

RECUPERACIÓN DE ADN DEL VINO PARA IDENTIFICACION VARIETAL

Maria José Rubio-Cabetas

Unidad de Fruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón
Montañana, 177, 50059 Zaragoza

RESUMEN

En el presente trabajo se evalúan los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de extracción de ADN del vino y el mosto, así como la concentración de las muestras para incrementar el rendimiento. Se adoptaron distintos métodos de extracción de alimentos manufacturados, así como diferentes protocolos para obtener ADN en cantidad y calidad para la PCR de material vegetal. En el análisis PCR se pudo distinguir en las distintas muestras analizadas la presencia tanto de ADN de la variedad como de la levadura mediante la utilización de cebadores específicos para plantas superiores (500-600 bp) y para levaduras (926 bp). El protocolo de CTAB dio los mejores resultados y se obtuvo buen rendimiento en dos variedades tintas y una blanca. La recuperación del ADN de las variedades que componen el vino o el mosto puede utilizarse para su identificación varietal mediante la utilización de marcadores moleculares, principalmente microsatélites.

Palabras clave: ADN, identificación varietal, vid, levadura, mosto, vino

Introducción

La autenticidad de los ingredientes de los productos manufacturados es un asunto que concierne a toda la industria agroalimentaria, incluida la vitivinícola. La regulación europea permite, hasta cierto límite, la mezcla de diferentes variedades de uva, sin necesidad de mencionarlo en la etiqueta. Hasta ahora la caracterización de las variedades de vid y el análisis por zonas geográficas, tanto del mosto como del vino, se ha basado principalmente en métodos analíticos basados en diferentes técnicas bioquímicas con la separación de los antocianos y los polifenoles del vino por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Pena-Neira, 2000) o la combinación de métodos electroforéticos e inmunológicos (SDS-PAGE), a la hora de dilucidar las proteínas específicas de los vinos (Ferreira et al., 2000; Polo et al., 1999). Sin embargo, la mayoría de estas metodologías no dan respuesta al origen botánico de la variedad de uva utilizada en la elaboración del mosto.

La identificación de las variedades de vid mediante análisis del ADN es una alternativa que fue propuesta hace ya tiempo (Bowers et al., 1993) y ya se han utilizado diversos marcadores moleculares como STSs (Thomas y Scott, 1993), RAPDs (Stravakis et al., 1997) y microsatélites (Faria et al., 2000; Siret et al., 2000). Igualmente se han identificado ampliamente los microorganismos involucrados en la fermentación, como *Saccharomyces cerevisiae*, y *Oenococcus oeni*, utilizando las técnicas basadas en la PCR (Fernández et al., 2000; Zapparoli et al., 2000). Sin embargo, se ha desarrollado muy poco la identificación del ADN para conocer el origen de las variedades que componen los mostos. Esta identificación es importante en los vinos monovarietales, que están incrementando su peso en el mercado. Estos tipos de vinos requieren una clara identidad de las variedades utilizadas en su elaboración; tanto para cumplir la regulación como para garantizar la calidad

al consumidor. Este trabajo se centra en el paso previo, la optimización de la extracción del ADN en mostos y vinos, para poder discriminar si este ADN proviene de la levadura o de la variedad de uva.

Materiales y Métodos

Se realizaron dos experimentos diferentes en los cuales se ensayaron diferentes métodos de extracción y distinto material vegetal.

Experimento 1

En este experimento se utilizó un mosto y dos vinos, uno blanco y otro tinto, fermentados y embotellados sin filtrado en el laboratorio. En primer lugar se procedió a su concentración mediante Polietilenglicol (PEG) y el uso de membranas de diálisis (Lloyd, 1994). Para ello, 150 ml de cada muestra se introdujeron en membranas Spectra/Por 1 Membrana MWCO 6-8000 (Pierce & Warriner, Chester, UK), se cerraron en ambos extremos con pinzas (Spectra/Por), y se colocaron con PEG (Sigma MB 20,000) y se dejó durante 24 h. A través de la membrana sólo pasan las moléculas inferiores a 8000 daltons (el peso molecular de la glucosa es 180 daltons y el del agua 18 daltons) que forman hidrolizados con el PEG.

Las muestras concentradas se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Para la extracción del ADN del vino se utilizaron dos métodos comercializados para el análisis de alimentos transformados genéticamente: el método Wizard® Resin (Promega), basado en una resina, el kit de Gene Check (Hanse-Analytik), basado en un protocolo CTAB. La concentración de ADN se estimó en geles de agarosa al 0.8 % y con tinción de bromuro de etidio, utilizando como testigos de concentración estándar los suministrados por los fabricantes.

Como muestras comparativas de extracción de ADN se utilizaron otros productos manufacturados líquidos como salsa de soja y leche de soja compradas en los supermercados locales, así como ADN de levadura fresca y liofilizada.

Experimento 2

Los vinos utilizados en este experimento fueron de variedades de uva fermentados en condiciones estándar en diferentes bodegas de la denominación de origen Cariñena. Se tomaron muestras en tres fechas diferentes: Al principio de la fermentación (0d), aproximadamente a mitad de ésta (7d) y al final (14d). Se recogieron dos variedades de blancos ('Macabeo' y 'Parellada') y cuatro de tintos ('Merlot', 'Tempranillo', 'Cabernet Sauvignon' y 'Garnacha'). La extracción y purificación se realizó con el método descrito por Siret *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Este método se basa en el aislamiento de los ácidos nucleicos de la parte sólida y de la parte líquida tras una centrifugación. Sólo en tres variedades ('Merlot', 'Tempranillo' y 'Macabeo') se realizó la purificación del ADN con el método Quiaprep Spin Miniprep (Promega). La dilución final fue sometida directamente al análisis PCR. En las otras variedades ('Cabernet Sauvignon', 'Garnacha' y 'Parellada') no se realizó la purificación del ADN. Se estimó la concentración utilizando el espectrofotómetro Gene Quant II (Pharmacia Biotech) y se analizaron con PCR.

Análisis PCR

Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ l (experimento 1) y en uno de 25 μ l (experimento 2) con 200 ng de DNA genómico, 0,5 U de Taq-polimerasa, 20 mM del cebador 20-base, 100 μ M de cada dNTP (Promega), 1,5 mM de $MgCl_2$ y 1x del tampón suministrado con el enzima. Las PCR se realizaron en un termociclador Gene Amp PCR System 9710 (PE) Applied Biosystems con las condiciones de amplificación adaptadas de Hotzel *et al.* (1999): desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min. Seguida de 40 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de anillamiento de acuerdo a las temperaturas expresadas en el cuadro 1 y 1 min de elongación a 72 °C con 2 min de extensión final a 72 °C. Los cebadores utilizados fueron secuencias de un gen de la clorofila de plantas superiores c/d y de un gen específico de hongos UF1/S3. La secuencia de los cebadores se muestra en el cuadro 1. Los fragmentos de la PCR se separaron en geles de agarosa a 2 % en tampón TBE 1 X, con un marcador de peso molecular 1 Kb y 100 pb. Los geles se visualizaron en un transiluminador tras la tinción durante 5 min. con bromuro de etidio 1 μ g/ml.

Resultados y Discusión

Experimento 1

Los dos métodos de extracción mostraron diferencias. Con el método 1, Gene-Check (Hanse-Analytik), se obtuvo ADN capaz de visualizarse directamente en la agarosa 1,5 % en todas las muestras comparadas, incluido el mosto donde no se había concentrado la muestra (figura 1). Sin embargo cuando las muestras se concentraron con la membrana de diálisis y el PEG desde 150 ml a 2 ml, se obtuvo mayor cantidad de ADN no sólo en el mosto sino también una señal débil en el vino tinto aunque no en el vino blanco (figura 2). Por lo tanto, la realización de la concentración fue positiva, obteniéndose el mejor resultado con las muestras concentradas de 150 ml a 2 ml y no partiendo de 15 ml. Con los cebadores específicos de levaduras UF1/S3, se obtuvo un producto de amplificación (926 pb) en la levadura fresca y en el mosto, mientras que en los vinos ya fermentados no se observó tal fragmento (figura 3). Los extractos vegetales de soja utilizados en este caso como testigos negativos tampoco amplificaron esta banda. Cuando se utilizaron cebadores específicos de la planta c/d se obtuvo un fragmento de 500 pb en los extractos vegetales de soja, utilizados aquí como controles positivos, mientras que no se observó en la levadura. Igualmente se obtuvo en el mosto, y una señal mas débil en el vino tinto y no en el blanco. Por lo tanto, con estos cebadores es posible discriminar si el ADN extraído proviene de la levadura o de la planta.

Experimento 2

Al realizar la extracción de la fracción sólida y la líquida por separado, se obtuvieron concentraciones diferentes dependiendo de si las muestras se sometieron a su posterior purificación. Cuando las muestras se purificaron, se pudo recuperar ADN de las partes sólidas de dos de las variedades de tinto ‘Merlot’ y ‘Tempranillo’ y en menor cantidad de la fracción líquida. Igualmente se obtuvo muy poca cantidad en la variedad de blanco ‘Macabeo’. En este caso se realizó directamente la PCR obteniéndose productos de amplificación con c/d (500-600pb) y con UF1/S3 (926 pb) en las muestras de 0 días y de 14 días de la fracción sólida (S), pero sólo en las muestras de 0 días en el caso de la fracción líquida (L) tanto de ‘Merlot’ como de ‘Tempranillo’ (figura 4).

En el resto de muestras (‘Cabernet Sauvignon’, ‘Garnacha’ y ‘Parellada’) se aplicó el mismo protocolo de extracción a las partes sólidas y líquidas pero sin el posterior paso de

purificación en columna. En este caso se obtuvo mucha mas concentración de ADN en ambas fracciones y se pudo cuantificar en el espectrofotómetro. La concentración en la fracción sólida (S) fue mayor que en la líquida (L) en las tres muestras (0d, 7d, 14d) de las dos variedades de tinto ('Cabernet Sauvignon' y 'Garnacha'), mientras que en 'Parellada' fue la fracción líquida (L) la que dio mayor rendimiento en las tres fechas diferentes (0d, 7d, 14d). Para el posterior análisis de PCR ambas concentraciones se analizaron juntas. El análisis PCR condujo a la amplificación en todas las variedades del fragmento de 600 pb específico de las plantas excepto en la variedad de blanco 'Parellada' (14d), donde se había obtenido menor concentración, y en la variedad 'Macabeo', en la que se obtuvo poco rendimiento de ADN (figura 5). Estos resultados confirman la existencia de ADN residual de las variedades y la capacidad de ser analizado e identificado con marcadores moleculares que ya hayan sido utilizados en la identificación del material vegetal. En el caso de la amplificación con cebadores de la levadura los resultados fueron más variables y la mayoría de ellas amplificaron el fragmento de 926 pb.

El papel de la concentración fue positivo para las extracciones ya que en el experimento I las muestras más concentradas fueron las que dieron mejores resultados. Además, el hecho de hacer la extracción de las fracciones líquidas y sólidas por separado mejoró notablemente el rendimiento de la extracción. En ambos experimentos los protocolos basados en CTAB (Murray y Thompson, 1980) han resultado mejores para la extracción de los ácidos nucleicos. Estos protocolos son los que han dado también mejores resultados con las plantas leñosas, que necesitan protocolos más exigentes para eliminar los fenoles, que normalmente degeneran el DNA. En este caso se han podido también eliminar algunos taninos y fenoles que pudieran estar adheridos a las proteínas, puesto que éstos podrían inhibir la PCR. La purificación posterior de los ácidos nucleicos supuso una pérdida considerable de ADN y la calidad obtenida sin la purificación es suficiente para el análisis. Aunque el ADN de la levadura podría permanecer un tiempo menor, las diferencias en los resultados al principio de la fermentación pueden atribuirse sin duda a las diferentes prácticas de fermentación utilizadas en cada una de las bodegas donde se recogieron las muestras, mientras que el ADN de la planta permanece por más tiempo, hasta 8 semanas después de la fermentación (Leopold et al., 2002). Por lo tanto, el ADN residual es susceptible de amplificarse con marcadores microsatélites (Bowers et al., 1996, Siret et al., 2000) y permite comprobar el origen de las variedades que componen los vinos. La extracción y purificación de vinos más viejos podría ser mas difícil a causa de las técnicas utilizadas en la vinificación (filtrado, etc) que dejan sólo trozos de ADN sin fragmentar y también expuesto durante la fermentación a degradación debido a las diferentes actividades (lisis por enzimas de la levadura, etc). En este caso se ha demostrado que es posible aislar una mínima cantidad de ADN y suficientemente purificado para ser analizado por PCR. Sería conveniente una mejora del método para aumentar el rendimiento de la extracción que permitiera hacer distintos análisis con marcadores para proceder a la identificación, especialmente en los vinos más viejos. Esto permitiría analizar no sólo las variedades y la pureza de los vinos embotellados, sino también controlar el tipo de levadura utilizada, la contaminación por enfermedades del material vegetal, etc., que pudieran influir en los procesos de fermentación posteriores mermando la calidad de los caldos embotellados.

Agradecimientos

La primera parte de este trabajo se realizó en el laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Aristotelis de Salónica (Grecia). La autora agradece a Bodegas Ignacio Marín, Solar de Urbezo, Grandes Vinos de Cariñena, Aylés de Mezalocha y Cooperativa Virgen de la Fuente de Muel por la recogida desinteresada de muestras. La

financiación de este trabajo proviene de la D.G.A. La autora agradece igualmente la colaboración de Susana Chueca del CITA.

Bibliografía

- Bowers J.E., Bandman E.B., Meredith C.P. 1993. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *Amer. J. Enol. Vitic.* 44 (3): 266-274.
- Bowers J.E., Dangl G.S., Vigmani R., Meredith C.P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera*) L. *Genome* 39: 628-633.
- Faria M.A., Magalhães R., Ferreira M.A., Meredith C.P., Ferreira Monteiro F. 2000. *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA análisis (SSR). *J. Agric. Food Chem.* 48: 1096-1100.
- Fernández M., Ubeda J.F., Briones A.I. 2000. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 29-36.
- Ferreira R.B., Monteeiro S., Picarra-Pereira A.M., Tenganho M.C., Loureiro V.B., Teixeira A.R. 2000. Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods. *Amer. J. Enol. Vitic.* 51 (1): 22-28.
- Hotzel H., Müller W., Sachse K. 1999. Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients *Eur. Food Res. Technol.* 209: 192-196.
- Leopold S. Uehlein N., Kaldenhoff R., Scharl A. 2002. Fate of DNA during must fermentation. Bayerische Landsanstalt für Weinbau und Gartenbau, Septiembre.
- Lloyd K.M., Haine H.E., Jones J.L. 1994. DNA diagnostics for testing wine authenticity. Campden, Food and Drink Research Association. *Techn. Memo.* 713: 1-20, 33-37.
- Pena-Neira A., Hernández T., Vallejo G., Estrella I., Suárez J.A. 2000. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *Eur. Food Res. Technol.* 210: 445-448.
- Polo M.C., Cabello F., Pueyo E., Moreno-Arribas M.V., Martín-Álvarez P.J. 1999. Utilización de las proteínas de los mostos para la identificación varietal. En: J.M. Ortiz (Ed.): *Identificación Molecular de Germoplasma de Vid.* IMIA.
- Siret R., Boursiquot J.M., Merle M.H., Cabanis J.C., This P. 1999. Toward the authentication of varietal wines by the analysis of Grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 5035-5040.
- Stavarakakis M.N., Biniari K., Hatzopoulos P. 1997. Identification and discrimination of eight Greek grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* 36(4): 175-178.
- Thomas M.R., Scott N. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990.
- Zapparoli G., Reguant C., Bordons A., Torriani S., Dellaglio F. 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiol.* 40: 351-355.

Cuadro 1. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR para las ampliaciones.

Cebador	Secuencias	Organismo específico	Tamaño pb	Temperatura de anillamiento
C	5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG -3'	Plantas	500-600	54°C
D	5'-GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC-3'			
UF1	5'-CGA ATC GCA TGG CCT TG-3'	Levaduras	926	53°C
S3	5'-AGT CAA ATT AAG CCG CAG-3'			

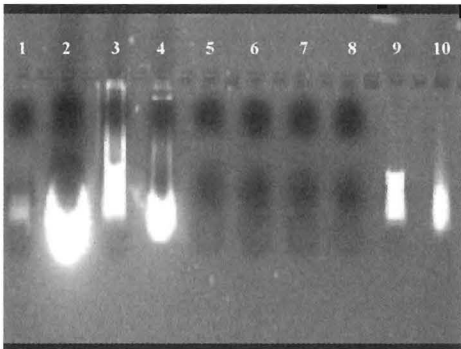


Figura 1. Estimación de la concentración de DNA en geles de agarosa 1,5%. Método Gene-Check Hanse-Analytik. Muestras sin concentrar. 1. Mosto, 2. Levadura fresca, 3. Concentrado Soja, 4. Leche soja, 5. Salsa soja, 6. Vino blanco, 7. Vino tinto, 8. ddH2O, 9. Marcador de tamaño, 10. Marcador de concentración.

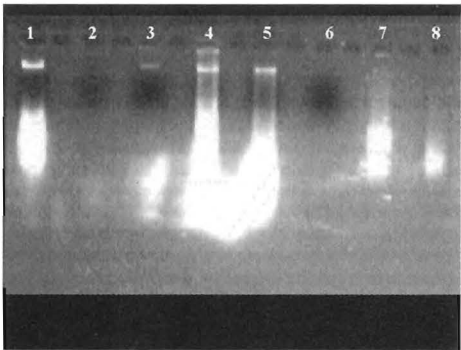


Figura 2. Estimación de la concentración de DNA en geles de agarosa 1,5%. Método Gene-Check Hanse-Analytik. Muestras concentradas de 150-ml a 2 ml. 1. Mosto, 2. Vino blanco, 3. Vino tinto, 4. Leche soja, 5. Levadura, 6. ddH2O, 7. Marcador de tamaño, 8. Marcador de concentración.

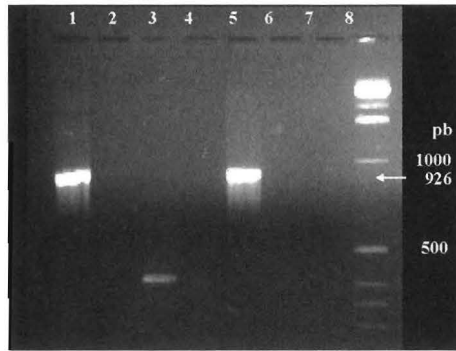


Figura 3. Resultados de PCR de las muestras concentradas y amplificadas con UF1/S3. 1. Mosto, 2. Vino Blanco, 3. Vino Tinto, 4. Leche soja, 5. Levadura fresca, 6. Control Extracción ddH₂O 7. Control ddH₂O 8. 1 kb.



Figura 4. Resultados de PCR amplificadas con UF1/S3. 1. Merlot 0dS, 2. Merlot 7dS, 3. Merlot 14dS, 4. Merlot 0dL, 5. Merlot 7dL, 6. Merlot 14dL, 7. Tempranillo 0dS, 8. Tempranillo 7dS, 9. Tempranillo 14dS, 10. Tempranillo 0dL, 11. Tempranillo 7dL, 12. Tempranillo 14dL 13. 100 pb, 14. 1Kb, 15. 123.

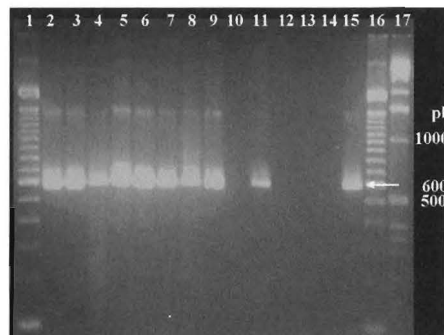


Figura 5. Resultados de PCR amplificadas con P1 y P3. 1. 100 pb, 2. Cabernet 0d, 3. Cabernet 7d, 4. Cabernet 14d, 5. Garnacha 0d, 6. Garnacha 7d, 7. Garnacha 14d, 8. Parellada 0d, 9. Parellada 7d, 10. Parellada 14d, 11. ADN Hoja 12. Macabeo 0d, 13. Macabeo 7d, 14. Macabeo 14 d, 15. ADN Hoja, 16. 100 pb, 17. 1Kb