

Vitivinicultura del Siglo XXI: Selección Clonal y Limpieza de Virus en el cv. Carménère.



Figura 1

La disponibilidad de material de propagación vitícola de buena calidad, sanidad y características genéticas sobresalientes es hoy en día un requisito fundamental para tener una industria vitivinícola moderna, competitiva, exitosa y con liderazgo en los mercados. La Pontificia Universidad Católica de Chile, como parte del Programa de Selección Clonal de Vides desarrolla el proyecto COPEC-UC: "Selección Clonal y Sanitaria del cv. Carménère en Chile", orientado a la obtención de clones de Carménère certificados. Con ello, el país podrá contar con el primer material certificado de este cultivar.

Doris Prehn, Armando Azúa, Claudio Lillo, Berta Puebla
y Jorge Pérez-Harvey
dprehn@uc.cl, joperez@uc.cl

Antecedentes del cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera*

La micropropagación *in vitro* de *Vitis vinifera* es una herramienta deseable para la incorporación de material de propagación en el desarrollo de programas de certificación. Esta técnica, aplicada al cultivar Carménère, es desarrollada actualmente por investigadores de los Laboratorios de Fisiología Frutal y Biotecnología de la Facultad.

El cultivo *in vitro* se define como la propagación de plantas, sus órganos, tejidos o células en un medio artificial controlado usando técnicas de asepsia y medios de crecimiento de composición nutricional y hormonal conocida. La micropropagación se refiere a la

multiplicación vegetativa *in vitro* de plantas a partir de meristemas apicales o tejidos nodales que resulta en la proliferación acelerada de brotes en los subcultivos siguientes. Además, permite multiplicar plantas a gran escala en espacios reducidos, permitiendo entre otros, la caracterización y rápida obtención de clones específicos y la limpieza de material valioso infectado, con patógenos como virus y fitoplasmas. El cultivo *in vitro* se inicia usualmente con una pequeña porción de la planta o explante, el que es removido, esterilizado superficialmente y colocado en un medio de cultivo. A medida que crece, este explante es subdividido

y subcultivado lo que logra la efectiva multiplicación del material inicial.

Cultivo *in vitro* de Carménère

La investigación se inició con material tomado del Bloque de Selección Clonal PUC

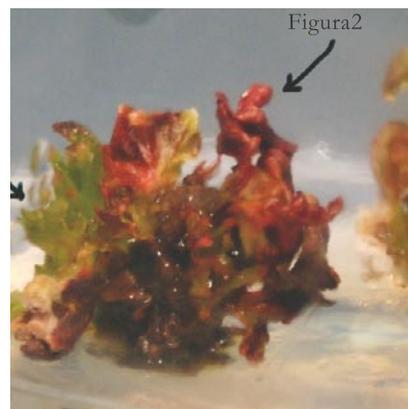


Figura 2

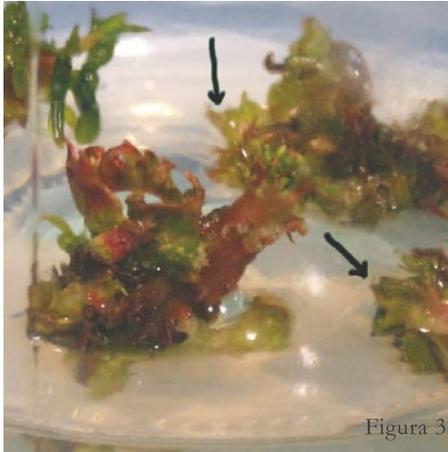


Figura 3

(figura 1), proveniente de antiguos viñedos de la zona centro sur del país.

El material está establecido en el Campo de Experimentación de COPEVAL S. A., en San Fernando. Estos clones son el resultado del proyecto FDI-CORFO "Mejoramiento de la Calidad del Material de Propagación del Viñedo Chileno: Plantas Libres de Virus y Portainjertos Resistentes a Filoxera y Nemátodos". La búsqueda se materializó en la individualización de 14 clones del cultivar Carménère, los que forman parte de un Bloque Fundación, el que cuenta además con 80 potenciales clones de 12 variedades.

El cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera* ha sido realizado con éxito por otros investigadores. Sin embargo, existe suficiente variabilidad entre los cultivares. Un medio para el cultivo *in vitro* eficiente para la multiplicación de la variedad Cabernet sauvignon o Merlot no

necesariamente ha de funcionar para la variedad Carménère.

Optimización de protocolos de micropropagación

Carménère es particularmente sensible a las condiciones que han de enfrentar los tejidos vegetales *in vitro*. Este estrés se manifestó como una detención en

el crecimiento de brotes y en un marcado desarrollo de pigmentación rojiza (figura 2). En un inicio, los tejidos fueron afectados por un fenómeno llamado hiper-hidricidad (vitrificación), desorden fisiológico que otorga un aspecto de vidrio al material vegetal provocando una detención del crecimiento (figura 3).

Según la literatura, la vitrificación se atribuye a un desbalance osmótico de los tejidos afectados, produciéndose una entrada excesiva de agua. Entre las causas posibles se mencionan: a) bajo potencial

mátrico del medio de cultivo; b) baja intensidad lumínica; y c) alto nivel de humedad del aire.

El problema de la vitrificación fue solucionado modificando los componentes del medio que influyen en una disponibilidad equilibrada de agua para la planta. A continuación se abordó el punto del crecimiento estancado de brotes y el desarrollo anormal de pigmentación rojiza.

Antecedentes previos indican que la aparición de pigmentos rojizos en tejidos vegetales cultivados *in vitro* resultan de una sobre expresión de antocianos, como producto de problemas de estrés oxidativo originados por la composición nutricional y hormonal del medio.

La falta de elongación de brotes sería causada por un factor nutricional limitante, lo que origina una competencia entre brotes, provocando la coexistencia de brotes verdes y rojizos, observándose en estos últimos entrenudos cortos o inexistentes y nula expansión de las láminas foliares (figura 2).

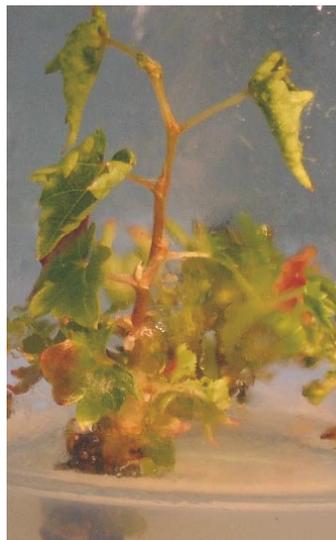


Figura 4



Figura 5

Luego de descartar otras causas de estrés, como el efecto de la temperatura y los niveles de luminosidad, se modificó la composición del medio de cultivo con el fin de potenciar aquellos elementos del sistema natural antioxidante. Esto se realizó mediante la incorporación de aminoácidos y otros elementos que permitieron a los tejidos disponer de una fuente elevada de nutrientes para combatir con éxito los problemas de estrés oxidativo, a través de una activación del metabolismo.

Además, se agregó hidroxiquinoleína y compuestos antioxidantes al medio de cultivo. Con estas modificaciones, se

solucionaron los problemas de pigmentación rojiza y la nula elongación de brotes, obteniéndose plantas de crecimiento normal (figura 4).

Actualmente se está realizando la rizogénesis (figura 5) y el traspaso a sustrato perlita:turba (1:1) de estas plantas. Esta técnica permite obtener a partir del material del Banco de Germoplasma *in vitro* (figura 6) vides completamente desarrolladas (figura 8).

Obtención de plantas libres de virus

En Chile a la fecha se ha informado de 24 virus y 4 fitoplasmas que infectan las vides. Sus efectos van desde síntomas suaves hasta enfermedades severas.

En prospecciones recientes, se ha detectado en Chile, que un 84% de las muestras de los viñedos analizados tienen presencia de los virus *Tomato ringspot virus*-ToRSV, *Grapevine fan leaf virus*-GFLV y *Grapevine leaf roll associated virus*- GLRaV.

En el caso de Carménère, en el 2002, se detectó por ELISA (enzyme linked inmuno-sorbent assay) el closterovirus, *Grapevine leaf roll assoc. virus 3* -GLRaV-3 (figura 7) con una incidencia de 7,1 %. En el mismo año se informó de la presencia de *Rupestris stem pitting associated virus* -RSPaV- en vides

en Chile. Considerando lo anterior en el 2004 se empleó la técnica de diagnóstico molecular RT-PCR (transcription reverse of polymerase chain reaction) para detectar RSPaV en las selecciones clonales de Carménère. Los resultados indicaron un 57,1% de clones afectados. Del total del material analizado un 7,1% presentó infección por dos virus (GLRaV-3 + RSPaV). **El material infectado esta siendo sometido a termoterapia y posterior cultivo de meristemas.**

El laboratorio de Fisiología Frutal cuenta con las capacidades para la detección de virus por las técnicas serológicas DAS o DASI ELISA y RT-PCR de un amplio espectro de virus presentes en Chile. Esto permite detectar aquellas plantas infectadas con virus presentes en el programa y además ofrecer estos análisis como servicio a la comunidad.

Los virus detectados en el cv. Carménère, GLRaV-3 y RSPaV se diseminan principalmente por el uso de material de propagación infectado, único mecanismo de diseminación citado hasta ahora para RSPaV; y por medio de algunos insectos vectores, donde experimentalmente se ha comprobado la transmisión de GLRaV-3 como: *Pseudococcus viburni*, *Ps. calceolariae*, *Ps. longispinus*, *Planococcus citri* y *Pl. ficus* citados todos excepto *Pulvinaria vitis* para Chile. En este aspecto se está considerando realizar pruebas de detección y transmisión del GLRaV-3 en los vectores citados.

El trabajo en marcha indica que plantas infectadas con GLRaV-3 maduran 30 a 45 días después y las bayas presentan menores porcentajes de azúcar que plantas sanas. Además, los



Figura 6

vinos producidos por estas plantas son identificados por un panel de expertos como de menor calidad global, especialmente en aspectos como intensidad de color. Por esto, se inició un programa de limpieza de plantas de vid infectadas con estos patógenos utilizando las **técnicas de termoterapia** combinada con el cultivo de meristemas. En esta metodología, se someten las plantas a altas temperaturas (38 a 42 °C) por un período prolongado (90 a 150 días). Esto favorecería el metabolismo de la planta en desmedro del viral, permitiendo que las capas celulares más externas del meristema apical no presenten partículas virales. Este "domo apical", tejido de tamaño no mayor de 0,4 mm, es escindido bajo microscopio estereoscópico y cultivado *in vitro* para posteriormente regenerar una planta completa libre de virus.

Modificación genética de *Vitis vinifera*

El establecimiento de los procedimientos básicos de micropropagación *in vitro* de Carménère ha permitido iniciar también el estudio de metodologías para la transformación genética de *Vitis vinifera*.

La modificación genética de vides es una alternativa atractiva ya que potencialmente sobrepasa las restricciones del mejoramiento tradicional. Esto, porque permite la incorporación de genes específicos en forma directa a

los cultivares de elite conservando intactas el resto de sus cualidades. La transformación estable de plantas generalmente se realiza a través de la inserción del gen foráneo en el genoma nuclear o, en algunos casos, en el genoma del cloroplasto. La transformación puede efectuarse utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística, o ciertos



Figura 7

virus de plantas.

Con el fin de establecer una metodología que permita la incorporación de un gen de interés agronómico, en nuestro laboratorio se introducirán diversos genes reporteros como proteína fluorescente amarilla y luciferasa, entre otros. Estos genes, junto con los genes de resistencia a antibióticos, permitirán establecer los protocolos básicos de transformación de *Vitis vinifera*. Esto le permitirá a la planta contar con resistencia a plagas o enfermedades o adaptarse a

condiciones restrictivas del ambiente, desarrollando tolerancia a condiciones de estrés hídrico, salino o térmico.

El establecimiento de los protocolos de modificación genética también permitirá abordar diversos temas en la investigación básica de la fisiología de vides.

Certificación de Carménère

Con el trabajo realizado, Chile podrá contar con material incorporado al Programa de Certificación de Material de Propagación de *Vitis spp.* dirigido por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG, 2003) para en un futuro cercano disponer de clones certificados del cv. Carménère.

Los esfuerzos siguientes estarán orientados a la incorporación de nuevos clones del cultivar a la Selección Clonal PUC, para así mantener la diversidad, así como la incorporación de otros cultivares de importancia como: Cabernet sauvignon, Cabernet franc, Cot y Merlot, contribuyendo así al desarrollo de una viticultura del siglo XXI para Chile.



Figura 8