

Análisis fenotípico y molecular de la variante de fruto oval en la variedad de vid Prieto Picudo

L. Pereira^{1,2}, P. Carbonell-Bejerano¹, R. Torres-Pérez¹, C. Royo¹, J. Yuste^{*2} y J.M. Martínez Zapater^{*1}.

1 Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja). C/ Madre de Dios, 51, 26006, Logroño. *E-mail: zapater@icvv.es

2 Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Ctra. Burgos, km 119, 47071, Valladolid. *E-mail: yusbomje@itacyl.es

Resumen

La variedad de uva tinta de vinificación Prieto Picudo, tradicional de Castilla y León, presenta una variante somática, denominada Prieto Picudo Oval, con bayas más ovaladas. Desde hace décadas se ha mostrado interés por esta variante y se han seleccionado clones con este fenotipo. En este trabajo se presenta la caracterización fenotípica de las dos variantes, normal y oval, y se investigan las causas celulares y moleculares de las diferencias encontradas y el momento del desarrollo en el que se establecen. Una caracterización morfométrica del pistilo en anthesis mostró que ya durante su desarrollo pre-anthesis se establece una diferencia en la longitud de un componente concreto del pistilo, el estilo, que es más largo en la variante oval. Análisis similares de la morfología del fruto y de la semilla identificaron que tanto las uvas maduras como las semillas son también más largas en esta variante. Un análisis histológico en tres estadios del desarrollo del pistilo y del fruto sugirió que la diferencia en la forma del fruto podría estar relacionada con la existencia de mayor número de divisiones celulares durante la morfogénesis del estilo en la variante oval. Pese a la mayor longitud del estilo en esta variante, su línea celular epidérmica presenta células de menor tamaño y por tanto más células. Sin embargo, en el fruto en pre-envero ya no se observan diferencias significativas entre las dos variantes en el tamaño celular, lo que indica que la expansión celular no está afectada. Un experimento de RNAseq permitió identificar 52 genes expresados diferencialmente entre flores de ambas variantes durante la morfogénesis del pistilo. Entre ellos, el gen más sobre-expresado en la variante oval, anotado como receptor de glutamato, presentó un único haplotipo expresado en esta variante y ausencia de expresión en la variante normal. Este hecho sugeriría que una mutación en un alelo de este gen o en la secuencia reguladora provoca su desregulación en la variante oval. Este trabajo supone un avance en el conocimiento de los procesos de desarrollo que producen variaciones de forma de fruto en la vid y podría servir como base para la identificación de la mutación responsable de la variación somática entre las variantes oval y normal de Prieto Picudo.

Palabras clave: variación somática, selección clonal, forma de uva, división celular, expresión génica.

INTRODUCCIÓN

El origen de la variedad Prieto Picudo no se conoce con exactitud, pero se pueden encontrar en la literatura numerosas referencias al cultivo de la misma en Castilla y León (Yuste et al., 1998), y al consumo y comercialización del vino elaborado. Actualmente es

la variedad principal de la Denominación de Origen Tierra de León, ubicada en el SE de León, el N de Valladolid y el NE de Zamora. Prieto Picudo presenta un racimo pequeño en general, de forma cónica, con alas y compacto. La baya suele ser pequeña, negra y más o menos apuntada. Las propiedades agronómicas más importantes son: baja fertilidad, que en parte lleva a una producción media-baja, época de maduración media y vigor medio (Arranz et al., 2007). Además, en general es poco sensible a plagas y enfermedades. En la uva, sobresalen la excelente relación entre contenido de azúcares y acidez total y su destacable color (Rubio et al., 2009).

Durante la selección y el estudio de cepas en las parcelas en las que se encontraba originalmente Prieto Picudo se obtuvieron clones certificados (Yuste et al., 1998) y se observó la existencia de algunas plantas con ciertas características diferenciales, especialmente una forma oval de la baya más marcada. Esta variante somática de Prieto Picudo se denominó Prieto Picudo Oval (PPO) para la que se enunciaron varias diferencias existentes con respecto a Prieto Picudo Normal (PPN). Entre ellas, una forma de la baya más oval en PPO, una mayor compacidad del racimo en PPN, y peso medio de la pepita, más elevado en PPO. Puesto que todas las cepas de Prieto Picudo proceden de propagación vegetativa a partir de una semilla original, las diferencias fenotípicas entre las variantes de Prieto Picudo pueden deberse a mutaciones somáticas mantenidas en algunas líneas a través de su reproducción vegetativa. Para identificar estas mutaciones realizamos un análisis comparativo para obtener más información sobre las causas genéticas de las diferencias fenotípicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal estudiado de PPN (Prieto Picudo Normal) y PPO (Prieto Picudo Oval) corresponde a vides situadas en la finca Zamadueñas (Valladolid), del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Como control se utilizaron dos clones certificados de Prieto Picudo, CL-9 y CL-58, del este mismo Instituto. Como variantes somáticas se utilizaron tres clones de Prieto Picudo Oval: PPO1, PPO2 y PPO3.

Se caracterizaron morfológicamente pistilos de flores recién abiertas (100 pistilos por clon), bayas maduras (150 por clon) y semillas (las de las 150 bayas analizadas). Se escanearon a gran resolución los pistilos y las semillas para medir diversos parámetros con el programa ImageJ (Figura 1).

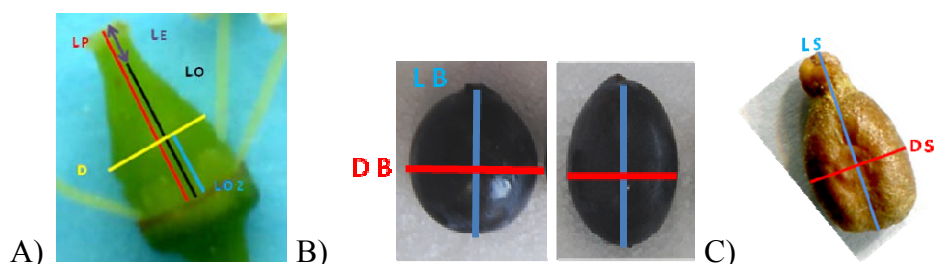


Figura 1. A) Medidas realizadas en cada pistilo: longitud del ovario (LO), longitud de la flor completa (LP), longitud desde la base del ovario hasta el diámetro máximo (LO2) y el diámetro máximo (D); y la derivada longitud del estilo (LE). B) Medidas de bayas: longitud (LB) y diámetro (DB). C) Medidas en semilla escaneada: longitud (LS) y diámetro (DS).

La caracterización histológica se llevó a cabo en los clones PPN58 y PPO3 en 3 estadios de desarrollo: flor en antesis recién abierta, fruto en cuajado y fruto en pre-enero. Las muestras se fijaron en FAA (Formalin-Acetic-Alcohol), se deshidrataron en

series de etanol (50%, 60% y 70%) y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones longitudinales finas (8 μm) de la muestra en un microtomo (HM 330, MICROM) y se fijaron en los portaobjetos. Por último, se tiñeron con azul de toluidina.

El análisis histológico de la flor se centró en la epidermis del estilo por ser ésta la parte del pistilo que mostró dimensiones diferentes entre los morfotipos Oval y Normal. Se midió una línea alrededor del contorno interno de la epidermis de dichas zonas. Después se contó el número de células contenidas en esa longitud y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener la longitud celular media (cociente entre la longitud total medida en el contorno y el número de células que incluye) y la densidad celular (cociente entre el número de células contabilizadas y la longitud total medida). Ambos parámetros informan sobre el tamaño de las células estudiadas, permitiendo comparar los dos genotipos.

La zona elegida para el análisis del fruto en ambos estadios de desarrollo fue su parte distal que ontológicamente proviene del estilo. En los cortes histológicos del fruto se tomaron dos medidas por imagen en dos zonas: el mesocarpo interno (células grandes) y el mesocarpo externo (células pequeñas), realizando posteriormente la media aritmética para cada tejido en cada imagen. Para obtener el área celular y la densidad celular se utilizó una metodología similar a la descrita en trabajos similares (Houel et al., 2013). Con el programa ImageJ, se seleccionó un rectángulo donde las células se distinguieran claramente, se midió el área del rectángulo (tras introducir la escala correspondiente) y se contaron las células contenidas en el rectángulo marcado. Seguidamente se calcularon el área celular (cociente entre área del rectángulo y número de células) y la densidad celular (cociente entre número de células y área celular).

El análisis estadístico de las medidas fenotípicas se realizó mediante el software Statistica (StatSoft, Inc. versión 7.1, 2005). Se utilizó un diseño jerarquizado, en el que se consideraron tres factores (morfotipo, clon y planta) que contribuyen a la varianza. El factor clon está anidado a morfotipo, y el factor planta, a su vez, está anidado a clon. Para la comparación de datos histológicos recogidos en preparaciones de un solo clon por morfotipo se utilizó un análisis de varianza unidimensional.

El análisis de expresión diferencial se realizó entre los clones PPN58 y PPO3. Para ello se utilizaron tres réplicas biológicas de inflorescencias en estadio H (escala fenológica de Coombe (1995) de cada clon. La extracción de RNA se realizó con el kit Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma). La secuenciación del RNA (RNAseq) se llevó a cabo en el CRG (Centre for Genomic Regulation, Barcelona) generándose secuencias (*reads*) *paired-ends* de 101 nucleótidos de longitud. Tras el control de calidad las secuencias de mRNA se alinearon con el programa TopHat2 con la secuencia de referencia del genoma completo de vid, versión 12X (Jaillon et al., 2007). Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el programa Htseq-count, que contabilizó los *reads* que alinean en cada gen anotado sin ambigüedades (por ejemplo, *reads* en genes solapados) y mediante el paquete EdgeR se identificaron genes diferencialmente expresados con $P < 0,05$ tras el ajuste de Bonferroni y un nivel de cambio ≥ 2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfométrica de pistilos, frutos y semillas

En la caracterización morfométrica del pistilo (Figura 2) las mayores diferencias entre los morfotipos oval y normal correspondieron a la longitud del estilo (LE) y al diámetro máximo del ovario (D). Los pistilos del morfotipo PPO muestran mayor LE (Tabla 1). En cambio, los pistilos de PPO tiene menor D que los pistilos de PPN.

Tabla 1. Valor medio y desviación estándar de las variables que presentaron mayores diferencias en pistilo (LE, longitud del estilo y D, diámetro máximo del ovario), en baya (LB, longitud y DB, diámetro) y en semilla (LS, longitud y DS, diámetro).

	Variable	PPN	PPO
Pistilo	LE (mm)	0,031 ±0,006	0,039±0,008
	D (mm)	0,137±0,009	0,133±0,008
Baya	LB (mm)	13,56±0,960	15,02±0,960
	DB (mm)	12,17±1,103	11,66±0,840
Semilla	LS (cm)	0,58±0,520	0,65±0,560
	DS (cm)	0,37±0,029	0,37±0,028

La diferencia en la forma de la baya es el carácter más evidente que ha permitido distinguir ambas variantes morfológicas de Prieto Picudo (Figura 2). Esta forma es más oval en PPO. Los clones ovales mostraron generalmente valores de LB superiores a los clones normales y valores de DB inferiores (Tabla 1). En las bayas maduras el valor de F fue marcadamente distinto entre clones de distintos morfotipos y muy similar entre clones del mismo morfotipo.

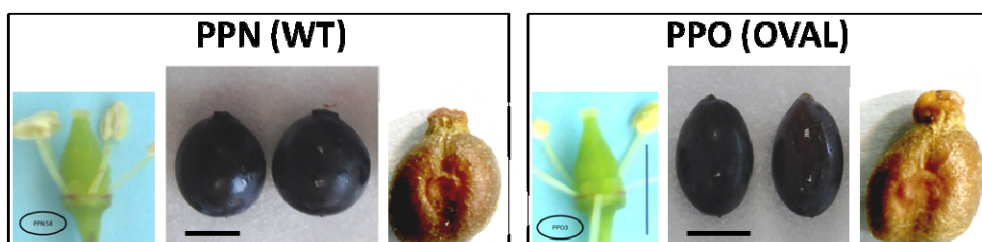


Figura 2. Pistilos, bayas y semillas de PPN y PPO.

En cuanto a la semilla, los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la LS (Figura 3), mayor en los morfotipos ovales que en los normales. Como consecuencia la variable derivada FS es mayor en los morfotipos ovales (Tabla 1).

Análisis histológico del pistilo y del fruto

A partir de los cortes histológicos de flores recién abiertas (Figura 3A) se caracterizó la composición celular de la epidermis del estilo (Figura 3B). La longitud celular de la epidermis (cociente entre la longitud del segmento y el número de células que contiene) y la densidad celular por unidad de longitud (cociente entre el número de células y la longitud del segmento) indican diferencias estadísticamente significativas. Las células epidérmicas del estilo del morfotipo oval son más pequeñas que las del normal (PPN58: longitud celular = 18,001±1,480, densidad celular = 56,103±4,545; PPO3: longitud celular = 15,537±0,542, densidad celular = 64,545±2,335).

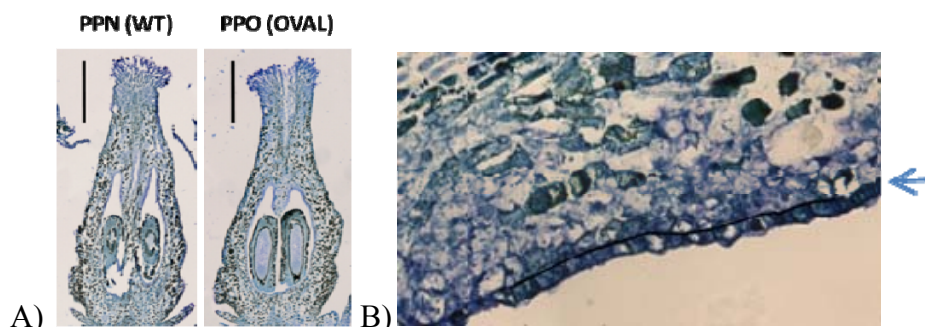


Figura 3. A) Cortes histológicos de un pistilo de PPN58 (izquierda) y PPO3 (derecha). B) Ejemplo de procedimiento de medida de células en la epidermis del pistilo. La línea negra, señalada por una flecha, sigue el contorno de la capa de células epidérmicas. Esta longitud se midió con el programa ImageJ y se contó el número de células incluidas.

En frutos en cuajado las diferencias entre morfotipos no fueron estadísticamente significativas para ninguna variable indicando que las células llegan a alcanzar tamaños similares en ambos morfotipos.

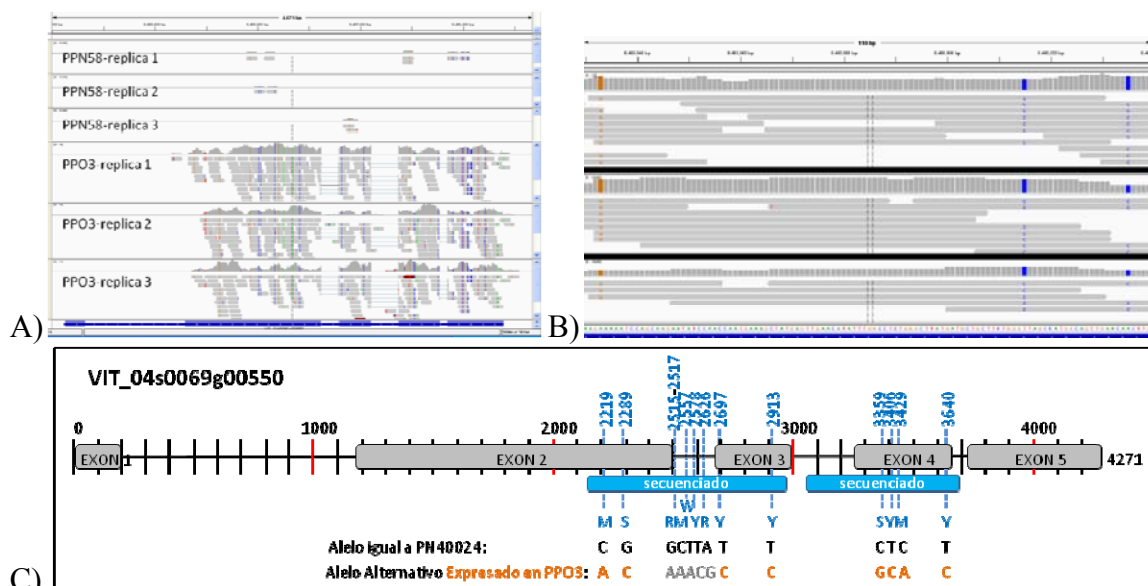


Figura 4. Alineamiento de los *reads* para el gen *VIT_04s0069g00550*. A) En PPN58 no hay *reads* porque no hay expresión del transcrito, en cambio en PPO3 sí. B) Fragmento exónico en las réplicas de PPO3 (separadas por las líneas negras) donde parece expresarse un único alelo. C) Esquema del gen *VIT_04s0069g00550* donde se muestran dos fragmentos de gDNA secuenciados (azul) en PPN58 y PPO3, y los polimorfismos heterocigotos presentes.

Comparación transcriptómica

El análisis transcriptómico identificó 52 genes expresados diferencialmente entre PPO y PPN. De ellos, 21 se encontraron sobreexpresados y 31 subexpresados en PPO3. Entre los sobreexpresados en PPO3 hay un gen, *VIT_04s0069g00550*, que destacó por presentar el mayor cambio de expresión (sobre-expresado más de 57 veces en PPO3 respecto a PPN58). Este gen está anotado en el genoma de la vid como un receptor de glutamato, un canal iónico que presenta similitud con receptores del neurotransmisor glutamato de animales (Grimplet et al., 2012).

El alineamiento de los *reads* indica además diferencias de expresión alélica en el gen del receptor de glutamato *VIT_04s0069g00550* (Figura 4A). Su expresión sólo se detectó en PPO3 y la secuencia de los *reads* indica que solo hay un haplotipo expresado (Figura 4B), a pesar de que la secuencia genómica indica el estado de heterocigosis del gen (Figura 4C).

CONCLUSIONES

La mayor longitud del estilo está relacionada con mayor número de células, aunque de menor tamaño, en el estilo de las flores de morfotipo oval. Se estima la existencia de una división adicional en al menos la mitad de sus células.

Las diferencias en la forma de la baya entre ambos morfotipos de Prieto Picudo se establecen en el desarrollo del pistilo y se mantienen a lo largo del desarrollo del fruto. La mayor longitud del fruto en PPO estaría relacionada con diferencias en el número de células y no en su tamaño.

Asociadas a la forma de la baya se detectaron diferencias en la forma de la semilla que es más alargada en los clones del morfotipo oval que en los del morfotipo normal.

A nivel de expresión génica, cabe destacar un gen anotado como receptor de glutamato, *VIT_04s0069g00550*, sobreexpresado en flores de PPO3 y no detectable en PPN58. La sobreexpresión de un único alelo de este gen es un indicio de que la mutación que causa la sobreexpresión se encuentre en *cis* con el alelo sobreexpresado de este gen.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con fondos del proyecto BIO2011-026229 y constituye la Tesis de Máster de L. Pereira.

Referencias

- Arranz, C., de la Torre, S., Rubio J.A., Yuste J. (2007). Variabilidad genotípica, fenotípica y cualitativa de la variedad tinta Prieto Picudo. *Vida Rural*, 242, 54–57.
- Coombe, B.G. (1995). Growth Stages of the Grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1, 100-110.
- Grimplet, J., Van Hemert, J., Carbonell-Bejerano, P., Díaz-Riquelme, J., Dickerson, J., Fennell, A., Pezzotti, M., Martínez-Zapater, J.M. (2012). Comparative analysis of grapevine whole-genome gene predictions, functional annotation, categorization and integration of the predicted gene sequences. *BMC Research Notes*, 5, 213.
- Houel, C., Martin-Magniette, M-L., Nicolas, S.D., Lacombe, T., Le Cunff, L., Franck, D., Torregrosa, L., Conejero, G., Lalet, S., This, P., et al. (2013). Genetic variability of berry size in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19, 208–220.
- Jaillon, O., Aury, J-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., et al. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449, 463–467.
- Rubio, J.A., Yuste, J., Yuste, J.R., Alburquerque, M.V., Arranz, C., Barajas, E. (2009). Clones certificados de las principales variedades tradicionales de vid en Castilla y León.
- Yuste, J., Peláez, H., Rubio, J.A., Robredo, L.M. (1998). Selección clonal y sanitaria de la vid en Castilla y León. *Agricultura*, 792, 548–552.