

Exemple que il·lustra les possibilitats d'utilització de la seqüenciació en la tècnica dels SSR*

Resum de la conferència impartida per la Dra. Fort dins del 5é Congrés de l'ICEA (Institució Catalana d'Estudis Agràris, filial de l'Institut d'Estudis Catalans), el mes de juliol de 2007 a la Universitat Politècnica de Catalunya, campus Castelldefels)

IDENTIFICACIÓ I TIPIFICACIÓ DE VARIETATS DE *Vitis vinifera* L. AUTÒCTONES O BÉ MOLT ARRELADES ALS PAÏSOS CATALANS

Francesca Fort¹, Catalina Baig ¹, Tomas Puig², Nuria Barbera², Joan M. Canals¹, Fernando Zamora¹

¹ Grup de Tecnologia Enològica. Dep. Bioquímica i Biotecnologia. Unitat d'Enologia del Certa. Facultad de Enología de Tarragona. Universidad Rovira i Virgili. C/ Marcel·li Domingo, s/n. 43007-Tarragona.977 558976 mariafrancesca.fort@urv.cat

² Bodegues Sumarroca SL. El Rebato s/n 08739 Subirats, Barcelona.

Resum

L'objectiu d'aquest treball va ser la caracterització de diferents varietats de *Vitis vinifera* mitjançant la tècnica dels microsatèl·lits (SSR). Es varen estudiar 59 varietats procedents del germoplasma de Bodegues Sumarroca SL. El total de varietats identificades va ser inferior (49 varietats o genotipus) ja que es detectaren algunes identitats (sinonímies). Concretament varen ser les següents: Grumet Negre-Ginebra; Macabeu-Cerverola-Verdiguell; Monastrell-Garrut-Morastrell; Subirat parent-Vinyater-Barcelonès; Torrontés-Marseguera; Trepal-Traput-Isidrós. D'altra banda es va trobar un grup de varietats amb un sol *locus* (o microsatèl·lit) de diferència i quatre amb dos *loci* (o microsatèl·lits), que es consideraren clons. També es trobaren 13 homonímies a partir de l'estudi de diferents bases de dades i diferents diccionaris ampelogràfics. En les varietats viníferes estudiades es detectaren un total de 85 al·lels. Es va comprovar l'eficàcia i la capacitat discriminant dels microsatèl·lits utilitzats, éssent els millors: el ZAG47, el ZAG64 i el VVMD28. El conjunt d'aquests resultats va permetre l'elaboració d'un fenograma i d'un arbre filogenètic de les varietats estudiades.

Palabras clave: *Vitis vinifera*, microsatèl·lites, ADN, sinonímies, homonímies.

1. INTRODUCCIÓ

La producció actual de vi a casa nostra (de la mateixa manera que a la resta de zones vitivinícoles mundials) ha quedat restringida a la utilització d'un petit nombre de varietats, concretament en les 11 Denominacions d'Origen Catalanes (exceptuant la D.O. Cava), està permès vinificar amb no més de 35 varietats aproximadament, de les quals unes 23 pertanyen a l'estat espanyol. Aquestes xifres són del tot ridícules si tenim present que la població mundial de varietats viníferes està compresa entre 10.000 i 20.000 varietats. Això ha fet per un costat, que els vins siguin molt semblants en les seves característiques organolèptiques, i per l'altre, ha forçat la pèrdua de la biodiversitat de *Vitis vinifera* per la desestimació de varietats potser menys conegudes, però portadores d'una tipicitat única.

Bodegues Sumarroca S.L. ha estat la pionera en construir un germoplasma ampli, d'unes 339 varietats entre les quals n'hi ha 59 que estan molt arrelades o bé són autòctones dels Països Catalans, les quals identificarem i tipificarem en aquest estudi. L'estratègia a seguir és la detecció del que es coneix com a sinonímies i homonímies, que no són més que l'expressió dels errors que poden aparèixer quan la classificació de varietats es realitza utilitzant la ciència coneguda amb el nom d'Ampelografia, la qual utilitza els caràcters fenotípics (morfològics) per a la classificació de varietats. El terme **sinonímia** fa referència a quan un mateix genotipus rep o se'l coneix per més d'un nom degut a la seva redenominació durant el període de dispersió geogràfica, en canvi el terme **homonímia** fa referència a quan a un sol nom li corresponen diferents genotipus.

L'objectiu d'aquest estudi és la identificació i tipificació de varietats mitjançant l'estudi del seu genoma (ADN), ja que és invariable, molt més exacte i per tant capaç de detectar el mal indexatge ampelogràfic (sinonímies i homonímies). La tècnica utilitzada és coneix amb el nom de microsatèl·lits o SSR (*Simple Sample Repeat*), es tracta d'un marcador molecular que ens permet diferenciar individus amb exactitud arribant a nivell de varietat.

Els microsatèl·lits a més, ens permetran establir amb fiabilitat les relacions filogenètiques existents entre els 49 individus que configuraran aquesta població.

2. MATERIAL I MÈTODES

- S'ha aïllat l'ADN de 59 varietats de *Vitis vinifera* del germoplasma de Bodegues Sumarroca S.L., fent servir el Kit d'extracció de QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit).
- L'amplificació dels fragments s'ha fet en un termociclador MyCycler (BioRad), utilitzant els següents «primers» marcats amb diferents fluorocroms: VVS2, VVS29 [1]; ZAG47, ZAG62, ZAG64, [2]; VVMD6, VVMD7, VVMD28 [3]; UCH11, UCH12, UCH19 [4].
- Els fragments amplificats s'han analitzat en un seqüenciador ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems) (electroforesis capil·lar).
-

El programa utilitzat per analitzar les dades ha estat el GenAEx 6.0, el qual permet realitzar la identificació dels genotipus existents. Per la construcció del fenograma i l'arbre fillogenètic s'ha fet servir el programa Treeview.

L'estudi de les homonímies ha estat bibliogràfic utilitzant diferents bases de dades ampelogràfiques, tals com «*Vitis* Internacional Variety Catalogue», «*European Vitis Database*» etc. i diversos diccionaris ampelogràfics.

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

De les 59 varietats que presentem a la Taula 1, s'han detectat com sinonímies: **Grumet Negre-Ginebra**; **Macabeu-Cerverola-Verdiguell**; **Monastrell-Garrut-Morastrell**; **Monastrell blanca-Merseguera**; **Trepat-Traput-Isidròs**; **Subirat parent-Vinyater-Barcelonés**. Així doncs, la població dels Països Catalans d'aquest germoplasma estarà formada per 49 genotipus.

Taula 1. Llistat de les 59 varietats arrelades o autòctones dels Països Catalans del germoplasma de Bodegues Sumarroca

<i>Varietats blanques</i>	<i>Origen</i>	<i>Varietats negres</i>	<i>Origen</i>
AFARTAPOBRES	Catalunya	BOVAL	País Valencià
BARCELONÉS (Alarije)	Espanya	CAMES DE GARSA	Catalunya
ALICANTÍ	Alacant	COLLÓ DE GALL	Catalunya
CEP DE LA MARIA	Catalunya	DE MANDUIXA	Catalunya
CERVEROLA	Catalunya	ESCOURSACH	Illes Balears
CUA DE MOLTÓ	Catalunya	ESPERÓ DE GALL	Illes Balears
FRANCESET			
(Chasselas blanc)	França	FOGONEU	Illes Balears
GARNATXA BLANCA	Catalunya	FORCOLLAT NEGRE	Espanya
	Aragó	GARNATXA NEGRA	Catalunya-Aragó
GRANITO DE ORO	?	GARRUT	Catalunya
MACABEU (Viura)	Catalunya	GINEBRA	Catalunya
MAGDALENS	Catalunya	GIRÓ ALACANT	?
MALVASIA DE SITGES	Catalunya	GRUMET NEGRE	Illes Balears
MARSEGUERA			
(Merseguera)	P. Valencià	ISIDRÓS	?
MASSECAMP	Catalunya	LLEDONER PELUT	Catalunya-Aragó
MATEU	Catalunya	MAMELLA DE MONJA	Catalunya
MOC DE GALL	Catalunya	MANDÓ	Catalunya
PARELLADA	Catalunya	MANTO NEGRO	Illes Balears

PLANTA (novas)	P. Valencià	MONASTRELL	P. Valencià
QUIGAT	Catalunya	MONASTRELL	P. Valencià
SANT JAUME	Catalunya	MORENILLO	Espanya
SUBIRAT PARENT (Malvasia blanca)	Itàlia	MORO NEGRE	Catalunya
TORRONTÉS BLANCA (Monastrell blanca)	Espanya	PÀMPOL GIRAT	Catalunya
VERDIELL	Catalunya	PLANTA MULLA	P. Valencià
VERDIGUELL	P. Valencià	SABATÉ NEGRA	Illes Balears
VILANOVA	Catalunya	SALZENC	P. Valencià
VINYATER	Catalunya	TARRAGONÍ	Catalunya
XAREL-LO	Catalunya	TRAPUT	Espanya
		TREPAT	Catalunya
		TROBAT	Catalunya
		ULL DE LLEBRE (Tempranillo)	Catal./Esp.
		XAREL-LO VERMELL	Catalunya

Com a clons que presenten el mateix genotipus trobem: **Xarel.lo-Xarel.lo vermell** i **Garnatxa negra-Garnatxa blanca-Lledoner pelut**, que no podem diferenciar mitjançant aquesta tècnica, però que es distingeixen en el seu color i en la seva pilositat. Aquest fet ens indica que els SSR no són capaços de discriminar clons tant pròxims (una o poques mutacions). S'ha descrit que la tècnica idònia per poder diferenciar aquest tipus de clons és la que és coneix com AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

Entre les varietats que presenten diferències en 1 ó 2 *loci* podem trobar els següents grups de varietats: **Grumet negre-Ginebra** respecte a **Mamella de monja**; **Giro alacant** respecte al **Garrut-Monastrell-Morastrell**; **Granito de Oro** respecte a **Afartapobres**; **Mateu** respecte a **Alicantí**; **Sant Jaume** respecte a **Magdalens**. Diferents autors [5] consideren aquestes agrupacions com clons. A partir de tres SSR diferents, es tracta de varietats úniques.

En les Figures 1 i 2 es presenta el fenograma i l'arbre filogenètic de la població estudiada. En elles es pot observar clarament tres grans branques. La primera de les quals està formada per dues varietats (De Manduixa i Boval) que es mostren filogenèticament molt allunyades de la resta de varietats. La segona branca està formada per un total de 15 varietats agrupades en dos grups, i la tercera branca engloba les 32 varietats restants agrupades en 3 grups segons el seu nivell de proximitat filogenètica.

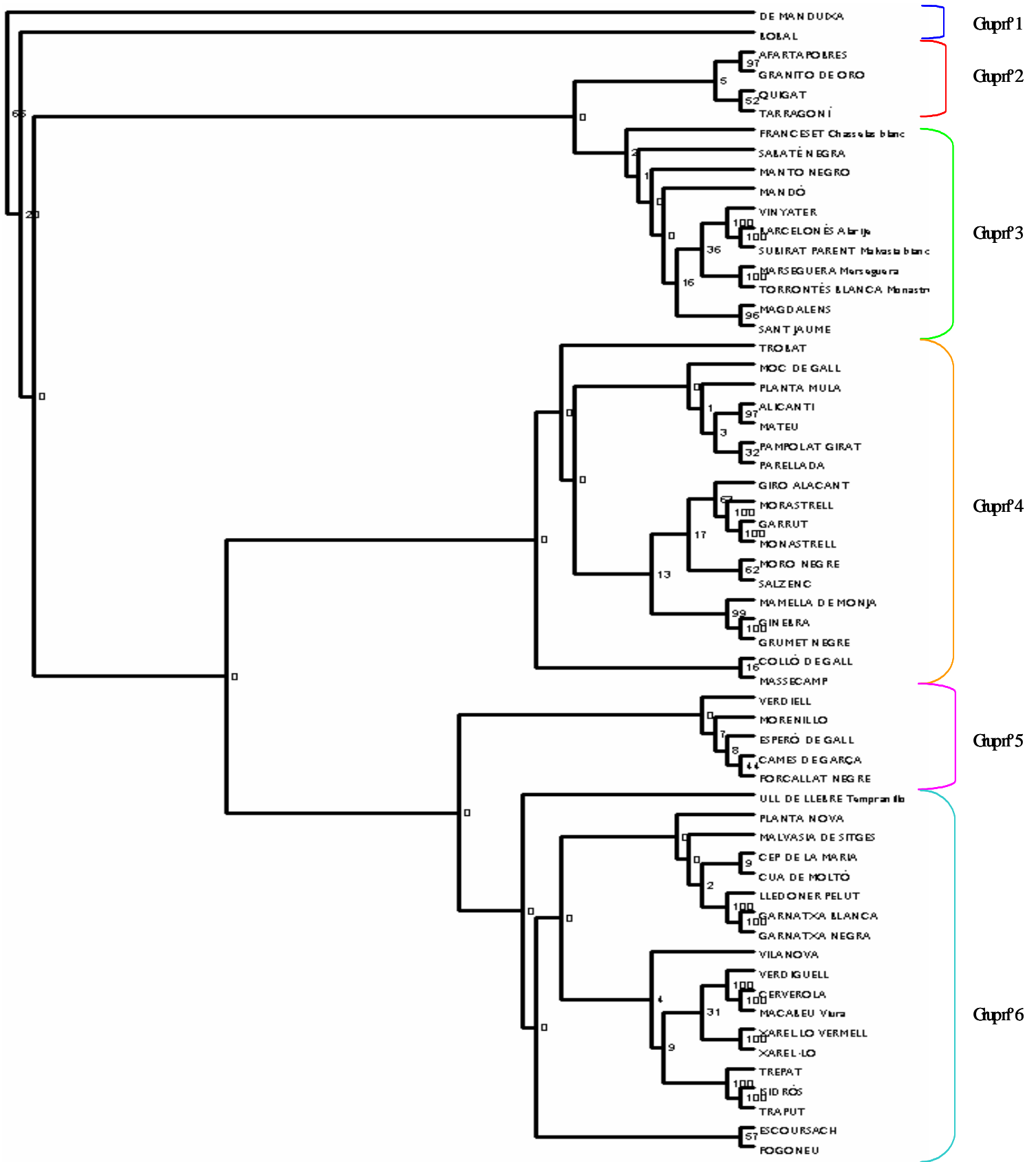


Figura 1. Fenograma amb les agrupacions segons el percentatge d'identitat.

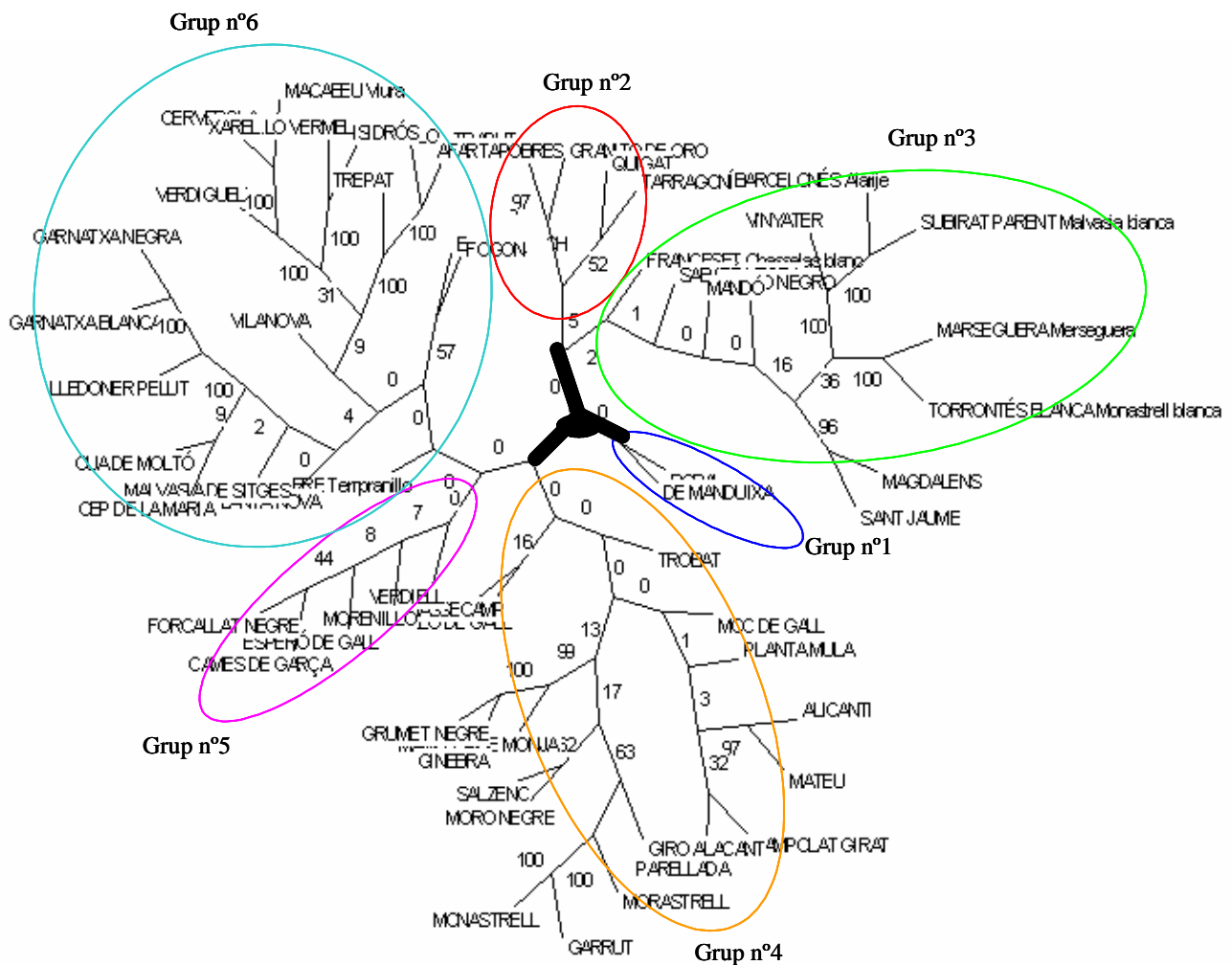


Fig. 2. Arbre filogenètic on es poden visualitzar les tres grans branques, a partir de les quals es formen els grups de varietats emparentades.

A partir de la informació ampelogràfica registrada en les diferents bases de dades [8, 9] i diccionaris [6, 7], s'han pogut detectar 13 homonímies que es mostren en la Taula n° 2. Així doncs, podem observar com s'utilitza un nom per a designar genotipus diferents.

Taula 2. Homonímies detectades en l'estudi de les 49 varietats, després d'haver identificat les sinonímies de la població inicial.

NOM QUE REP	GENOTIPUS	FONT
ALICANTE	GARNATXA NEGRA (N)	Vitis internacional Variety Catalogue
	MONASTRELL (N)	Vitis internacional Variety Catalogue
	PLANTA MULA (N)	Vitis internacional Variety Catalogue

VALENCÍ TINTO	PLANTA MULA (N)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	GRUMET NEGRE (N)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
GRUMER	GRUMET NEGRE (N)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	VINYATER (B)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
FORCALLA	MACABEU (B)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	FORCALLAT NEGRE (N)	GALET. Dictionnaire encyclopédique des cépages
VERDAL	MALVASIA DE SITGES (B)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	FORCALLAT NEGRE (N)	GALET. Dictionnaire encyclopédique des cépages
SUBIRAT	MACABEU (B)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	SUBIRAT PARENT (B)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
PANSÓ	TREPAT (N)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	TROBAT (N)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
PANSA	XARELLO (B)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	VINYATER (B)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
UVA PLANTA	PLANTA NOVA (B)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	MARSEGUERA (B)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
VERDIELL	ULL DE LLEBRE (N)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	VERDIGUELL (B)	FAVÀ. Diccionari dels noms de ceps i raïms
VERDIL	VERDIELL (B)	FAVÀ. Diccionari dels noms de ceps i raïms
	VERDIGUELL (B)	“El abandono y la esperanza” dins de la secció de “Las copas de Ariadna” “elmundovino.com”
TROBAT	MARSEGUERA (NEGRA, (N))	FAVÀ. Diccionari dels noms de ceps i raïms
	TARRAGONÍ (N)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
	TROBAT (N)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue
TARRAGONÍ	TREPAT (N)	Wikipèdia Enciclopèdia lliure “online”
	TROBAT (N)	<i>Vitis</i> internacional Variety Catalogue

En la Taula 3 es mostren les característiques dels microsatèl·lits utilitzats. Es va obtenir un total de 85 al·lels diferents amb una mitjana de 7,3 al·lels per microsatèl·lit. Aquests valors força alts ens donen una idea de l'elevat polimorfisme que presenten. El microsatèl·lit que va presentar més poder discriminat dins del grup de varietats estudiades, va ser el ZAG47 seguit del ZAG64 i del VVMD28, perquè són els que tenen els valors més baixos de probabilitat d'identitats (PI). Quan la heterocigositat observada és menor que la esperada, significa que existeix la possibilitat d'obtenir al·lels nuls (per exemple VVMD6).

Taula 3. Característiques dels SSR utilitzats: rang dels amplificats en pb (parells de bases), H_o (heterocigositat observada), H_e (heterocigositat esperada) i probabilitat de identitats

SSR Loci	Rango pb	Nº alelos	H_o	H_e	Probabilidad Identidad (PI)
VVS2	119-148	11	0,881	0,786	0,076
VVS29	169-179	4	0,424	0,349	0,461
VVMD6	187-206	4	0,288	0,453	0,352
VVMD7	232-260	7	0,678	0,700	0,139
VVMD28	223-257	10	0,814	0,748	0,094
ZAG47	154-169	6	0,881	0,815	0,061
ZAG62	180-204	8	0,780	0,639	0,172
ZAG64	133-157	7	0,915	0,792	0,076
UCH11	218-258	8	0,814	0,723	0,120
UCH12	143-166	10	0,732	0,725	0,119
UCH19	177-213	10	0,831	0,754	0,090
	Total	85			
	Mijana	7,73	0,73	0,68	

1. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. **THOMAS, M. R.; SCOTT, N.S.** (1993) «Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged site (STSs)». *Theor. Appl. Genet.*, núm 86, p. 985-990
2. **SEFC, K.; REGNER, F.; TURETSCHKE, E.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H.** (1999) «Identification of microsatellite sequence in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species». *Genome*, vol. 42 (3), p. 367-373
3. **BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C. P.** (1996) «Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.)». *Genome*, núm 39, p. 628-633
4. **LEFORT, F.; KYVELOS, CH. J.; ZERVOU, M.; EDWARDS, K.J.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.** (2002) «Characterization of new microsatellite loci from *Vitis vinifera* and their conservation in some *Vitis* species and hybrids». *Mol. Ecol. Note*, núm 2 (1), p. 20-21
1. **LEFORT, F. and ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.** (2001) «Genetic comparison of greek cultivars of *Vitis vinifera* L. by nuclear microsatellite profiling». *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 52(2), p. 101-108
2. **GALET, P.** (2001). Dictionnaire encyclopédique des cépages. Ed. Hachette
3. **FAVÀ, X.** (2001). Diccionari dels noms de ceps i raïms: L'ampelonímia Catalana. Edita: Institut d'Estudis Catalans. Barcelona
4. *Vitis* **INTERNACIONAL VARIETY CATALOGUE.**
<<http://www.genres.de/idb/vitis/vitis.htm>>
5. **EUROPEAN *Vitis* DATABASE.** <<http://www.genres.de/eccdb/vitis/>>