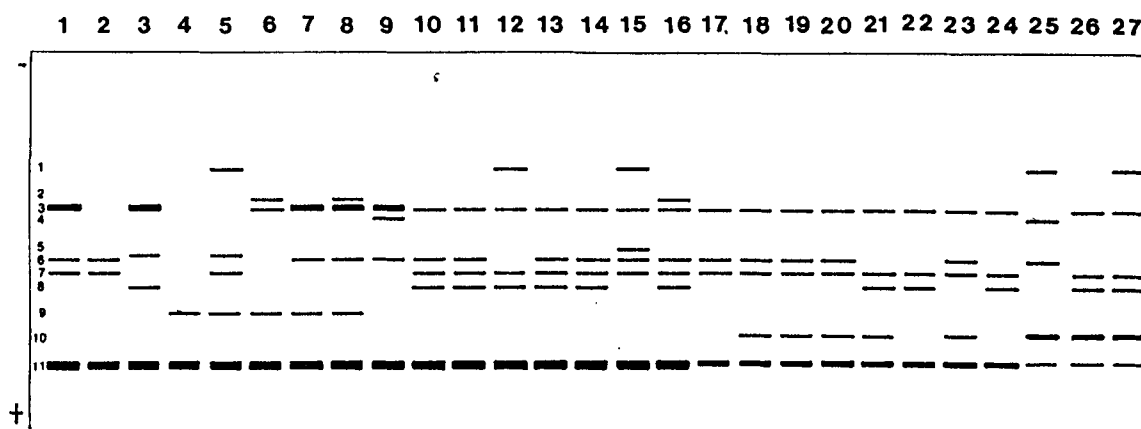


Figura 5

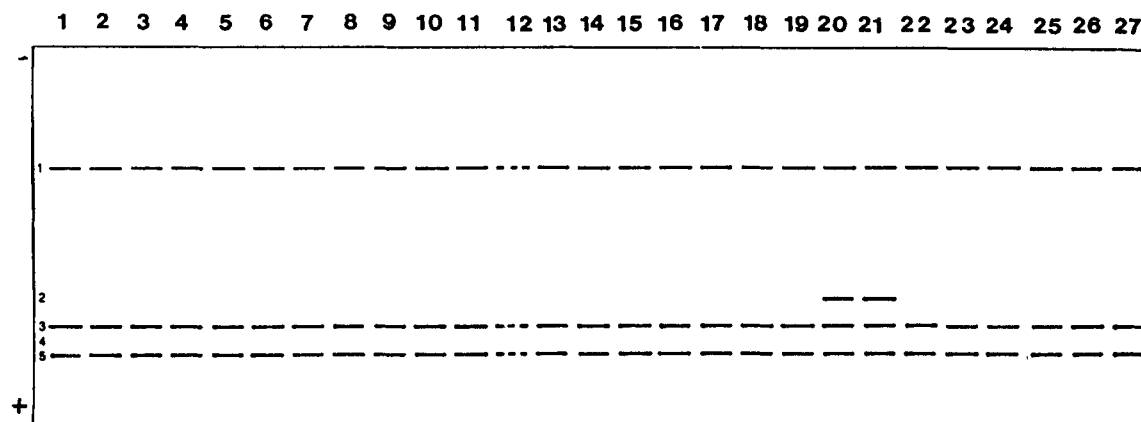


Figura 6

Fig. 4. Esquema del zimograma de GOT de los diferentes cultivares y portainjertos de *Vitis*. Números de la fila superior: cultivares y portainjertos, como en Tabla 1 y números verticales: banda isoenzimática.

Fig. 5. Esquema del zimograma de MDH de los diferentes cultivares y portainjertos de *Vitis*. Números de la fila superior: cultivares y portainjertos, como en Tabla 1 y números verticales: banda isoenzimática.

Fig. 6. Esquema del zimograma de PER de los diferentes cultivares y portainjertos de *Vitis*. Números de la fila superior: cultivares y portainjertos, como en Tabla 1 y números verticales: banda isoenzimática.

(Tris 6 g, glicocola 28,8 g completándose a 2 l con agua destilada)

Para la tinción de los geles se siguieron las propuestas por Brewer y Singh (1971); salvo para fosfatasas ácidas que se utilizó la propuesta por Schwenneisen *et al.*, (1982).

Una vez obtenidos los zimogramas se procedió a la elaboración de los esquemas correspondientes. Se aplicó un análisis estadístico de los datos mediante el programa "Numerical Taxonomy System" (NTSYS) en un ordenador personal (IBM-P52).

RESULTADOS Y DISCUSION

En los esquemas de zimogramas de las ACPH (Fig 1), se observa una zona superior de actividad enzimática con las banda 1 a 8, con mayores posibilidades para distinguir los cultivares. La presencia de algunas bandas es muy constante (5,7,10 y 12). La zona inferior presenta en casi todos los cultivares las bandas 10 y 12, sólo "Rosetti" (9) presenta la banda 11 y "Thompson Seedless" (11) la banda 9.

Las variedades "Alfonso Lavallée" (1), "Cardinal" (2), "Emperador" (3), "Italia" (4), "Perlette" (7), "Red Málaga" (8), "Palomino" (20) y "Parellada" (21), presentan el mismo modelo enzimático. Un segundo modelo se observa en las variedades "Moscatel de Alejandría" (5), "Moscatel de Hamburgo" (6), "Alicante Bouschet" (12), "Garnacha" (16,17,18), "Malvasía" (19) y "Ruby Cabernet" (23). No es posible distinguir los clones de "Cabernet Sauvignon" (13-14) ni de "Garnacha" (16,17,18). Los portainjertos por su parte presentan un perfil diferente para cada uno de ellos, como algunas bandas comunes en todos los casos. El presente sistema enzimático permite caracterizar algunas variedades y portainjertos por lo cual cumple con nuestro objetivo.

En las CO (Fig. 2) el número de bandas para cada variedad es bajo, pero hay grandes diferencias entre ellas, es decir, diversos perfiles. Los clones de "Cabernet Sauvignon" (13, 14) y "Garnacha" (16,17,18) no presentan diferencias interclonales. También presentan perfiles iguales "Alfonso Lavallée" (1), "Cardinal" (2), "Moscatel de Alejandría" (5), "Moscatel de Hamburgo" (6) y "Red Málaga" (8); "Alicante Bouchet" (12), "Cabernet Sauvignon" (13,14) y "Cariñena" (15). Los portainjertos presentan distintos perfiles para cada uno de ellos.

Los esquemas de los zimogramas de las EST (Fig. 3), se caracterizan por el alto número de ban-

das que, aunque dificultan el análisis comparativo de los perfiles obtenidos, proporcionan mucha información. Algunas bandas se presentan en la mayoría de las cultivares y portainjertos, tal es el caso de las bandas 1, 4, 8, 12, 16 y 17. Por el contrario otras se presentan sólo raramente, como ocurre con las bandas 2 y 3 que sólo aparecen en los portainjertos "110R" (25); la banda 6 sólo en "Alfonso Lavallée" (1); la banda 7 en "Alfonso Lavallée" (1) y "Cardinal" (2) y la banda 18 sólo en "Thompson Seedless" (11). Se presentan algunos modelos que reagrupan algunas variedades, tal es el caso: "Garnacha" (16,17,18), "Malvasía" (19) e "Italia" (4); otro con las variedades "Palomino" (20), "Parellada" (21), "Pedro Ximenez" (22) y "Ruby Cabernet" (23). Se presentan diferencias entre los clones de "Cabernet Sauvignon" (13,14); se diferencian los tres portainjertos 110R (25), "Rupestris du Lot" (26) y 41B (27). Esto hace que el este sistema enzimático presente interés para la caracterización.

Los esquemas de los zimogramas de GOT (Fig. 4), presentan dos zonas de actividad, una superior con las bandas 1 a 3 y otra inferior con las bandas 4 a 6. La banda 4 sólo aparece en "Perlette" (7). Se presentan dos modelos fundamentales que agrupan a la mayoría de los cultivares: el primer modelo con las bandas 1, 2, 3, 5 y 6 en "Alfonso Lavallée" (1), "Italia" (4), "Red Málaga" (8), "Thompson Seedless" (11), "Cariñena" (15), "Garnacha" (16,17,18), "Malvasía" (19), "Parellada" (21), "Pedro Ximenez" (22). El segundo modelo formado por las bandas 1,2, 5 y 6 incluye "Cardinal" (2), "Emperador" (3), "Moscatel de Alejandría" (5), "Moscatel de Hamburgo" (6), "Rosetti" (9), "Ruby Seedless" (10), "Ruby Cabernet" (23) y los portainjertos 110R (25), "Rupestris du Lot" (26) y 41B (27). Esta isoenzima presenta pocos modelos y por lo tanto menor importancia con fines de caracterización.

Las MDH (Fig. 5), presentan un elevado número de bandas. Las bandas 3,6,7,11 se encuentran en la mayoría de los cultivares y por el contrario la banda 4 sólo aparece en "Rosetti" (9) y en el portainjertos 110R (25) y la banda 5 sólo se encuentra en "Cariñena" (15). Se presentan algunos modelos que reagrupan cultivares: "Ruby Seedless" (10), "Thompson Seedless" (11) y "Cabernet Sauvignon" (13,14), y otro con los cultivares "Garnacha" (16,17), "Malvasía" (19), "Palomino" (20) y "Ruby Cabernet" (23). Se presenta un buen número de modelos con pocas bandas cada uno lo que facilita la interpretación de los resultados siendo muy interesantes a los fines de la carac-

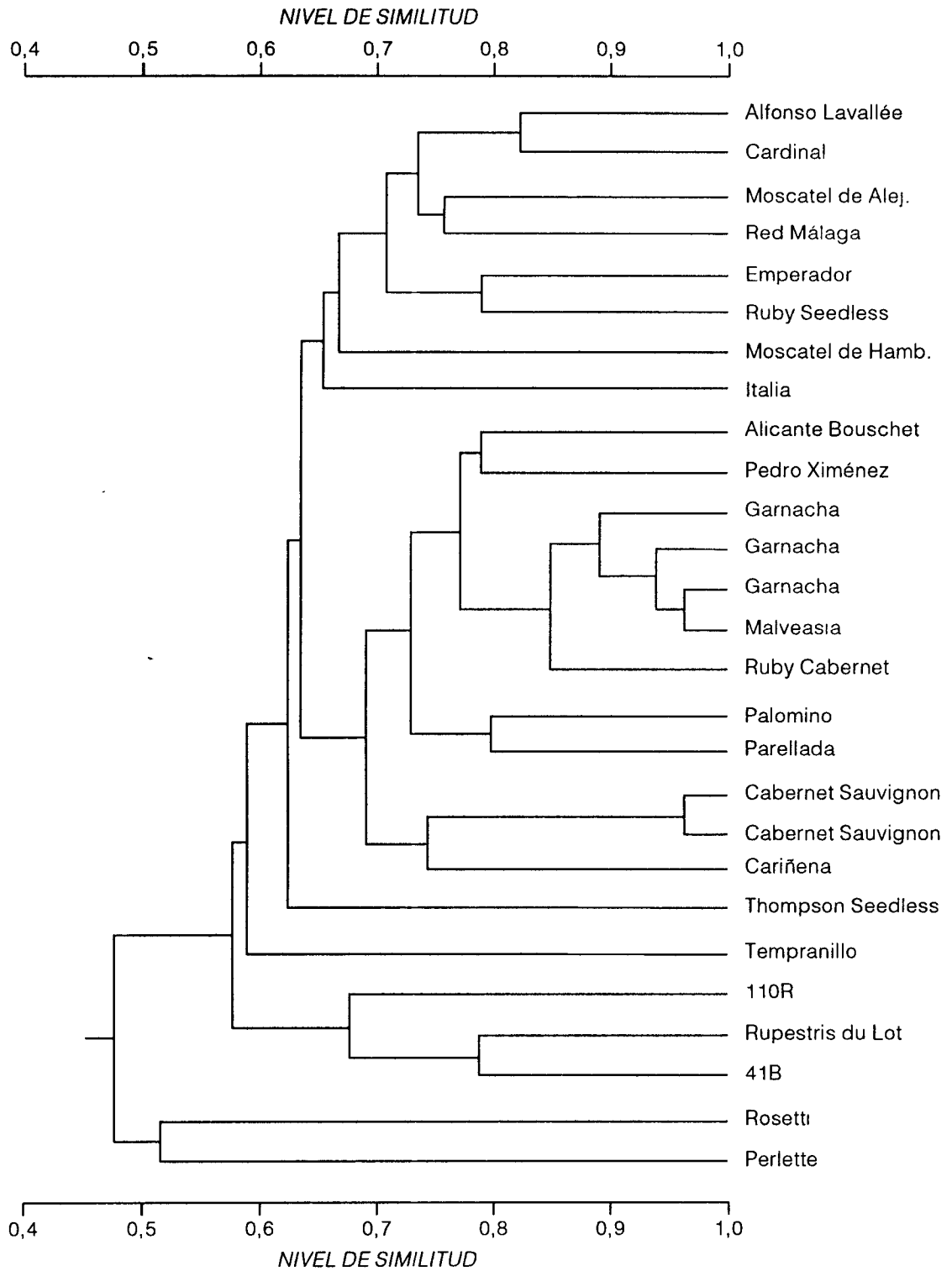


Fig. 7. Dendrograma de agrupación de las OTU (Unidades Taxonómicas Operacionales) mediante los sistemas isoenzimáticos analizados.

terización. Se aprecian diferencias entre los tres clones de "Garnacha" (16, 17, 18).

Las peroxidases (Fig. 6) presentan un número de bandas muy reducido, las bandas 1, 3, 5 que representan un modelo, que aparece en todos los tipos; y la banda 2 aparece sólo en "Palomino" (20) y "Parellada" (21). Por lo tanto este sistema isoenzimático dada la uniformidad de los zimogramas resulta poco adecuado para la caracterización.

El dendrograma resultante de los distintos sistemas isoenzimáticos estudiados (Fig. 7) presenta una primera rama con nivel de similitud de 0,65 en donde se ubican la mayoría de las uvas de mesa y otra rama con nivel de similitud de 0,70 con los cultivares de vinificación. Los clones de "Cabernet Sauvignon" (13, 14) se unen a nivel de similitud de 1 lo que dice de su semejanza genética e incluso de la posibilidad de que se trate del mismo clon. Por el contrario los clones de "Garnacha" (16, 17, 18), aunque si con niveles de similitud muy altos aparecen pequeñas diferencias entre ellos. Los cultivares "Alfonso Lavallée" (1) y "Cardinal" (2) aparecen unidas a un nivel de similitud de 0,80, esto puede explicarse por ser "Cardinal" (2) un cruzamiento entre "Alfonso Lavallée" (1) y "Flame Tokay".

CONCLUSIONES

Las isoenzimas de extractos de raíz son un instrumento válido para la caracterización de cultivares y portainjertos de vid.

De los sistemas isoenzimáticos estudiados, los que presentan mayores posibilidades para la caracterización son fosfatasas ácidas, catecol oxidases, esterasas y malato dehidrogenasas; por su parte glutamato oxalacetato transaminasas sólo permiten hacer grandes grupos con los tipos estudiados y peroxidases presentan una gran uniformidad en los perfiles isoenzimáticos.

En cuanto a los clones aparece una pequeña diferencia en "Cabernet Sauvignon" (13, 14) con esterasas, en "Garnacha" (16, 17, 18) con malato dehidrogenasas.

El dendrograma resultante del análisis multivariante de los datos de las isoenzimas estudiadas presentó dos ramas fundamentales que reagrupan respectivamente a los cultivares de mesa y vinificación, evidenciando algunas relaciones genéticas entre cultivares.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto fue financiado por el CO-NICOR.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmedullah, M., H.W. Wolfe, 1981. Starch gel electrophoresis of grape pollen. *HortScience* 16426 (Abstr, N.201).
- Altube, H.A., F. Cabello, J.M. Ortiz, 1991. Caracterización de variedades y portainjertos de vid mediante isoenzimas de los sarmientos. *Vitis* 30,203-212.
- Angelakis, K.A., W.M. Kiewer, 1983. Ammonia assimilation in *Vitis vinifera* L. I. Isolation and properties of leaf and root glutamate dehydrogenase. *Vitis* 22,202-219.
- Arulsekhar, S., D.E. Parfitt, 1986. Isoenzymes analysis procedures for some fruits, almond, grape, walnut, pistachio and Fig. *HortScience* 21,928-933.
- Bachmann, O., 1989. Isoenzymes as a tool for grape identification. *Riv. Viticolt. Enol* 42 (1),27-31.
- Benin, M., J. Gazquez, A. Bessis, C. Labroche, 1985. Laboratory tests to evaluate the enzymatic and morphological variability of the wine. *Moët-Hennessy. Co II. Amélioration de la Vigne Culture in Vitro*, 28.
- Benin, M., A. Mahfoudi, R. Bessis, 1988. Caractérisation biochimique des cépages de *Vitis vinifera* L. par électrophorèse d'isoenzymes foliaires: Essai de classification des variétés. *Vitis* 27,157-172
- Brewer, G., Singh, 1971. Introduction to Isoenzyme Techniques. Academic Press. New York.
- Cargnello, G., E. Gianazza, G. Tedesco, M. Cappella, F.M. Gerola, 1988. Wall protein of *Vitis vinifera* pollen. I. Constancy of the phenotype. *Vitis* 27,47-55.
- Dal Belin Peruffo A., Z. Varanini, G. Maggioni, 1981. Caractérisation d'espèces, variétés et clones de vigne au moyen de électrophorèse d'extrait enzymatiques des feuilles. 3e Symp. Intern. Sélection Clonale de la Vigne, Venise, 8-12 Juin 81, 31-40.
- Dettweiler, E., 1987. Ein Modell zur Unterscheidbarkeit von Reb sorten mit Hilfe blattmorphologischer Merkmale. Diss. Univ. Hohenheim.
- Drawert, F., W. Müller, 1973. Über die elektrophoretische Differenzierung und Klassifizierung von Protein II. Dunnschicht-iso elektrische Fokussierung von Protein aus Trauben verschiedener Rebsorten. *Z. Lebensm.-Untersuch. Forsch.* 153,204-212.
- I.B.P.G.R., 1983. Descriptor for grape. Rome. p.93.
- Matto, M.C., M.L. Rúa, E. Ferro, 1988. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation of *Vitis* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 72,84-88.
- Nakamura, K., Y. Amano, M. Kagami, 1981. Electrophoretic patterns of polyphenol oxidase from Koshu and Muscat Bailey A grapes. *J. Inst. Enol. Viticult. Yamaguchi University* 16,15-20.
- O.I.V., 1983. Codes des caractères descriptifs des variétés et espèces de *Vitis*. Paris. Ed. Dedon.
- Plakida, E.K., E.N. Dokuchaeva, 1983. Differences in the composition of protein complexes of grape parent

- forms and their hybrids Fiziol.Biokhim.Kul't. Rast.16,15-20.
- Rajasekaran, K., M.G. Mullins, 1983. The origin o embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. Amer.J Enol.Viticult, 34,108-113.
- Sach, J.P., 1661. Ampelographia. Liepzig.
- Samaan, I.G., D.H. Wallace, 1981. Taxonomy affinities of 5 cultivars of *Vitis vinifera* L. as sided by serological analysis of pollen proteins. J. Amer. Soc Hort. Sci.106,804-809.
- Schaefer, H , 1982. Failure of distinguishing *Vitis* species and hybrids by protein and isoenzyme analysis of roots. Bioch.Syst. Ecol.Vol 10,N.4,349.
- Schwennesen, J., E.A. Mielke, W.H. Wolfe, 1982. Identification of seedless table grape cultivars and bud sport with berry isoenzymes. HortScienze i7,366-368.
- Stavrakakis, M., M. Loukas, 1983. The between and within-grape cultivars genetic variation. Sci. Hort. 19, 321-334.
- Stavrakakis, M., M. Loukas, 1985. Identification of grape cultivars by pollen isoenzyme polymorphism. Agricult. Res. 9, 347-357.
- Subden, R.E., A. Krizus, S.C. Lougheed, K. Carey, 1987. Isozyme characterization of *Vitis* species and some cultivars. Amer. J. Enol. Viticult, 38, 176-181
- Walters, T.W., U. Poluszny, P.G. Kevan, 1989. Isoenzyme analysis of the grape (*Vitis*).I. A practical solution. Can.J. Bot. 67, 2894 2899.
- Wolfe, W.H., 1976. Identification of grape varieties by isoenzyme banding patterns. Amer. J. Enol. Viticult. 27, 68-73.