

## Método bioquímico de determinación de la afinidad entre injerto y patrón en vid

por

A. MASA VAZQUEZ

### Biochemical method for determination of scion-rootstock affinity in grape

**S u m m a r y :** A biochemical method for the determination of affinity or incompatibility between scions and rootstocks in grape grafting is described. This method is based on the comparison of scions' and rootstocks' total proteins.

Total proteins of 5 *Vitis vinifera* L. cultivars (Airén, Bobal, Garnacha, Tempranillo, Viura) and 6 rootstocks (420-A, 41-B, 99-R, 110-R, 161-49, 196-17C) were extracted and analysed by polyacrylamide gel electrophoresis. From the REM (relative electrophoretic mobilities) of proteins the affinity indexes between scion and stock ( $K_{I-P}$ ) and stock and scion ( $K_{P-I}$ ) combinations were calculated. The results obtained were confronted with those advanced from cultural studies. The application of this biochemical method can allow to learn *a priori* which rootstocks may be compatible with a given cultivar.

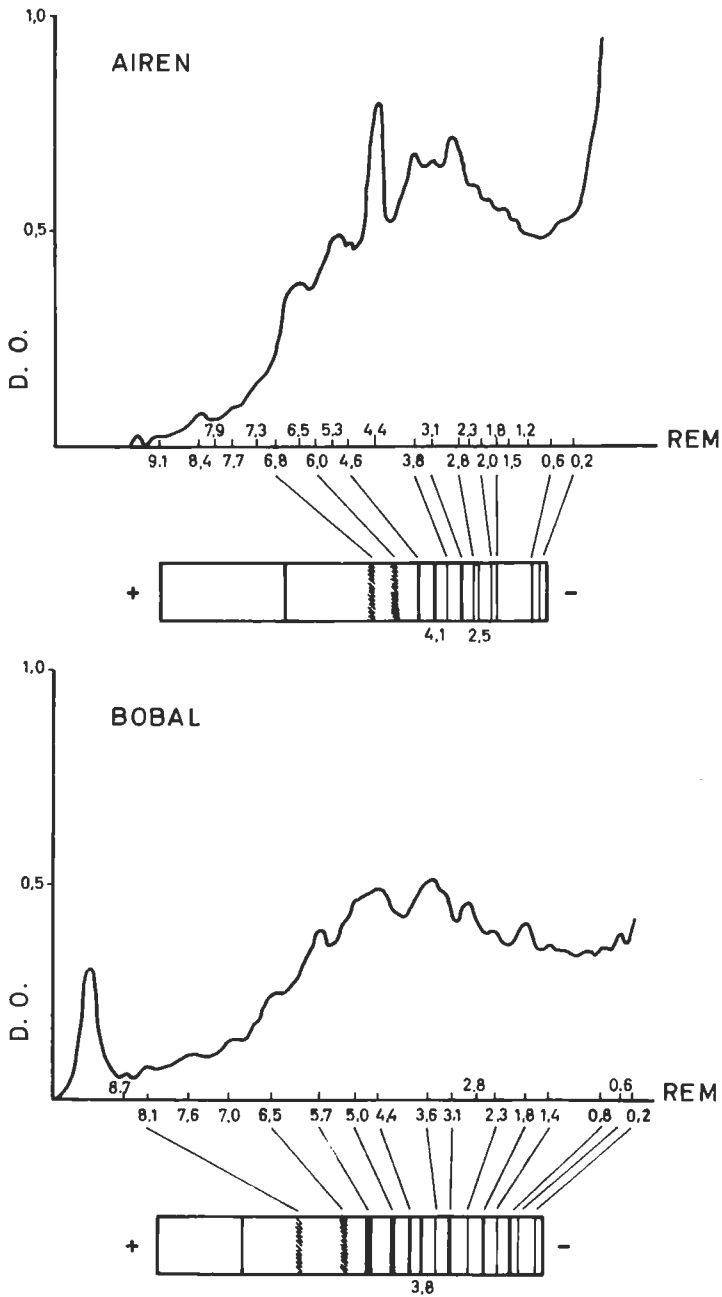
**K e y w o r d s :** affinity, biochemistry, protein.

A partir de la invasión filoxérica sufrida por la vid europea (*Vitis vinifera* L.) ha habido multitud de intentos de definir de qué depende la afinidad entre injerto y patrón en viticultura. Uno de los métodos que mejores resultados ha dado ha sido el estudio del comportamiento en el campo de la planta injertada (HIDALGO y R-CANDELA 1969, 1970, 1976, 1979; HIDALGO 1981). Este método, con ser de gran utilidad, presenta varios inconvenientes: 1) Sus resultados no son fácilmente generalizables, ya que los índices de afinidad considerados (peso de la producción, producción de azúcar/ha, riqueza azucarada de los mostos, peso de la madera de poda) dependen en exceso de las condiciones ambientales, y 2) resulta muy lento, puesto que las plantas injertadas han de alcanzar la plena producción.

En este estudio se propone un método bioquímico basado en los trabajos realizados en la Unión Soviética para injertos en el género *Malus* (SAFONOV y VEIDENBERG 1969). Se tratará de definir la afinidad bioquímica entre injertos y patrones por similitud de sus proteínas totales y se compararán los resultados obtenidos con aquellos avanzados para su afinidad cultural.

El material vegetal, sarmientos de 5 variedades de *V. vinifera* (Airén, Bobal, Garnacha, Tempranillo, Viura) y de 6 portainjertos (420-A, 41-B, 99-R, 110-R, 161-49, 196-17C) fué recogido en la finca que el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias posee en El Encín (Alcalá de Henares, España), y procedía de las mismas plantas utilizadas en los estudios ya citados sobre afinidad cultural.

El método general responde al esquema clásico de extracción e identificación de proteínas. Todas las operaciones se han realizado a una temperatura de 0—4 °C. Se realizó la extracción del material vegetal en mortero junto a una cantidad similar en peso del polímero PVP-insoluble en presencia de nieve carbónica y tampón Tris-glicina 0.01 M pH 8.3 provisto de mercaptoetanol 0.7 % y ácido ascórbico 0.5 %. La existencia de procesos bioquímicos por los cuales ciertos compuestos de naturaleza fenólica interaccionan con las proteínas inhibiendo su actividad enzimática, obliga a utilizar los cita-



Gráficas densitométricas y diagramas esquemáticos de alguna de las muestras estudiadas. En ellas aparecen los REM de las bandas protéicas multiplicados por 10.

Densitometric graphics and schematic diagrams of some of the studied samples. REM are  $\times 10$ .

dos agentes protectores (ANDERSON 1968). La concentración de proteína de los extractos se ha determinado por el método descrito por POTTY (1969).

Para la identificación de proteínas se ha elegido la electroforesis de disco en geles del 7.5 % de poliacrilamida según DAVIS (1964) modificado (GABRIEL 1971). La electroforesis (2—2.5 h) se realiza con tampón Tris-glicina 0.005 M pH 8.3 y una corriente de 3—4 mA/gel; se tiñen los geles con Coomassie R-250 (SMITH 1976) y se elaboran los diagramas esquemáticos (expresión visual de los geles) y las gráficas densitométricas (Gelman DCD-16 a 550 nm) para cada muestra. Se calculan las movilidades electroforéticas relativas (REM) de las bandas proteicas (tanto a partir de los diagramas como de las gráficas densitométricas), y de ellas los coeficientes de afinidad entre injertos y patrones ( $K_{I-P}$ ) y viceversa ( $K_{P-I}$ ) de acuerdo con SAFONOV y VEIDENBERG (1969):

$$K_{I-P} = \frac{\text{Prot. comunes}}{\text{Prot. tot. injerto}} \times 100 \qquad K_{P-I} = \frac{\text{Prot. comunes}}{\text{Prot. tot. patrón}} \times 100$$

Estos autores consideran proteínas comunes aquellas que tienen similar REM, y establecen que una asociación injerto/patrón es afín si su  $K_{I-P}$  es mayor o igual que 70 o bien su  $K_{P-I}$  es mayor o igual que 65. Se hace necesario calcular ambos coeficientes ya que si bien no es fácil delimitar la influencia del injerto sobre el patrón de aquella del patrón sobre el injerto, sí se sabe que esta influencia recíproca existe, por lo que ha de reflejarse en alguna medida. Dado que el número total de bandas proteicas puede no ser similar para ambos componentes de una asociación injerto/patrón dada, podrá haber diferencias entre los valores de los dos coeficientes para una misma asociación.

En la figura aparecen los diagramas esquemáticos y gráficas densitométricas de alguna de las muestras estudiadas; en ella se ofrecen los valores de los REM para dichas muestras. Se han calculado los coeficientes de afinidad para cada asociación injerto/patrón tanto a partir de los diagramas como de las gráficas densitométricas, ya que al no existir ningún dato similar en bibliografía se hace necesario saber si hay o no diferencias significativas en los resultados según se aplique uno u otro método. Parece más preciso el segundo de ellos, si bien los resultados finales de afinidades son bastante similares en ambos (tabla). En esta tabla se comparan los resultados de afinidad e incompatibilidad bioquímica para las diferentes asociaciones injerto/patrón con aquellos obtenidos en campos de contraste de patrones, pudiéndose concluir que para las afines los resultados son en lo esencial coincidentes en ambos métodos. Esto es más evidente cuando se consideran los calculados a partir de las gráficas densitométricas. La escasa coincidencia entre los métodos bioquímico y cultural para la vinífera Viura puede explicarse por el hecho de que esta vinífera ha sido ensayada en menor número de campos de contraste de patrones que las demás viníferas, por lo que sus resultados para la afinidad cultural no son lo precisos que debieran. Se puede deducir cierta afinidad intrínseca a los portainjertos 161-49, 110-R, y 41-B, ya reseñada para los dos últimos por HIDALGO y R-CANDELA (1979), lo que parece una confirmación más de la correlación existente entre ambos métodos.

No es tan clara la coincidencia de resultados entre los dos métodos para las asociaciones incompatibles, pero para estas los resultados por el método cultural eran menos precisos que para las asociaciones afines. Se puede sin embargo citar el caso de la asociación Viura/420-A para la que por cualquiera de los dos métodos se deduce una incompatibilidad manifiesta. Podría hablarse, además, de la existencia de incompatibilidad intrínseca del portainjerto 420-A con cualquiera de las viníferas estudiadas.

Las ventajas que ofrece el método bioquímico de determinación de la afinidad vinífera/portainjerto sobre el cultural son: permite generalizar los resultados por no depender del medio; es más rápido; posibilita realizar pruebas de afinidad con un ele-

Análisis comparativo de los resultados de afinidad e incompatibilidad en distintas asociaciones injerto/patrón · A: Según el método cultural; B: según los coeficientes de afinidad obtenidos de las gráficas densitométricas; C: según los coeficientes de afinidad obtenidos de los diagramas esquemáticos

Comparative analysis of the results of affinity and incompatibility for different scion-stock combinations · A: According to cultural method; B: according to the affinity coefficients obtained from densitometric graphics; C: according to the affinity coefficients obtained from schematic diagrams

	Compatibles			Incompatibles		
	A	B	C	A	B	C
Airen	161-49 110-R	196-17C 161-49 110-R	161-49	99-R	420-A	41-B
Bobal	41-B 110-R 161-49	110-R 41-B 161-49	41-B 110-R	196-17C	420-A 196-17C	99-R
Garnacha	161-49 41-B 110-R	161-49 41-B 99-R	161-49	99-R	196-17C 420-A	99-R
Tempranillo	41-B 110-R	110-R 41-B 161-49	110-R 41-B	196-17C	99-R	420-A 196-17C
Viura	110-R 161-49	161-49	41-B 196-17C	420-A	420-A	420-A

vado número de viníferas y patrones (limitado en el método cultural). Por otra parte este método permite determinar *a priori* qué patrones serán afines con una vinífera dada, si bien en una primera fase parece necesario contrastar en el campo los resultados, a fin de establecer la validez general del método. En este sentido en la Misión Biológica de Galicia (Pontevedra, España), se está desarrollando una línea de trabajo encaminada a la determinación de los portainjertos afines bioquímicamente a aquellas variedades de interés en las diferentes zonas vitivinícolas de Galicia (noroeste de España), y se controlará culturalmente la eficacia de este método.

### Bibliografía

- ANDERSON, J. W.; 1968: Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* 7, 1973—1988.
- DAVIS, B. J.; 1964: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404—427.
- GABRIEL, O.; 1971: Analytical disc gel electrophoresis. In: JACOBY, W. B. (Ed.): *Methods in Enzymology* 22, 565—578. Academic Press, New York.

- HIDALGO, L.; 1981: Cuarta comunicación sobre afinidad y adaptación de portainjertos y viníferas. An. INIA, Ser. Agríc., **14**, 95—249.
- — ; R-CANDELA, M.; 1969: Primera comunicación sobre afinidad y adaptación de portainjertos y viníferas: Contraste de patrones. An. INIA **18**, 391—473.
- — ; — — ; 1970: Segunda comunicación sobre afinidad y adaptación de portainjertos y viníferas: Campos regionales. An. INIA **19**, 237—326.
- — ; — — ; 1976: Tercera comunicación sobre afinidad y adaptación de portainjertos y viníferas. An. INIA. Ser. Prod. Veg., **6**, 285—453.
- — ; — — ; 1979: Contribución al estudio de la afinidad intrínseca de portainjertos y viníferas. An. INIA. Ser. Prod. Veg., **9**, 241—280.
- POTTY, V. H.; 1966: Determination of proteins in the presence of phenols and pectins. Anal. Biochem. **29**, 535—539.
- SAFONOV, V. I.; VEIDENBERG, A. E.; 1969: Prognosis of scion-stock physiological incompatibility in apple by determination of protein spectra [Russ.]. Dokl. Akad. Nauk SSSR **186**, 978—980.
- SMITH, I.; 1976: Acrylamide gel disc electrophoresis. In: SMITH, I. (Ed.): Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. II, 210—249. William Heinemann Medical Books Ltd., London.

*Eingegangen am 4. 7. 1984*

A. MASA  
Misión Biológica de Galicia (C.S.I.C.)  
Apartado, 28 — Pontevedra  
España