

CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA DE DIFERENTES VARIEDADES Y CLONES DE VID (*Vitis vinifera* L.), Y POSIBLE RELACIÓN ENTRE ESTOS ASPECTOS Y DETERMINADAS CARACTERÍSTICAS AMPELOGRÁFICAS, AGRONÓMICAS Y DE RESISTENCIA A MILDIU

Alonso-Villaverde, V.; Boso, S.; Gago, P. y Martínez M.C.

Misión Biológica de Galicia (CSIC), Apartado de correos 28, 36080 Pontevedra, Spain

Tel. +34986854800; Fax. +34986841362; e-mail <vavi@mbg.cesga.es>

RESUMEN

Estudios previos realizados en la Misión Biológica de Galicia (CSIC), han permitido caracterizar y diferenciar a nivel ampelográfico, agronómico, molecular y en cuanto al nivel de resistencia a Mildiu, diferentes variedades de vid y clones del cultivar Albariño (*Vitis vinifera* L.)

A partir de estos estudios se inicia el presente trabajo para intentar relacionar dichas diferencias ampelográficas, agronómicas y de resistencia a Mildiu con posibles diferencias a nivel histológico y anatómico.

INTRODUCCIÓN

Estudios previos realizados en la Misión Biológica de Galicia (CSIC), han permitido caracterizar y diferenciar a nivel ampelográfico, agronómico y molecular diferentes variedades de vid (Martínez y Pérez, 1999; Santiago et al., 2005). También a nivel ampelográfico y agronómico hemos diferenciado clones pertenecientes a la variedad Albariño (Boso et al., 2004a), e incluso se ha podido demostrar (en campo y laboratorio) que entre algunos de estos clones existen diferencias en cuanto al nivel de resistencia a Mildiu (Boso et al., 2004b).

Basándonos en que posiblemente algunas de las diferencias agronómicas y ampelográficas entre variedades y clones a nivel macroscópico, están ligadas a diferencias a nivel microscópico (histológico), y en los estudios realizados por diversos autores (Gabler, 2003; Bessis et al., 2002; Jeandet y Bessis, 1989) que apuntaban que la resistencia a enfermedades criptogámicas, entre las variedades y clones, podría venir marcada por ciertas diferencias a nivel anatómico (longitud de los entrenudos del pámpano, estructura del raquis en el racimo, etc.) e histológico (grosor de la hoja, grosor y estructura de los diferentes tejidos que forman parte de la hoja, número de estomas, densidad y tipo de pelos en el haz y envés de la hoja, estructura de la epidermis de la baya, etc.), se emprendió un estudio en esta dirección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se estudiaron dos cultivares conocidos y ampliamente utilizados a nivel internacional: Alicante Bouschett y Cabernet Sauvignon. Además se estudiaron otros dos de interés en el Noroeste de

España: Caíño Tinto y Albariño. De este último se incluyeron en el estudio dos clones diferentes: el Albariño CSIC-9, que según los datos de que disponemos es el más sensible a Mildiu, y el Albariño CSIC-3 que es el más resistente.

Todas las plantas objeto de estudio se encuentran plantadas en la parcela experimental de la Misión Biológica de Galicia (CSIC), en espaldera y con poda Sylvoz. Todas tienen la misma edad y han sido sometidas a idénticas prácticas de cultivo.

Toma de muestras

Entre el cuajado y el envero, se realizó el muestreo de la hoja adulta. En cinco cepas de cada cultivar y clon, y cuando la mayoría de los pámpanos habían desarrollado entre 12 y 14 entrenudos, se recogió la 8ª hoja contando desde la base de un pámpano fértil. De cada una de estas hojas, de la zona del limbo próxima al seno peciolar y comprendida entre los nervios L y L1, se cortó una muestra de forma rectangular, de un tamaño aproximado de 0,3x1 cm, y se fijó con F.A.A. conservándose en nevera ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) hasta su inclusión en parafina (Jensen, 1962). Posteriormente se realizaron cortes con microtomo rotatorio (Leica RM2235), se tiñeron y se montaron las preparaciones definitivas para su observación a microscopio óptico (Jensen, 1962) y se realizaron fotografías de cada una de ellas.

Antes de la maduración, se realizó otro muestreo de hoja adulta. Se recogió la 7ª hoja contando desde la base de un pámpano fértil por cada cinco cepas por variedad y clon. De cada una de estas hojas se obtuvo la impronta (método D'Ambrogio de Argüeso, 1986), tanto del haz como del envés, con forma cuadrada y de tamaño aproximado de 1x1 cm, de la zona del limbo próxima al seno peciolar y comprendida entre los nervios L y L1. Cada una de las muestras se conservaron en sobres de aluminio, para su posterior observación al microscopio.

En la maduración (septiembre-octubre), se procedió al muestreo de racimos. Se recogió un racimo representativo por cada cepa, por cada cultivar o clon. Posteriormente se le quitaron todas las bayas y se prensaron los raspones, para el posterior estudio de su morfología, tamaño, etc.

Parámetros medidos

- Número de estomas: En las improntas de los 10 fragmentos de hoja de cada uno de los cultivares o clones, se procedió a la observación a microscopio óptico de campo claro (Nikon Eclipse E200) a 10x, para el posterior recuento de los estomas. Para ello, se montó una preparación en fresco con agua destilada y cada una de las improntas. Se realizaron 2 fotografías por impronta, de 2 zonas distintas dentro de la misma, con cámara digital Nikon Coolpix 990 acoplada al microscopio. Esas fotografías posteriormente se volcaron en el ordenador y se procedió al recuento de los estomas en cada fotografía a través del procesador de imágenes (AnalySIS Five).

- Tamaño y estructura del raspón: Cada uno de los raspones por cultivar o clon, se fotografió para con ayuda de una Nikon Coolpix 990, con objeto de poder comparar las estructuras de unos y otros. En cada uno de ellos se midió la longitud del pedúnculo, largo y ancho del racimo. También se midió la longitud de 50 pedicelos seleccionados al azar entre los raspones por variedad o clon.

Análisis estadísticos

Cada uno de los parámetros (número de estomas, longitud del pedúnculo, ancho y largo de los raspones y longitud de los pedicelos), por separado, se sometió a un análisis de varianza, para comprobar si había diferencia significativa entre los cultivares y clones. Todos los parámetros que en el análisis de varianza mostraron una F significativa, se sometieron a la prueba de la

mínima diferencia significativa (MDS) protegida de Fisher. (SAS System software, versión 9.1.2.).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

A partir de los análisis de varianza realizados para todos los parámetros, se observaron diferencias significativas al 99,9% para todos, excepto para el *ancho de raspón*, donde se observaron diferencias significativas al 99% (Tabla 1).

Variable	g.l.	C.M.
Nº estomas	4	4749.930***
Longitud pedúnculo	4	1393.874***
Largo raspón	4	8095.617***
Ancho raspón	4	6238.874**
Longitud pedicelos	4	21.710***

Tabla 1: Cuadrados medios del análisis de varianza realizado para las diferentes variedades y clones de estudio. **g.l.:** grados de libertad; **C.M.:** cuadrados medios; ***, **: nivel de significación del 0.001 y 0.01.

En el caso del número de estomas, el clon Albariño CSIC-9 presentó el mayor número, mientras que el menor correspondió al Caíño Tinto, seguido del clon Albariño CSIC-3 (Tabla 2). Estos datos se pueden relacionar con los obtenidos en el estudio de resistencia a Mildiu en los mismos clones de Albariño, en campo y laboratorio (Boso et al., 2004b). Así el clon más resistente fue también el que presentó una menor densidad de estomas y el más sensible el que presentó una densidad menor. Los estomas son una de las vías de entrada del hongo, y estos resultados podrían corroborar la hipótesis de que la resistencia a enfermedades criptogámicas, entre las variedades y clones, puede venir marcada por ciertas diferencias a nivel anatómico (Gabler, 2003; Bessis et al., 2002; Jeandet y Bessis, 1989) o histológico.

Variedad/Clon	Valores medios
Albariño CSIC-9	146.900 a*
Alicante Bouschett	140.200 ab
Cabernet Sauvignon	125.000 bc
Albariño CSIC-3	121.400 c
Caíño Tinto	90.700 d
MDS (0.05)	16.046

Tabla 2: Valores medios y mínima diferencia significativa (MDS) para el número de estomas de las diferentes variedades y clones de estudio. *Las medias seguidas por la misma letra, para cada columna y cada carácter, no difieren significativamente.

En el caso de la longitud del pedúnculo de los raspones, se observó que la variedad Caíño Tinto presentó la mayor longitud de pedúnculo y Cabernet Sauvignon la menor (Tabla3).

Tabla 3: Valores medios y mínima diferencia significativa (MDS) para los diferentes parámetros evaluados en las variedades y clones de estudio.

Variedad/Clon	Longitud pedúnculo	Largo raspón	Ancho raspón	Longitud pedicelos
Albariño CSIC-3	17.000 bc*	105.000 bc	119.330 ab	5.070
Albariño CSIC-9	27.714 bc	120.140 b	104.00 bc	6.340
Alicante Bouschett	30.250 b	166.000 a	146.380 a	4.830
Cabernet Sauvignon	15.313 c	152.750 a	84.000 c	6.170
Caíño Tinto	49.000 a	88.750 c	76.500 c	5.210
MDS (0.05)	13.304	27.580	35.213	0.407

*Las medias seguidas por la misma letra, para cada columna y cada carácter, no difieren significativamente.

Para largo y ancho de racimo, se observó que la variedad Alicante Bouschett presentó un mayor valor para ambos parámetros, mientras que Caíño Tinto presentó el menor (Tabla 3). Los clones de Albariño presentaron un valor intermedio y no hubo diferencia significativa

entre ellos. Este es un parámetro que tendrá que ser estudiado más a fondo, ya que podría estar relacionado con el nivel de compactación del racimo y a su vez con la aparición de un microclima óptimo para el establecimiento del hongo

En el caso de la longitud de los pedicelos la diferencia fue significativa para el clon Albariño CSIC-9 y Cabernet Sauvignon, presentando el mayor valor, con respecto a Alicante Bouschett, el clon Albariño CSIC-3 y Caíño Tinto (Tabla 3). En este caso los resultados contradicen la hipótesis de que a menor longitud del pedicelo, mayor grado de compactación del racimo y mejores condiciones para el desarrollo del hongo, puesto que el clon CSIC-9 es más sensible a Mildiu (Boso et al., 2004b).

A nivel histológico, aparentemente se observan diferencias en cuanto al grosor del limbo y de las diferentes capas celulares de las hojas, en las diferentes variedades y clones de Albariño. Esto podría estar relacionado con la mayor o menor capacidad de penetración del hongo y a su vez, con el nivel de resistencia a Mildiu propio de cada variedad o clon. Será necesario por lo tanto, profundizar y continuar con este estudio para poder establecer unas conclusiones definitivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bessis, R., Douillet, A. C., Adrian, M., Jeandet, P., Joubert, J. M., 2002. Stratégies d'utilisation des défenses naturelles de la vigne vis-à-vis des champignons parasites et notamment Botrytis cinerea, Bulletin de l'OIV, 853-854: 145-156.
- Boso, S., Santiago, J. L., Martínez, M. C., 2004a. Intravarietal agronomic variability in the cv. Albariño (*Vitis vinifera* L.), American Journal of Enology and Viticulture, 55 (3), 279-282.
- Boso, S., Santiago, J. L., Martínez, M. C., 2004b. Resistance of eight different clones of the grape cultivar Albariño to *Plasmopara viticola*, Plant Disease, 88 (7), 741-744.
- D'Ambrogio de Argüeso, A., 1986. Manual de técnicas en histología vegetal, Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Gabler, F. M., Smilanik, J. L., Mansour, M., Rammning, D. W., Mackey, B. E., 2003. Correlations of morphological, anatomical and chemical features of grape berries with resistance to Botrytis cinerea, Phytopathology, 93, 1263-1273.
- Jeandet, P., Bessis, R., 1989. Une réflexion sur les mécanismes morphologiques et biochimiques de l'interaction vigne-Botrytis, Bulletin de l'OIV, 62, 637-657.
- Jensen, W.A., 1962. Botanical Histochemistry. Principles and Practice, W.H. Freeman and Co., San Francisco, London.
- Martínez, M.C. y Pérez, J. E., 1999. La vid en el occidente del principado de Asturias. Descripción ampelográfica de las variedades, Departamento de Publicaciones del CSIC, Madrid.
- Santiago, J. L., Boso, S., Martín, J. P., Ortiz, J. M., Martínez, M. C., 2005. Characterization and identification of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from northwestern Spain using microsatellite markers and ampelometric methods, Vitis, 44 (2), 67-72.
- SAS System software, versión 9.1.2, 2004. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.