

Revelando el origen de la variedad de vid 'Bonarda' cultivada en Argentina a través del empleo de marcadores moleculares microsatélites ¹

Unraveling the origin of the cultivar 'Bonarda' in Argentina using microsatellite molecular markers

María Inés de Rosas ²

Cecilia B. Agüero ^{2,3}

Liliana Martínez ²

Originales: Recepción: 18/02/2009 - Aceptación: 19/05/2009

RESUMEN

'Bonarda' es una variedad de vid que en Argentina se cultiva principalmente en las provincias de Mendoza y San Juan, representa el segundo cepaje tinto en superficie nacional cultivada y es considerada con gran potencial para la elaboración de vinos tintos de alta calidad. Existe incertidumbre respecto a su origen en el país. La descripción ampelográfica de la 'Bonarda' cultivada en Argentina remarca gran nivel de similitud con la variedad italiana 'Bonarda Piemontesa' y con la variedad francesa 'Corbeau'. En un trabajo previo, basado en el uso de marcadores moleculares, se demostró que 'Bonarda' se diferencia de 'Bonarda Piemontesa' y es idéntica a 'Corbeau'. El objetivo de este trabajo fue confirmar la identidad de esta variedad empleando un gran número de loci microsatélites de tal manera de cubrir -en lo posible- la mayor parte del genoma. Se analizaron 17 accesiones de 'Bonardas' procedentes de distintos puntos geográficos de las provincias de Mendoza y San Juan, y de la variedad francesa 'Corbeau'. Para las reacciones de PCR se usaron 13 loci microsatélites. Todas las accesiones de 'Bonarda' fueron idénticas entre sí e idénticas a la variedad francesa Corbeau, por lo que se

ABSTRACT

'Bonarda' is the second most cultivated red variety in Argentina, mainly in the provinces of Mendoza and San Juan. In the past few years it has been valued for its great potential for the production of high quality wines. The origin of this variety was uncertain. The ampelographic description of the Argentine 'Bonarda' shows high level of similarity to the Italian variety 'Bonarda Piemontese,' and the French variety 'Corbeau'. However, recent work using molecular markers has shown that 'Bonarda' differs from 'Bonarda Piedmontese' and is identical to 'Corbeau'. The aim of this study was to confirm the identity of this variety using a larger number of microsatellite loci in such a way to cover, if possible, the entire genome. We analyzed 17 accessions of 'Bonarda' from the provinces of Mendoza and San Juan, Argentina, and the French variety 'Corbeau' with 13 microsatellite loci. All accessions of 'Bonarda' were identical to each other and to the French variety 'Corbeau', confirming that it is the same variety. It is proposed that the variety 'Bonarda' grown in Mendoza and San Juan is called 'Bonarda from Argentina' to distinguish it from the Italian Bonarda, but knowing, with a high confidence level, that corresponds to the noble French variety 'Corbeau'.

1 Trabajo financiado a través de la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la UNCuyo.

2 Dpto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. lmartinez@fca.uncu.edu.ar

3 Department of Viticulture & Enology. University of California. 1162 RMI North - 595 Hilgard Lane. Davis, CA 95616-5270 U.S.A.

concluye que se trata de la misma variedad. Se propone que la variedad 'Bonarda' cultivada en Mendoza y San Juan sea denominada 'Bonarda-Argentina', para diferenciarla de las italianas, pero a sabiendas, con un alto nivel de confianza, que corresponde a la variedad noble francesa 'Corbeau'.

Palabras clave

Vitis vinifera L. • vid • Bonarda Argentina • microsátélites • Corbeau

Keywords

Vitis vinifera L. • grapevine • Bonarda Argentina • microsattellites • Corbeau

INTRODUCCIÓN

La República Argentina es un país del nuevo mundo que ha desarrollado ampliamente su industria vitivinícola. El 92% del total de la superficie argentina cultivada con vid está ubicada en las provincias de Mendoza y San Juan (14). En el decenio 1995-2005 se constató un considerable cambio cualitativo de la superficie implantada, especialmente con variedades tintas, tal como fue el caso de la variedad 'Bonarda'.

Esta variedad ocupa el segundo lugar en superficie cultivada luego de la variedad 'Malbec' (14). La 'Bonarda', tal como se la conoce en el país, es una variedad de antigua data del encepado argentino. Si bien en sus comienzos se la utilizaba mayoritariamente para la elaboración de vinos de mesa y cortes, en los últimos años ha sido revalorizada y es considerada una variedad con potencial para la producción de variedades tintas de alta calidad (19).

Actualmente existe incertidumbre respecto del origen de esta variedad en Argentina. La llegada de inmigrantes españoles, franceses e italianos permitió la introducción de nuevas variedades al país. En algunos casos no se mantuvo el nombre original de la variedad ni existen registros del lugar de procedencia, creando así confusión respecto de la identidad de algunos cepajes. Este podría ser el caso de la 'Bonarda Argentina' ('Bonarda-Arg.') cuya ampelografía presenta similitudes con algunos cultivares de Francia e Italia.

De acuerdo con Rodríguez y Matus (19), se denomina 'Bonarda' una familia de variedades cultivadas en el Piemonte Italiano. Dalmaso *et al.* (8, 9, 10) consideran dos cepajes: 'Bonarda Piemontesa' y 'Bonarda di Gattinara' (o di Cavaglia), esta última correspondería a las variedades 'Croatina' y 'Uva Rara'. Sin embargo, Schneider y Mannini (20) señalan que 'Bonarda Piemontesa', 'Croatina' y 'Uva Rara' son variedades diferentes, llamadas genéricamente 'Bonardas' y describen en detalle la ampelografía de los tres cepajes. Es posible que en el pasado, inmigrantes provenientes del Piemonte Italiano hayan introducido y difundido en Argentina algunas de estas variedades, bajo el nombre de 'Bonarda'. La ampelografía de la 'Bonarda' cultivada en la región de Cuyo (Bonarda-Arg.) fue descrita originalmente por Alcalde (1) quien remarcó la gran similitud morfológica entre 'Bonarda-Arg.' y la italiana 'Bonarda Piemontesa' y sugirió que estas dos denominaciones fueran sinónimos de la misma variedad. Por otro lado, Truel (25), en un informe sobre el encepado argentino, postula que la 'Bonarda-Arg.' correspondería a la variedad francesa 'Corbeau',

también conocida como 'Douce Noir', basado en datos morfológicos. Tizio observó una gran similitud ampelográfica entre 'Corbeau' y 'Bonarda-Arg.' durante una visita a distintos viñedos californianos (comunicación personal). Sin embargo, Rodríguez y Matus (19), comparando datos ampelográficos de ambos cepajes, señalaron que hay algunas diferencias morfológicas entre las dos variedades.

Existen diversos métodos para diferenciar variedades de vid. El primero que se utilizó para clasificar variedades de vid fue la ampelografía, basada en la descripción morfológica de la vid. Este método es rápido, de bajo costo y muy útil cuando se trata de diferenciar variedades genéticamente poco relacionadas. Sin embargo, estos marcadores morfológicos son muy influenciados por el ambiente y no permiten diferenciar variedades genéticamente similares (23).

Otro método es el basado en el uso de marcadores bioquímicos o isoenzimáticos los cuales tienen como ventaja la rapidez en la obtención de resultados y su bajo costo; fueron los primeros marcadores bioquímicos empleados para caracterizar cultivares de vid (2). El inconveniente que presentan es el de ser afectados por el ambiente y disponer de escasa cantidad de sistemas isoenzimáticos capaces de diferenciar la gran cantidad de variedades de vid que existen.

Los marcadores moleculares detectan polimorfismo a nivel de ADN, no son afectados por el ambiente y permiten la identificación varietal y, en algunos casos, clonal, en forma precisa; por lo tanto, representan la mejor alternativa para diferenciar variedades genéticamente similares. En vid se han utilizado diversos marcadores moleculares, entre ellos RFLPs (3, 4, 22), RAPDs (26), AFLPs (15) y SSRs (5, 7, 16, 17, 18, 21, 24). Los SSRs son una excelente opción para la determinación de variedades de vid y de hecho es el método de elección en muchos casos, en parte por ser codominantes y multialélicos.

Empleando 8 loci de microsatélites, Martínez *et al.* (18) concluyeron que la variedad de vid 'Bonarda' que se cultiva en Argentina no corresponde a las variedades 'Bonarda Piamontese', 'Croatina' ni 'Uva Rara'; sino a la variedad francesa 'Corbeau'. Las accesiones de 'Bonarda Argentina' utilizadas en dicho trabajo estuvieron restringidas a la colección de variedades de la Estación Experimental Agropecuaria Luján de Cuyo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA - Luján) y a un viñedo comercial de la empresa Peñaflo, ubicado en el departamento de Santa Rosa, Mendoza.

Objetivo

Corroborar que plantas de la variedad 'Bonarda' procedentes de distintas zonas de Mendoza y San Juan comparten la misma identidad y corresponden a la variedad 'Corbeau'. Para ello se analizó un total de diecisiete muestras y se aumentó a trece el número de loci de microsatélites utilizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron hojas jóvenes y sanas, no mayores a 2 cm de largo, de cada planta de *Vitis vinifera* L. de la variedad 'Bonarda' en activo crecimiento durante noviembre y diciembre de 2007.

Se muestrearon dieciséis viñedos comerciales procedentes de distintas regiones vitícolas de la provincia de Mendoza y un viñedo comercial de la provincia de San Juan (tabla 1). Como patrón de referencia se recolectaron hojas de 'Bonarda' de la colección de vid de INTA - Luján y hojas adultas de la variedad francesa 'Corbeau', provenientes de la colección del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Domaine de Vassal, Marseillan, Francia.

Tabla 1. Departamento, porcentaje de hectáreas cultivadas con la variedad 'Bonarda', distrito, empresa y denominación asignada a cada una de las muestras.

Table 1. Department, percentage of hectares planted to 'Bonarda', location, company and denomination assigned to each of the samples.

Departamento/ Provincia	ha * %	Distrito	Productor	Sigla
San Martín	24,79	Chapanay	CARFIN S.C. (Von der Hiede)	BoSMC4
		Nueva California	Vaieretti María del Valle	BoC3
San Rafael	12,59	Cuadro Benegas	Viñas del Golf (Finca Algodón)	BoVA3
		Goudge	Bodegas y Viñedos López Sainz	BoLC5
Lavalle	12,2	Jocolí	Viñas Don Emilio	BoLDE5
		Costa de Araujo	Finca Los Primos	BoLIC3
Rivadavia	12	El Mirador	Sachsy	BoRS2
Santa Rosa	9,1	Villa Santa Rosa	Clement S.A.	BoSC3
		Loma del Chañar	Grupo Peñaflor	BoPF5
Junín	7,22	Medrano	Miriam Inés Moreira de Bertona	BoMB3
Maipú	6,8	Barrancas	Miriam Inés Moreira de Bertona	BoIB3
Tupungato	5,3	Villa Bastías	La Rosita	BoRT4
Luján	3,3	Ugarteche	Agropecuaria Ugarteche	BoLA4
		Drummond	Antonio Fazio S.A.	BoFL5
		Anchoris	Valdearenas Alcázar José Manuel	BoVAJM2
San Carlos	0,4	Eugenio Bustos	Olivos del Pilar S.A.	BoOP3
San Juan	-	Cañada Honda	Viñas del Monte S.A.	BoVM1

* Representa el porcentaje de hectáreas cultivadas con 'Bonarda' por departamento respecto del total de hectáreas cultivadas con 'Bonarda' en Mendoza (15.131,803 ha.).

* Represents the department share of total hectares of 'Bonarda' in Mendoza (15,131.803 ha).

La recolección de muestras de viñedos ubicados en distintas localidades tuvo por objeto obtener un muestreo representativo de toda la provincia. Así la cantidad de muestras tomadas por departamento se ajustó, en lo posible, al porcentaje de hectáreas cultivadas con 'Bonarda' en cada uno de ellos, respecto del total de hectáreas cultivadas con esta variedad en toda la provincia de Mendoza. Dentro de cada departamento, las muestras fueron obtenidas en diferentes distritos, tanto de plantas

conducidas en espaldero como en parral. No fueron muestreados los departamentos con menos del 1,5%, a excepción de San Carlos, del que se tomó sólo una muestra. En todos los casos de viñedos comerciales, la identidad de la variedad 'Bonarda' fue certificada, a través de la descripción de caracteres ampelográficos y registros de inscripción, por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV).

Además se extrajeron muestras de las variedades de vid 'Cabernet Franc', 'Cabernet Sauvignon', 'Chardonnay', 'Chenin', 'Dolcetto', 'Pinot Noir', 'Riesling', 'Sangiovese', 'Sauvignon Blanc', 'Syrah', 'Viognier' y 'Zinfandel' de la colección de INTA - Luján para ser empleadas como referencias.

Luego de la recolección, las hojas fueron colocadas en sobres con papel absorbente en su interior y silica gel hasta el momento de la extracción del ADN. Las hojas obtenidas de la EEA INTA - Luján se conservaron en freezer a -20°C hasta su utilización.

Extracción de ADN

Se realizó, en todos los casos, con el método de extracción de ADN modificado según protocolo basado en Bowers *et al.* (4) de acuerdo con los resultados obtenidos por Fojo (12).

Concentración de ADN

Tanto la medición de la absorbancia como los cálculos de absorbancia 260nm/280nm, concentración de DNA, proteínas y pureza se realizaron usando un espectrofotómetro "GeneQuant RNA/DNA calculador" (Pharmacia Biotech, Biochrom). Para las mediciones se utilizó una cubeta de cuarzo de 5 mm de longitud de camino óptico, y un volumen de 7 µl.

Sobre la base de los datos de absorbancia se realizó la dilución del DNA a 25ng/µl utilizando agua GIBCO como disolvente. Las diluciones se midieron luego en el espectrofotómetro, para asegurar que se encontraban a la concentración deseada.

Reacciones de amplificación

Se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorff Mastercycler gradient. Cada reacción consistió en 20 µl de volumen final, con una concentración de 200 µM de cada dNTP (Invitrogen), 0,2 µM de cada primer (INC Technologies), 2 µl de buffer de reacción 10X (Invitrogen), 2 mM de Cl₂Mg (Invitrogen), 1,5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen). La concentración empleada de ADN fue de 75 ng, excepto para las muestras Bo LDE5 y BoC3, en las que se emplearon 50 ng y 67,8 ng, respectivamente, por contener una alta concentración de proteínas que inhibían la reacción. La dilución de ADN fue realizada de tal manera de no superar más de 0,4 mg/µl de proteína disuelta.

Se emplearon 16 primers, de manera que se abarcaron 11 de los 19 grupos de ligamientos (11). Los primers utilizados fueron: VVMD5, VVMD7 (5), VVS2, VVS29 (24), VVMD17, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD31, VVMD32 (7), VrZAG62, VrZAG79, VrZAG83, VrZAG93 (21), VMC2c3 y VMC2h4 (13). La mayoría de los protocolos de

amplificación empleados se basaron en las recomendaciones de los autores de cada primer, pero algunos necesitaron ser optimizados. Para ello se determinó la temperatura de annealing (T°_a) óptima realizando reacciones de PCR en gradientes de temperatura.

Para los primers VVMD31, VVMD32, VVMD5 VVMD27, VrZAG79, VrZAG62, VVMD17, VVMD25, VVMD28, VVMS29, VVMC2c3, VVMC2h4, VrZAG83, VrZAG93, se utilizó el mismo protocolo, pero con distinta temperatura de annealing (T°_a) según el primer. La T°_a fue de 56°C para los primers: VVMD31, VVMD32, VVMD5 VVMD27, VrZAG79, VrZAG62, VVMD17, VMC2c3, VrZAG83, VrZAG93; de 54°C para el primer VVMD25; 51°C para el primer VVMD28 y 50°C para los primers VVMS29 y VMC2h4. El programa empleado fue: 2 min. a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 min. a 92°C, 1 min. a T°_a , y 2 min. a 72°C, y finalmente 7 min. a 72°C.

Para el primer VVMD7 se utilizó un programa diferente, comenzando con 2 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 seg. a 92°C, 30 seg. a 58°C y 2 min. a 72°C y finalmente 7 min. a 72°C. En el caso del primer VVMS2 se utilizó un programa de amplificación con "touch down" que consistió en 1 ciclo de 30 sec a 94°C, 45 sec a 59°C (T°_a), y 45 seg. a 72°C, seguido por 14 ciclos, en los cuales la T°_a disminuyó 0,2°C por ciclo, continuado por 20 ciclos de: 30 seg. a 94°C, 45 seg a T°_a -3°C, 45 seg a 72°C y por último una extensión final de 7 min. a 72°C. El producto de las amplificaciones se observó en geles de agarosa al 1,2% (1,2 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE 0,5 X) con tinción de bromuro de etidio.

Electroforesis en poliacrilamida

Las muestras que amplificaron se resolvieron posteriormente en geles de poliacrilamida (6% de acrilamida, buffer TBE 1X, urea 7M), con TBE 1 X como buffer de corrida. La visualización de las bandas se realizó por tinción con nitrato de plata, de acuerdo con lo recomendado por el kit de tinción de Promega (Promega Inc).

La estimación del peso molecular de cada una de las bandas amplificadas se realizó empleando un marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen), y los patrones de banda de peso molecular conocido amplificados de empleando 2 a 3 variedades de referencia para cada primer.

RESULTADOS

Se analizaron 13 de los 16 pares de primers evaluados, ya que 3 de ellos: VVMD5, VrZAG83 y VrZAG93 no amplificaron en ninguna de las muestras empleadas, a pesar de haber efectuado numerosas combinaciones de temperaturas de annealing y programas de PCR. En el caso del primer VrZAG93, la falta de amplificación fue presumiblemente debida a que este primer no se hereda de manera mendeliana (21), mientras que VVMD5 y VrZAG83 no amplificaron probablemente debido a que transcurrió mucho tiempo desde su adquisición. Adicionalmente, las muestras Bo SM2 y Bo LDE5 no amplificaron con VVMD7 y la muestra de Bo LA4 no amplificó con VVS2. Los pesos moleculares de los alelos correspondientes a cada primer en cada muestra se observan en la tabla 2 (pág. 183).

Tabla 2. Peso molecular de los alelos (en pares de bases) correspondientes a cada primer, para cada muestra.
Table 2. Allele molecular weight (in base pair) for each primer and sample.

Muestras	VVMD31	VVMD32	VVMD7	VVMD27	VZAG79	VZAG62	VVS2	VVMD17	VVMD25	VVMD28	VVS29	VMC2c3	VMC2H4														
Bo VG4 (VA3)	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo RC4 (LC5)	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo RS2	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo OP3	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo MB3	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo AV3 (LA4)	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	NA	NA	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo TLR3 (RT4)	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo SM2	204	212	241	273	NA	NA	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo C3	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo FL5	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo PF5	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo LIC3	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo VJAM2	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo LDE5	204	212	241	273	NA	NA	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo IB3	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo VM1	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo SC3	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Bo BI5	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Corbeau	204	212	241	273	249	263	189	189	251	259	195	201	151	151	212	221	253	267	231	247	179	181	165	170	204	218	
Cabernet Franc			241	259					247	259																	
Cabernet Sauvignon															221	222	243	253									
Chardonnay														137	143											204	238
Chenin	210	216																									
Dolcetto			263	273	247	255	179	194											231	237					165	165	
Pinot Noir									239	245													171	179	170	198	
Riesling																	253	259									
Sangiovese			253	257																							
Sauvignon Blanc											189	195															
Syrah																											
Viognier							185	191							212	224										202	218
Zinfandel	212	214							237	259	201	205							221	247	171	181					

Las últimas 12 variedades de la lista corresponden a las referencias. NA: no amplificado.
 Last 12 varieties were used as references. NA: not amplified.

En los casos de los loci VVM31, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79, VVMD27, VVMD7, VVS2 se utilizaron amplificaciones de PCR de 'Corbeau' realizadas en 2006 y corridas junto con las muestras de 'Bonarda-Argentina'. No se encontraron diferencias entre las muestras tomadas de parral y de espaldero, hecho que evidencia que la diferenciación de variedades por este método no es afectada por el ambiente, por ejemplo sistema de conducción.

De acuerdo con el análisis molecular realizado en este trabajo, el patrón bandas que presentó la muestra de 'Bonarda', tomada del germoplasma de INTA - Luján, fue exactamente el mismo que presentó el 'Corbeau' muestreado en Francia. Adicionalmente, todas las 'Bonarda' recolectadas de los distintos departamentos de la provincia de Mendoza, y la 'Bonarda' de San Juan fueron iguales entre sí e idénticas a 'Bonarda' de INTA - Luján y a 'Corbeau' (figura, pág. 185). Se observaron 2 alelos por cada locus para los 13 loci analizados. Las frecuencias alélicas fueron de 0,5 para cada alelo, de acuerdo con los resultados obtenidos al emplear el software IDENTITY 1.0 (<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/MANUAL.rtf>). La probabilidad de que todas las 'Bonarda' analizadas fueran 'Corbeau' fue igual a 1. Esta probabilidad fue calculada de acuerdo con $1/(p+q)$, siendo p y q las frecuencias alélicas para cada locus analizado (6).

DISCUSIÓN

En California existe una variedad de vid denominada 'Charbono', que al parecer no sería otra que 'Corbeau'. Esta variedad habría sido confundida por numerosos ampelógrafos, que la consideraban 'Bonarda Piamontesa', 'Dolcetto' o 'Barbera'. La confusión con 'Dolcetto', una de las hipótesis más apoyada, habría surgido debido a que un sinónimo italiano de esta variedad es 'Dulce nero', y un sinónimo de 'Corbeau' en francés es 'Douce noir'. La traducción de ambos al inglés es la misma: 'Sweet black'. Para resolver este conflicto, la Dra. Carole Meredith determinó, mediante el empleo de marcadores microsatélites, que la verdadera identidad de 'Charbono', era 'Corbeau' (Meredith, comunicación personal). Asimismo, señaló que 'Charbono' también correspondería a algunas 'Bonarda' argentinas, debido a similitudes ampelográficas.

Martínez *et al.* (18) demostraron, mediante el empleo de 8 loci microsatélites, que la variedad 'Bonarda' cultivada en Argentina no se corresponde con la variedad 'Bonarda Piamontese', como se pensó originalmente. En el mismo trabajo se comprobó que las variedades 'Croatina' y 'Uva Rara' son diferentes entre sí, a pesar de las similitudes ampelográficas encontradas (8, 9, 10), y que a la vez difieren de la variedad 'Bonarda Piamontese'. Estos autores muestran que 'Bonarda Argentina' es en realidad igual al 'Corbeau' Francés, afirmando las semejanzas ampelográficas encontradas por Truel (25). Los cálculos de la probabilidad de identidad (PI) acumulada con 8 pares de primers revelaron que la probabilidad de que 'Bonarda-Argentina' no sea 'Corbeau' fue igual a $5,0 \times 10^{-12}$. Los resultados que aquí se presentan fueron obtenidos con 13 loci lo que aumenta la certeza de que 'Bonarda-Argentina' es 'Corbeau'. Estos microsatélites, además, fueron elegidos de modo de abarcar la mejor distribución posible entre los grupos de ligamiento que presenta el genoma de la vid y disminuir aún más la probabilidad de error.

Figura.

Gel de poliacrilamida. Las siglas corresponden a las presentadas en la tabla 1: Bo INTA: 'Bonarda' de INTA-Luján; LB: loading buffer. El gel muestra los patrones de banda obtenidos con el primer VrZAG79. Las bandas señaladas a la izquierda (259 pb y 251 pb) corresponden a los alelos de las variedades 'Bonarda' y 'Corbeau'. También se observa una banda de 300pb producida por el marcador de peso molecular comercial 100bp. Como referencia se utilizaron las variedades : 'Cabernet Franc', 'Pinot Noir', y 'Zinfandel', con bandas de peso molecular conocido.

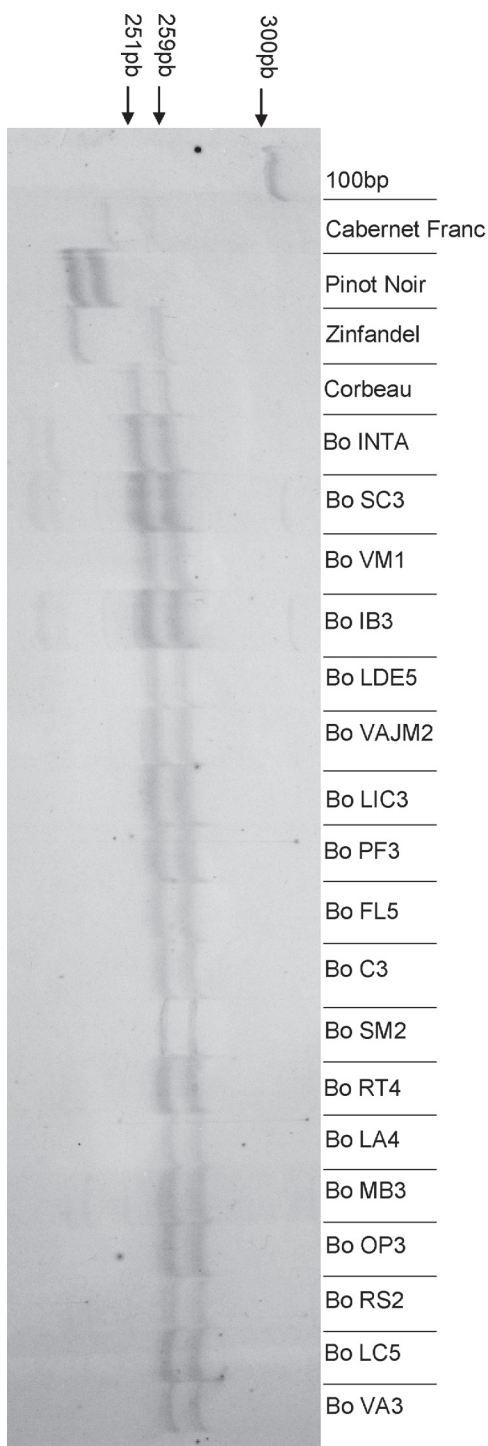


Figure.

Polyacrylamide Gel. Samples are named according to table 1: Bo INTA: 'Bonarda' of INTA-Luján). The gel shows bands obtained with the loci VrZAG79. The bands marked on the left (259 bp and 251 bp) correspond to the alleles of the varieties 'Bonarda' and 'Corbeau'. There is also a band of 300pb produced by the commercial molecular weight marker 100bp. Three different varieties were used as references of known molecular weight: 'Cabernet Franc', 'Pinot Noir' and 'Zinfandel'.

La importancia del presente trabajo también radica en el número de muestras utilizadas, que incluyen colecciones de todas las zonas vitícolas de la provincia de Mendoza, y una muestra de la provincia vecina de San Juan, demostrando que las 'Bonarda' presentes en ambas provincias son iguales entre sí. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el 92% de la superficie cultivada con 'Bonarda' en Argentina se encuentra en las provincias de Mendoza y San Juan, se podría generalizar que la 'Bonarda' cultivada en Argentina corresponde a la variedad francesa 'Corbeau'.

El muestreo representativo, tomando una mayor cantidad de muestras en aquellos departamentos con una mayor superficie cultivada con 'Bonarda' (tabla 1, pág. 180), sumado a la certificación del INV de cada viñedo, avala los resultados. El hecho de que las muestras provengan de lugares totalmente diferentes, y de plantas sujetas a distintas prácticas agrícolas, podría hacer suponer que tiene distintos orígenes. A pesar de ello, todas las muestras de 'Bonarda' presentaron el mismo patrón de bandas, sin importar su origen ni práctica de cultivo. Así, tanto las 'Bonarda' de San Martín (departamento con mayor cantidad de hectáreas cultivadas con esta variedad), como las de San Carlos (departamento con menor cantidad de hectáreas cultivadas con esta variedad) y las 'Bonarda' cultivadas en espaldero como en parral, fueron iguales entre sí y a 'Corbeau'.

CONCLUSIÓN

El análisis molecular de las 'Bonarda' cultivadas en Argentina y 'Corbeau' realizado en este trabajo permite afirmar, con un elevado grado de certeza, que se trata de la misma variedad y confirma previas especulaciones basadas en observaciones ampelográficas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alcalde, A. J. 1989. Cultivares vitícolas argentinas. Asociación Cooperadora de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza INTA. 133 p.
2. Arulsekar, S.; Parfitt, D. E. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, pistachio and fig. HortScience. Vol. 21, p. 928-933.
3. Bourquin, J-C. ; Tournier, P. ; Otten, L.; Walter, B. 1992. Identification of sixteen grapevine rootstocks by RFLP and RFLP analysis of nuclear DNA extracted from the wood. Vitis. Vol. 31, p. 157-162.
4. Bowers, J. E.; Bandman, E. B.; Meredith, C. P. 1993. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. Am. J. Enol. Vitic., Vol. 44, N° 3, p. 266-274.
5. _____; Dangl, G. S. ; Vignani, R. et al. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). Genome. Vol. 39, p. 628-633.
6. _____; Meredith, C. P. 1997. The parentage of a classic wine grape Cabernet Sauvignon. Nat. Genet., Vol. 16, pp84-87.
7. _____; Dangl, G.S., Meredith, C.P. 1999. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. Am. J. Enol. Vitic. Vol. 50, p. 243-246.

8. Dalmaso, G.; Cacciatorre, M.; Corte, A. 1962. "Croatina". In: Principali vitigni da vino coltivati in Italia. Ministerio dell' agricoltura e delle foreste. Vol. 2, p. 21.
9. _____ . 1962. "Uva rara". In: Principali vitigni da vino coltivati in Italia. Ministerio dell' agricoltura e delle foreste. Vol. 2, p. 55.
10. _____ . 1963. "Bonarda piemontese". In: Principali vitigni da vino coltivati in Italia. Ministerio dell' agricoltura e delle foreste. Vol. 3, p. 7.
11. Doliguez, A.; Adam-Blondon, A. F.; Cipriani, G. et al. 2006. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 113, p. 369-382.
12. Fojo, I. A. 2003. Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN en vid (*Vitis vinifera*). Trabajo realizado para obtener el grado de Lic. en Biología Molecular. Universidad Nacional de San Luis. 49 p.
13. Goto-Yamamoto, N.; Mouri, H.; Azumi, M.; Edwards, K. 2006. Development of grape microsatellite markers and microsatellite analysis including oriental cultivars. *Am. J. Enol. Vit.* 57(1): 105-108.
14. Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) Censo Vitícola Nacional Año 2005.
15. Martínez, L.; Cavagnaro, P. F.; Masuelli, R. W.; Rodríguez, J. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *E. J. Biotech.* 6 (3): 244-253.
16. _____; Cavagnaro, P.; Masuelli, R. W.; Zúñiga, M. 2006. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Sci.* Vol. 170, p. 1036-1040.
17. _____; Cavagnaro, P.; Masuelli, R. 2006. Caracterización molecular de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) de calidad enológica por marcadores microsatélites. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo.* 38(1): 77-86.
18. _____; Cavagnaro, P.; Boursiquot, J.-M.; Agüero, C. 2008. Molecular characterization of Bonarda-type grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from Argentina, Italy and France. *Am. J. Enol. Vitic.* 53(9): 287-291.
19. Rodríguez, J. G.; Matus, M. S. 2002. Bonarda. Gran cepaje tinto revalorizado. *Revista del Instituto Nacional de Vitivinicultura (Argentina).* Número extraordinario, p. 48-55.
20. Schneider, A.; Mannini, F. 1993. Guida all' identificazione del vitigno "Bonarda Piemontese". *Vignevari.* Vol. 9, p. 26-32.
21. Sefc, K. M.; Regner, F.; Turetschek, E.; Glössl, J. Steinkellner, H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome.* Vol. 42, p. 367-373.
22. Striem, M. J.; Spiegel-Roy, P.; Ben-Hayyim, G.; Beckham, J.; Gidoni, D. 1990. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes. *Vitis.* Vol.29, p. 223-227.
23. Tessier, C. ; David, J. ; This, P.; Boursiquot, J. M.; Charrier, A. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 98, p. 171-177.
24. Thomas, M.; Scott, N. S. 1993. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analyzed as sequence-tag sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* Vol. 86, p. 985-990.
25. Truel, P. 1968. Repport de misión en Argentina et au Chile. *Vinífera-Revista del Instituto Nacional de Vitivinicultura (Argentina).* Número extraordinario, p. 48-55.
26. Ulanovsky, S.; Gogorcena, Y.; Martínez de Toda, F.; Ortiz, J. M. 2002. Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies en grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturæ.* Vol. 92, p. 241-254.