



Programa Formativo

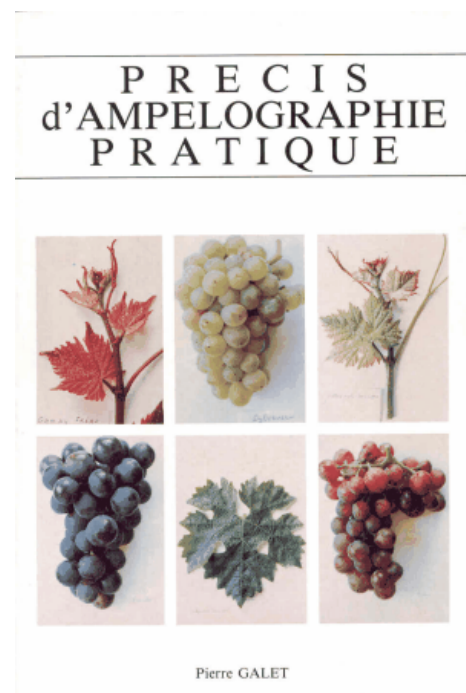
20 de enero de 2010

Fernando Zamora

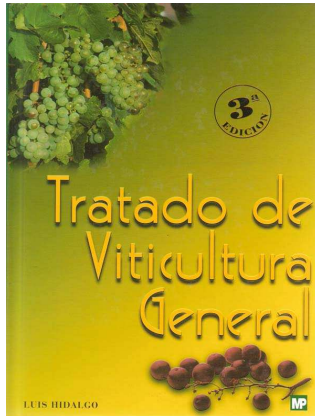
Identificación varietal en *Vitis vinifera* mediante técnicas moleculares; Resultados preliminares en variedades canarias



Según Pierre Galet (2000) existen más de 9.600 variedades viníferas en el mundo.



...Y en el International Variety Catalogue (Maul et al. 2007) aparecen más de 18.000 referencias.

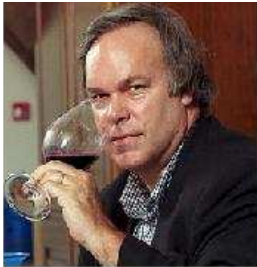


No obstante según Manuel Hidalgo (1993), tan sólo 16 variedades representan el 90 % de la producción:

- Cabernet sauvignon
- Merlot
- Pinot noir
- Syrah
- Malbec
- Tempranillo
- Garnacha
- Sangiovese
- Chardonnay
- Sauvignon blanc
- Riesling
- Gewürztraminer
- Muscat de Frontignan
- Airen
- Macabeo
- Pinots blanc, gris,...

Y otras 26 representan otro 9 %....

... ¡ Lo que deja al resto de las variedades tan sólo el 1 % restante !

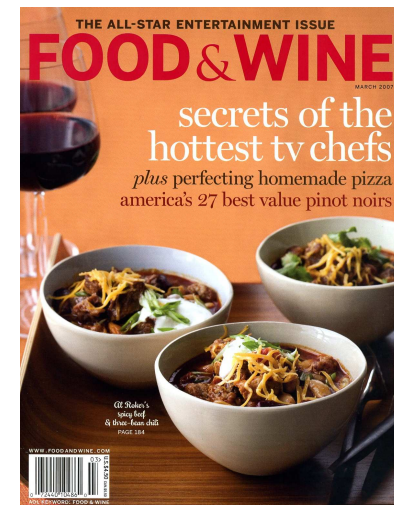


The
WINE
ADVOCATE

Robert Parker (2004) realizó **12 predicciones** sobre el futuro del vino

Food & Wine, October 2004 www.foodandwine.com/articles/parker-predicts-the-future

1. *Habrá una auténtica revolución en la distribución.*
2. *Las Web del vino fortalecerán su dominio.*
3. *Las oferta agresivas comenzaran también para los mejores vinos*
4. *Francia tendrá dificultades*
5. *Los tapones de corcho serán substituidos.*
6. *España será la estrella*
7. *El Malbec será grande*
8. *California conducirá America*
9. *El sur de Italia subir *
10. *Los vinos sin maderas ampliarán su mercado*
11. *El valor será valorado*
12. *Diversidad será la palabra*



Food & Wine, October 2004 www.foodandwine.com/articles/parker-predicts-the-future

6. España será la estrella:

Fijaros en España que seguirá creciendo. Hoy en día está emergiendo como un líder en la calidad del vino y la creatividad, combinando las mejores características de la tradición vitivinícola con una filosofía moderna y progresista. España, acaba de salir de un largo período de elaboración del vino de cooperativas que valoraba la cantidad sobre la calidad, ha comenzado a reconocer que posee muchos antiguos viñedos de vid con un potencial casi ilimitado. Las bodegas españolas reconocen que no están atrapadas ni por historia ni por la necesidad de mantener el statu quo que en la actualidad frustra e inhibe a tantos productores franceses. En 2015, las áreas que tradicionalmente han producido los mejores vinos de España (Ribera del Duero y La Rioja) habrán pasado a un segundo lugar detrás regiones ascendentes como Toro, Jumilla y Priorat.



Tinta de Toro
(Tempranillo)



Monastrell



Garnacha

Food & Wine, October 2004 www.foodandwine.com/articles/parker-predicts-the-future

12. Diversidad será la palabra

Para el año 2015 el mundo del vino habrá crecido y será aún más diverso. Vamos a ver vinos de calidad en los lugares más inesperados, como Bulgaria, Rumania, Rusia, México, China, Japón, Líbano, Turquía y quizás incluso en la India. Pero creo que incluso con todos estos nuevos productores, al punto de saturación no se alcanzará, ya que un número cada vez mayor de la población mundial exigirá el vino como su bebida alcohólica preferida.



Nuevos países



Nuevos estilos



Nuevas variedades

La expresión **ABC**



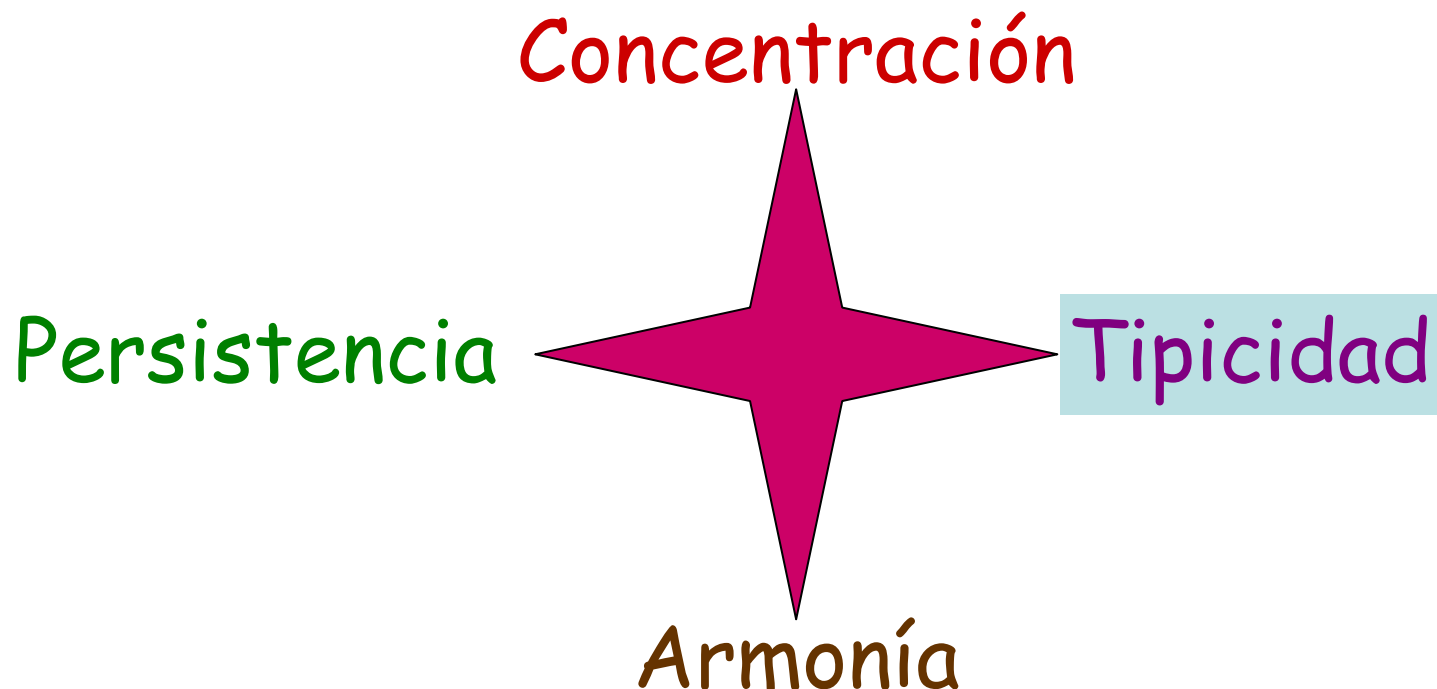
<http://www.anythingbutcabernet.com/>



<http://www.anythingbutchardonnay.com/>

Queda claro por tanto la importancia de conocer y recuperar nuestras variedades autóctonas. Al menos de aquellas que pueden proporcionarnos vinos de calidad, interesantes y sobre todo distintos.

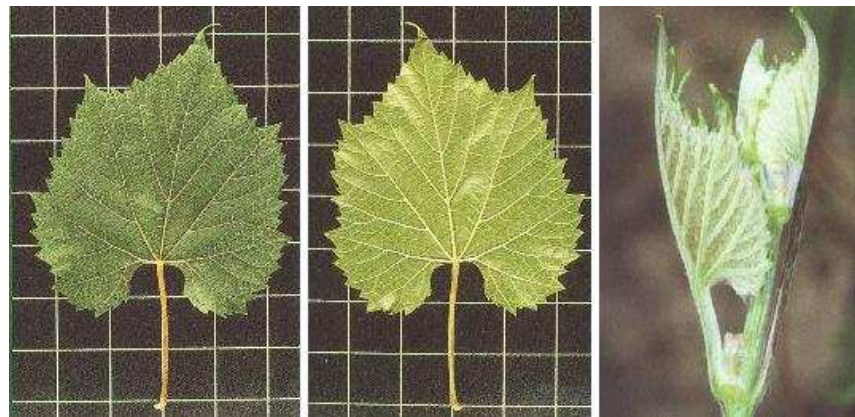
Tendencias actuales en los vinos de alta calidad



La Ampelografía

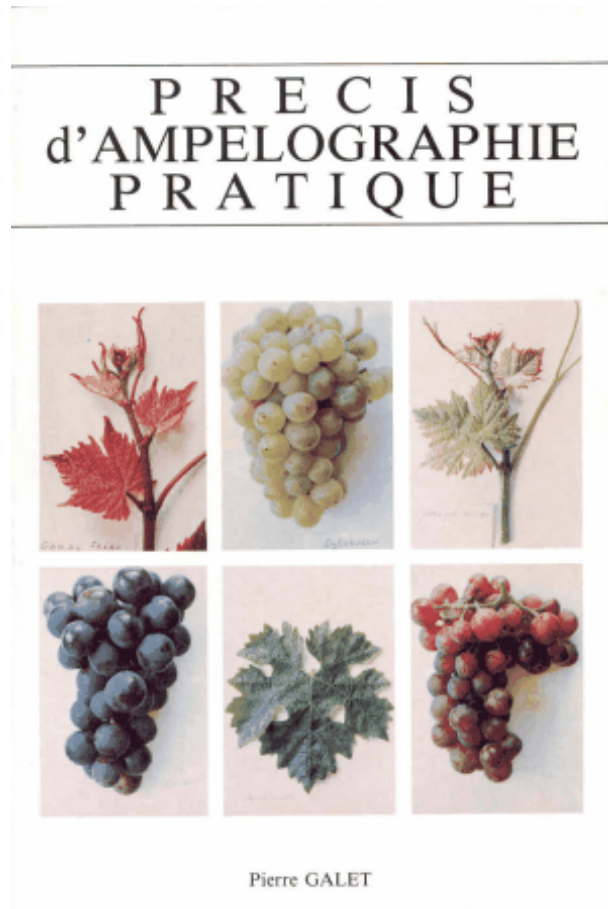
La **Ampelografía** (del griego "ampelos"-vid y "grafos"-clasificación) es la ciencia que se encarga del estudio, la descripción y la identificación de la vid (vitis vinifera), sus variedades y sus frutos.

Se basa en un análisis preciso y sistemático de la estructura, forma y color de distintas partes, como flores, brotos, peciolos, hojas y racimos, además del sabor de las bayas.



Pierre Galet (1998) Précis d' Ampelographie Pratique.
Ed. TEC & DOC. 7ème edition. Paris. 256 pp

OIV, UPOV e IBPGR. 1983. Code des caractères
descriptifs des variétés et espèces de Vitis. Office
International de la Vigne et du Vin. Paris. 140 pp.



FICHA AMPELOGRÁFICA

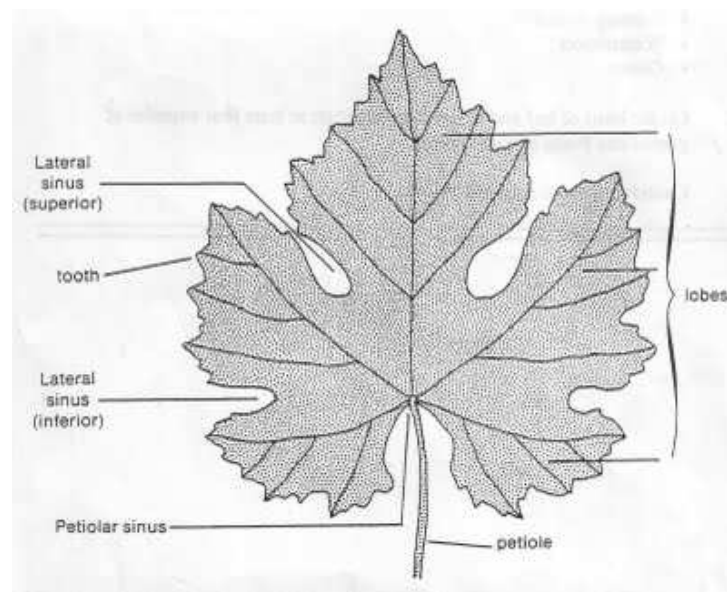
Variedad: Malvasía	
Sumidad:	
Apertura extremidad	Abierta
Pelos postrados de la extremidad	Pigmentación: Media Densidad: Baja a media
Pámpano:	
Color entrenado	Cara dorsal: Verde con rayas rojas Cara ventral: Verde con rayas rojas
Color nudo	Cara dorsal: Verde con rayas rojas Cara ventral: Verde con rayas rojas
Densidad pelos tumbados	Nudo: Baja Entrenado: Baja
Hoja joven :	
Intensidad antociánica de las 6 hojas terminales	Media a fuerte
Densidad pelos tumbados	Entre Nervios: Nula o muy baja Sobre Nervios : Baja
Hoja adulta :	
Tamaño del limbo	(14 - 16) x 12 cm
Forma del limbo	Reniforme
Número de lóbulos	Cinco
Disposición lóbulos del seno peciolar	En "U" medio abierto
Hinchazón del haz	Nula o Muy débil
Perfil en sección transversal	Plana
Profundidad y disposición de los lóbulos de los senos	Muy profundos y abiertos
Pigmentación del haz	Ausente o muy débil
Densidad pelos tumbados entre nervios principales	Nula o muy baja
Longitud y densidad de pelos sobre el peciolo	No tiene
Forma y longitud de dientes	Medios a largos, mezcla convexos y rectilíneos

Forma base seno peciolar	En "U"
Relación longitud nervio central / peciolo	Más corto (8/11,5) el nervio que el peciolo (7/10)
Relación longitud / anchura dientes	Media. (Igual de anchos que largos)
Disposición lóbulo seno peciolar	Más anchos que largos

Racimo	
Tamaño	Medio - Grande
Compacidad	Suelto
Longitud pedúnculo	1,5 - 2 cm
Baya	
Tamaño	Medio - Pequeño
Uniformidad tamaño	No uniforme
Color Epidermis	Verde - Amarillo
Forma de perfil	Elíptica - corta
Separación pedicelo	Medio - Fácil
Grosor piel	Fina
Pigmentación pulpa	Ausente
Consistencia pulpa	Blanda
Suculencia pulpa	Muy jugosa
Sabores particulares	Fruta Tropical
Formación pepitas	Bien formadas
Sarmiento	
Color	Amarillento
Relieve superficie	Estríada
Fenología	
Época de desborre	Precoz
Época de maduración	Precoz
Aptitudes agronómicas	
Vigor medio o largo	Fertilidad media
Podá larga	Sensible al oidio

La Ampelografía

Anàlisis morfológico de las hojas



Parámetros a medir en las hojas

L1:

L2:

L3:

L4:

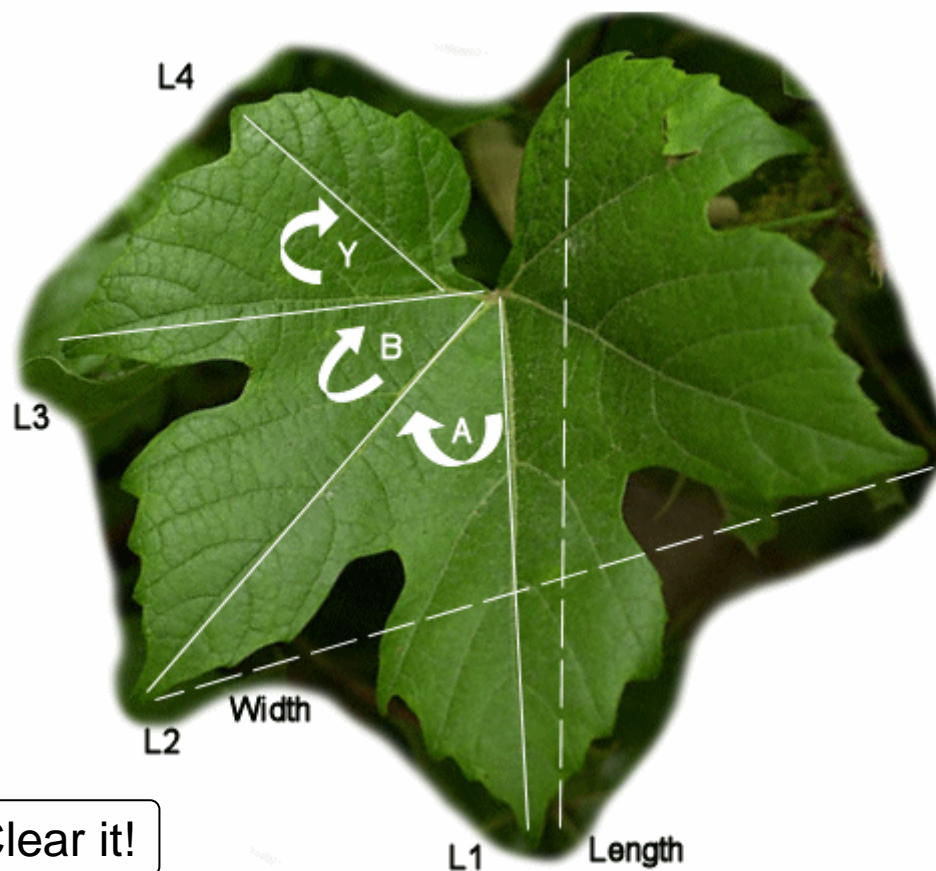
Length:

Width:

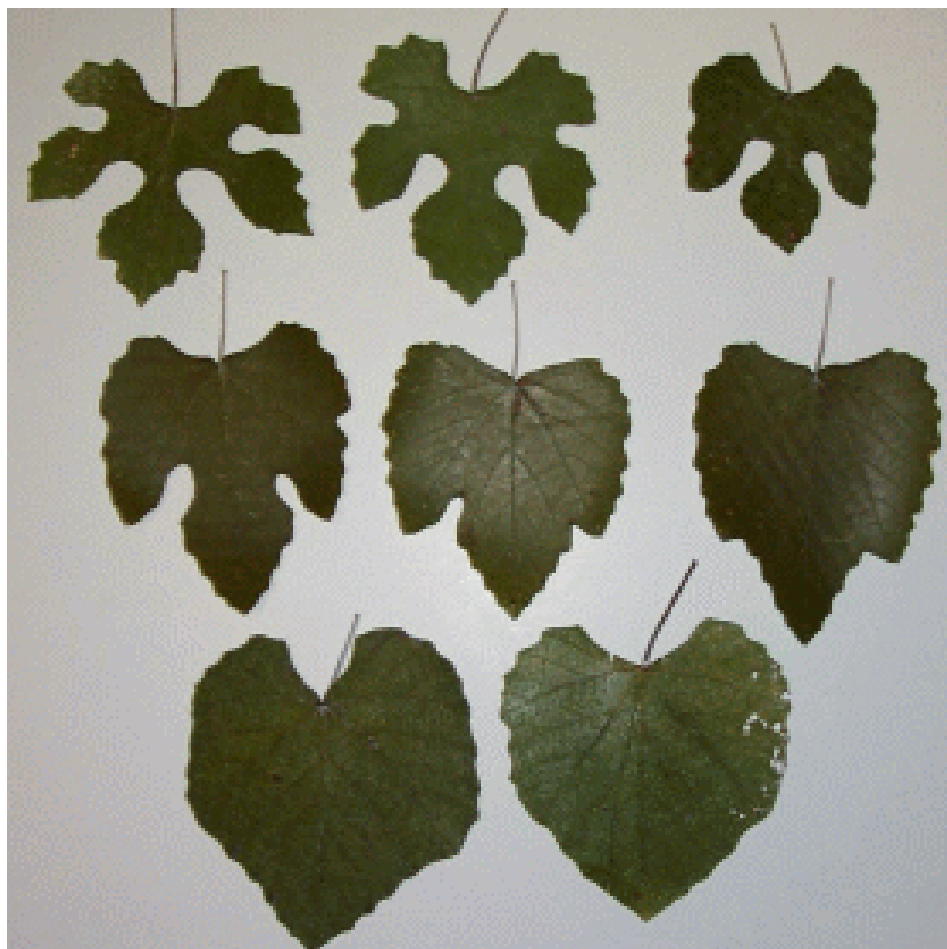
Angle A:

Angle B:

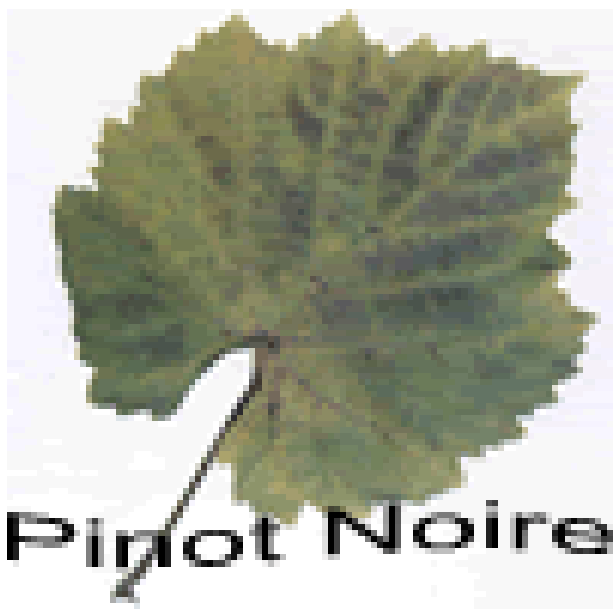
Angle Y:



Muy eficaz para distinguir diferentes especies de Vitis



Muy eficaz para distinguir entre algunas variedades de *Vitis vinifera*



Pero no en todos los casos...

El Carménère, variedad originaria de Burdeos, se creía que se había extinguido completamente en Francia durante la plaga de la Filoxera.

No fue hasta 1994 en que el ampelógrafo francés Jean-Michel Boursiquot advirtió que algunas parras de Merlot tardaban más en madurar. Los resultados de sus estudios concluyeron que se trataba de la antigua variedad de Burdeos, el *Carménère*.

Carménère vs Merlot



La hoja del Carmenère es mustia de color verde más pálido que el Merlot, el que presenta una hoja más acartonada o dura y con el sector alrededor del punto peciolar más arrugado.

Katrina Muller http://www.recursosdeenologia.com/docs/2003/2003_ampelografia_facil.pdf

La Ampelografía tradicional



Se basa en los caracteres fenotípicos

Pero, ¿Qué es el FENOTIPO?



FENOTIPO = GENOTIPO + AMBIENTE

Es decir, tal y como se expresan los GENES

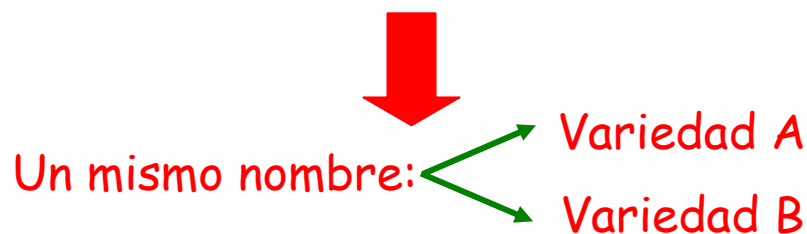
INCONVENIENTES:

- Sumisión al ciclo biológico
- Gran variabilidad debida a:
 - Factores del medio
 - Estado sanitario de la planta
 - Estado nutricional de la planta
- Uso de muchos caracteres
- Personal altamente experimentado




Ampelografía

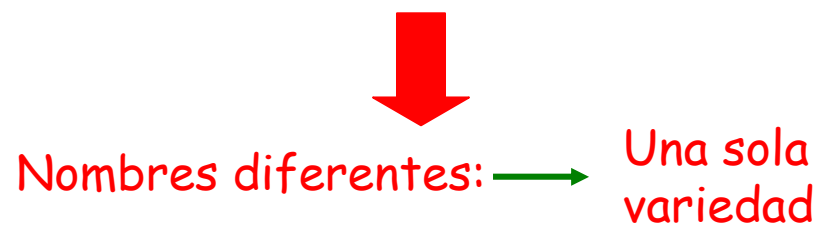
Homonimias



 Ejemplo

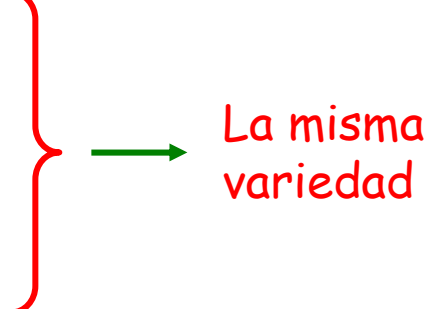
Merlot: 

Sinonimias



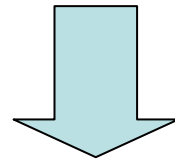
 Ejemplo

Tempranillo
Cencibel
Tinta de Toro
Ull de llebre
Tinta Rouriz

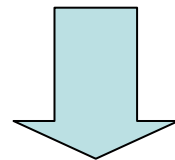


Taxonomía molecular

ESTUDIO DEL ADN



INVARIABLE



INFORMACIÓN EXACTA



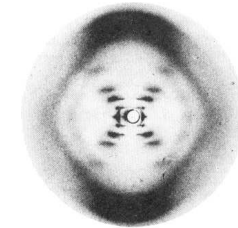
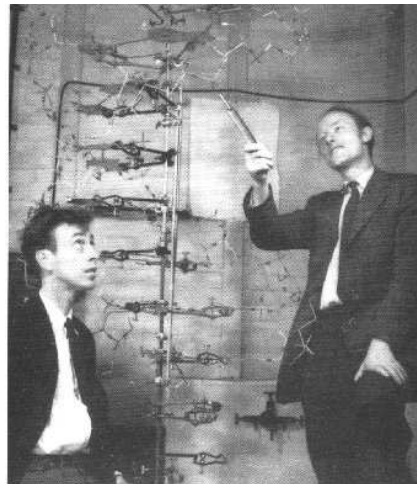
El ADN (ácido dexoxiribonucleico)

Rosalind Franklin en 1952 logró la famosa fotografía 51 mediante difracción de rayos X de una muestra de ADN

Maurice Wilkins se la mostró a James Watson sin que Franklin lo supiera... El resto es historia muy conocida

El modelo de estructura en doble hélice fue propuesto en 1953 por James Watson y Francis Crick (Nature 171: 737-738, 1953)

Watson, Crick y Wilkins recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1962,



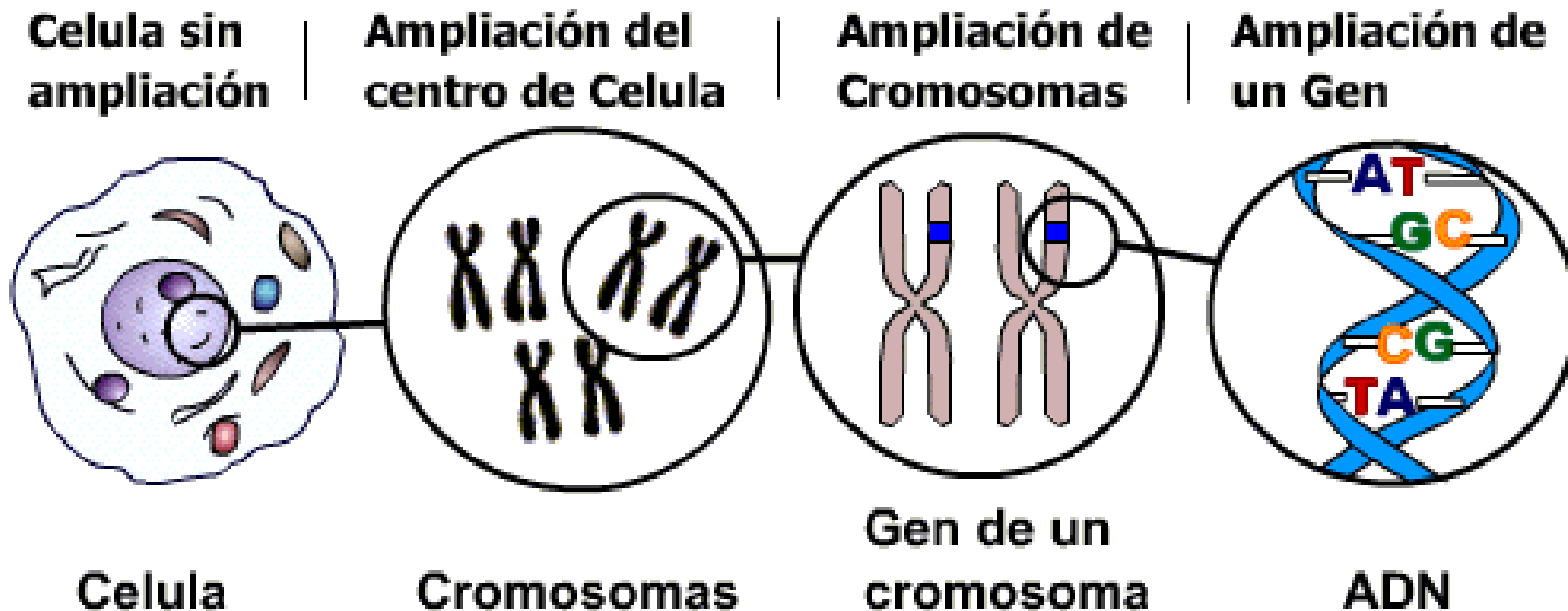
Fotografía 51

Rosalind Franklin falleció en 1958



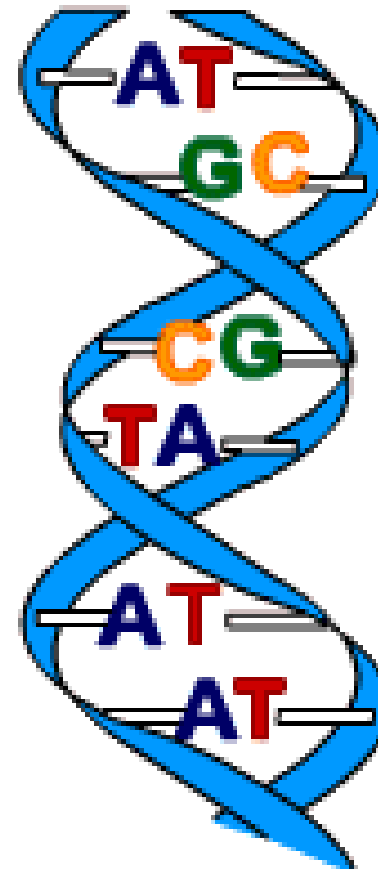
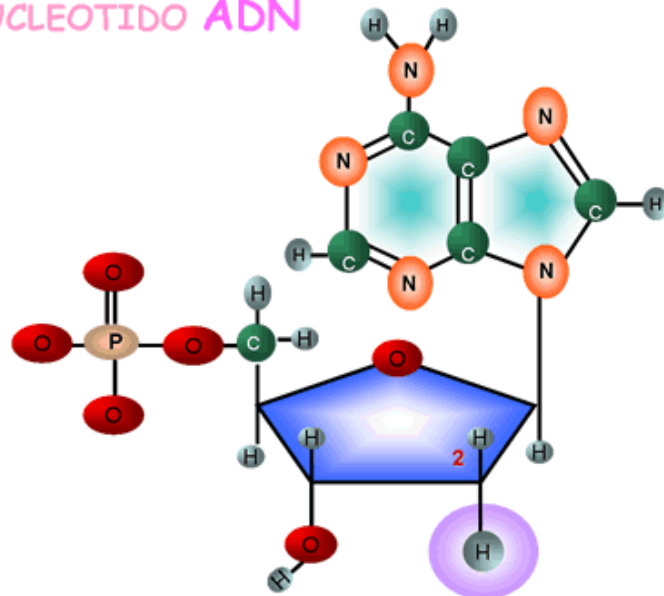
Rosalind Franklin

El ADN (ácido dexoxiribonucléico)



EI ADN (ácido dexoxiribonucleíco)

NUCLEOTIDO ADN



A Adenina

T Timina

C Citosina

G Guanina

Representación
grafica del
ADN

LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR NOS PERMITEN ESTUDIAR EL ADN



MARCADORES MOLECULARES

PRICIPALES MARCADORES MOLECULARES

MARCADOR	RFLP	RAPD	AFLP	SSR o Microsatelites
Discriminación	Moderada	Alta	Alta	Alta
Dificultad	Fácil	Fácil	Moderada	Fácil
Reproducibilidad	Buena	Pobre	Buena	Buena
Complejidad	Baja	Baja	Alta	Baja

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RAPD: Random Amplified Polymorphic ADN

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

SSR: Simple Sequence Repeats

Los SSR o MICROSATÉLITES

• Concepto: $\longrightarrow (GA)_n$

Simple Sequence Repeats

CATGACATCCACCTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATA TCTGCC TCC T
GTACTGTAGGTGGATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTATAGACGGAGGA

N: numero de pares de bases

N puede variar o no en función de la variedad específica

Variedad A $\longrightarrow N_1$

CATGACATCCACCTGGAGAGAGAGAGAGAGATATCTGCCTCCT

Variedad B $\longrightarrow N_2$

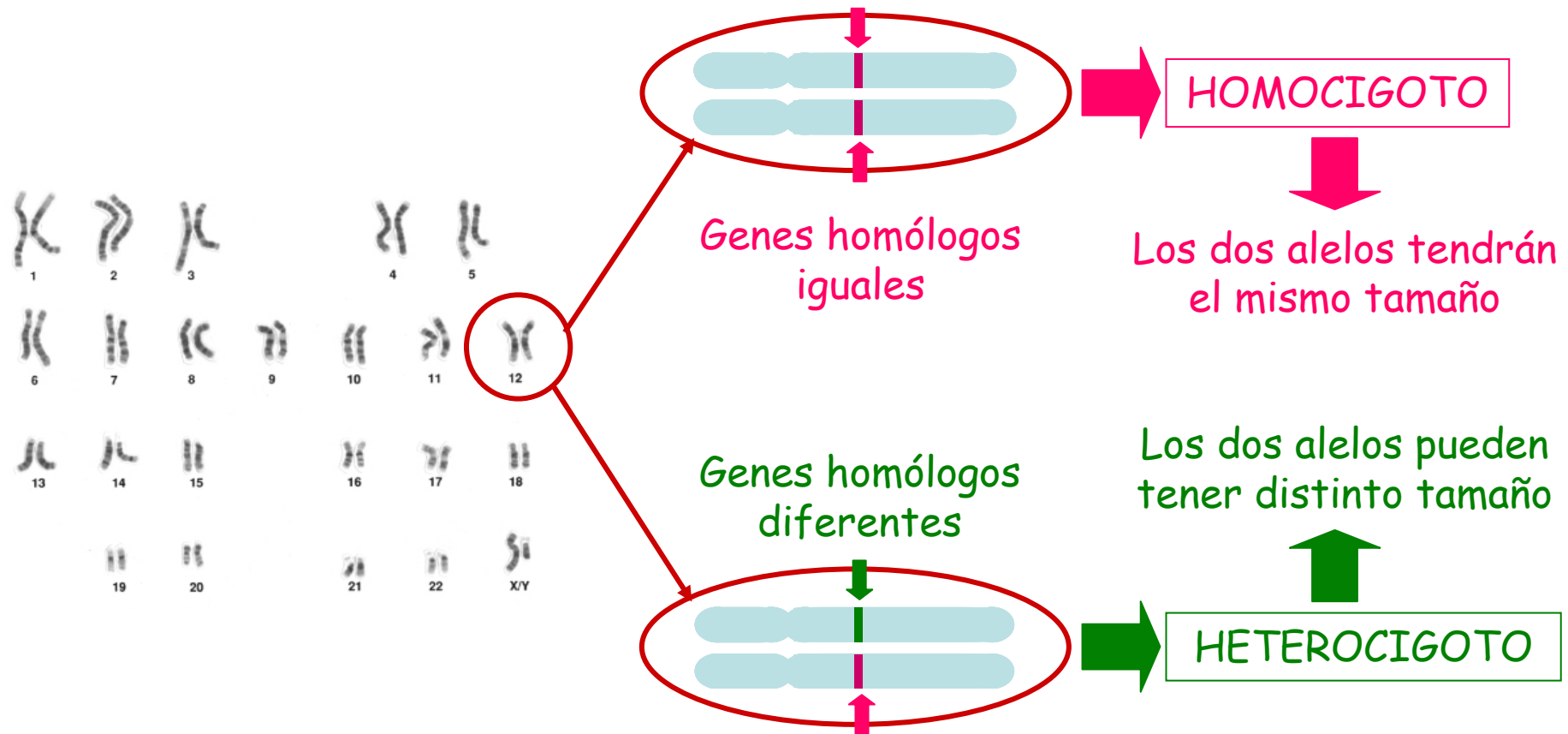
CATGACATCCACCTGGAGAGAGAGATATCTGCCTCCT

Variedad C $\longrightarrow N_3$

CATGACATCCACCTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATATCTGCCTCCT

Homocigotos y heterocigotos

Los cromosomas: { Homo sapiens: 23 pares
Vitis vinifera: 19 pares

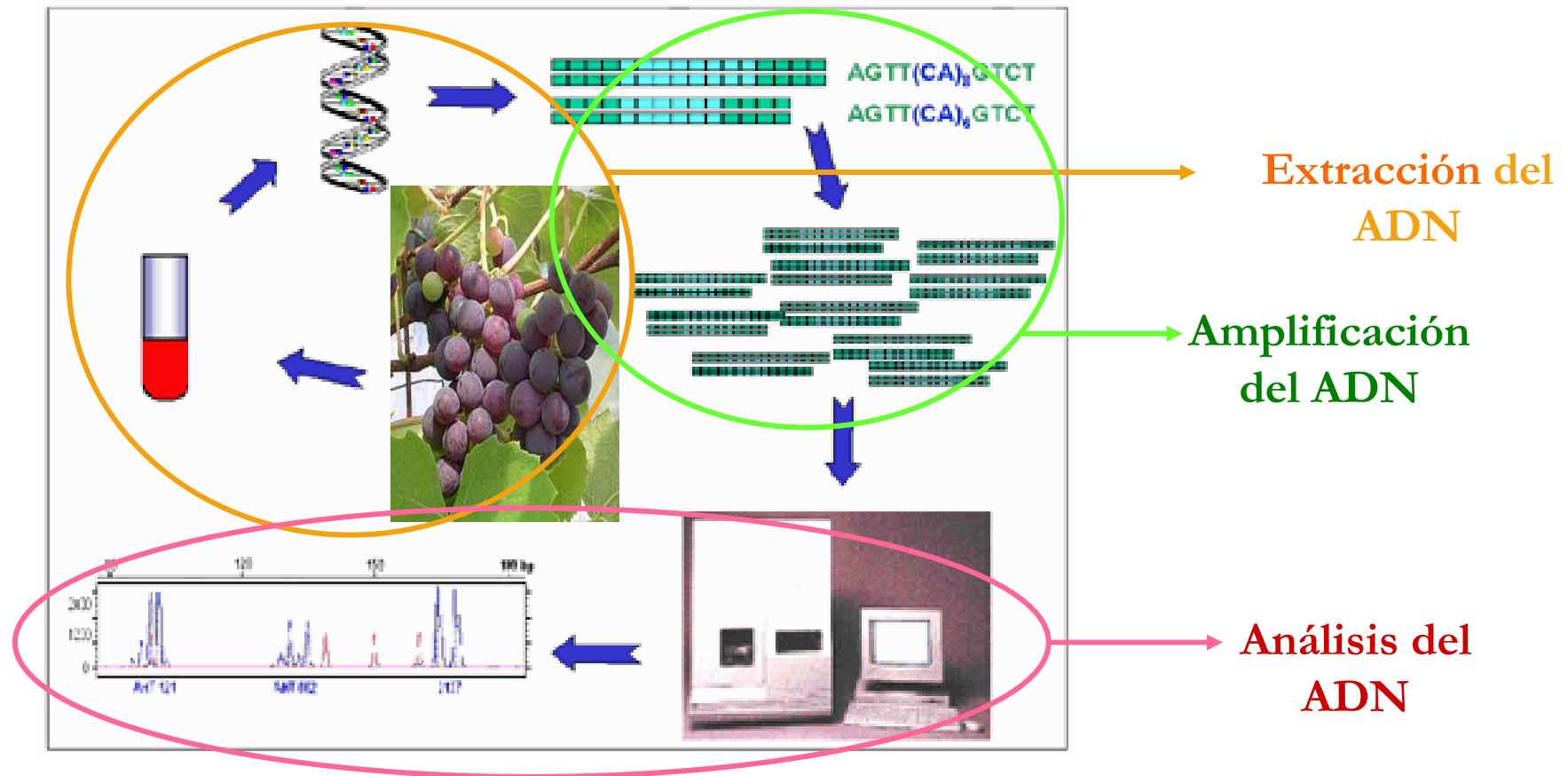


OBJETIVOS

1. Disponer de técnicas moleculares que permitan:
 - Identificación de variedades a partir de: hojas, sarmientos, semillas y... vinos
 - Identificación de clones
 - Estudios de parentesco y evolutivos
2. Elaborar una base de datos que incluya el máximo número posible de variedades para:
 - Identificación de nuevas variedades
 - Identificación de sinonimias y homonimias
 - Estudios de parentesco y evolutivos
 - Transferencia de conocimiento a bodegas, viveristas, viticultores, ...

- El proyecto CDTI "Viñas del mundo" (Bodegas Sumarroca S.L.) nos ha permitido poner a punto las técnicas necesarias y crear una base de datos con 338 variedades viníferas de su colección ampelográfica.
- Estamos ampliando esta base de datos y dentro de este contexto se han analizado más de 60 muestras procedentes de Canarias.
- Los resultados preliminares de este trabajo se presentaran en la parte final de la charla.

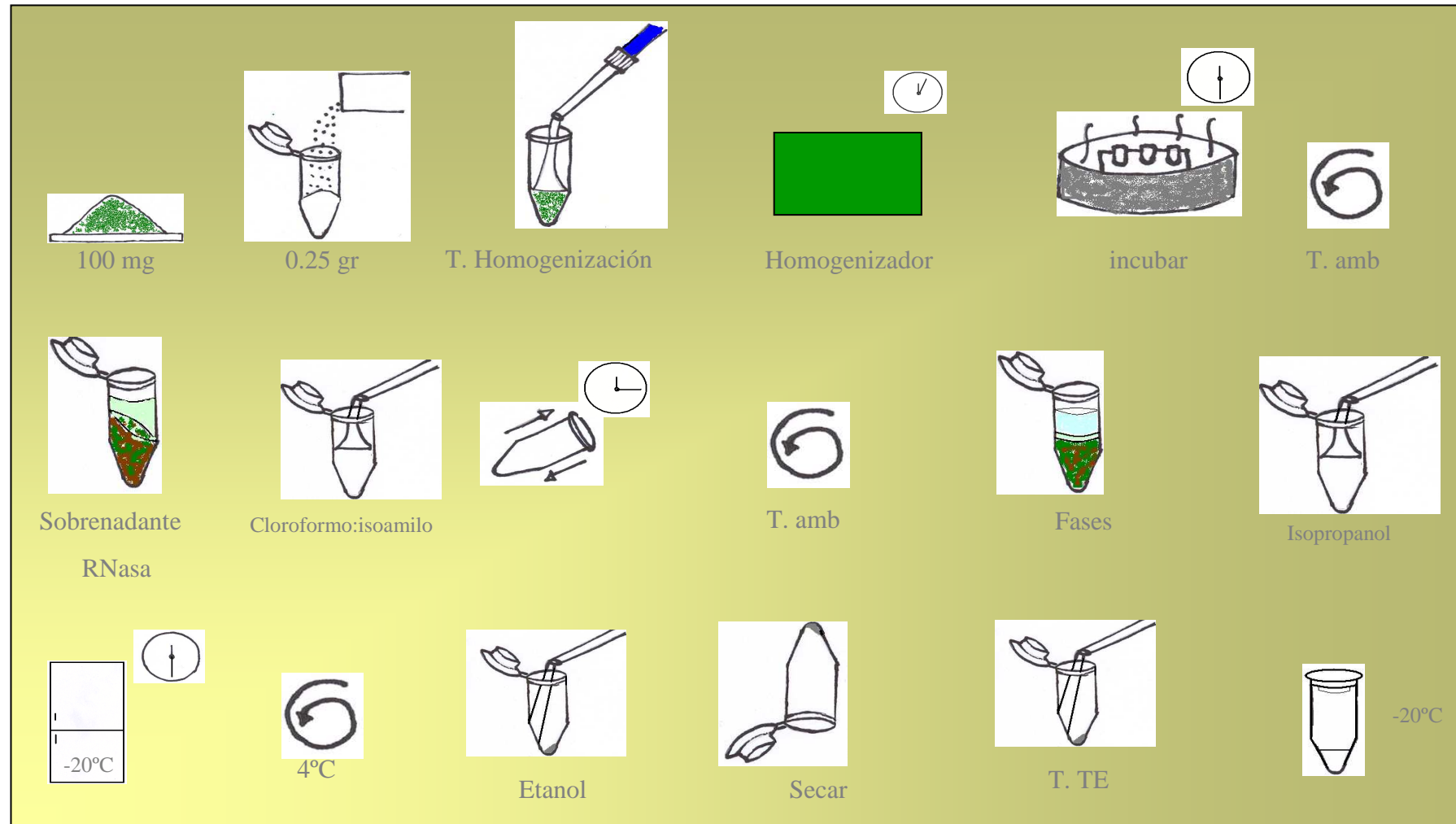
METODOLOGÍA



Extracción del ADN

- Kit comercial (QIAGEN)
- Modificación del protocolo de Steenkamp et al., 1994

Protocolo de extracción



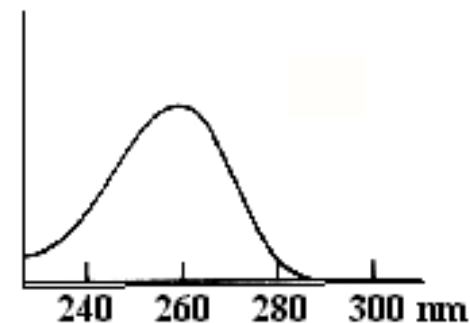
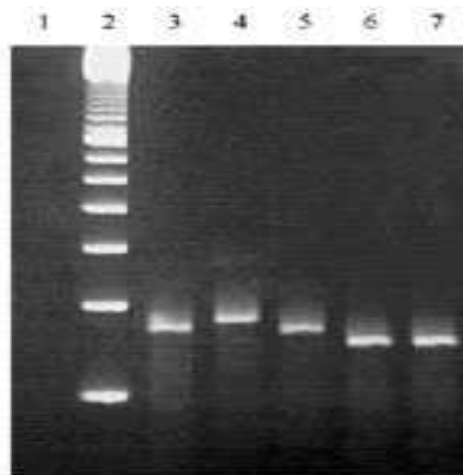
Protocolo de extracción

Control de calidad

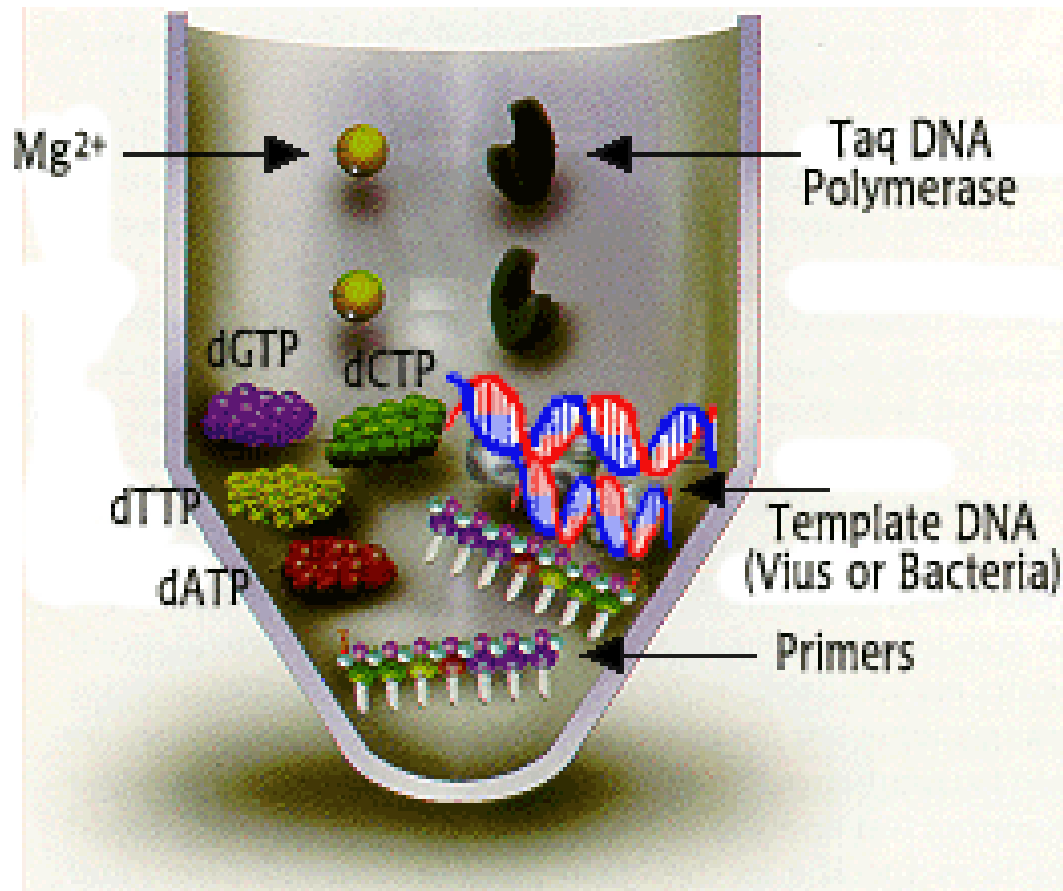
Rendimiento: $[N] = \frac{A_{260}}{\epsilon_{260}} \cdot \text{dilución}$

Índice de pureza: $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1,8$

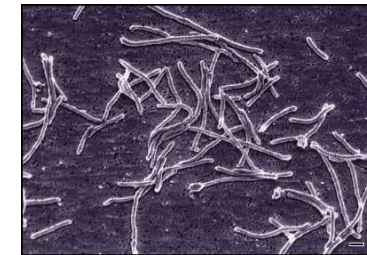
Integridad:



AMPLIFICACIÓN (PCR)



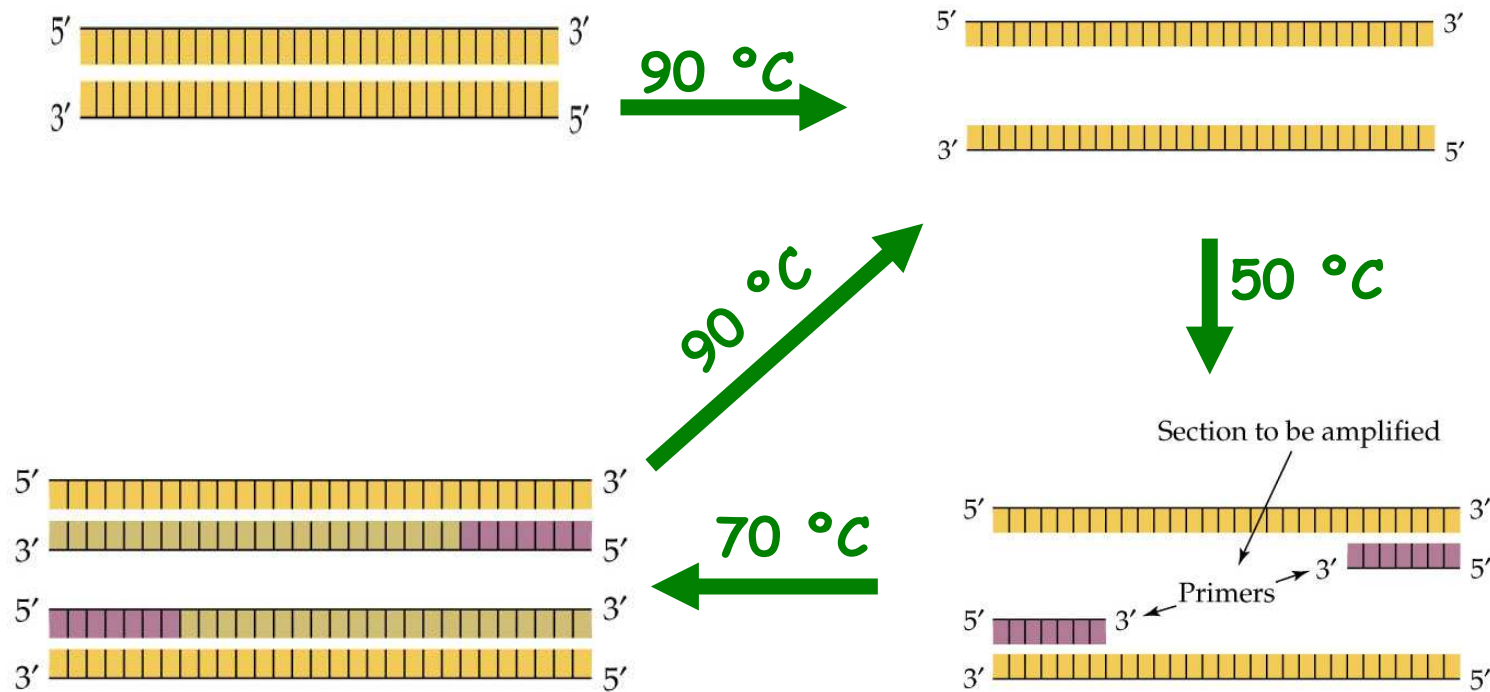
Thermus aquaticus



Geiseres de yellowstone

AMPLIFICACIÓN (PCR)

Reacción en cadena de la polimerasa

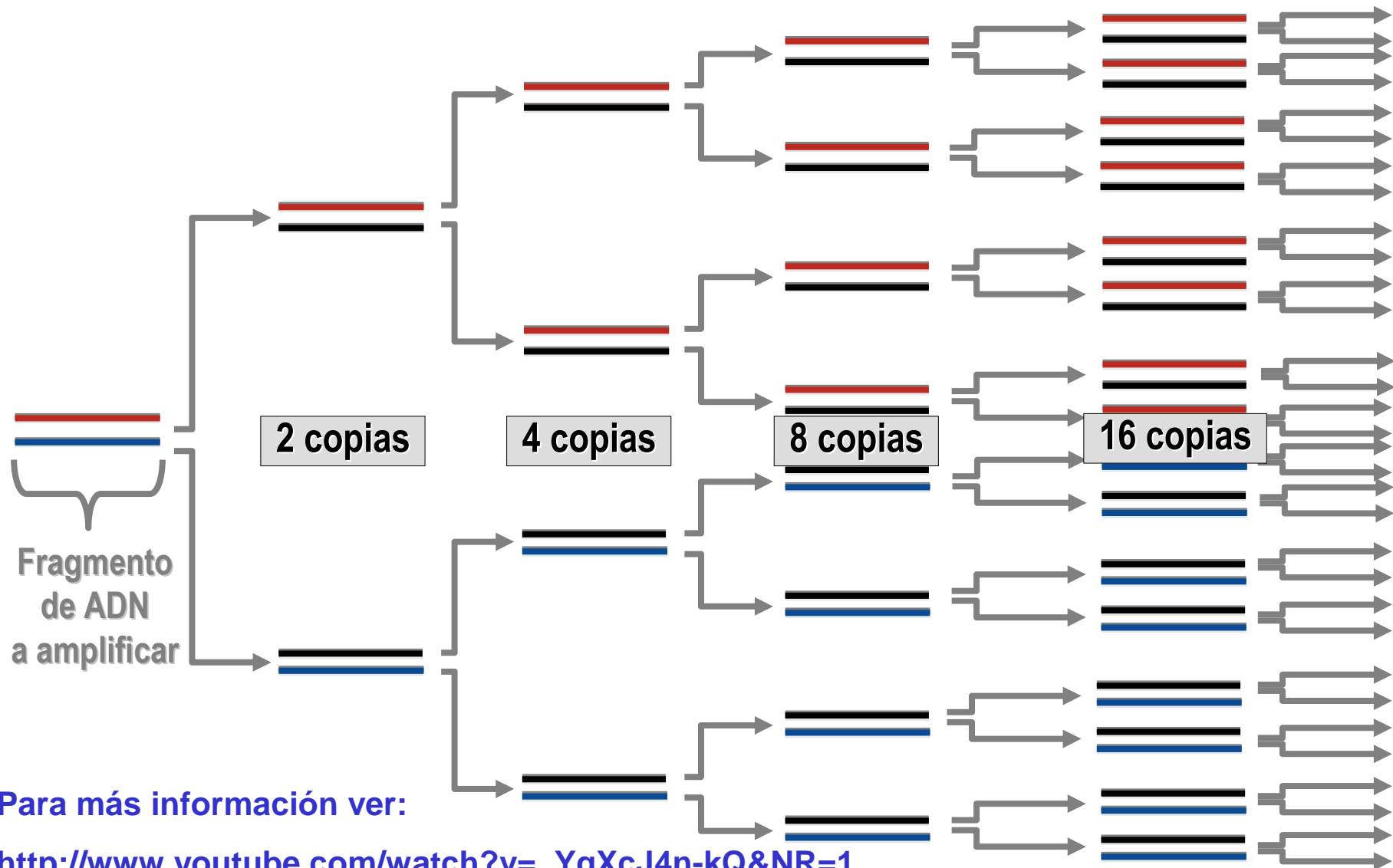


AMPLIFICACIÓN (PCR)

El termociclador



Amplificación (PCR) Reacción en cadena de la polimerasa



Para más información ver:

http://www.youtube.com/watch?v=_YgXcJ4n-kQ&NR=1

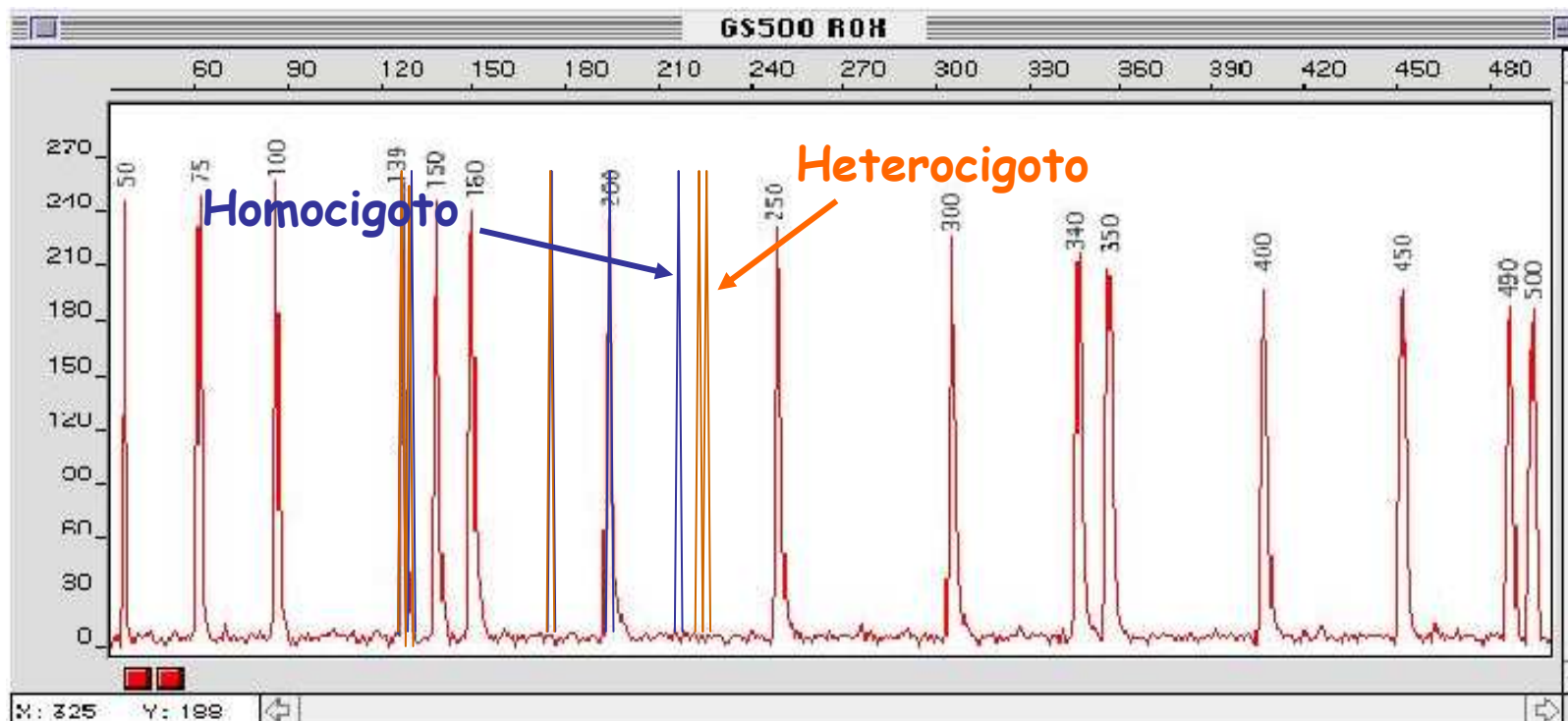
ANÀLISI DELS FRAGMENTES SECUENCIADOR ABI PRISM 310



ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS

- Marcador interno (500 ROX)

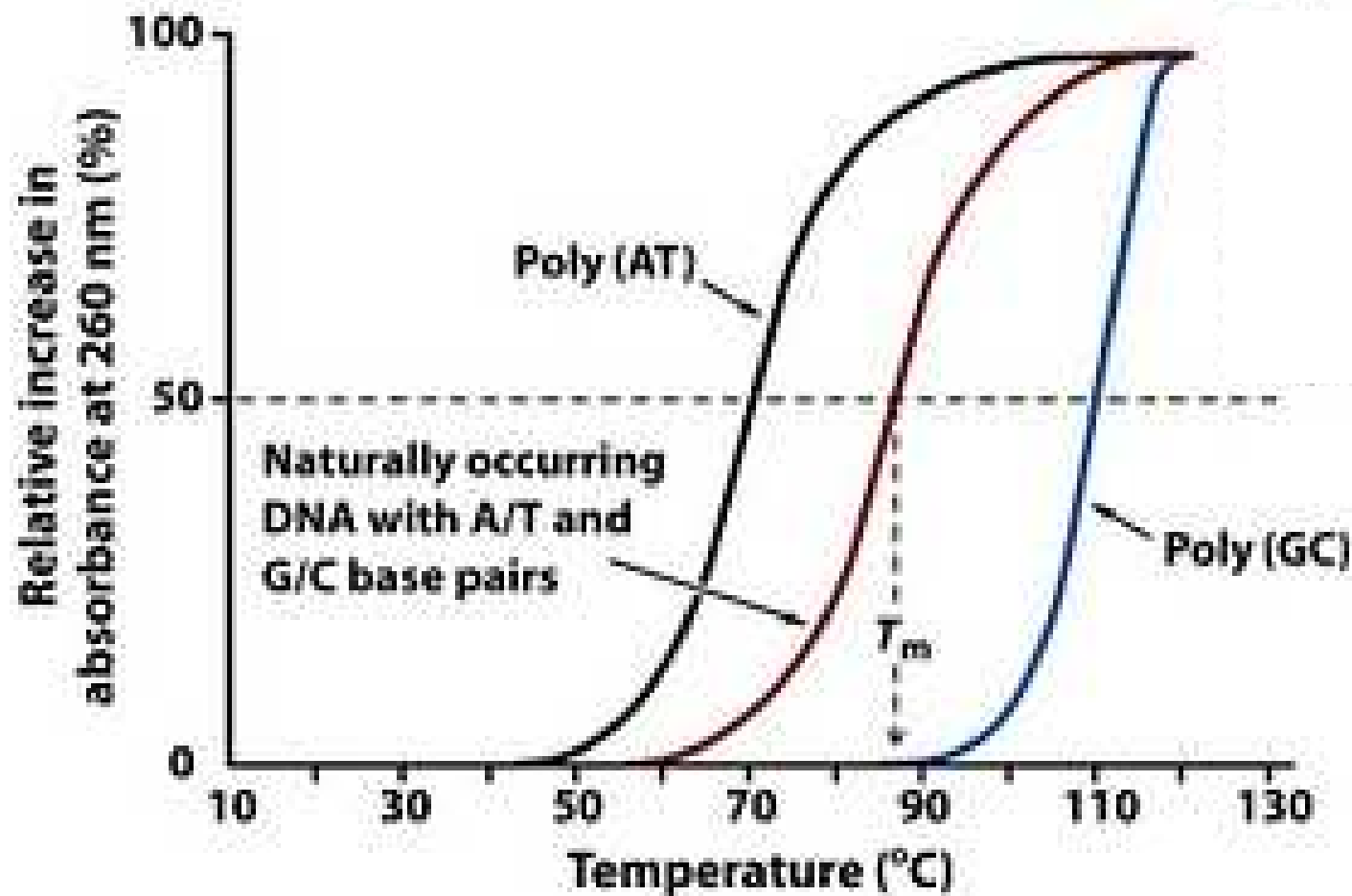
	VVS2		VVMD5		ZAG62	
Malvasia de Sitges	139	141	222	222	186	200
Malvasia Bianca	139	141	230	232	186	186



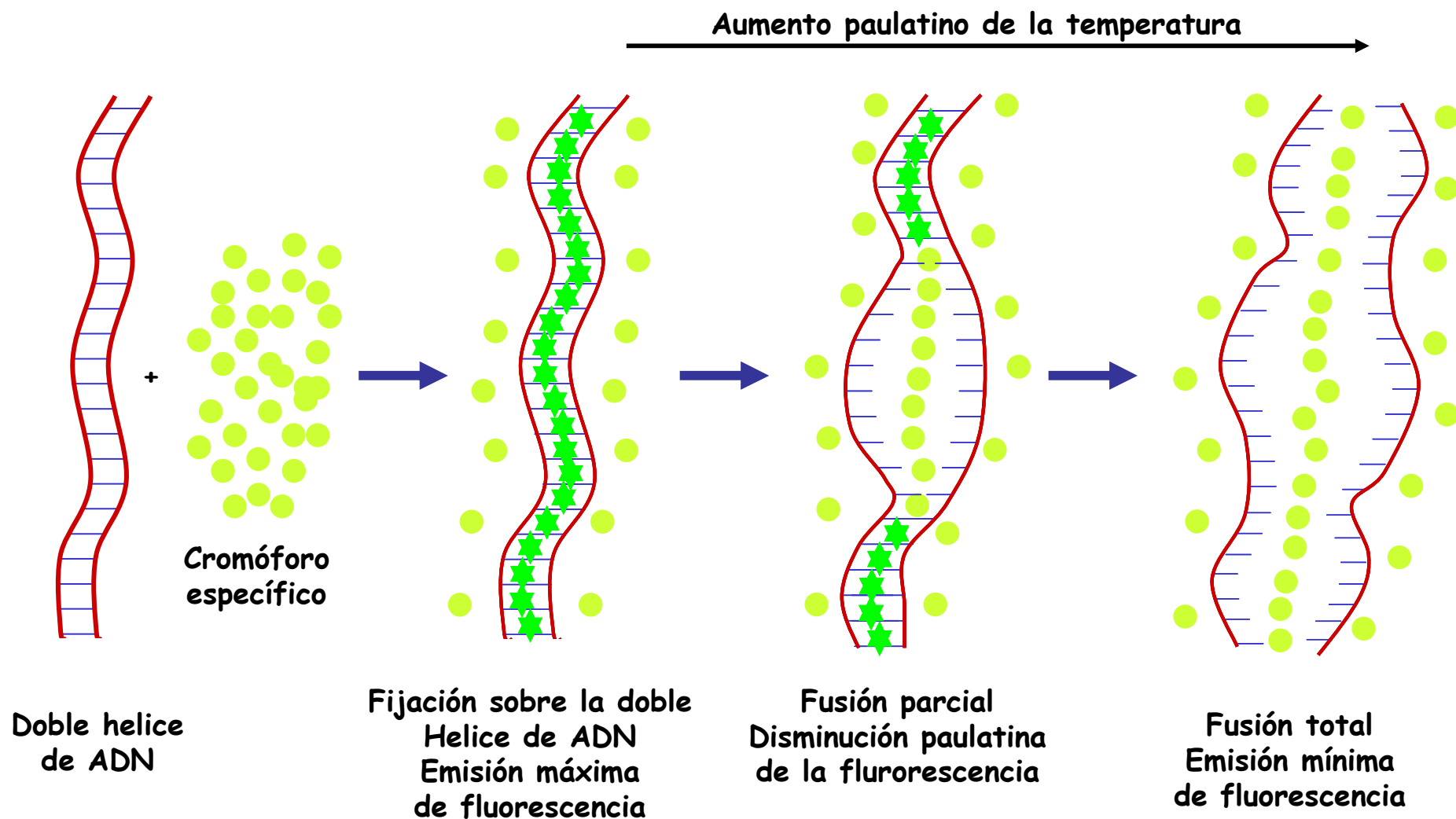
Ejemplo de algunos resultados

	VVS2	VVMD5	VVMD7	ZAG47	ZAG62	ZAG64
Cabernet franc	138:146	224:238	236:260	159:167	193:203	157:159
Cabernet sauvignon	138:150	230:238	236:236	153:167	187:193	139:159
Cot (Malbec)	132:150	226:236	236:260	167:169	187:201	139:159
Merlot	138:150	224:234	236:244	167:169	193:193	137:159
Sauvignon blanc	132:150	226:230	236:254	153:167	187:193	139:143
Semillon	132:132	234:236	236:254	153:163	187:193	137:159
Listan Blanco	129:141	232:236	236:236	160:169	186:186	133:139
Malvasia Bianca	139:141	230:232	236:236	160:169	186:186	133:135
Malvasia de Sitges	139:141	222:222	240:246	154:158	186:200	133:139
Malvasia de Chianti	129:141	222:224	246:246	164:169	188:198	133:139
Malvasia di Lazio	141:141	222:232	236:246	154:156	194:200	139:157

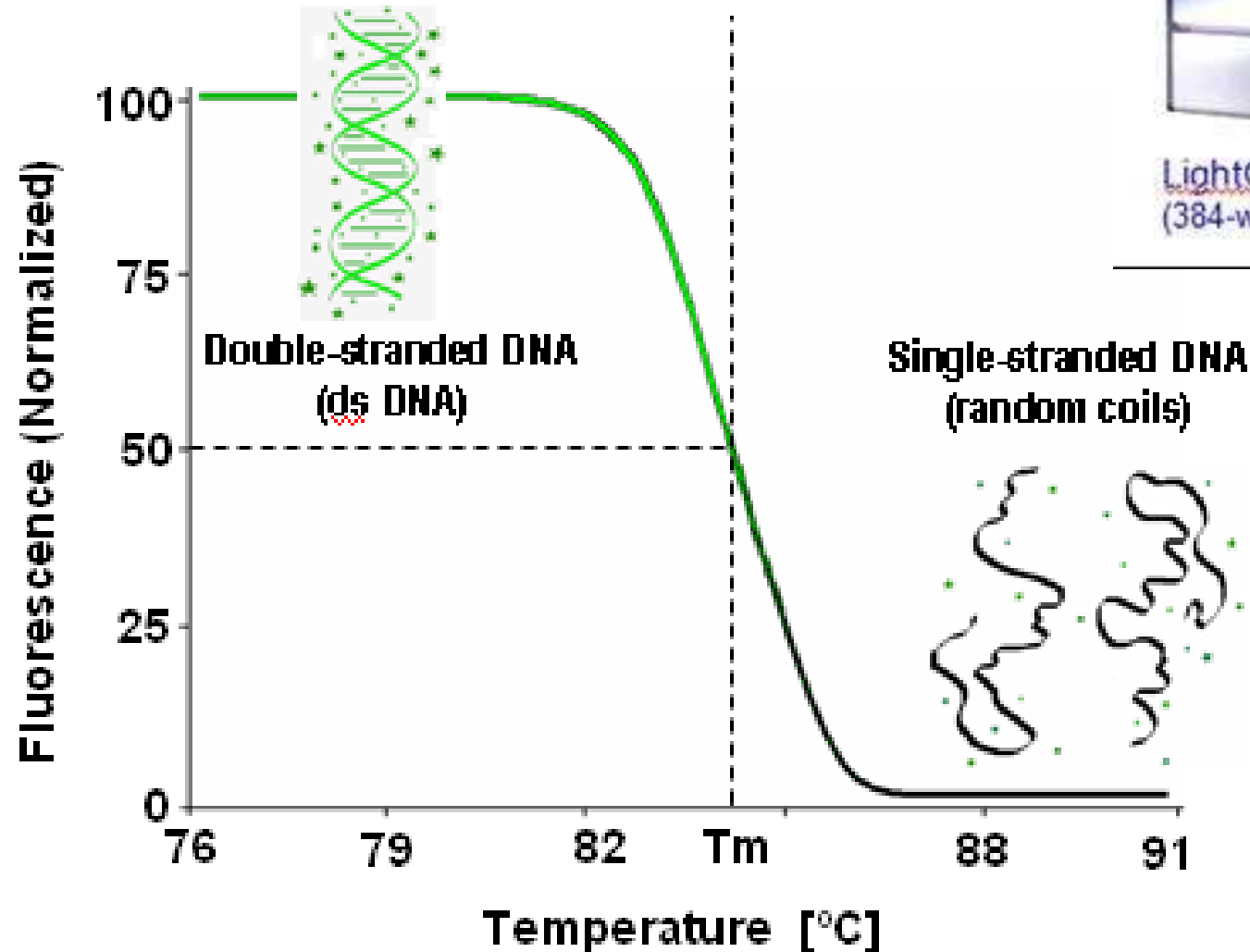
Un nuevo método: el High Resolution Melting Point (HRMP)



Fundamento del método High Resolution Melting Point

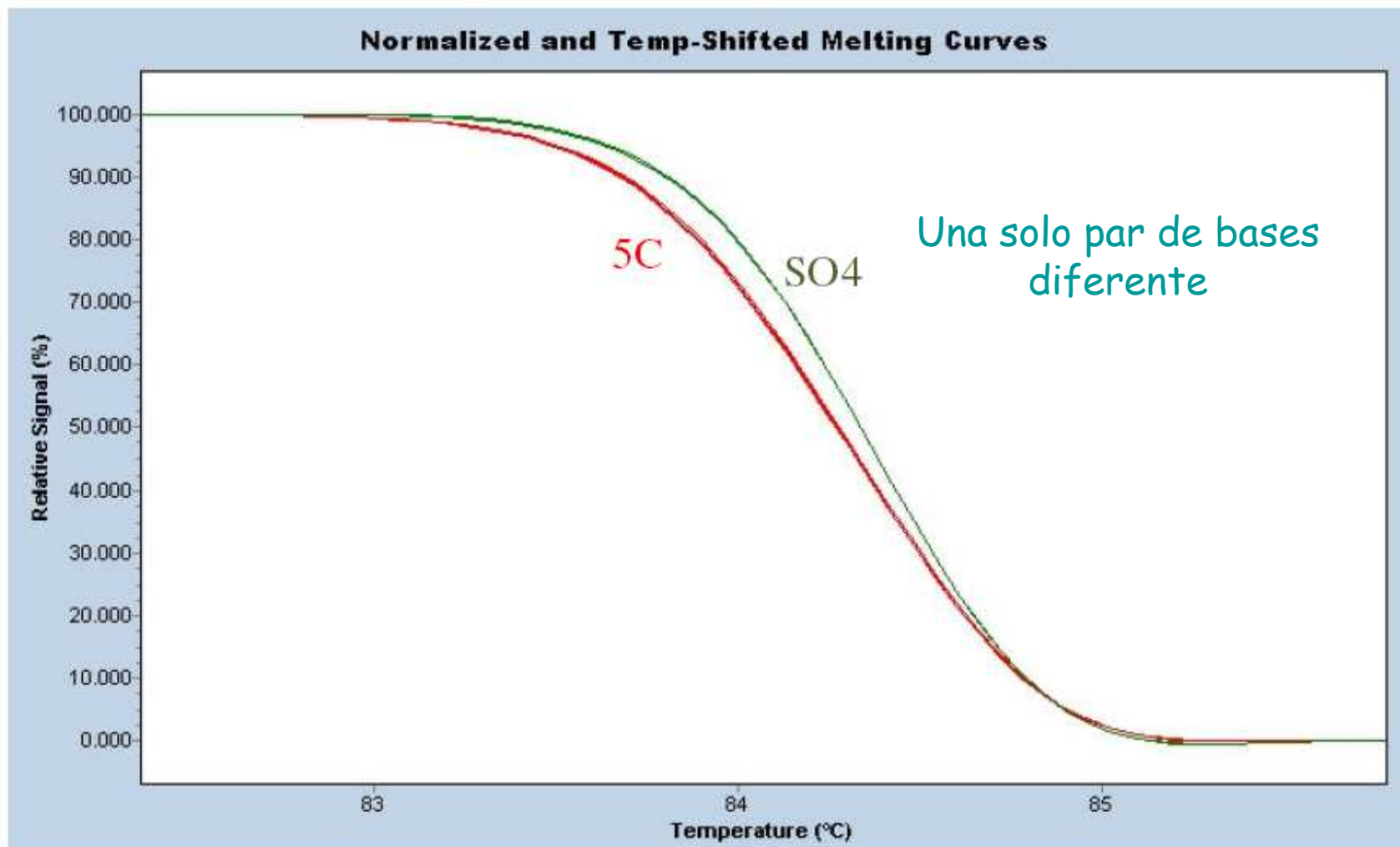


B. Normalized Melting Curves

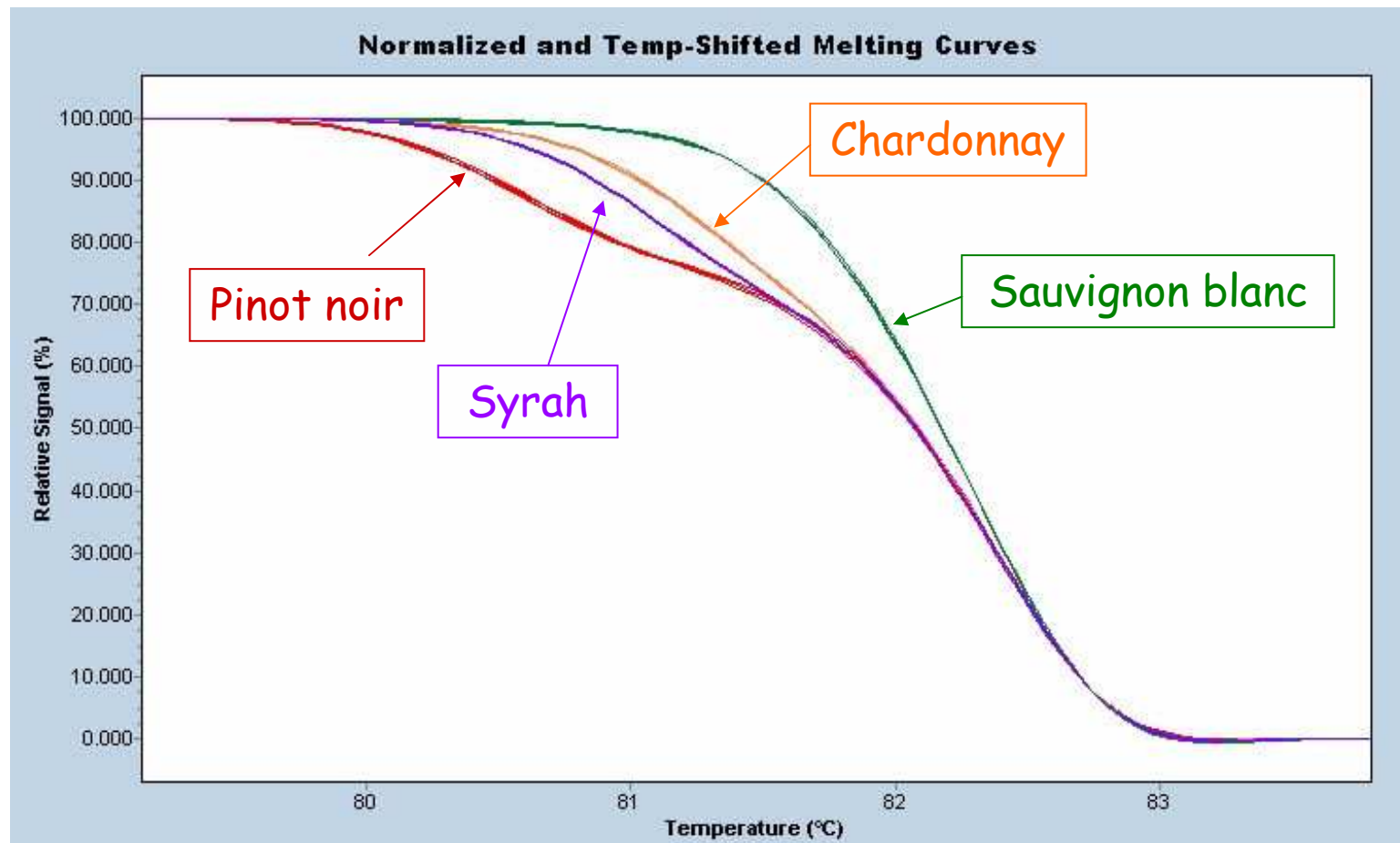


LightCycler 480
(384-well)

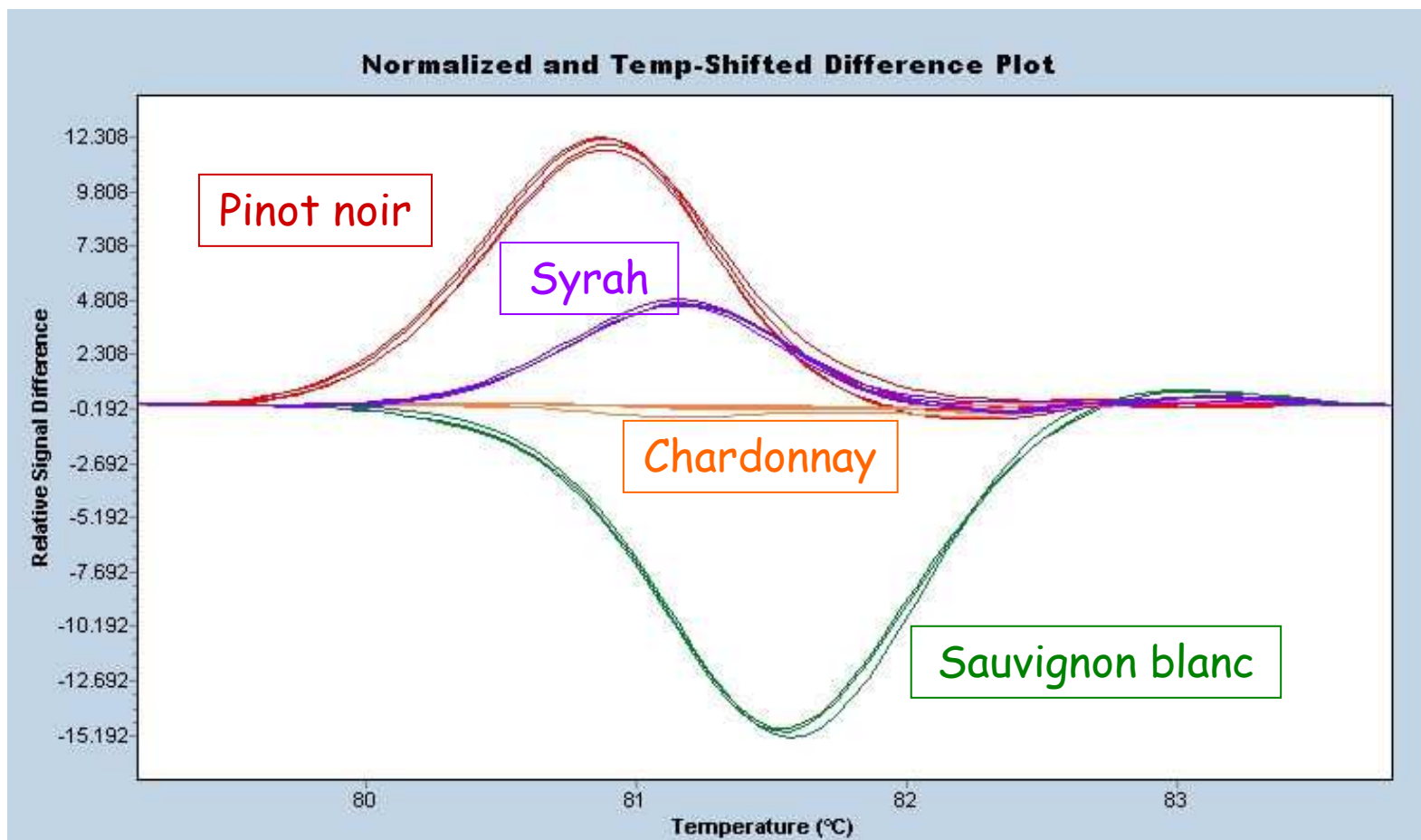
Curvas características del método High Resolution Melting Point



Método High Resolution Melting Point Ejemplos de identificación varietal



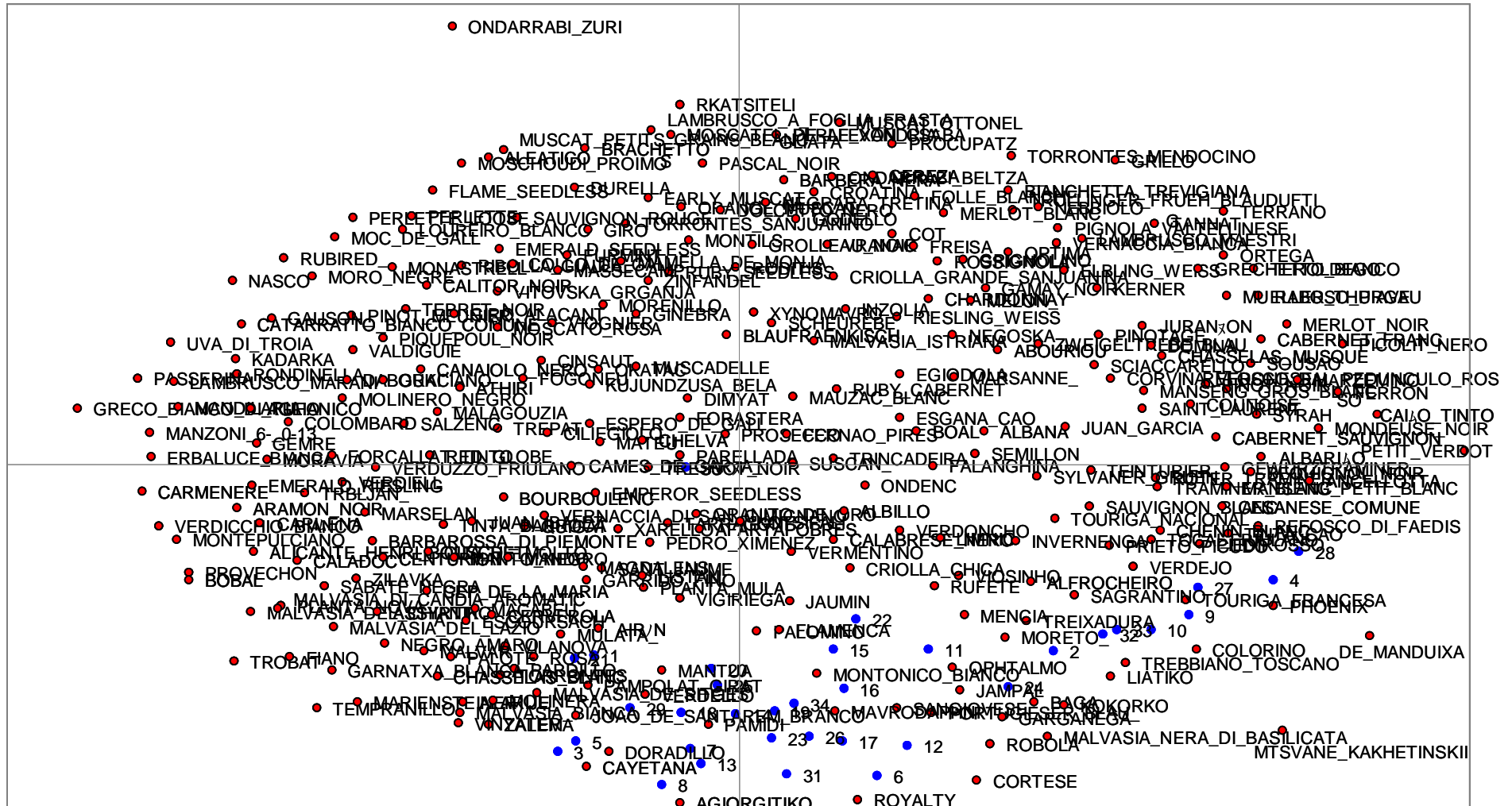
Método High Resolution Melting Point Ejemplos de identificación varietal



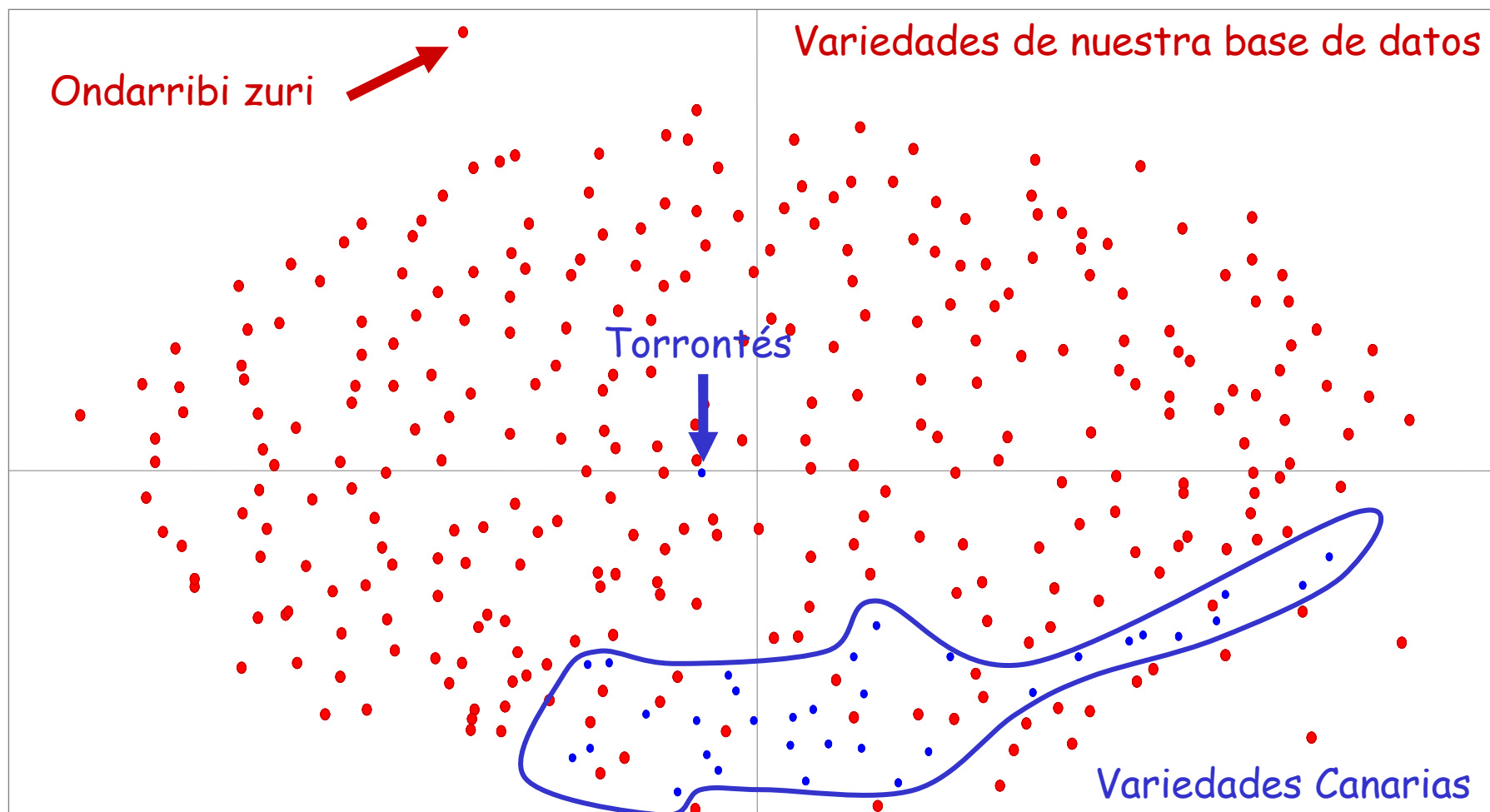
Variedades Canarias; Resultados preliminares

- Se presentan los resultados de solo 34 Variedades Canarias del total de 66. Se está finalizando los análisis del resto.
- Se presentan los resultados con 14 Microsatelites. Se está finalizando los análisis con 5 microsatelites más.
- El conjunto de la información equivale a una matriz de 66 filas por 38 columnas (2508 items) que si se amplia al total de la base de datos equivaldría a 404 filas por 38 columnas (15.352 items).
- Es evidente que el análisis detallado de los resultados requiere tiempo y que por tanto los resultados que hoy se presentan deben ser considerados como PRELIMINARES.

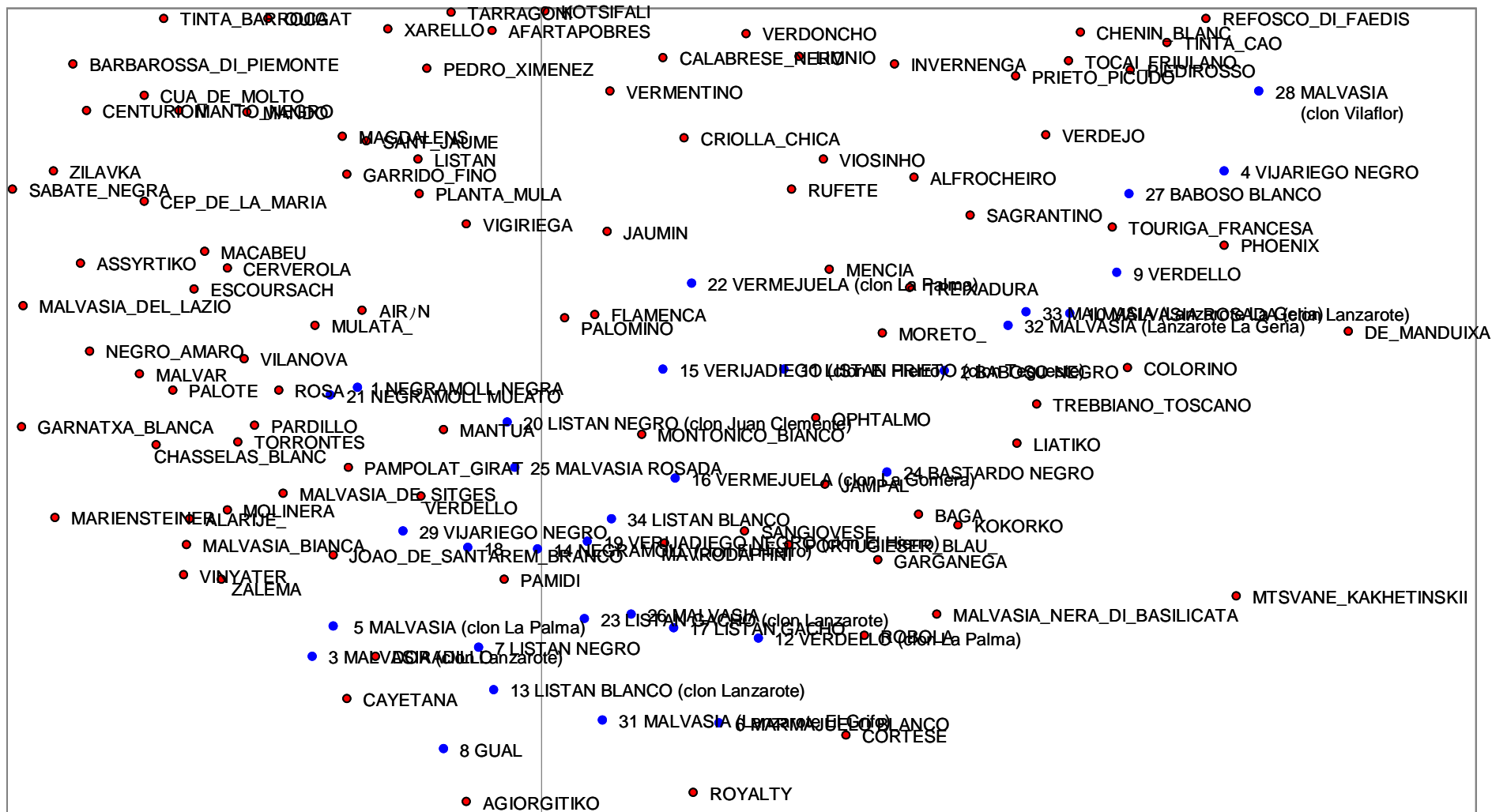
El conjunto de variedades



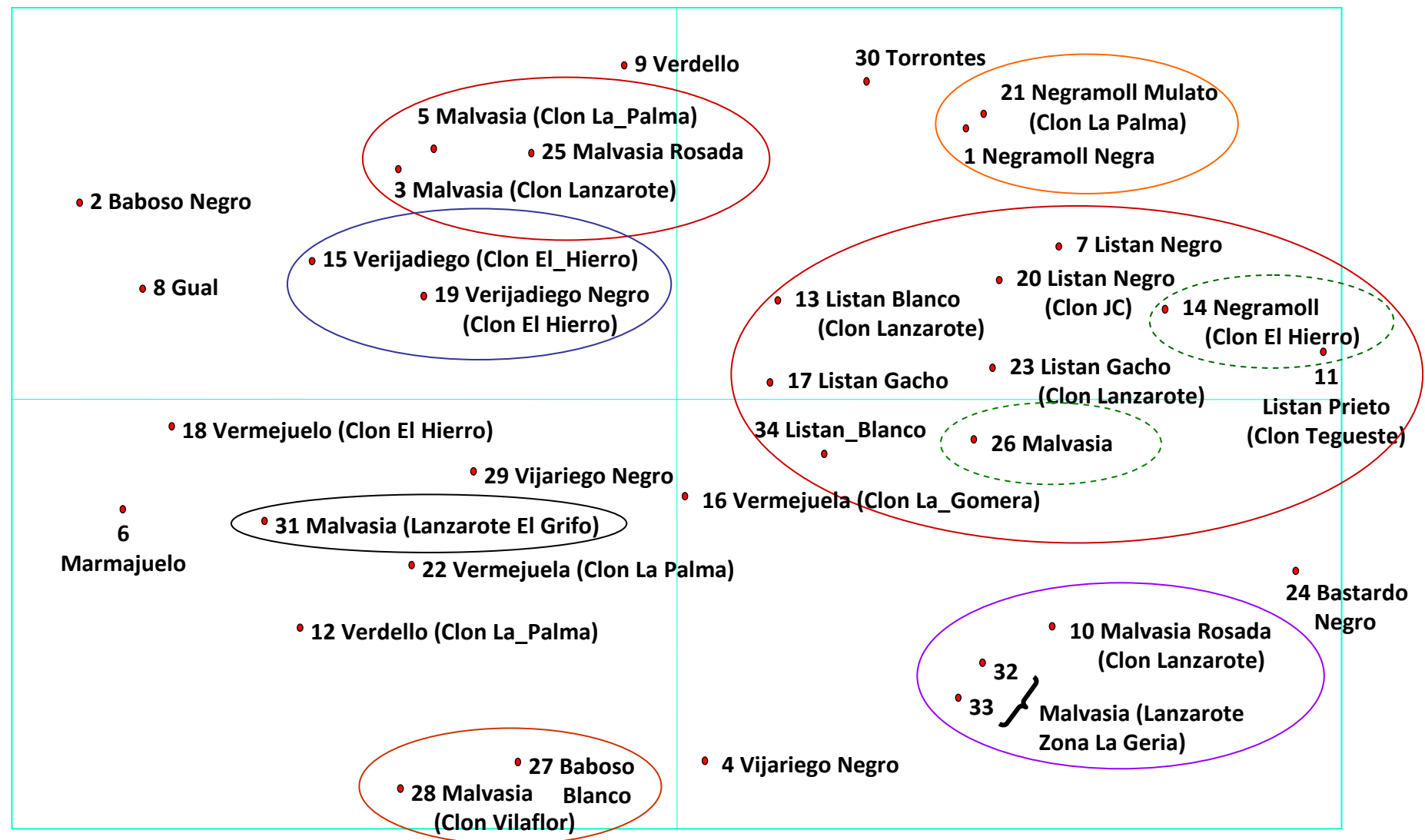
Comparación de las variedades canarias con las del resto del mundo



Ampliación de la zona de las variedades canarias



Análisis preliminar del germoplasma canario



Posibles sinonimias

Torrontés = Alicante = Chelva

Muestra	Origen de la muestra	ZAG47		ZAG21		UCH11		ZAG62		SCU6		ZAG83		ZAG64	
Alicantí	España peninsular	156	164	198	204	238	240	186	202	171	175	195	195	133	157
Chelva	España peninsular	156	164	198	204	238	240	186	202	171	175	195	195	133	157
Torrontés	Canarias	156	164	198	204	238	240	186	202	163	163	195	195	133	157

Muestra	Origen de la muestra	VVMD28		VVS29		UCH19		VVMD36		VVS2		VVMD6		VVMD7	
Alicantí	España peninsular	241	255	169	169	191	191	259	259	131	139	204	206	240	246
Chelva	España peninsular	241	255	169	169	191	191	259	259	131	139	206	206	240	246
Torrontés	Canarias	241	255	169	169	191	191	259	259	131	139	204	206	240	246

Posibles sinonimias

Baboso negro = Alfrocheiro preto

Otras sinonimias: Tinta Bastardinha y Tinta Francesa

Muestra	Origen de la muestra	ZAG47		ZAG21		UCH11		ZAG62		SCU6		ZAG83		ZAG64	
Alfrocheiro	Portugal	154	164	198	200	238	244	186	198	171	173	189	195	135	137
Baboso Negro	Canarias	154	164	198	200	238	244	186	198	162	162	189	195	135	137

Muestra	Origen de la muestra	VVMD28		VVS29		UCH19		VVMD36		VVS2		VVMD6		VVMD7	
Alfrocheiro	Portugal	233	245	169	169	191	203	249	267	139	148	197	204	250	254
Baboso Negro	Canarias	233	255	169	169	191	203	249	267	139	148	197	204	250	254

El Alfrocheiro preto

Alfrocheiro Preto é uma casta portuguesa, com certeza! Tem bastante açúcar e casca escura, o que deixa o vinho com alto teor alcoólico e cor concentrada. Muito boa para cortes com uvas mais leves. Também é chamada de Tinta Bastardinha ou Tinta Francesa de Viseu. Os aromas são de amoras, cassis, morango, menta, canela, cravo (madeira), pimenta preta e flores silvestres. Possui um equilíbrio excelente entre acidez e açúcar

El Alfrocheiro Preto es una variedad Portuguesa. Tiene bastante azúcar y una piel oscura lo que origina vinos de muy alto grado alcohólico y color concentrado. Muy buena para cupages con uvas ligeras. También se la llama Tinta Bastardinha o Tinta Francesa de Viseu. Sus aromas son moras, cassis, morango, menta, canela, clavo (cuando pasa por maderera), pimienta y flores silvestres. Posee un excelente equilibrio entre acidez y azúcar.

Según Jorge Zerolo el Baboso es una sinonimia del Albarin Negro

Pero Félix Cabello amplía las sinonimias a las siguientes variedades: Alfrocheiro Preto (Portugal), Bruñal (Zaragoza), Caiño Gordo (Pontevedra) y Tinta Francesa (Portugal).

Baboso



Alfrocheiro Preto



Posibles sinonimias

Listan Blanco = Palomino

Muestra	Origen de la muestra	ZAG47		ZAG21		UCH11		ZAG62		SCU6		ZAG83		ZAG64	
Palomino	España peninsular	156	156	198	204	238	242	186	192	162	162	191	195	139	139
Listan Blanco	Canarias	156	156	198	204	238	242	186	192	162	162	191	195	139	157

Muestra	Origen de la muestra	VVMD28		VVS29		UCH19		VVMD36		VVS2		VVMD6		VVMD7	
Palomino	España peninsular	241	245	169	169	191	191	263	267	139	139	204	204	236	246
Listan Blanco	Canarias	241	245	169	169	191	191	263	267	129	139	204	204	236	246

Posibles sinonimias

Negramoll Negra = Negramoll Mulata = Mulata

Muestra	Origen de la muestra	ZAG47		ZAG21		UCH11		ZAG62		SCU6		ZAG83		ZAG64	
Mulata	Portugal	156	156	198	204	238	240	186	194	163	175	195	195	133	139
Negramoll Negra	Canarias	156	156	198	204	238	240	186	194	163	163	195	195	133	139
Negramoll Mulato (clon La Palma)	Canarias	156	156	198	204	238	240	186	194	163	163	195	195	133	139

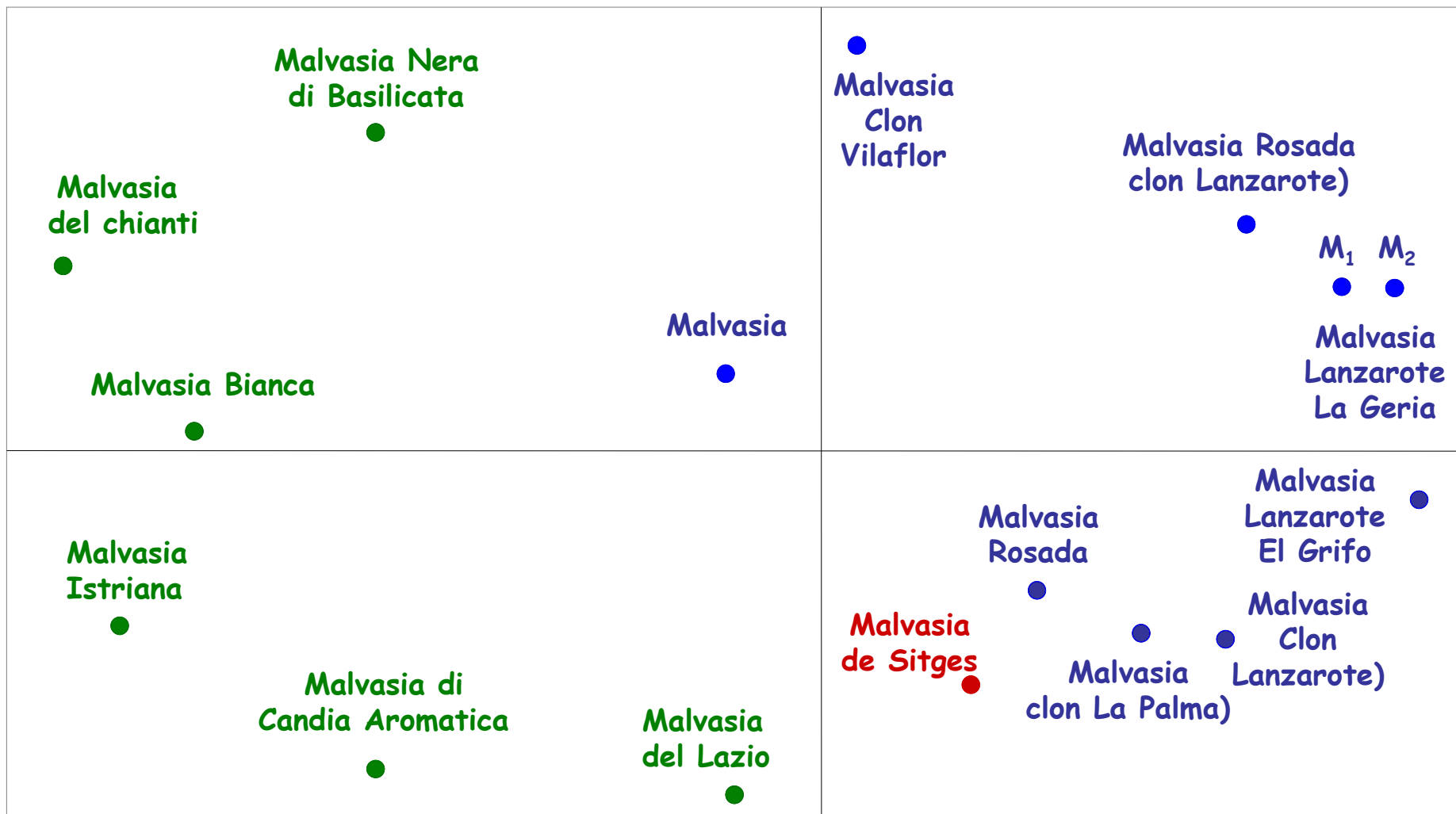
Muestra	Origen de la muestra	VVMD28		VVS29		UCH19		VVMD36		VVS2		VVMD6		VVMD7	
Mulata	Portugal	241	255	169	169	191	191	259	263	139	141	187	204	236	236
Negramoll Negra	Canarias	241	255	169	169	191	191	259	263	139	141	188	204	236	236
Negramoll Mulato (clon La Palma)	Canarias	241	255	169	169	191	191	259	263	193	141	187	204	236	236

El caso de las Malvasias

Muestra	Origen	ZAG47		ZAG21		UCH11		ZAG62		SCU6		ZAG83		ZAG64	
de Sitges	España peninsular	154	158	204	212	238	240	186	200	175	175	195	195	133	139
Clon La Palma	Canarias	154	158	204	212	238	240	186	200	162	162	195	195	133	139
Rosada	Canarias	154	158	204	212	238	240	192	202	162	162	195	195	133	139
Clon Lanzarote	Canarias	154	158	204	212	238	240	186	186	162	162	195	195	133	139
Lanzarote La Geria	Canarias	156	156	198	204	238	240	192	202	164	164	191	201	133	135
Clon Vilaflor)	Canarias	154	164	198	202	238	242	184	192	163	163	193	203	133	161
Baboso Blanco	Canarias	154	164	198	202	238	242	184	192	164	164	191	201	133	161

Muestra	Origen	VVMD28		VVS29		UCH19		VVMD36		VVS2		VVMD6		VVMD7	
de Sitges	España peninsular	233	255	169	177	191	191	249	259	139	141	187	204	240	246
Clon La Palma	Canarias	233	255	169	169	191	191	249	259	139	141	186	204	240	240
Rosada	Canarias	233	255	169	169	191	191	249	259	139	141	187	204	240	246
Clon Lanzarote	Canarias	233	255	169	169	191	191	249	259	141	141	186	204	240	240
Lanzarote La Geria	Canarias	263	263	169	169	191	197	259	289	129	139	197	204	240	240
Clon Vilaflor)	Canarias	233	243	169	169	197	203	249	249	129	148	204	204	234	244
Baboso Blanco	Canarias	233	243	169	169	197	203	249	249	129	148	204	204	236	252

Las Malvasias



En este trabajo han participado:

Catalina Baig
Gemma Marsal
Josep M^a Mateo
Francesca Fort



Muchas
gracias por
su atención