



Scientia Agropecuaria

Web page: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>

Facultad de Ciencias
Agropecuarias

Universidad Nacional de
Trujillo

RESEARCH ARTICLE



Molecular and ampelographic characterization of Pisco grapevine accessions conserved in a germplasm collection center of the Ica, Peru

Caracterización molecular y ampelográfica de accesiones de vides pisqueras conservadas en un centro de colección de germoplasma de Ica, Perú

Aybel Almanza Cano¹, * ; Hanna Cáceres Yparraguirre² ; María Del Rocío Torres³ ; David Saravia Navarro¹ ; Raúl Blas Sevillano¹

¹ Laboratorio de Genómica y Bioinformática, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Peru.

² Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Agroindustrial – CITEagroindustrial Ica, Peru.

³ Estación Experimental Agropecuaria Mendoza (EEA Mza), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.

* Corresponding author: aybelac@gmail.com (A. Almanza Cano).

Received: 13 July 2021. Accepted: 25 November 2021. Published: 15 December 2021.

Abstract

Pisco is a distillate of cultural and economic importance for Peru, made from heterogeneous vine varieties called "pisqueras", covered by a Pisco Denomination of Origin legislation. The aim was to confirm the varietal identity of eight accessions conserved in the Germplasm Collection of the Centre for Productive Innovation and Technology Transfer Agroindustrial Ica (CITEagroindustrial), using 9 standardized microsatellite loci (SSR) and 14 morphological descriptors according to the International Organisation of Vine and Wine (OIV) to identify grapevine varieties. The SSR molecular profiles of 7 accessions were identified as varieties registered in the Vitis International Variety Catalog (VIVC) and only one had no association. Of these, Mollar, Albilla, Italia, Quebranta and Uvina accessions, were associated with Mollar Cano (VIVC 7901), Palomino Fino (VIVC 8888), Muscat of Alexandria (VIVC 8241), Quebranta (VIVC 9840) and Jacquez (VIVC 5627), respectively. The SSR profile of the Torontel accession was not associated with any variety registered in the VIVC and the Negra Criolla and Moscatel accessions were associated with the Spanish variety Listan Prieto (VIVC 6860). According to the ampelographic observations, it was determined that Moscatel presented phenotypic variations with respect to Negra Criolla, although at the molecular level it was perfectly associated with Listan Prieto, indicating that it would be a clonal variation. In addition, 7 variables were discriminant to identify the accessions evaluated. The molecular and ampelographic analysis allowed to clarify the varietal identity of the accessions conserved at CITEagroindustrial, Ica, which plays a preponderant role as a reference regarding the identification of the varieties used for the elaboration of Pisco in Peru.

Keywords: Pisco varieties; criollas; SSR; Moscatel; Pisco.

Resumen

El Pisco es un destilado de importancia cultural y económica para el Perú, elaborado con variedades de vid heterogéneas denominadas "pisqueras", abarcadas en una legislación de Denominación de Origen Pisco. El objetivo fue confirmar la identidad varietal de ocho accesiones conservadas en la Colección de Germoplasma del Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Agroindustrial Ica (CITEagroindustrial), usando 9 loci microsatélites (SSR) estandarizados y 14 descriptores morfológicos según la Organización Internacional de la vid y el vino (OIV) para identificar variedades de vid. Los perfiles moleculares SSR de 7 accesiones se identificaron como variedades registradas en la Vitis International Variety Catalogue (VIVC) y solo una no tuvo asociación. De ellas, las accesiones correspondientes a Mollar, Albilla, Italia, Quebranta y Uvina se asociaron a las variedades Mollar Cano (VIVC 7901), Palomino Fino (VIVC 8888), Moscatel de Alejandría (VIVC 8241), Quebranta (VIVC 9840) y Jacquez (VIVC 5627), respectivamente. El perfil SSR de la accesión Torontel no se asoció a ninguna variedad registrada en la VIVC y las accesiones Negra Criolla y Moscatel se asociaron a la variedad española Listan Prieto (VIVC 6860). De acuerdo a las observaciones ampelográficas se determinó que Moscatel presentó variaciones fenotípicas respecto a Negra Criolla pese que a nivel molecular se asoció perfectamente a Listan Prieto, indicando que sería una variación clonal. Además, 7 variables fueron discriminantes para identificar las accesiones evaluadas. El análisis molecular y ampelográfico permitió esclarecer la identidad varietal de las accesiones conservadas en el CITEagroindustrial, Ica, la cual juega un rol preponderante como referente en cuanto a la identificación de las variedades empleadas para la elaboración de Pisco en Perú.

Palabras clave: variedades pisqueras; criollas; SSR; Moscatel; Pisco.

DOI: <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.057>

Cite this article:

Almanza Cano, A., Cáceres Yparraguirre, H., Torres, M. R., Saravia Navarro, D., & Blas Sevillano, R. (2021). Caracterización molecular y ampelográfica de accesiones de vides pisqueras conservadas en un centro de colección de germoplasma de Ica, Perú. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 525-533.

1. Introducción

Las bebidas alcohólicas en el mundo se consumen desde la antigüedad y tienen un papel de importancia a nivel social, económico y cultural (Botelho et al., 2020; López, 2021). En América del Sur sus orígenes se remontan al siglo XVI y están relacionados con la conquista y la colonización española donde uno de los destilados más reconocidos es el Pisco (Menevseoglu et al., 2021).

Pisco, es el nombre de la bebida bandera del Perú, protegido en una legislación de Denominación de Origen (D.O.). Es obtenido por destilación de mostos recientemente fermentados a partir de 8 variedades de vides pisqueras cultivadas y destiladas en la costa del territorio peruano, la cual comprende a Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y los valles de Locumba, Sama y Caplina del departamento de Tacna (Indecopi, 2012). Las variedades pisqueras pueden ser no aromáticas (Quebranta, Mollar, Negra Criolla, Uvina) y aromáticas (Italia, Torontel, Albilla, Moscatel), las cuales presentan características muy particulares que le dan al Pisco un perfil organoléptico genuino (Menevseoglu et al., 2021).

En la costa sur de Perú está ubicado el departamento de Ica, un valle con óptimas condiciones agroecológicas para la producción vitícola (Morón, 2017). Desde inicios de la viticultura en el país, se convirtió en una de las principales regiones de elaboración de Pisco (Huertas, 2004) y por su relevancia, a fines de la década de los 90 se creó el Centro de Innovación Tecnológica Vitivinícola (CITEvid); ahora Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Agroindustrial (CITEagroindustrial). Actualmente conserva una vasta colección de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) que fue creada con material vegetal colectado en las diferentes zonas vitícolas con D.O. Pisco. Más tarde se introdujeron variedades de mesa, vino y portainjertos traídos de Europa y Estados Unidos. Actualmente cuenta con más de 70 accesiones que se conservan con la finalidad de apoyar y promover el desarrollo vitícola de la región, principalmente a los productores de Pisco.

Entre las accesiones se destacan las correspondientes a las uvas pisqueras, las cuales juegan un papel determinante en la elaboración del Pisco. Por normativa del Consejo Regulador del Pisco (Indecopi, 2012), se establecieron 8 cultivares como los únicos aceptados para su elaboración, en los que se incluye a Quebranta, Moscatel, Torontel, Italia, Negra Criolla, Mollar, Albilla y Uvina. Las variedades nombradas en la normativa son un grupo heterogéneo, en cuanto a su origen, ya que incluye cultivares tradicionales, autóctonos e introducidos.

Tradicionalmente las variedades de vid han sido identificadas mediante caracteres ampelográficos, pero ello presenta algunas dificultades debido a la variabilidad que expresan los fenotipos en relación al ambiente (Rodrigues, 2021). Para robustecer y a la vez simplificar su identificación, actualmente se emplean técnicas moleculares que al estar basadas en el análisis del genoma evitan los efectos ambientales. Una de estas técnicas es la de *simple sequence repeats* (SSR), también conocida como microstélites que ha sido exitosamente empleada en la identificación de genotipos y el estudio de relaciones parentales entre los cultivares y, como consecuencia, ha facilitado la organización y gestión de colecciones de

germoplasma de vid (Lacombe et al., 2013; Li et al., 2017; Labagnara et al., 2018; Popescu & Crespan, 2018; Miliordos et al., 2021).

A través de SSR se identificaron 5 de las variedades a las que hace referencia la legislación de D.O., permitiendo asociar los nombres de los cultivares empleados en Perú con sus correspondientes primeros nombres, de acuerdo al registro mundial de variedades (OIV, 2009, 2013). En vid, las denominaciones locales son consideradas como nombres sinónimos en relación con el que se establece como primer nombre de referencia para una determinada variedad. De este modo se sabe que como cultivares tradicionales Negra Criolla corresponde a la variedad Listan Prieto (This et al., 2006; Milla-Tapia et al., 2007), Italia a Muscat of Alexandria (Mendoza et al., 2019) y Mollar a Mollar Cano (Aliquó et al., 2017). Como cultivar autóctono, Quebranta no presenta nombres sinónimos y fue descrita como descendencia de Listan Prieto y Mollar Cano (This et al., 2006; Lacombe et al., 2013). Por otra parte, Uvina es la variedad Jacquez introducida desde EEUU (Pszczólkowski & Lacoste, 2016), producto de la cruce de *Vitis aestivalis-cinerea* y *Vitis vinifera* L. En cuanto a Albilla, Torontel y Moscatel, aún resta clarificar y profundizar la identidad de estos cultivares. Por ello el objetivo del presente trabajo fue estudiar a nivel molecular y ampelográfico las accesiones de vid conservadas en la colección de Germoplasma del CITEagroindustrial, Ica, Perú, que abarcan las ocho variedades enunciadas en la legislación de D.O., con la finalidad de revisar la identidad varietal de las mismas, dando lugar a una colección correctamente referenciada que sirva de apoyo para el sector productivo.

2. Materiales y métodos

Material vegetal

Se evaluaron 8 accesiones en la Colección de Germoplasma del CITEagroindustrial, ubicado a 13°59'52" S – 75°46'12" W – 417 msnm, en el distrito de Salas Guadalupe de la Provincia y Región de Ica, Perú. Las accesiones fueron identificadas de acuerdo a sus nombres locales: Negra Criolla, Moscatel, Mollar, Albilla, Italia, Quebranta, Torontel y Uvina.

Caracterización molecular

Se colectaron hojas jóvenes y sanas en activo crecimiento de una planta de cada accesión. Para la extracción de ADN se utilizó la metodología de Bromuro de Cetil Trimetil Amonio (CTAB) (Doyle & Doyle, 1990) modificado por el uso de NaCl para eliminar los polisacáridos y PVP para eliminar los polifenoles durante la purificación del ADN, métodos descritos por Lodhi et al. (1994). La cuantificación del ADN fue realizada mediante espectrofotometría ultravioleta mientras que la calidad se estimó mediante migración en geles de 0,1% de agarosa teñidos cada gel en 1µg/ml de bromuro de etidio y se visualizaron con un transiluminador UVP UVsolo touch (Analytik Jena, Alemania) (Dauob et al., 2018; Işçi, 2019). Se seleccionó un set de 9 marcadores SSR: VVS2 (Thomas & Scott, 1993), VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32 (Bowers et al., 1996, 1999), VrZAG62, VrZAG79 (Sefc et al., 1999) descritos por Vitis International Variety Catalogue (VIVC). A partir del ADN extraído, se amplificaron los SSR correspondientes, mediante la

técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen final de 10 µl, con 40 ng de ADN, tampón para PCR 1X (100 mM de Tris-HCl, 2,5 mM de MgCl₂, y 20 mM de sulfato de amonio); 0,5 µM de cada iniciador (directo y reverso) y 1 U de enzima Taq polimerasa, en un termociclador Eppendorf AG (Vapo.Protect Mastercycler® Pro, Alemania) en gradiente. Las condiciones de PCR fueron: 94 °C x 3 min, 35 ciclos de 94 °C x 45 s, Ta (temperatura de *annealing* específica) x 45 s, 72 °C x 90 s y una extensión final de 72 °C x 20 min. Los fragmentos amplificados fueron leídos en un analizador de fragmentos ABI 3130 XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). Los tamaños de los alelos se determinaron con el software Gene Mapper v. 4.0 (Applied Biosystems). Todos los procedimientos para la caracterización molecular fueron realizados en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina y la lectura de los fragmentos amplificados en el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

Caracterización ampelográfica

Se evaluaron 10 plantas por accesión, en total 80, durante las campañas 2017 y 2018. La caracterización ampelográfica fue realizada de acuerdo a los criterios establecidos en la 2da Edición de la Lista Prioritaria de Descriptores Primarios para Variedades de Vid y Especies de Vitis desarrolladas por la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV) (OIV, 2009). El listado de descriptores consistió de 14 variables cualitativas correspondientes a: 1 en zarcillo, 2 en pámpano, 1 en hoja joven, 8 en hoja adulta y 2 en bayas. Las observaciones se efectuaron entre brotación y floración en pámpanos jóvenes de 10 a 30 cm de longitud y hojas jóvenes. En floración (cuando llegaron al 50% de apertura floral), se evaluaron pámpanos y zarcillos. Mientras que las observaciones en hoja adulta se hicieron durante el invierno, cuando el 50% de las bayas cambiaron de color, mediante un muestreo aleatorio de 10 hojas adultas de la parte media del pámpano, por accesión. La época de madurez se evaluó cuando las bayas alcanzaron los 24 °Brix, los datos correspondieron a la media de 40 bayas maduras por accesión, muestreándose aleatoriamente 10 racimos por accesión. La notación asignada a cada carácter corresponde a la moda de las observaciones realizadas en campo.

Análisis de datos

Una vez obtenidos los pesos moleculares de los alelos de cada marcador por accesión, estos fueron normalizados. Posteriormente, se asociaron los perfiles moleculares a la variedad de vid correspondiente mediante la aplicación Microsatellites by profiles de la base de datos VIVC

(<https://www.vivc.de/index.php?r=eva-analysis-mikrosatelliten-vivc%2Findex>). Se obtuvo la moda de las observaciones ampelográficas realizadas, luego las mismas fueron sometidas a un análisis estadístico con el software R 4.0.2 y R Studio 1.3.1056. Para el análisis de comparación múltiple de variedades sobre las variables ampelográficas se utilizó el paquete Agricolae 1.3 – 3 (De Mendiburu & Simon, 2015) con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y luego el test de Willcoxon Mann Whitney (como alternativa al t-test) para determinar las variables diferenciales entre ellas. Para la construcción de los análisis de correspondencia múltiple (ACM) se utilizó las librerías FactoMiner (Husson et al., 2020) y FactoExtra (Kassambara & Mundt, 2020).

3. Resultados y discusión

Identificación de variedades mediante SSR

De los 9 loci SSR específicos empleados para la identificación de las variedades de vid, 8 (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 y VrZAG79) amplificaron patrones de bandas nítidas y reproducibles excepto para el locus VVS2 que reveló patrones no definidos en la variedad Moscatel debido a que consistentemente mostró dificultades técnicas en las reacciones de PCR. El número de alelos detectados por locus varió entre 4 (VVMD7) y 7 (VVS2, VVMD28, VrZAG62 y VrZAG72), con un total de 48 alelos en los 8 loci y una media de 6,2 alelos por locus. Los tamaños de los alelos se cuantificaron en pares de bases (pb) mediante electroferogramas y normalizaron con las variedades Quebranta y Listan Prieto como patrones, de acuerdo con la base de datos Vitis International Variety Catalogue (VIVC) (Tabla 1).

Los perfiles moleculares de SSR de 7 accesiones: Quebranta, Moscatel, Mollar, Albilla, Negra Criolla, Italia y Uvina se asociaron a las variedades registradas en la VIVC, mientras que sólo la accesión Torontel no se asoció a ninguna de ellas (Tabla 2).

Las accesiones Negra Criolla y Moscatel se asociaron a la variedad española Listan Prieto (VIVC 6860). Negra Criolla coincidió en los 16 alelos comparados, mientras que Moscatel varió en un alelo del marcador MD28 siendo heterocigota en Listan Prieto (234:244 pb) y homocigota en Moscatel (244:244 pb) (Tablas 1 y 2). Variaciones de este tipo se han reportado previamente en vid, donde accesiones de una misma variedad son heterocigota u homocigota para un loci específico (Narváez et al., 2001; Marsal et al., 2016; Aliquó et al., 2017; Rodrigues, 2021) debido a la existencia de un alelo nulo o a una amplificación ineficiente del alelo de menor peso molecular.

Tabla 1

Tamaño de alelos en pares de bases (pb), por accesión, para los 8 loci microsatélites

ID Accesión	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD27	VVMD28	VVMD32	VrZAG62	VrZAG79								
Quebranta	135	143	230	242	239	249	182	190	234	258	256	272	188	194	243	247
Moscatel	nd	nd	230	242	239	249	186	190	244	244	256	258	194	196	243	251
Mollar	143	145	224	242	239	239	182	182	244	258	252	272	188	196	247	259
Albilla	133	145	230	242	239	249	186	194	236	248	256	258	188	194	251	257
Torontel	133	149	230	242	249	251	180	190	244	244	258	264	194	204	243	255
Italia	133	149	230	234	249	251	180	195	244	268	264	272	187	204	247	255
Uvina	139	147	230	245	237	239	180	190	229	236	252	252	186	190	249	249
Negra Criolla	133	135	230	242	239	249	186	190	234	244	256	258	194	196	243	251

nd = no definido.

Tabla 2

Comparación de los perfiles genéticos obtenidos con 8 loci microsatélite y los perfiles genéticos de Vitis International Variety Catalogue

Nombre Local	Número de alelos comparados	Número de loci idénticos	Primer nombre VIVC	Código VIVC	País de origen
Quebranta	16	8	Quebranta	9840	Perú
Moscatel	14	6	Listan Prieto	6860	España
Torontel	16	8	Perú/Chile	-	-
Mollar	16	8	Mollar Cano	7901	España
Albilla	16	8	Palomino Fino	8888	España
Negra Criolla	16	8	Listan Prieto	6860	España
Italia	16	8	Moscatel de Alejandría	8241	Grecia
Uvina	16	8	Jacquez	5627	EEUU

Tabla 3

Perfiles fenotípicos obtenidos mediante la ampelografía de las 8 variedades pisqueras*

OIV	Descriptor	Quebranta	Moscatel	Mollar	Albilla	Torontel	Italia	Uvina	Negra-corriente
001	Apertura de la extremidad	5	5	5	5	5	5	5	3
004	Densidad de los pelos tumbados de la extremidad	7	7	5	7	7	9	7	5
016	N° de zarcillos consecutivos	1	1	1	1	1	1	2	1
051	Hojas jóvenes	2	2	1	2	3	3	4	3
067	Forma del limbo	3	3	4	3	3	2	3	2
068	N° de lóbulos	3	3	2	3	3	3	3	3
070	Distribución de la pigmentación antocianica de los nervios principales del haz del limbo	1	3	1	3	2	1	1	2
076	Forma de los dientes	3	3	3	5	3	2	3	3
079	Grado de apertura / solapamiento del seno peciolar	3	3	3	3	3	3	3	3
081-2	Base del seno peciolar limitada por la nervadura	1	1	1	1	1	1	1	1
084	Densidad de los pelos tumbados entre los nervios principales sobre el envés del limbo	7	5	5	7	7	7	5	5
087	Densidad de los pelos erguidos sobre los nervios principales del envés del limbo	5	3	5	1	1	1	1	1
223	Forma de la baya	3	1	3	2	2	8	2	2
225	Color de la epidermis de la baya	5	3	2	1	1	1	6	5

* Los datos corresponden a la moda de 10 mediciones de sus niveles de expresión, OIV= códigos de variables.

Los perfiles de SSR de las accesiones correspondientes a Mollar, Albilla, Italia, Quebranta y Uvina se asociaron a las variedades de Mollar Cano (VIVC 7901), Palomino Fino (VIVC 8888), Moscatel de Alejandría (VIVC 8241), Quebranta (VIVC 9840) y Jacquez (VIVC 5627), respectivamente (Tabla 2), siendo idénticos en cuanto a los alelos comparados.

El perfil de SSR de la accesión Torontel no se asoció a ninguna variedad registrada en la VIVC. No obstante, en la base de datos se encuentra registrada la variedad Torontel (N 15465) sin un perfil de SSR reportado. Por otra parte, Milla-Tapia et al. (2007) e Ibacache et al. (2015) reportan accesiones de Torontel pero la diferencia en cuanto a los marcadores empleados y la estandarización de los pesos moleculares de los alelos, impide una adecuada comparación de los resultados entre los distintos trabajos. Por otra parte, un análisis que involucre mayor número de marcadores permitiría conocer el origen parental de la variedad.

Caracterización ampelográfica

Las observaciones ampelográficas de las ocho accesiones se obtuvieron mediante la descripción de 14 variables cualitativas que se muestran en la Tabla 3.

Negra Criolla presentó una extremidad semi abierta con densidad alta de pelos tumbados en el pámpano, hojas adultas de forma cuneiforme, distribución de la

pigmentación antocianica de los nervios principales del haz del limbo hasta el punto peciolar y bayas de forma esférica achatada de coloración rojo violeta oscuro.

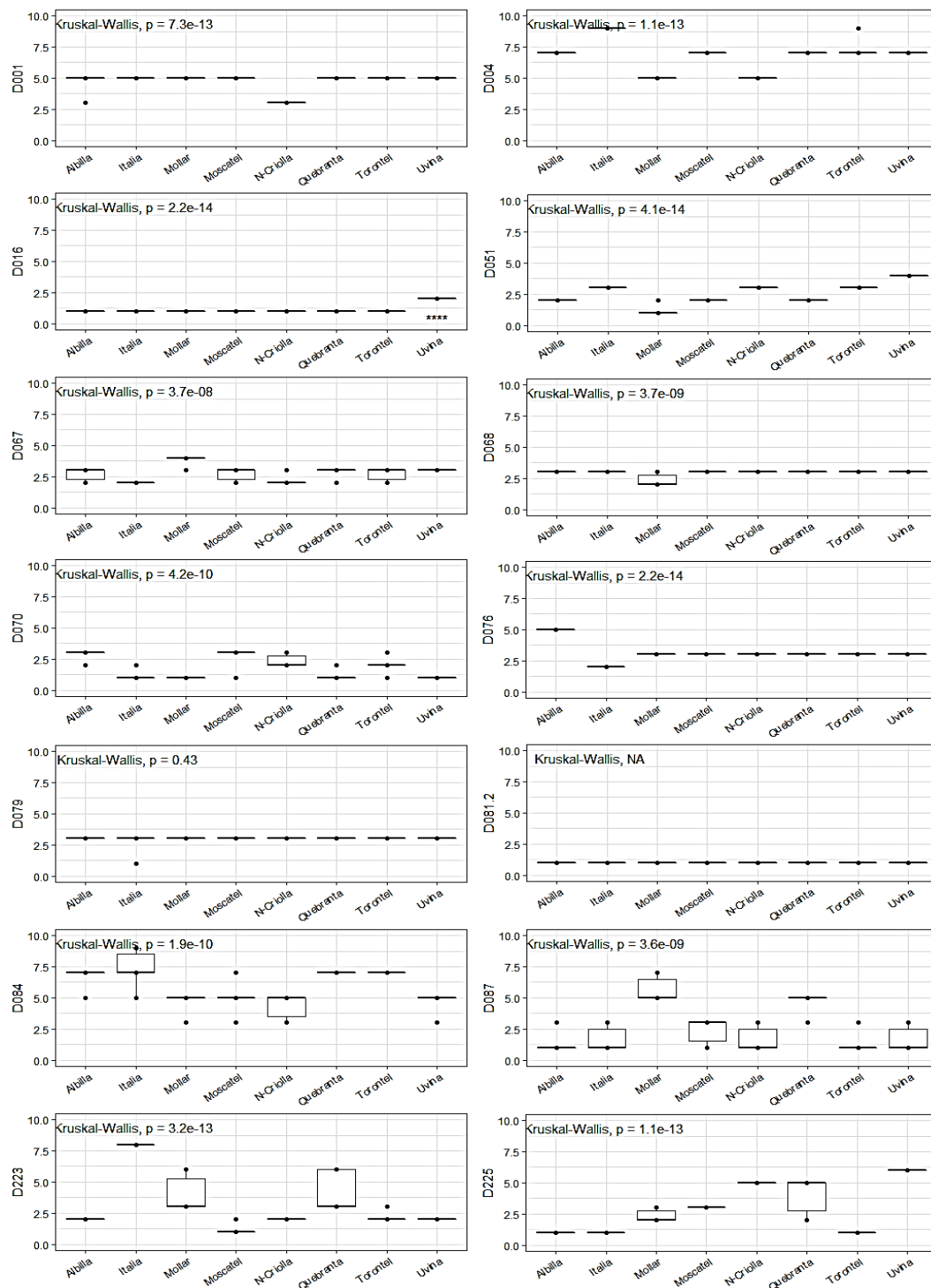
Moscatel presentó una extremidad completamente abierta con alta densidad de pelos tumbados en el pámpano, hojas adultas pentagonales, distribución de la pigmentación antocianica hasta la primera bifurcación de los nervios principales del haz del limbo y bayas de forma esférica de color rojo.

Mollar presentó una extremidad abierta con densidad media de pelos tumbados en el pámpano, hojas adultas de forma orbicular y bayas de forma elíptica corta de coloración rosa.

Albilla mostró una extremidad completamente abierta con alta densidad de pelos tumbados en el pámpano, hojas adultas pentagonales con una mezcla de dientes de ambos lados convexos y rectilíneos y bayas de forma esférica de color verde amarillo.

Italia presentó una extremidad completamente abierta con muy alta densidad de pelos tumbados en el pámpano, hojas adultas de forma cuneiforme con dientes de ambos lados rectilíneos y bayas de forma ovoide inversa de color verde amarillo.

Quebranta presentó una extremidad abierta con alta densidad de pelos tumbados, hojas adultas de forma pentagonal y bayas de forma elíptica corta de color rojo violeta oscuro.



* D001, D004, D016, D51, D067, D068, D070, D079, D084, D087, D223 y D225 = códigos OIV

Figura 1. Prueba No Paramétrica Kruskal Wallis y comparación entre tratamientos con el test de Willcoxon Mann Whitney. Se usó el p-valor ajustado con el método de Bonferroni con Alpha 0.05 para observar las características ampelográficas diferenciales entre las accesiones *pisqueras*. En el eje X se observan las accesiones y, en el eje Y la suma de los rangos.

Uvva presentó características muy particulares, una extremidad abierta con alta densidad de pelos tumbados en el pámpano, hojas adultas de forma pentagonal, distribución y número de zarcillos consecutivos de tres o más y bayas de forma esférica de color negro azulado.

Torontel, presentó una extremidad abierta con alta densidad de pelos tumbados en el pámpano, hojas adultas pentagonales, distribución de la pigmentación antocianica de los nervios principales del haz del limbo hasta el punto peciolar y bayas de forma esférica de color verde amarillo.

Adicionalmente, se observaron características diferenciales para cada una de las accesiones de este grupo mostradas en la **Figura 1**, mediante las cuales es posible discriminarlas, así por ejemplo el descriptor OIV-001 (apertura de la extremidad), diferenció la accesión Negra Criolla que, presentó la apertura de la extremidad, semi abierta. Asimismo, la accesión Italia se diferenció por la densidad de pelos tumbados muy alta sobre la extremidad, presentada en el descriptor OIV-004.

Una de las características más notables se observó en el descriptor OIV-016 (números de zarcillos consecutivos) el cual diferenció a la accesión Uvina. Según la OIV, las accesiones que presentaron dos o menos zarcillos pertenecían a la especie *Vitis vinifera* L. Contrariamente, las accesiones que presentaron tres o más zarcillos consecutivos no pertenecían a la especie *Vitis vinifera* L. (OIV, 2009). En ese sentido, Uvina, fue la única accesión de este grupo que presentó tres zarcillos consecutivos o más, en los pámpanos adultos (**Figura 1**).

En ampelografía, el descriptor OIV-067 (forma del limbo de las hojas adultas), determina una de las características más importantes para la identificación de la vid. De las 8 accesiones, 5 (Quebranta, Moscatel, Albilla, Torontel y Uvina) presentaron forma pentagonal, 2 (Italia y Negra Criolla) forma cuneiforme y 1 (Mollar) forma orbicular. Complementariamente el descriptor OIV-068 (número de lóbulos), diferencia a Mollar, siendo la única accesión que exhibió 3 lóbulos en sus hojas adultas (**Figura 1**).

El descriptor OIV-070 (distribución de la pigmentación antocianica de los nervios principales en el haz del limbo), determinó que, 4 accesiones no presentaron pigmentación antocianica (Quebranta, Mollar, Italia y Uvina), 2 accesiones presentaron pigmentación antocianica hasta la primera bifurcación de los nervios principales (Moscatel, Albilla) y 2 accesiones presentaron pigmentación antocianica hasta el punto peciolar (Torontel y Negra Criolla), característica que ha diferenciado estas accesiones (**Figura 1**).

Dos accesiones se diferenciaron usando el descriptor OIV-076 (forma de los dientes de las hojas adultas), una de ellas Italia, presentó dientes con ambos lados rectilíneos y la otra Albilla, presentó la mezcla de dientes con lados rectilíneos y dientes con lados convexos en sus hojas adultas (**Figura 1**).

El descriptor OIV-87 (densidad de pelos erguidos sobre los nervios principales del envés del limbo), ha permitido discriminar a 3 accesiones de este grupo. Moscatel presentó densidad baja, Quebranta densidad media y Mollar densidad alta de pelos erguidos (**Figura 1**).

A través del test de Kruskal Wallis señalados en la **Figura 1** se pudo determinar las variables discriminantes para las accesiones pisqueras, indicando que existe variabilidad en las características ampelográficas evaluadas, a excepción de los descriptores OIV-079 (grado de apertura y/o solapamiento del seno peciolar) y OIV-081-2 (base del seno peciolar limitada por la nervadura) que no mostraron diferencias estadísticas.

Cáceres et al. (2017), también caracterizaron a nivel morfológico las variedades pisqueras en la misma colección. El análisis comparativo con los perfiles fenotípicos obtenidos indicó similaridad en 11 caracteres

(OIV- 1, 4, 51, 67, 68, 70, 79, 81-2, 84, 87 y 225). Las diferencias (descriptores OIV - 76, 84 y 223), probablemente se debieron a la alta variabilidad fenotípica observada y la subjetividad del ampelógrafo. Cabe mencionar que estos autores, determinaron a Albilla como Listan B de Francia (INRA, 2009). Por otro lado, al comparar el perfil fenotípico de la accesión Albilla con la variedad Listan Blanco de Canarias descritos por **Rodríguez-Torres (2017)**, fueron muy similares, compartiendo 13 de los 14 caracteres evaluados. Además, señalaron, sería una sinonimia de Palomino Fino. Estos análisis indicarían que se trataría de la misma variedad, con sinonimias en los diferentes países.

Estudios anteriores a nivel molecular de **This et al. (2006)**, **Lacombe et al. (2013)** y **Aliquó et al. (2017)** determinaron a Quebranta como la descendencia de Listan Prieto y Mollar Cano. Al asociar los perfiles fenotípicos de las accesiones Quebranta y Mollar, compartieron 8 caracteres de los 14 evaluados indicando una similitud parcial. Del mismo modo, entre Quebranta y Negra Criolla, compartieron la misma notación para 6 descriptores. Esa combinación de caracteres morfológicos hace que el perfil fenotípico de la variedad Quebranta muestre un fenotipo intermedio entre Negra Criolla y Mollar (**Figura 2**), siendo más notable en el carácter forma de las hojas adultas (OIV-067), donde Negra Criolla presentó hojas de forma cuneiforme y Mollar de forma orbicular, mientras que la accesión Quebranta, hojas de forma pentagonal. De acuerdo a Mendoza et al. (2019), es sabido que la variedad Moscatel de Alejandría es denominada Italia, en Perú. Al contrastar los perfiles fenotípicos de la accesión Italia con Moscatel de Alejandría descritos por **Mendoza et al. (2019)**, y **Rodríguez-Torres (2017)**, reveló similaridad para 13 caracteres. Estas similitudes confirmaron que se trataría de la misma variedad.

Por otro lado, el perfil fenotípico de la accesión Negra Criolla fue asociado a Criolla Chica, descrito en el catálogo de Cultivares Vitícolas Argentinos (**Alcalde, 2008**), correspondiendo estos nombres a sinonimias utilizadas en Sudamérica de la variedad Listan Prieto. Igualmente, el perfil fenotípico de Mollar fue similar al de Mollar Cano, descrito en la Estación Experimental Rancho de la Merced de Jerez de la Frontera (España), compartiendo 11 de 14 descriptores (**García De Luján et al., 1990**). Las diferencias encontradas podrían atribuirse a variaciones somáticas generadas en el tiempo, desde su introducción al Perú procedente de Europa y a la propagación vegetativa que constituyen la fuente principal de la diversidad genética para la mejora de variedades tradicionales de la vid, como lo citan varios autores (**Martínez-Zapater et al., 2014**; **Carbonell-Bejerano et al., 2017**; **Jiménez-Cantizano et al., 2020**).

A nivel ampelográfico, los perfiles de las accesiones Moscatel y Negra Criolla presentan fenotipos distintos, como se aprecia en la **Tabla 3** y la **Figura 2**, estas diferencias estuvieron presentes en 8 de los 14 descriptores. Finalmente, la accesión Torontel, no se pudo asociar a ninguna variedad por su perfil fenotípico, siendo las más cercanas las del grupo Torrontes (**Rodríguez & Matus, 2002**).

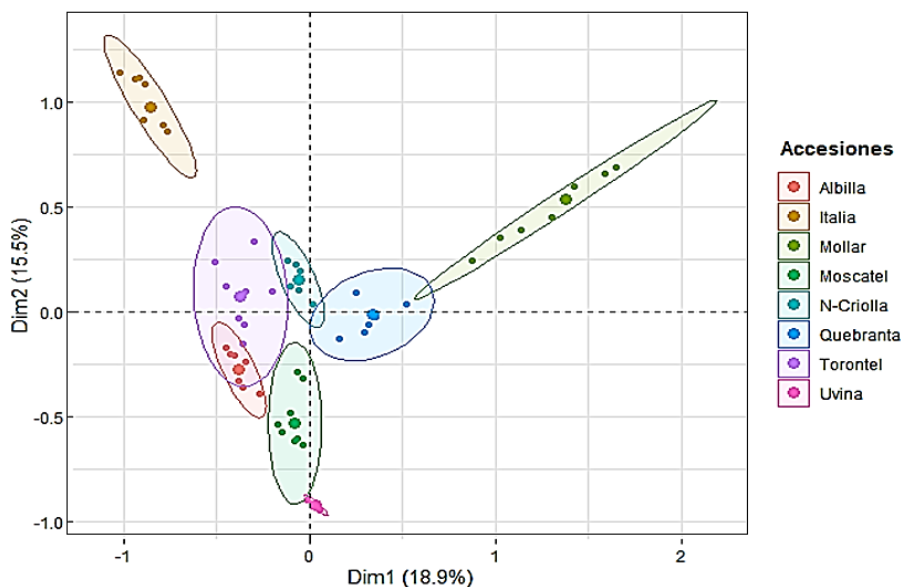


Figura 2. Análisis de correspondencia múltiple individual de la caracterización ampelográfica de las variedades pisqueras.

El análisis de correspondencia múltiple (ACM) por accesión ha permitido identificar a las accesiones pisqueras relacionadas por sus variables ampelográficas como se observa en la Figura 2, siendo Italia y Mollar las que se alejan más de las otras variedades, este ACM con las dos primeras dimensiones (Dim 1 y Dim 2) logra explicar el 34.4 % de la varianza existente entre las 8 accesiones de vid (variedades pisqueras) y las 14 variables ampelográficas.

Según la comparación de alelos para cada marcador, en relación a las variedades genotipadas, se determinó que 17 alelos fueron específicos (es decir estaban presentes solo en uno de los genotipos). El número de alelos únicos varió de 1 (VVMD7) a 3 (VVMD5 y VVMD28) (Tabla 4), los cuales se encontraron en 4 variedades, 3 de ellas europeas (Italia, Albilla y Mollar) y una (Uvina) proveniente de los EEUU. La presencia de estos alelos únicos en estas variedades se atribuye a que proceden de diferentes orígenes por tanto de diferentes pools genéticos. Listan Prieto, siendo una variedad europea, no presentó alelos únicos para este grupo de variedades, debido a la similitud encontrada con el perfil genético de Moscatel. Cabe resaltar, que Listan Prieto fue la primera variedad introducida al Perú y considerada la variedad fundadora de los cultivares criollos de Sudamérica junto con Moscatel de Alejandría (Milla-Tapia et al., 2007; Aliquó et al., 2017).

Por otro lado, el análisis comparativo de los perfiles ampelográficos de las variedades Moscatel y Negra Criolla, revelaron diferencias notables en los caracteres OIV 001, 004, 051, 067, 070, 087, 223 y 225. Esto hace referencia a los caracteres asociados a la apertura de la extremidad, densidad de los pelos tumbados en la extremidad, color de las hojas jóvenes, distribución de la pigmentación antocianica en los nervios principales, forma de las hojas adultas, densidad de los pelos erguidos en el envés del limbo, color y forma de las bayas (Tabla 3 y Figura 2). Este mismo caso ha sido explicado por

Rodríguez (2019) en la variedad Garnacha Blanca como una variante somática de Garnacha Tinta. Otro caso importante para la viticultura, fueron las variedades derivadas de Pinot noir a partir de mutaciones somáticas, estudiado por diferentes grupos de investigación (Carrier et al., 2012; Vezzulli et al., 2012; Martínez-Zapater et al., 2014; Carbonell-Bejerano et al., 2017) y han demostrado mediante secuenciación masiva cuantificando la variación en la secuencia nucleotídica existente entre los clones de Pinot Noir, responsables de la variación fenotípica observada, así también se ha evidenciado estas variaciones en otras variedades locales (Marsal et al., 2016; Jiménez-Cantizano et al., 2020). Estas variaciones fenotípicas observadas en Moscatel podrían deberse a variaciones somáticas que habría acumulado a lo largo del tiempo desde la introducción de Listan Prieto en el Perú, indicando que la variedad Moscatel del Perú sería una variante clonal de Listan Prieto.

Tabla 4

Alelos únicos hallados en las variedades de la Colección de Germoplasma del CITEagroindustrial

Locis SSR	Alelos únicos (pb)		Variedad
VVS2	139	147	Uvina
VVMD5	224		Mollar
	234	245	Italia Uvina
VVMD7	237		Uvina
VVMD27	194		Albilla
	195		Italia
VVMD28	268		Italia
	229	248	Uvina Albilla
VrZAG62	187		Italia
	186		Uvina
VrZAG79	259		Mollar
	249		Uvina

*El locus VVMD32 no presentó alelos únicos, todos los alelos fueron compartidos entre las variedades pisqueras estudiadas.

De las accesiones estudiadas, se identificaron siete variedades y sus respectivas descripciones fenotípicas. Dos de ellas pertenecieron a la misma variedad (Negra Criolla y Moscatel) aunque presentaron diferencias estables en la expresión de algunos caracteres del fenotipo. Además, se identificó a Torontel como cultivar de Perú y del cual no se ha incorporado su genotipo a la base de datos VIVC. La profundización en el estudio de las variaciones fenotípicas halladas entre Negra Criolla (var. Listan Prieto) y Moscatel (var. Listan Prieto), tanto a nivel fenotípico como genotípico, contribuiría a comprender las bases moleculares y el origen de las diferencias entre ambas variantes clonales. Además, con respecto a Torontel, sería meritorio ampliar los estudios moleculares con marcadores a fin de conocer el origen parental de la variedad.

4. Conclusiones

El análisis molecular y ampelográfico permitió esclarecer la identidad varietal de las accesiones conservadas en la Colección de Germoplasma del CITEAgroindustrial, Ica, la cual juega un rol preponderante como referente en cuanto a la identificación de las variedades más importantes, en términos tradicionales y de cultura, empleadas para la elaboración de Pisco en Perú. Se hallaron diferencias fenotípicas entre dos accesiones (Moscatel y Negra Criolla) pertenecientes a la variedad Listan Prieto señalando se trataría de variaciones clonales de dicha variedad. También, se determinó que la accesión Torontel como cultivar de Perú no corresponde a ninguna variedad registrada.

Agradecimientos

Este proyecto estuvo financiado por el Instituto de Biotecnología, Área de Genómica y Bioinformática de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

ORCID

A. Almanza Cano  <https://orcid.org/0000-0003-4518-8484>
 H. Cáceres Yparraguirre  <https://orcid.org/0000-0001-5040-8950>
 M. Del R. Torres  <https://orcid.org/0000-0001-5321-6815>
 D. Saravia Navarro  <https://orcid.org/0000-0003-3136-220X>
 R. Blas Sevillano  <https://orcid.org/0000-0003-3378-4035>

Referencias bibliográficas

Alcalde, A. (2008). *Cultivares vitícolas Argentinas*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2ª ed. C.A. de Buenos Aires. 146p.

Aliquó, G., Torres, R., Lacombe, T., Boursiquot, J. M., Laucou, V., et al. (2017). Identity and parentage of some South American grapevine cultivars present in Argentina. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(3), 452–460.

Botelho, G., Anjos, O., Estevinho, L. M., & Caldeira, I. (2020). Methanol in grape derived, fruit and honey spirits: A critical review on source, quality control, and legal limits. *Processes*, 8(12), 1–21.

Bowers, J. E., Dangi, G. S., & Meredith, C. P. (1999). Development and Characterization of Additional Microsatellite DNA Markers for Grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(3), 3.

Bowers, J. E., Dangi, G. S., Vignani, R., & Meredith, C. P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39(4), 628–633.

Cáceres, H., Quispe, P., Pignataro, D., Orjeda, G., & Lacombe, T. (2017). Morphological characterization of grapevine varieties for Pisco production under conditions of the middle zone of the Ica valley, Peru. *Scientia Agropecuaria*, 8(May), 63–72.

Carbonell-Bejerano, P., Brun, C., Marcos, J. I., & Martínez-Zapater, J. M. (2017). ACENOLOGIA Claves moleculares de la variación somática en la vid. *ACE Revista de Enología* (159), 2. http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/claves_moleculares_somatica_cienc0217.htm

Carrier, G., Le Cunff, L., Dereeper, A., Legrand, D., Sabot, F., et al. (2012). Transposable elements are a major cause of somatic polymorphism in *Vitis vinifera* L. *PLoS ONE*, 7(3), 1–10.

Indecopi. (2012). Reglamento de la Denominación de Origen Pisco. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual. Perú. In: https://www.indecopi.gob.pe/documents/20195/200722/6+Reglamento_DO-PISCO.pdf/a2259836-69e6-4c8c-b403-f8c3c38f7039

Dauob, R., Makhoul, G., & Mahfoud, H. (2018). Genetic Diversity among Grapevine (*Vitis Vinifera* L.) Cultivars of Tartous Province (Syria) using Microsatellite Markers. *International Journal of Agriculture & Environmental Science*, 5(6), 54–58.

De Mendiburu, F., & Simon, R. (2015). Agricolae - Ten years of an open source statistical tool for experiments in breeding, agriculture and biology. *PeerJ*, 3, 0–17.

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* (12) 13–15).

García De Luján, A., Puertas, B., & Lara, M. (1990). *Varietades de vid en Andalucía*. Dirección General de Investigadores y Extensión Agrarias. Andalucía - España. 254p.

Huertas, L. (2004). Historia de la producción de vinos y piscos en el Perú. In *Universum (Talca)* 19(2).

Husson, F., Josse, J., Le, S., & Maitainer, J. M. (2020). Multivariate exploratory data analysis and data mining. In *Cran* 2.3(1) 1–130. Recuperado de: <http://factominer.free.fr>.

Ibacache, A., Zurita, A., Gonzáles, C., & Montoyai, A. (2015). *Caracterización Genética y Agronómica de Variedades Pisqueras No tradicionales* 39(4).

Işçi, B. (2019). Genetic relationships of some local and introduced grapes (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite markers. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 1303–1310.

Jiménez-Cantizano, A., Muñoz-Martín, A., Amores-Arrocha, A., Sancho-Galán, P., & Palacios, V. (2020). Identification of red grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) preserved in ancient vineyards in axarquía (Andalusia, Spain). *Plants*, 9(11), 1–10.

Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). Extract and visualize the results of multivariate data Analyses. In *Cran* 1.0 (7), 84.

Labagnara, T., Bergamini, C., Caputo, A. R., & Cirigliano, P. (2018). *Vitis vinifera* L. germplasm diversity: A genetic and ampelometric study in ancient vineyards in the South of Basilicata region (Italy). *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 57(1), 1–8.

Lacombe, T., Boursiquot, J. M., Laucou, V., Di Vecchi-Staraz, M., Péros, J. P., & This, P. (2013). Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126(2), 401–414.

Li, B., Jiang, J., Fan, X., Zhang, Y., Sun, H., Zhang, G., & Liu, C. (2017). Molecular characterization of Chinese grape landraces (*Vitis* L.) using microsatellite DNA markers. *HortScience*, 52(4), 533–540.

Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6–13.

López, F. (2021). Brandy Production: Fundamentals and Recent Developments. In *Winemaking* (1ª ed., p. 27).

Marsal, G., Mateo-Sanz, J. M., Canals, J. M., Zamora, F., & Fort, F. (2016). SSR analysis of 338 accessions planted in Penedès (Spain) reveals 28 unreported molecular profiles of *Vitis*

- vinifera L. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(4), 466–470.
- Martínez-Zapater, J. M., Fernández, L., Torres-Pérez, R., Royo, C., Grimplet, J., et al. (2014). Base genética y molecular de la variación somática en la vid. *I Jornada Del Grupo de Viticultura y Enología*, 70, 47–53.
- Mendoza, K., Torres, M. R., Aliquo, G. A., Prieto, J. A., Grados, M., & Mendiola, J. (2019). Molecular and morphological characterization of the grapevine cultivars "Italia" in the Ica and Cañete valleys (Peru). *BIO Web of Conferences*, 12, 01017.
- Menevseoglu, A., Aykas, D. P., Hatta-Sakoda, B., Toledo-Herrera, V. H., & Rodríguez-Saona, L. E. (2021). Non-invasive monitoring of ethanol and methanol levels in grape-derived pisco distillate by vibrational spectroscopy. *Sensors*, 21(18), 6278.
- Milla-Tapia, A., Cabezas, J. A., Cabello, F., Lacombe, T., Martínez-Zapater, J. M., Hinrichsen, P., & Cervera, M. T. (2007). Determining the Spanish origin of representative ancient American grapevine varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(2), 242–251.
- Miliordos, D. E., Merkouropoulos, G., Kogkou, C., Arseniou, S., Alatzas, A., et al. (2021). Explore the rare—molecular identification and wine evaluation of two autochthonous greek varieties: "karnachalades" and "bogialamades." *Plants*, 10(8), 1556.
- Morón, J. (2017). La vid en el Perú y la elaboración del Pisco en Ica. *Cultura, Ciencia y Tecnología. ASDOPEN-UNMSM*, 11, 14.
- Narváez, C., Castro, M. H., Valenzuela, J., & Hinrichsen, P. (2001). Patrones genéticos de los cultivares de vides de vinificación más comúnmente usados en Chile basados en marcadores de microsatélites. *Agricultura Técnica*, 61(3), 249-261.
- OIV. (2009). Lista de descriptores OIV para variedades de vid y especies de vitis. In *Book: Vol. 2*. 2ª ed. Paris-Francia 215p.
- OIV. (2013). *Liste internationale des variétés de vigne et de leurs synonymes Internationale. Edición 2013*. 2ª ed. Paris-Francia, 235p.
- Popescu, C. F., & Crespan, M. (2018). Combining microsatellite markers and ampelography for better management of romanian grapevine germplasm collections. *Notulae Scientiae Biologicae*, 10(2), 193–198.
- Pszczółkowski, P., & Lacoste, P. (2016). Native varieties, an opportunity for chilean pisco. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 48(1), 239–251.
- Rodríguez, J. (2021). Microsatellite DNA fingerprinting of a new vinifera red grapevine cultivar , Cabernet labrusco , indigenous to South Africa. *ResearchGate*, May.
- Rodríguez-Torres, I. (2017). *Varietades de vid cultivadas en Canarias: Descriptores morfológicos. caracterización morfológica, molecular, agronómica y enológica* (2da Ed., Issue 1). Imprenta Bonnet, S.I. 194p.
- Rodríguez, J., & Matus, M. (2002). Ampelographic characteristics of the Torrontés Riojano. *Rev. FCA UNCuyo*, 1, 71–80.
- Rodríguez, M. (2019). *Estudio del origen genético de la variedad de vid Garnacha Blanca , de su diversidad fenotípica y de los efectos moleculares asociados a la variación en el color de la uva*. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja. Repositorio Institucional - Universidad de La Rioja.
- 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*, 42(3), 367–373.
- This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22, 511–519.
- Thomas, M. R., & Scott, N. S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics*, 86(8), 985–990.
- Vezzulli, S., Leonardelli, L., Malossimi, U., Estefanini, M., Velasco, R., & Moser, C. (2012). Pinot blanc and Pinot gris as arose and independent somatic mutations of pinot noir. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 695–709.