

25. Medio Ambiente

Diversidad epigenética y fenotípica de dos clones *Vitis vinifera* cv. Malbec cultivados en ambientes contrastantes

Varela, Anabella. Orientadores: Berli, Federico; Marfil, Carlos

avarela@mendoza-conicet.gob.ar

Instituto de Biología Agrícola Mendoza, Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Cuyo

Resumen

La plasticidad fenotípica (PF) es la capacidad de un genotipo para expresar fenotipos alternativos en diferentes ambientes, fenómeno que desempeña un rol clave en las respuestas a diferentes estreses, impactando en la evolución, la ecología y la agricultura. La PF abarca cambios fisiológicos, bioquímicos y de expresión génica a corto plazo, así como cambios genómicos a gran escala en la que participan modificaciones genéticas y epigenéticas. El objetivo del trabajo fue evaluar el rol de mecanismos epigenéticos en el origen de la PF en vides cv. Malbec. La hipótesis fue que clones de Malbec cultivados durante décadas en diferentes viñedos presentan patrones de metilación y fenotipos diferenciales; y que estas modificaciones epigenéticas asociadas a cada viñedo se correlacionan con los fenotipos. Se trabajó con dos clones de Malbec cultivados durante 20 años en dos ambientes (fincas) contrastantes: Gualtallary y Agrelo, Mendoza. Analizando la metilación con marcadores MSAP, se encontraron diferencias epigenéticas entre clones y el establecimiento de patrones de metilación asociados al viñedo en sólo uno de los clones. Analizando 10 caracteres morfológicos se logró diferenciar los clones en variables asociadas al rendimiento y la calidad. En la finca Agrelo se obtuvo más rendimiento y grados Bx que en Gualtallary, mientras que en esta última se observaron mayores niveles de polifenoles. Ambos clones mostraron una correlación significativa entre la variabilidad epigenética y las 10 variables fenotípicas cuando fueron comparadas las plantas de Agrelo y de Gualtallary por separado. En el trabajo se discutirá la relevancia de los hallazgos y la posibilidad de avanzar en ensayos para estudiar la estabilidad de la variabilidad encontrada.

Palabras clave: vid, *terroir*, metilación del DNA, MSAP, plasticidad fenotípica

Introducción

Las plantas al ser organismos sésiles dependen de la plasticidad fenotípica para enfrentar cambios del entorno, por lo que el fenómeno tiene un impacto significativo en la aclimatación/adaptación de las plantas en distintos ambientes de cultivo (Gianoli & Valladares, 2012). Existe una multiplicidad de mecanismos moduladores para responder y adaptarse a las diversas condiciones ambientales, los mismos operan a distintos niveles, incluyendo cambios fisiológicos, bioquímicos y de la expresión génica a corto plazo (Atkinson & Urwin, 2012), así como modificaciones genéticas y epigenéticas del genoma de mayor alcance (Turner, 2009). En la caracterización de este último conjunto de procesos es donde el presente trabajo pretende hacer un aporte.

Los mecanismos epigenéticos participan en diversos procesos biológicos, por lo que cambios en los patrones epigenéticos consiguen generar nuevos fenotipos heredables que podrían aumentar la capacidad de las plantas para adaptarse a diversos desafíos (Reinders et al., 2009). En este sentido, los mecanismos epigenéticos permiten estabilizar patrones de expresión génica particulares. Por consiguiente, la variación fenotípica puede ocurrir sin

cambios correspondientes en el genoma. La información epigenética es, por lo tanto, de particular interés para estudiar el origen de la plasticidad fenotípica (Chinnusamy & Zhu, 2009; Mirouze & Paszkowski, 2011; Reinders et al., 2009; Zhang et al., 2013).

A nivel molecular, los fenómenos epigenéticos son mediados por modificaciones reversibles tales como la metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de las histonas, y por pequeños RNAs (sRNAs) que pueden alterar la regulación de genes o regiones genómicas (Henderson & Jacobsen, 2007). El mecanismo epigenético mejor estudiado es la metilación del DNA. La variación entre individuos en el grado de metilación de un gen, a los que llamamos epialelos, puede producir nuevos fenotipos heredables mitótica y/o meióticamente.

Cambios epigenéticos inducidos ambientalmente han demostrado mediar la plasticidad fenotípica (aclimatación) a través de la regulación de la expresión génica específica, así como modificando el desarrollo de la planta después de un cambio en las condiciones ambientales (Zhang et al., 2013). La hipótesis es que los mecanismos epigenéticos contribuyen a producir plasticidad fenotípica, en contraste con variación en la secuencia de DNA, ya

que las modificaciones epigenéticas son más propensas a ser reversibles. Si bien existen numerosas evidencias que demuestran la existencia de variaciones epigenéticas y sus posibles causas ambientales, se han reportado pocos estudios exhaustivos en plantas cultivadas en su contexto productivo, condiciones en la que participan múltiples estímulos ambientales que inducen complejas respuestas en términos de expresión génica, actividad metabólica y modificaciones epigenéticas. La mayoría de las especies utilizadas para estudios epigenéticos han sido plantas herbáceas anuales ensayadas en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, la dinámica de los mecanismos epigenéticos en respuesta al ambiente plantea importantes interrogantes para las especies perennes leñosas. El presente trabajo se inserta en un proyecto con el que pretendemos avanzar sobre estas necesidades utilizando como modelo la vid (*Vitis vinifera* L.) en una situación de mundo real.

La vid es un cultivo frutícola relevante a nivel mundial (FAOSTAT, 2016) que al propagarse asexualmente y cultivarse en todo el mundo en condiciones ambientales contrastantes se ha propuesto como un excelente modelo experimental para

estudiar el papel de la variabilidad epigenética en la respuesta al estrés y la plasticidad fenotípica en plantas leñosas perennes de importancia agrícola (Fortes & Gallusci, 2017). Las vides se caracterizan por poseer una alta plasticidad fenotípica (Keller, 2010), donde la composición de la baya y la tipicidad del vino pueden asociarse a un viñedo o región vitivinícola específica. En viticultura y enología, el conjunto de todos los factores, combinando el material vegetal (genotipo), las condiciones ambientales y de manejo que afectan la calidad de la uva y el vino, se conoce como *terroir*. Existe un interés creciente en generar bases científicas para una mejor comprensión de cómo los factores individuales del *terroir* influyen en el comportamiento de la vid (Anesi et al., 2015). Debido a la falta de información sobre cómo el ambiente afecta el epigenoma en vid y en qué medida esta interacción afecta la calidad de la fruta, una publicación reciente clama por la inclusión de datos epigenómicos en el análisis del efecto *terroir* (Fabres et al., 2017).

Las bases moleculares de la plasticidad fenotípica en vid se han evaluado comparando el transcriptoma de bayas en un solo clon del cv. Corvina durante tres años consecutivos de crecimiento en 11 viñedos diferentes (Dal Santo et al., 2013).

Los autores encontraron genes candidatos potencialmente responsables de la plasticidad fenotípica y avanzaron hacia la caracterización de la plasticidad transcriptómica bajo diferentes sistemas agrícolas. En el trabajo de Dal Santo et al. (2016), estudiaron la plasticidad fenotípica de la maduración de bayas en el cv. Garganega, una variedad blanca típica de Verona, Italia. Llegaron a la conclusión de que hay una respuesta metabolómica altamente plástica cuando Garganega se cultivó en diferentes ambientes, especialmente la fracción fenólica. Lo mismo sucedió con la respuesta transcriptómica, pudiendo identificar algunos genes asociados con la plasticidad fenotípica observada. Los autores confirmaron una clara correlación entre la expresión génica y la acumulación de fenilpropanoides y flavonoides, y también que no todos los cultivares de vid son igualmente plásticos, ya que al comparar el metabolismo de compuestos fenólicos de las bayas, el cv. Garganega mostró ser más plástico que Corvina (Dal Santo et al., 2016). El presente trabajo utiliza uno de los cultivares insignia de la vitivinicultura argentina como modelo de generación de conocimiento acerca de la respuesta de la vid al ambiente, estudiando el rol de la metilación del DNA en la plasticidad

fenotípica de clones de Malbec cultivados durante décadas en entornos (fincas) contrastantes. La información obtenida nos permitirá profundizar el entendimiento de la plasticidad fenotípica asociada al *terroir*.

Objetivos

- 1- Estudiar los cambios epigenéticos entre clones cultivados en distintos viñedos (ambientes de cultivo).
- 2- Estudiar los cambios fenotípicos producidos por la plantación de clones en distintos viñedos.
- 3- A partir de la información obtenida en los objetivos anteriores, detectar las correlaciones entre modificaciones epigenéticas y los cambios fenotípicos en respuesta al ambiente.

Materiales y Métodos

Material vegetal

En la temporada 2016-2017 se trabajó con cinco réplicas biológicas de dos clones de *Vitis vinifera* cv. Malbec que forman parte de la colección de la empresa Bodegas Esmeralda S.A.: clon 01 (MB01) y clon 10 (MB10), los cuales son cultivados desde 1995 en Agrelo, Luján de Cuyo (33°10'04.25" S 68°54'20.91" O) y desde 1999 en Gualtallary, Tupungato (33°23'42.91" S 69°14'50.10" O). La densidad de plantación en ambos viñedos

es de 4444 plantas por hectárea con 2 m entre hileras y 1,25 m entre plantas conducidas en un espaldero alto. La poda utilizada es guyot doble, con cargadores de 14 a 16 yemas. El riego es por goteo. Sólo el viñedo de Gualtallary posee malla antigranizo. Ambos ambientes de cultivo son propiedad de la misma bodega y cuentan con un manejo agronómico similar. En septiembre 2016 ápices meristemáticos de cada clon y en cada viñedo fueron recolectados para su análisis molecular. Las muestras (10 por viñedo) fueron congeladas con nitrógeno líquido y colocadas a -80 °C hasta su procesamiento. En febrero de 2017 muestras de racimos y hojas de las mismas plantas fueron extraídas de la orientación este del espaldero para su caracterización fenotípica. A la altura media del primer brote de cada brazo se tomaron dos hojas sanas y enteras mientras que se tomó solo el primer racimo del primer brote del brazo izquierdo. Hojas y bayas fueron colocadas en bolsas de nylon etiquetadas, mantenidas en hielo para prevenir su deshidratación, transportadas al laboratorio y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

Extracción de DNA y análisis molecular

El DNA genómico de los ápices meristemáticos se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Lodhi et al. (1994) reemplazando la extracción con

Cloroformo:Octanol, por Cloroformo:Isoamílico. Luego de medir la cantidad y calidad del DNA por espectrofotometría (Ampliquant AQ-07 Spectrophotometer), las muestras se diluyeron a 50 ng/μl en un volumen final de 50 μl. La variabilidad genética y epigenética se analizó con la técnica *methylation-sensitive amplified polymorphism* (MSAP). Este análisis permite evaluar patrones de metilación de secuencias anónimas distribuidas por todo el genoma mediante una amplificación selectiva por PCR de fragmentos digeridos usando las enzimas de restricción *EcoRI*, *HpaII* y *MspI*. *HpaII* y *MspI* son isoesquizómeros que presentan una sensibilidad diferencial a la metilación de las citosinas del sitio de corte 5'-CCGG. Los fragmentos obtenidos de la digestión con *EcoRI* y luego con *HpaII* indica que una citosina externa se encuentra hemimetilada, mientras que las obtenidas con *EcoRI/MspI* indica una metilación en la citosina interna (Eckstein et al., 2013). La presencia de un mismo fragmento en ambas digestiones indica un sitio que se encuentra desmetilado. Finalmente la ausencia de fragmentos en ambas amplificaciones da lugar a una interpretación ambigua ya que puede deberse tanto a una metilación completa como a una mutación en la secuencia nucleotídica de ese sitio de corte

(Fig.1A). Las 20 muestras fueron tratadas siguiendo las especificaciones del protocolo de MSAP descritas por Cara et al. (2013). Tres primers selectivos *EcoRI marcados con fluorescencia (*FAM) fueron combinados con tres primers HpaII/MspI elegidos por su polimorfismo y repetibilidad en un ensayo previo (Tabla1). Los productos de la amplificación se separaron electroforéticamente usando el secuenciador ABI PRISM 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) y el marcador LIZ1200 (GeneScan™), servicio provisto por la Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires.

Tabla 1. Adaptadores y primers usados en este trabajo para el análisis por MSAP.

Primers de amplificación selectiva		Fragmentos obtenidos
Combinación 1	*EcoRI+AAG/ HpaII-Msp I+AAT	254
Combinación 2	*EcoRI+AAG/HpaII-Msp I+ATC	276
Combinación 3	*EcoRI+ACG/HpaII-Msp I+ATG	279
Total:		800

Análisis de datos moleculares

Los electroferogramas de cada combinación de primers se analizaron con el software GeneMarker V2.7.0 teniendo en cuenta tamaños comprendidos entre 100 y 600 pb. Para determinar la presencia o ausencia de un determinado fragmento se consideró un umbral de 50 RFU (*Relative Fluorescent Units*). Luego de una verificación manual de

los fragmentos, la matriz presencia/ausencia se transformó en una matriz de patrones de metilación de 0 a 3 (Fig.1A). Para asegurarnos que el polimorfismo epigenético fuese debido a alteraciones en el patrón de metilación y no a cambios genéticos en el sitio CCGG, se construyeron dos matrices distintas. Aquellos loci en donde todos los individuos presentaban el patrón 0 (ambiguo) y/o 1 (desmetilado) fueron apartados y utilizados para analizar la diversidad genética de las plantas estudiadas (Fig.1B). Con el resto de los epiloci se estudió la diversidad epigenética de las plantas. El patrón de metilación de cada epilocus (epialelo) fue codificado en una matriz binaria indicando la presencia (1) o ausencia (0) de cada patrón en particular (Fig.1A). Los epialelos presentes en un solo individuo (*singletons*) fueron considerados artefactos y excluidos de ambas matrices para evitar errores en los análisis estadísticos (Bonin et al., 2004). De la matriz epigenética se eliminó un epiloci monomórfico.

Análisis fenotípico

En total se analizaron 10 variables: diámetro de tronco (parámetro de vigor vegetativo), peso de racimo, número de bayas por racimo, peso fresco por baya (parámetros de rendimiento); °Brix (°Bx), número de semillas por baya, peso seco de hollejo,

A.	Estado de metilación	Fragmentos MSAP		MSAP patrón de metilación	Codificación binaria			B.	Epiloci					
		<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>		_1	_2	_3		Planta	1	2	3	4	5
Planta X ₁	CCGG	————	————	_1	1	0	0	X ₁	1	2	1	3	0	0
	GGCC													
Planta X ₂	CCGG	————		_2	0	1	0	X ₂	1	2	0	3	0	0
	GGCC													
Planta X ₃	CCGG		————	_3	0	0	1	X ₃	1	2	2	0	0	1
	GGCC													
Planta X ₄	CCGG			_0	0	0	0	X ₄	1	2	1	3	0	0
	GGCC													
	CCTG		Ambiguo											
	GGAC													

Fig 1: Patrones de amplificación obtenidos con marcadores MSAP e inferencia de los patrones de metilación. **A.** De la comparación de los fragmentos obtenidos a partir de DNA digerido con *EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI* se codificaron cuatro patrones de metilación (epialelos): _1 (Desmetilado), _2 (Hemimetilado), _3 (Metilado), _0 (Ambiguo). Los recuadros grises indican sitios de metilación. Los epialelos _1, _2 y _3 fueron luego codificados en una matriz binaria. **B.** Ejemplo de una matriz de patrones de metilación. Para el análisis de datos se apartaron los loci que representan cambios genéticos (1 y 6) de los que representan cambios epigenéticos (2 a 5) para trabajar de este modo con dos matrices independientes. El epilocus 5 se considera *singleton* y el epilocus 2 monomórfico.

contenido polifenólico (parámetros de calidad). El diámetro de tronco (medido a 65 cm del nivel del suelo), peso de racimo, número de bayas por racimo y peso de las bayas fue medido in situ en el momento del muestreo. El extracto fenólico de los hollejos y los °Bx fueron determinados de acuerdo a lo detallado por Berli et al. (2011). El hollejo usado para el extracto fenólico fue recuperado, colocado en papeles de aluminio tarados y llevado a estufa a 60°C hasta peso constante para medir peso seco de hollejos. El espectrofotómetro Varian Cary UV-vis fue utilizado como lo describe Berli et al. (2008) para medir antocianos

similitud fueron generados mediante el coeficiente DICE y el método de enlace UPMGA para la construcción del dendrograma genético y epigenético utilizando el programa NTSySpc versión 2.10t.. El análisis de componentes principales (ACP) junto con su gráfico biplot se utilizó para evaluar la variabilidad fenotípica. Para el análisis de correlación lineal se realizó el test de Mantel utilizando la matriz de distancias fenotípicas (Euclídea) y las matrices de distancias genética y epigenéticas (DICE, sqrt(1-S)). Los análisis ACP y el test de Mantel se realizaron con el software InfoStat (InfoStat

versión 2009; Grupo InfoStat, Córdoba, Argentina).

Resultados y Discusión

Las tres combinaciones de primers **EcoRI/HpaII-MspI* generaron un total de 800 epiloci, de los cuales 183 (23%) fueron apartados y utilizados para analizar la variabilidad genética.

Variabilidad genética

De los 183 fragmentos utilizados para analizar la variabilidad genética, 19 (~10%) se excluyeron del análisis por ser *singletons*. Los 164 loci restantes reflejaron una alta variabilidad interclon (97%). La variabilidad intraclon para MB01 y MB10 fue del 3% y 0% respectivamente. Todos los individuos del clon MB01 se diferenciaron genéticamente de MB10 (Fig.2A). Estudios previos han demostrado que la variabilidad interclonal ocurre con frecuencia debido a eventos de mutación somática (Anhalt et al., 2011). Más aún, el grado de variación clonal en *Vitis* ssp. parece ser dependiente del cultivar, en donde los cultivares Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Sangiovese y Traminer cuentan con mayor variación genética entre clones que Carmenere, Riesling o Zinfandel (Konradi et al., 2007). Dentro de cada clon no hay agrupamiento por lugar de procedencia, por lo que podemos inferir que los clones de Agrelo y

Gualtallary son genéticamente iguales. Estudios previos han usado marcadores AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) para distinguir variabilidad genética en clones de vid, arrojando coeficientes de similitud intraclonal más altos que los obtenidos en nuestros resultados (Blaich et al., 2007; Konradi et al., 2007). Imazio et al. (2002) luego de analizar 24 clones del cv. Traminer con marcadores AFLP y MSAP observó agrupamientos distintos entre clones con cada técnica. Las marcadas diferencias genéticas observadas entre los clones comparados en el presente trabajo puede deberse a que las mismas fueron inferidas a partir de marcadores MSAP. En suma, los resultados obtenidos confirmaron que para cada clon las plantas cultivadas en las diferentes fincas no presentan diferencias genéticas apreciables.

Variabilidad epigenética

De los 617 epiloci iniciales, se eliminaron 109 (18%) *singletons* y un epilocus monomórfico en el cual todos los individuos presentaron un patrón metilado. En total 507 epiloci fueron computados, en los cuales se identificaron 839 epialelos. Cuando se eliminaron aquellos patrones identificados como *singletons* quedaron 625 epialelos. El análisis fenético diferenció epigenéticamente los clones en dos grupos

(Fig.2B). Estudios previos también reportan diferencias entre clones al usar la técnica MSAP. Ocaña et al., (2013) logró distinguir epigenéticamente 37 clones de cv. Pinot Noir de los 40 estudiados. Más aún, la variación en los patrones de metilación de somaclones provenientes de dos cultivares de vid también se lograron detectar con esta técnica (Schellenbaum et al., 2008). Tanto Ocaña et al., (2013) como Schellenbaum et al., (2008) remarcan la importancia de los estudios epigenéticos para evaluar la diversidad clonal. Respecto a la influencia del ambiente en el epigenoma, sólo MB10 presenta variabilidad epigenética debido al lugar de procedencia (Fig.2B). El comportamiento de MB10 está en concordancia con trabajos similares donde han observado variabilidad epigenética en respuesta a cambios ambientales o a distintas condiciones de estrés (Chinnusamy & Zhu, 2009; Zhang et al., 2013). Esta variabilidad puede ser resultado de un control genético, inducción ambiental y/o epimutaciones estocásticas (Richards et al., 2017). Dado que los dos clones evaluados mostraron un comportamiento diferencial respecto al ambiente de cultivo, podemos suponer que un control genético podría estar influenciando la posibilidad del epigenoma de responder al ambiente. En una revisión reciente se presentan

evidencias de control genético sobre la variabilidad epigenética de *Arabidopsis thaliana* y maíz (Richards et al., 2017).

Análisis Fenotípico

No se observó variabilidad significativa debido al clon o al ambiente de cultivo en el diámetro del tronco, el número de semillas por baya y el peso seco de hoja. Variaciones fenotípicas inducidas por el ambiente se observaron en cinco variables, confirmando la alta plasticidad fenotípica de la vid (Keller, 2010). En Agrelo se obtuvieron racimos más pesados, con mayor número de bayas y °Bx, mientras que en Gualtallary los hollejos presentaron mayor peso seco y cantidad de antocianos totales. La finca Gualtallary se ubica a 1450 m s.n.m. mientras que Agrelo está a 1000 m s.n.m. Mayores alturas sobre el nivel del mar determina mayores niveles de radiación ultravioleta B (UV-B) (Berli et al., 2011). Para la protección de esta radiación, vacuolas de células epidérmicas acumulan compuestos polifenólicos con propiedades antioxidantes capaces de absorber rayos UV-B (Alonso et al., 2016). A su vez, existe evidencia demostrando que los antocianos protegen a la planta del estrés abiótico (Alonso et al., 2016). El mayor contenido de antocianos y peso seco de los hollejos observado en Gualtallary podría estar

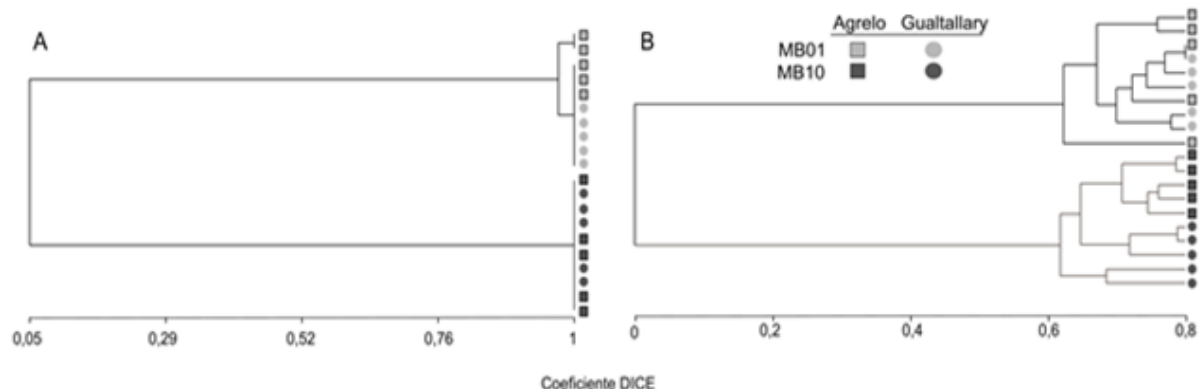


Fig. 2. Análisis de la variabilidad genética y epigenética en dos clones del cv. Malbec cultivados durante dos décadas en dos fincas diferentes. **A** Dendrograma basado en la matriz binaria de similitud genéticas. **B** Dendrograma basado en la matriz binaria similitud epigenética.

relacionado con esta función protectora.

Anesi et al. (2015) observaron en clones de cv. Corvina una respuesta metabólica plástica dependiente del *terroir* que persiste durante varias vendimias observando diferencias claras en estilbenos, antocianinas, flavonoides. Resultados similares se observaron en el trabajo de Dal Santo et al., (2016), donde se concluye que existe una respuesta metabólica altamente plástica del cv. Garganega cuando es cultivado en distintos ambientes, especialmente en flavanoles y ácidos fenólicos. La activación de estos mecanismos fotoprotectores que actúan a expensas del rendimiento (Alonso et al., 2016) podrían explicar los menores rendimientos observados en la finca Gualtallary respecto a la de Agrelo (Fig.3).

La asociación de la finca Agrelo con mayores niveles de $^{\circ}\text{Bx}$ podría deberse a que los racimos fueron extraídos el mismo día de ambas fincas y en Gualtallary la acumulación de azúcares es más lenta por las menores temperaturas presentes. Independientemente del lugar, el clon MB01 presentó mayor peso de racimos y número de bayas, siendo el clon más productivo de los evaluados.

Correlaciones

Se observó una correlación casi total entre la variabilidad genética y epigenética de ambos clones mientras que no se observó correlación entre la variabilidad genética con la fenotípica (Tabla 2). Como se detalló previamente, este resultado podría deberse a que la variabilidad genética fue estimada a partir de marcadores MSAP.

Respecto a la variabilidad epigenética de ambos clones y computando la variabilidad fenotípica observada en los 10 caracteres

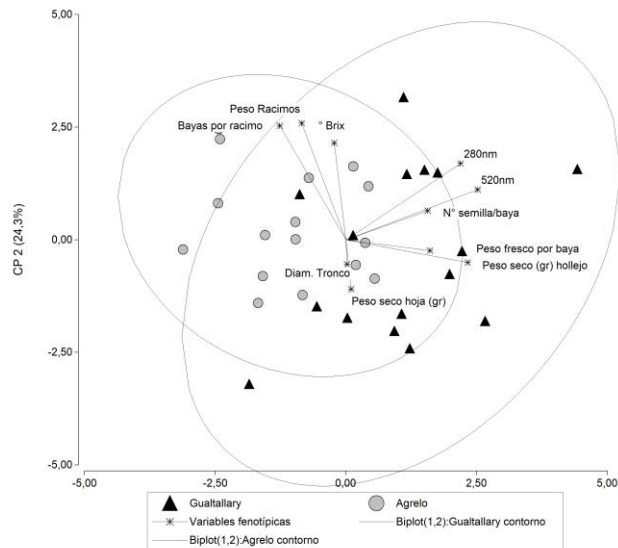


Fig.3. Visualización Biplot del ACP de las medidas de 10 caracteres morfológicos medidos en los clones cv. Malbec MB01 y MB10 para los dos sitios de cultivo, Agrelo y Gualtallary.

estudiados no se observó correlación lineal significativa. Se encontró correlación lineal significativa cuando se analizaron por separado los clones provenientes de Agrelo y Gualtallary (Tabla 2). La finca Gualtallary se caracteriza por poseer mayores niveles de UV-B, en donde los cambios epigenéticos inducidos por dicho estrés abiótico podrían tener una ventaja adaptativa para las plantas (Chinnusamy & Zhu, 2009). El clon MB10 mostró una correlación lineal de 0,54 (p-value=0,006) cuando fue analizado en relación a la

variabilidad observada en los °Bx y el peso seco de hollejo. Estos resultados sugieren que el ambiente puede afectar el fenotipo a través de un cambio en el epigenoma, y de esta manera contribuir potencialmente a la PF de las plantas (Fabres et al., 2017). Más aún, si estos cambios persisten a lo largo de muchas generaciones, entonces en algún punto pueden conducir a cambios en el genotipo que consolidan de manera funcional al cambio epigenético iniciador (Turner, 2009).

Tabla 2. Análisis de correlación lineal entre matrices de variabilidad genética, epigenética y fenotípica. Valores de R², entre paréntesis se indica el p-valor. *A y *G indican correlaciones entre variables obtenidas de plantas de Agrelo y Gualtallary, respectivamente.

	Genética	Epigenética	Morfológica
Genética	1		
Epigenética	0,98 (<0,0001)	1	
Morfológica	0,11 (0,0570)	0,52 (0,003)*A 0,21 (0,04)*G	1

Conclusiones

A pesar de la importancia comercial de los distintos clones de vid, la dinámica epigenética ha sido poco investigada en plantas leñosas perennes (Fortes & Gallusci, 2017). El presente estudio analizó

epigenética y fenotípicamente dos clones de Malbec cultivados hace 20 años en dos fincas contrastantes. Los resultados muestran que la metilación del DNA estuvo asociada al *terroir* sólo en el clon MB10, ya que presentó modificaciones epigenéticas distintas en cada viñedo a pesar de no existir diferencias genéticas entre ambos ambientes de cultivo. Fenotípicamente cada clon presentó comportamientos distintos en cada viñedo para 7 de las 10 variables estudiadas.

El análisis de correlación entre matrices de distancias epigenéticas y fenotípicas sugiere que el ambiente indujo cambios epigenéticos en MB10 que pueden estar contribuyendo en las diferencias de los fenotipos medidos. Para tener mayores indicios sobre si el genoma influye en la respuesta epigenética del clon, se evaluará el comportamiento de un tercer clon distinto de MB01 y MB10. Fortes & Gallusci (2017) mencionan que la variación en los patrones de metilación podría estar asociado con rasgos ambientales específicos, por lo tanto se analizarán las variables climáticas de cada viñedo (temperatura y humedad relativa del aire, precipitaciones y radiación solar) para conocer el grado de correlación de los cambios epigenéticos con el ambiente. Para estudiar la estabilidad en el tiempo de los cambios epigenéticos

encontrados, el clon con mayor variabilidad epigenética entre fincas se evaluará durante tres temporadas en una tercera finca. Caracterizando este material se espera describir patrones epigenéticos que se reprograman ante el cambio de ambiente como así también otros que muestren estabilidad (efecto de memoria) y finalmente poder asociar esta dinámica a cambios en la expresión génica y el fenotipo.

Bibliografía

- Alonso, R., Berli, F. J., Piccoli, P., & Bottini, R. (2016). Ultraviolet-B radiation, water deficit and abscisic acid: a review of independent and interactive effects on grapevines. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 28(1), 11–22. <https://doi.org/10.1007/s40626-016-0053-y>
- Anesi, A., Stocchero, M., Dal Santo, S., Commisso, M., Zenoni, S., Ceoldo, S., ... Guzzo, F. (2015). Towards a scientific interpretation of the terroir concept: plasticity of the grape berry metabolome. *BMC Plant Biology*, 15(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0584-4>
- Anhalt, U. C. M., Martínez, S. C., Rühl, E., & Forneck, A. (2011). Dynamic grapevine clones-an AFLP-marker study of the *Vitis vinifera* cultivar Riesling

- comprising 86 clones. *Tree Genetics and Genomes*, 7(4), 739–746. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0370-x>
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523–3543. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers100>
- Berli, F., D'Angelo, J., Cavagnaro, B., Bottini, R., Wuilloud, R., & Silva, M. F. (2008). Phenolic Composition in Grape (*Vitis vinifera* L . cv . Malbec) Ripened with Different Solar UV-B Radiation Levels by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2892–2898. <https://doi.org/10.1021/jf073421>
- Berli, F. J., Fanzone, M., Piccoli, P., & Bottini, R. (2011). Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *vitis vinifera* L. Increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4874–4884. <https://doi.org/10.1021/jf200040z>
- Blaich, R., Konradi, J., Ruhl, E., & Forneck, A. (2007). Assessing genetic variation among Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) clones with AFLP markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(4), 526–529.
- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, P. B., Pompanon, F., Brochmann, C., & Taberlet, P. (2004). How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13(11), 3261–3273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02346.x>
- Cara, N., Marfil, C. F., & Masuelli, R. W. (2013). Epigenetic patterns newly established after interspecific hybridization in natural populations of *Solanum*. *Ecology and Evolution*, 3(11), 3764–3779. <https://doi.org/10.1002/ece3.758>
- Chinnusamy, V., & Zhu, J. K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.006>
- Dal Santo, S., Fasoli, M., Negri, S., D'Incà, E., Vicenzi, N., Guzzo, F., ... Zenoni, S. (2016). Plasticity of the Berry Ripening Program in a White Grape Variety. *Frontiers in Plant Science*, 7(July), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00970>
- Dal Santo, S., Torielli, G. B., Zenoni, S., Fasoli, M., Farina, L., Anesi, A., ... Pezzotti, M. (2013). The plasticity of

- the grapevine berry transcriptome. *Genome Biology*, 14(6), r54. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r54>
- Eckstein, R. L., Management, R., & Use, L. (2013). Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies, 642–653. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12100>
- Fabres, P. J., Collins, C., Cavagnaro, T. R., & Rodríguez López, C. M. (2017). A Concise Review on Multi-Omics Data Integration for Terroir Analysis in *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science*, 8(June), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01065>
- FAOSTAT. (2016). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Retrieved from <http://faostat3.fao.org/home>
- Fortes, A. M., & Gallusci, P. (2017). Plant Stress Responses and Phenotypic Plasticity in the Epigenomics Era: Perspectives on the Grapevine Scenario, a Model for Perennial Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 08(February), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00082>
- Gianoli, E., & Valladares, F. (2012). Studying phenotypic plasticity: The advantages of a broad approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01793.x>
- Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 447(7143), 418–424. <https://doi.org/10.1038/nature05917>
- Imazio, S., Labra, M., Grassi, F., Winfield, M., Bardini, M., & Scienza, A. (2002). Molecular tools for clone identification: The case of the grapevine cultivar “Traminer.” *Plant Breeding*, 121(6), 531–535. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.00762.x>
- Keller, M. (2010). Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: A climate change primer for viticulturists. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(SUPPL. 1), 56–69. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00077.x>
- Konradi, J., Blaiich, R., & Forneck, A. (2007). *Genetic variation among clones and sports of “Pinot noir” (Vitis vinifera L.)*. *European Journal of Horticultural Science* (Vol. 72).
- Lodhi, M., Ye, G.-N., Weeden, N., & Reisch, B. (1994). A Simple and Efficient

- Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars, Vitis Species and Ampelopsis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6–13. Retrieved from [papers2://publication/uuid/7551A425-89F7-4DCB-934D-AC8860F0B592](https://doi.org/10.1007/s12033-013-9675-3)
- Mirouze, M., & Paszkowski, J. (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.004>
- Ocaña, J., Walter, B., & Schellenbaum, P. (2013). Stable MSAP markers for the distinction of vitis vinifera cv pinot noir clones. *Molecular Biotechnology*, 55(3), 236–248. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9675-3>
- Reinders, J., Wulff, B. B. H., Mirouze, M., Marí-Ordóñez, A., Dapp, M., Rozhon, W., ... Paszkowski, J. (2009). Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic Arabidopsis epigenomes. *Genes and Development*, 23(8), 939–950. <https://doi.org/10.1101/gad.524609>
- Richards, C. L., Alonso, C., Becker, C., Bossdorf, O., Bucher, E., Colomé-Tatché, M., ... Verhoeven, K. J. F. (2017). Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. *Ecology Letters*, 20(12), 1576–1590. <https://doi.org/10.1111/ele.12858>
- Schellenbaum, P., Mohler, V., Wenzel, G., & Walter, B. (2008). Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*, 8(1), 78. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-78>
- Turner, B. M. (2009). Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1534), 3403–3418. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0125>
- Zhang, Y. Y., Fischer, M., Colot, V., & Bossdorf, O. (2013). Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, 197(1), 314–322. <https://doi.org/10.1111/nph.12010>

Financiamiento y agradecimientos

Proyecto UE IBAM-CONICET 2016, Proyecto SeCTyP-UNCuyo 2016-2018 (A043). Anabella Varela es becaria doctoral de CONICET. Los autores agradecen a Catena Institute of Wine (CIW), Bodega Catena Zapata por su colaboración en los ensayos.