

Selección y caracterización genética de clones de ‘Tempranillo’ con ciclo de maduración adaptable al cambio climático

P. Carbonell-Bejerano¹, R. Torres-Pérez¹, M. Arrizabalaga-Arriazu², M. Oyarzun², C. Royo¹, E. Baroja¹, E. García-Escudero¹, F. Morales³, I. Pascual² y J.M. Martínez-Zapater¹

¹ Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), CSIC-Universidad de la Rioja-Gobierno de La Rioja, 26007 Logroño, email: pablo.carbonell@icvv.es

² Grupo de Fisiología del Estrés en Plantas (Dpto. de Biología Ambiental), Unidad Asociada al CSIC, EEAD, Zaragoza e ICVV, Logroño. Facultades de Ciencias y Farmacia, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona

³ Dpto. de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei (EEAD), CSIC, 50080 Zaragoza

Resumen

La reiterada multiplicación vegetativa de cultivares de vid (*Vitis vinifera* L.) de élite para la vinificación provoca la acumulación de variación somática que es explotada en la mejora varietal. Considerando la hipótesis de que variantes con ciclo largo de maduración (baja tasa de acumulación de azúcares) pueden adaptarse mejor a condiciones de alta temperatura, en este estudio se caracterizaron 450 accesiones de ‘Tempranillo’ buscando clones que difiriesen en la duración del ciclo de maduración. Se preseleccionaron diez clones de ciclo largo y nueve de ciclo corto y la consistencia de su ciclo se testó sobre esquejes fructíferos. Así se seleccionaron dos clones de ciclo largo y uno de ciclo corto, que además de mantener diferencias consistentes en el ciclo, presentaban un rendimiento y una producción de antocianinas equilibrados. Se realizó un análisis transcriptómico de estos tres clones, mediante la técnica RNA-seq, con el objetivo de identificar la variación genética responsable de las diferencias en el proceso de maduración. Comparando el transcriptoma de uvas que estaban completando el envero, se detectaron posibles mutaciones puntuales responsables del fenotipo de ciclo largo en uno de los clones. Asimismo, se identificó una región cromosómica con tres genes localizados consecutivamente que se hallaban sobreexpresados en el otro clon de ciclo largo analizado. La secuencia de los transcritos de estos genes indica que la sobreexpresión se debe a la inducción específica de uno de los alelos de cada gen, lo que sugiere la presencia de una mutación en *cis* con una región reguladora en una copia del cromosoma, que causaría la sobreexpresión ectópica de los tres genes y la ralentización de la maduración. Estos resultados pueden ser útiles en programas de mejora de la vid dirigidos a la adaptación de la elaboración de vino de calidad en condiciones de cambio climático.

Palabras clave: Control genético de la maduración, Selección clonal, Transcriptómica, Variación somática, *Vitis vinifera* cv. Tempranillo.

INTRODUCCIÓN

En relación con el cambio climático, el incremento de las temperaturas y de los episodios de sequía en las zonas donde tradicionalmente se practica la vitivinicultura están acelerando la fenología de la vid y produciendo un desacoplamiento entre la maduración sacarimétrica y la maduración fenólica, lo cual resulta en la elaboración de vinos desequilibrados y excesivamente alcohólicos.

Los cultivares de vid deben propagarse vegetativamente para mantener sus características varietales. Este es el caso de ‘Tempranillo’ que se originó a partir de la germinación de una semilla posiblemente hace más de 300 años (Ibáñez et al., 2012) y actualmente es el cultivar con mayor extensión de plantación para la elaboración de tintos en la Península Ibérica. Durante este largo tiempo de multiplicación vegetativa en grandes extensiones de terreno, distintos linajes del cultivar han acumulado mutaciones somáticas diferenciales. Algunas de estas mutaciones resultan en variación fenotípica intravarietal que puede ser explotada en la mejora varietal, incluyendo la selección de variantes con características adaptables a las condiciones de cambio climático. En este sentido, variantes con ciclo de maduración largo (baja tasa de acumulación de azúcares) podrían desplazar su maduración a periodos menos cálidos y ser menos sensibles a las altas temperaturas. Considerando estas premisas, en este trabajo se rastreó el banco de clones del ICVV con el objetivo de identificar accesiones de ‘Tempranillo’ tinto con ciclo de maduración largo. Para entender el origen de esta variación, se diseñó una comparación transcriptómica que permitió identificar genes candidatos a determinar las diferencias de fenotipo y a portar la variación genética causal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal: el material de partida fueron las 450 accesiones de ‘Tempranillo’ Tinto libres de virus presentes en el banco de clones del ICVV ubicado en la finca ‘La Grajera’ (Logroño, La Rioja). En el banco se dispone de cinco plantas por accesión, dirigidas en doble cordón e injertadas sobre Richter 110. Una selección de 19 accesiones se cultivó en condiciones controladas de invernadero mediante el sistema de esquejes fructíferos en las instalaciones de la Universidad de Navarra. Para cada clon se cultivaron esquejes en dos condiciones de temperatura en cámaras independientes, con ciclos de temperatura día/noche de 28°C/18°C o 24°C/14°C y un fotoperiodo de 16/8 h.

Análisis fenotípico: en el banco de clones, durante tres años (2009-2011) se registró la fenología (brotación, floración, envero y madurez) y se realizaron controles de maduración (pH, grado y potasio), producción (rendimiento, fertilidad, peso de racimo, peso de baya) y vigor (peso de madera). Sobre la preselección de 19 accesiones se realizó un seguimiento de la maduración con medidas semanales de grado, pH y antocianinas desde preenvero hasta madurez durante dos años (2013 y 2014). En esquejes fructíferos se hicieron controles de maduración similares durante dos ciclos (2014 y 2015).

Análisis transcriptómico: se llevó a cabo un análisis RNA-seq sobre tres accesiones, dos de ciclo de maduración largo (807 y 1084) y una de ciclo corto (1048). Considerando el establecimiento temprano de las diferencias en los niveles de azúcares tras iniciarse el envero, se seleccionó el momento del 20 % de envero (28/07/2015) para la recolección de las muestras a analizar. De las tres accesiones seleccionadas, se recolectaron uvas enveradas con la misma proporción de superficie coloreada (80% <

superficie de hollejo coloreada <100 %) tratando de homogeneizar el estado de madurez entre las uvas a comparar y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. En cada accesión se recolectaron tres réplicas independientes, cada una compuesta por uvas de dos racimos de la misma planta (uno de exposición norte y otro de exposición sur). Se obtuvo ARN de cada una de las réplicas a partir del pericarpo de 8-10 bayas. El ARN se purificó empleando el kit RNeasy de QIAGEN y se analizó construyendo genotecas de ADNc independientes para cada réplica que fueron secuenciadas en lecturas de 125 pb emparejadas. El análisis de expresión diferencial y la búsqueda de polimorfismos de secuencia entre los tres clones se realizaron en comparaciones dos a dos utilizando el protocolo de análisis desarrollado por nuestro grupo para tales fines (Royo et al., 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variación fenotípica de la duración del ciclo de maduración en distintas accesiones de ‘Tempranillo’

La colección de clones de ‘Tempranillo’ comprendió una gran diversidad en cuanto al ciclo de maduración, con diferencias de hasta seis semanas para el periodo envero-madurez entre las accesiones más extremas (Fig. 1 A). Las diferencias en la fecha de envero fueron menos acusadas. En base a los datos fenotípicos de tres años, se seleccionaron 10 clones de ciclo largo y 9 de ciclo corto para ser analizados en detalle. Entre estos, se seleccionaron los clones de ciclo largo 807 y 1084 y el clon de ciclo corto 1048 por la consistencia de su ciclo en condiciones de viñedo y en esquejes fructíferos (Fig. 1 B), y por presentar unos niveles de producción equilibrados, tratando de que no fuese éste el factor causal de las diferentes tasas de acumulación de azúcar. En general no se identificó susceptibilidad diferencial a la temperatura en estos clones (Fig. 1 B).

Análisis transcriptómico: búsqueda de posibles genes y mutaciones responsables de la variación en la duración del ciclo de maduración

La comparación del transcriptoma de bayas en envero identificó 852 genes expresados diferencialmente entre los tres clones seleccionados, incluyendo perfiles de expresión característicos de cada clon, evidenciando su distinto control genético. Las secuencias RNA-seq de los genes sobreexpresados en cada clon se revisaron buscando casos de sobreexpresión específica de uno de los alelos (ASE) que pudiesen indicar la presencia en *cis* con dichos loci de mutaciones que pudieran ser causantes de la desregulación. Así, en el clon 1084 se identificaron tres genes sobreexpresados localizados consecutivamente en el genoma que presentaban ASE, dos de ellos con solo un haplotipo expresado en el clon 1084 y ausencia de expresión en los otros dos clones, mientras que la secuenciación del genoma de ‘Tempranillo’ RJ51 confirmó la presencia de dos alelos distintos en estos genes (Fig. 2). Dos de estos genes codifican receptores quinasa tipo LRR y el tercero una enzima quercetina glicosiltransferasa. Los receptores LRR quinasa encabezan rutas de señalización celular y su sobreexpresión ectópica en el clon 1084 podría relacionarse con una ralentización inhabitual de la maduración.

Las secuencias de RNA-seq también se rastrearon buscando polimorfismos de secuencia. Se identificaron entre 6-9 SNV (*single nucleotide variation*) específicos de cada clon que pueden ser útiles para el diseño de marcadores moleculares dirigidos a su identificación genética. Un análisis de predicción de efecto identificó que un SNV

específico del clon 807 acarrea una sustitución de aminoácido deletérea para la proteína activadora de ubiquitina E3 codificada por el gen. La degradación de proteínas mediada por ubiquitinas también participa en procesos de señalización, por lo que esta mutación podría relacionarse con la causa del ciclo largo de maduración en el clon 807. Análisis funcionales adicionales podrían demostrar el control de la maduración por parte de estas variantes génicas.

Agradecimientos

El trabajo está financiado por el proyecto INNOVINE FP7-311775 de la UE.

Referencias

- Royo, C., Carbonell-Bejerano, P., Torres-Pérez, R., Nebish, A., Martínez, Ó., Rey, M., Aroutiounian, R., Ibáñez, J. and Martínez-Zapater, J.M. 2016. Developmental, transcriptome, and genetic alterations associated with parthenocarpy in the grapevine seedless somatic variant Corinto blanco. *J. Exp. Bot.* 6:259-273.
- Ibáñez, J., Muñoz-Organero, G., Zinelabidine, L.H, de Andrés M.T., Cabello F. and Martínez-Zapater, J.M. 2012. Genetic origin of the grapevine cultivar ‘Tempranillo’. *Am. J. Enol. Vitic.* 63:549-553.

Figuras

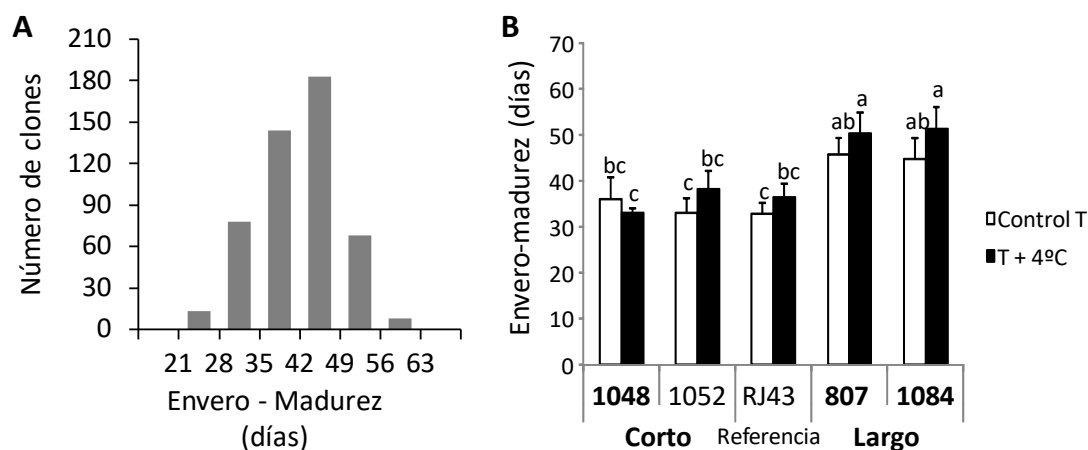


Fig. 1. Distribución de la longitud del ciclo de maduración en distintas accesiones de ‘Tempranillo’. A, histograma de distribución de la longitud del ciclo en la colección de clones de ‘Tempranillo’ (considerando para cada clon el promedio de los tres años analizados). B, longitud del ciclo de maduración de los clones seleccionados en las dos condiciones de temperatura ensayadas sobre esquejes fructíferos (en la campaña de 2015). Las letras indican la separación de las medias tras un ANOVA.

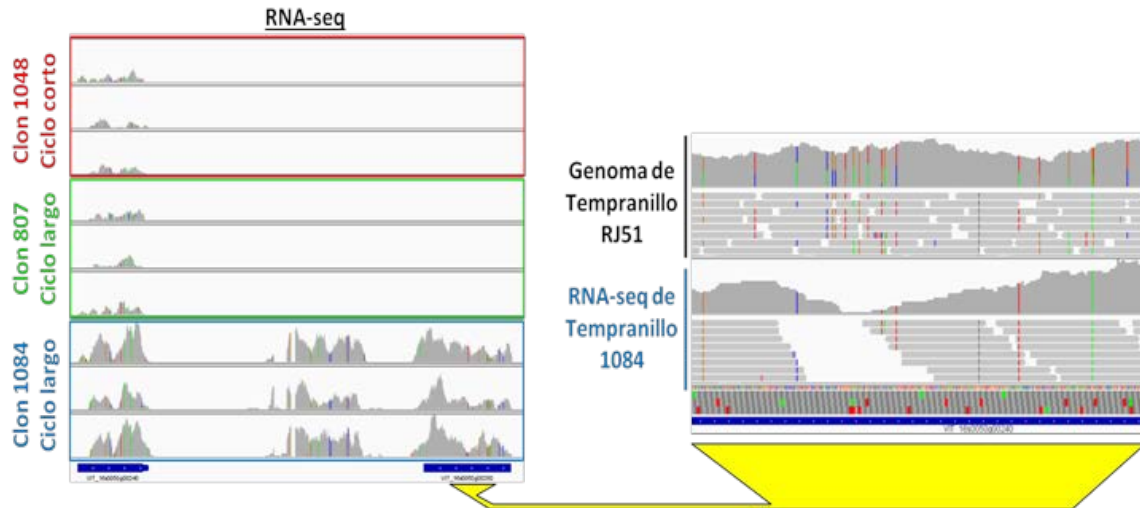


Fig. 2. Alineamientos de secuencias mostrando la sobreexpresión alelo-específica de tres genes en el clon 1084. A la izquierda se aprecian los niveles de expresión de los tres genes en todas las réplicas analizadas por RNA-seq. A la derecha se observa en detalle una de las réplicas del análisis RNA-seq de clon 1084 mostrando que solo hay un alelo expresado pese a que la secuenciación genómica de ‘Tempranillo’ muestra la presencia de dos alelos en el locus.