

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA VID EN MONTENEGRO

J. Ibáñez¹, V. Maras², J. Raicevic², R. Ocete, E. García-Escudero¹, N. Stajner³, M. Grbic¹, y J.M. Martínez-Zapater¹

¹*Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, UR, Gobierno de La Rioja)*

Finca La Grajera, Ctra. de Burgos km 6, 26007 Logroño, La Rioja, Spain

²*13 Jul Plantaže, P. Radomira Ivanovića 2, Podgorica, Montenegro*

³*Biotechnical Faculty, Agronomy Department, University of Ljubljana, Slovenia*

Palabras clave: Balcanes, marcadores moleculares, SNP, sylvestris, *Vitis vinifera*,

Resumen

Los Balcanes tienen una larga historia de cultivo de la vid (*Vitis vinifera*) y muchos estudios han demostrado la existencia de un acervo genético propio en esta región. La colaboración entre Montenegro-ICVV ha permitido llevar a cabo la mayor prospección de plantas de vid antiguas realizada en este país. Se tomaron muestras de más de 500 plantas en sus regiones vitivinícolas tradicionales, centradas principalmente en plantas cultivadas (sativa), pero también incluyeron 46 muestras de vides silvestres. Todas las muestras se estudiaron mediante análisis de marcadores SNP nucleares y cloroplásticos. Los marcadores nucleares de SNP permitieron determinar el número existente de genotipos diferentes, así como su frecuencia en la muestra, e identificar variedades. Se encontró un total de 151 genotipos diferentes, 43 de los cuales correspondieron a vides muestreadas como sylvestris, y 108 como cultivadas, incluyendo tres híbridos interespecíficos. De los 105 genotipos de vinífera sativa, 33 se identificaron completamente. El más interesante fue Kratosija, que fue el genotipo más repetido en el muestreo, apareciendo 125 veces. Como era de esperar, Vranac también apareció muchas veces (78) y el tercero fue Lisica (28 veces). Entre los 72 genotipos no identificados, hay 23 genotipos representados por más de una muestra en la base de datos y que, por lo tanto, corresponden muy probablemente a variedades verdaderas. Catorce de estos genotipos aparecieron solo en el muestreo montenegrino y podrían representar variedades locales. Los 49 genotipos restantes, representados por una sola muestra, probablemente corresponderían a todo tipo de casos: desde las vides derivadas de semillas germinadas espontáneamente hasta las variedades viejas y reales cercanas a la extinción. El número total de genotipos desconocidos representados solo por muestras de Montenegro es de 63. El análisis de su estructura genética, clorotipos y relaciones genéticas de primer grado también proporcionaron pistas interesantes sobre su origen.

INTRODUCCIÓN

Montenegro es un pequeño país en la península de los Balcanes, cara al mar Adriático. El cultivo de la vid en Montenegro se remonta a la época romana. Hay muchas pruebas históricas que indican el mantenimiento de este cultivo en Montenegro. La evidencia indiscutible de la larga tradición vinícola de estas regiones son los documentos escritos de Kotor, especialmente los contratos de dotes, arrendamientos, ventas y testamentos

del siglo XIV, en los que se hace referencia a viñedos del área actual de Tivat y los alrededores de Kotor. En los datos históricos procedentes de los archivos turcos, y registrados en los censos de 1521 y 1523, se mencionan los viñedos en Godinje, Beri, Brajići y otros lugares. La viticultura y la elaboración de vino en la Edad Media estaba bien desarrollada alrededor del lago Skadar y en la región de Crmnica. Según los datos del archivo de Kotor, Crmnica era el principal productor de uva y vino en Montenegro.

La viticultura actual y la producción de vino en Montenegro se basan principalmente en variedades autóctonas de vid, tales como Vranac, Kratošija, Krstač y Žižak. Además, existen numerosas variedades locales de vid que se consideran autóctonas, pero no están bien identificadas, y existe mucha confusión y numerosas sinonimias y homonimias.

Considerando la importancia de las variedades de vid autóctonas para el sector vitivinícola y vitivinícola montenegrino, la empresa 13. Jul Plantaže comenzó en 2005 a desarrollar actividades destinadas a examinar el origen y la identificación genética de las variedades de vid montenegrinas. Los resultados de estas actividades permitieron detectar la identidad existente entre la variedad autóctona montenegrina Kratošija y Zinfandel de EEUU, Primitivo de Italia y Crljenak kaštelanski de Croacia (Calò et al., 2008), que comparten el mismo perfil de ADN. Además, ese análisis de ADN reveló una relación muy estrecha de primer grado entre Kratošija y Vranac. Los resultados también han demostrado que Vranac, Krstač y Žižak tenían perfiles genéticos únicos y no detectados previamente en la literatura.

El objetivo de este trabajo era acometer un estudio sistemático completo de la viticultura tradicional montenegrina con el fin de identificar la diversidad genética existente y el origen y relaciones genéticas de las variedades encontradas, así como realizar una prospección preliminar y análisis genético de la vid silvestre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó un total de 512 muestras de vid recolectadas en Montenegro, de las cuales 462 procedían de prospecciones en zonas tradicionales de cultivo de vid de Montenegro. Dentro de estas muestras de prospección, 416 eran cultivadas, mientras que 46 fueron vides silvestres. La prospección a gran escala se realizó en tres años, 2014, 2016, 2017, con 272, 160 y 76 muestras respectivamente, la mayoría de vides mayores de 50 años. Además, se analizaron 50 muestras de la colección de germoplasma de vid mantenida en la Universidad de Montenegro como genotipos de referencia y posibles representantes de variedades antiguas que actualmente no se cultivan.

Todas las muestras se estudiaron mediante análisis de marcadores SNP nucleares y cloroplásticos, como se describe en trabajos previos (Cabezas et al., 2011; Cunha et al., 2016). Inicialmente se analizaron con un conjunto de 48 SNP para identificación, por comparación con la base de datos ICVV-SNP, que cuenta con más de 2800 genotipos diferentes de todo el mundo. Los genotipos únicos encontrados se analizaron con un conjunto de 192 SNP adicionales, para ampliar hasta 240 SNP, lo que permite llevar a cabo análisis de estructura genética y de pedigrís (Ghaffari et al., 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso del set de 48 SNP permitió detectar un total de 151 genotipos diferentes, de los que 43 correspondían a vides que fueron muestreadas como *sylvestris*, y 108 como cultivadas, entre las que se encontraron tres híbridos interespecíficos. Treinta y tres de los 105 genotipos de *Vitis vinifera* sativa se pudieron identificar con total certeza, porque coincidían con otros genotipos de la base de datos ICVV-SNP que consideramos verdaderos (en base a dos o más evidencias independientes). El genotipo más interesante correspondía a la variedad Kratosija, y fue el más recurrente en el muestreo, ya que fue observado hasta 125 veces, es decir, una de cada cuatro cepas viejas muestreadas en Montenegro correspondió a esta variedad. La variedad montenegrina más representativa actualmente, Vranac, también apareció muchas veces (78) y la tercera fue Lisica, a la que correspondieron 28 plantas muestreadas. La variedad turca de mesa Parmak Cerven, conocida en Montenegro como Razaklija también apareció un número significativo de ocasiones (28). Las otras variedades que aparecieron más de una vez fueron: Bratkovina Bijela (10), Chaouch Blanc (4), Plavina Crna (3), Koenigin der Weingaerten (3), Prokupac (3), Lagorthi, Coarna Alba, Muscat a petits grains blanc y Muscat Hamburg.

Resulta de gran interés el elevado número de genotipos no identificados (72), y especialmente los 23 genotipos representados por más de una muestra en la base de datos ICVV-SNP puesto que, muy probablemente, corresponden a variedades verdaderas en posible peligro de desaparición. De esos 23 genotipos, 14 aparecieron sólo en el muestreo montenegrino y podrían representar variedades locales. Los 49 genotipos restantes, que están representados por una única muestra, probablemente representan todo tipo de casos: desde variedades antiguas y reales cercanas a la extinción hasta vides derivadas de semillas germinadas espontáneamente. El número total de genotipos desconocidos representados solo por muestras de Montenegro en la base de datos ICVV-SNP es 63.

El estudio de los SNP cloroplásticos permitió determinar el clorotipo de las vides montenegrinas. El clorotipo A es mayoritario en las vides silvestres, como ocurre en toda Europa Occidental y Norte de África (Arroyo-García et al., 2006); además de las 30 plantas silvestres de clorotipo A, se observaron 6 de clorotipo C y 7 de clorotipo D. Entre las vides cultivadas se invirtió la distribución, con predominio de clorotipo C (43) y D (35), y menor presencia de A (16), apareciendo 2 plantas con clorotipo B.

El análisis de la estructura genética en base a los datos de 240 SNPs separó claramente la mayoría de las muestras cultivadas y silvestres, pero también se detectaron algunos casos que sugerían la existencia de errores o de ejemplos de cercanía o de flujo genético entre sativa y *sylvestris* (Figura 1). Entre las muestras silvestres se observaron 7 con mayor coeficiente de pertenencia al grupo de cultivadas que a silvestres, y cinco de ellas tenían clorotipo C. Entre las muestras cultivadas, 3 tenían un coeficiente muy alto de pertenencia al grupo de silvestres, y tenían clorotipo A; podrían ser casos de neodomesticación. Además, se observaron algunas muestras aparentemente mal clasificadas.

Por último, el estudio de pedigrís permitió descubrir 28 tríos (padre-madre-hijo) entre las vides montenegrinas, de los que 26 no habían sido descritos con anterioridad. Es interesante que, en 23 de los tríos, las tres variedades involucradas han sido muestreadas en Montenegro, lo que habla de un mantenimiento de la viticultura tradicional en las áreas de muestreo. La Tabla 1 muestra la participación numérica de las distintas

variedades en los tríos encontrados. De acuerdo con estos resultados, las variedades clave en la red genética vitícola de Montenegro son Kratosija entre las variedades de vinificación, y Razaklija (Parmak Cerven) entre las variedades de mesa. Curiosamente, dos de las muestras silvestres de clorotipo C y con mayor coeficiente de pertenencia al grupo de cultivadas resultaron ser descendientes directos de cruces entre estas dos variedades principales.

Un amplísimo muestreo de cepas antiguas en zonas tradicionales de cultivo de la vid en Montenegro, unido al uso y análisis de herramientas moleculares (SNP nucleares y cloroplásticos) ha permitido definir la diversidad genética existente, identificar variedades conocidas y nuevas, y establecer la estructura genética y las relaciones existentes entre las variedades, contribuyendo significativamente a aumentar el conocimiento de la viticultura en este país balcánico.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación de 13. Jul Plantaze y del Gobierno de Montenegro

Referencias

- Arroyo-García, R., Ruiz-García, L., Bolling, L., Ocete, R., Lopez, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Soylemezoglu, G., Uzun, H.I., Cabello, F., Ibanez, J., Aradhya, M.K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J.L., Costantini, L., Goris-Lavets, S., Grando, M.S., Klein, B.Y., McGovern, P.E., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikirios, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K.A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, J.M., Lefort, F. y Martínez-Zapater, J.M. 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Mol. Ecol.* 15:3707-3714.
- Cabezas, J.A., Ibáñez, J., Lijavetzky, D., Vélez, M.D., Bravo, G., Rodríguez, V., Carreño, I., Jermakow, A.M., Carreño, J., Ruiz-García, L., Thomas, M.R. y Martínez-Zapater, J.M. 2011. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC Plant Biol.* 11:12.
- Calò, A., Costacurta, A., Maraš, V., Meneghetti, S. y Crespan, M. 2008. Molecular Correlation of Zinfandel (Primitivo) with Austrian, Croatian, and Hungarian Cultivars and Kratošija, an Additional Synonym. *Am. J. Enol. Vitic.* 59:205-209.
- Cunha, J., Ibáñez, J., Teixeira-Santos, M., Brazao, J., Fevereiro, P., Martínez-Zapater, J.M. y Eiras-Dias, J.E. 2016. Characterisation of the Portuguese grapevine germplasm with 48 single-nucleotide polymorphisms. *Aust. J. Grape Wine Res.* 22:504-516.
- Ghaffari, S., Hasnaoui, N., Zinelabidine, L.H., Ferchichi, A., Martínez-Zapater, J.M. y Ibáñez, J. 2014. Genetic diversity and parentage of Tunisian wild and cultivated grapevines (*Vitis vinifera* L.) as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Tree Genet. Genomes* 10:1103–1112.

Tabla 1: Variedades involucradas como progenitores en los tríos (padre-madre-hijo) detectados en el estudio de variedades de Montenegro.

| Clorotipo | Nombre | Número de tríos |
|-----------|----------------------|-----------------|
| C | Razaklija | 15 |
| C | Kratosija | 12 |
| C | Coarna Alba | 4 |
| B | Alphonse Lavallee | 3 |
| C | Čubrica | 3 |
| D | Lisica | 2 |
| D | Lagorthi | 2 |
| D | Duljenga | 1 |
| B | Heptakilo | 1 |
| D | Prokupac | 1 |
| A | Afus Ali | 1 |
| D | Chasselas | 1 |
| A | Pinot | 1 |
| D | Vranac | 1 |
| A | Bijela Sitnih Bobica | 1 |
| - | Volovina Iz Opeke | 1 |
| D | Bratkovina Bijela | 1 |
| A | Volovnik | 1 |
| D | Impigno | 1 |
| D | Krstac | 1 |
| D | Radovača II | 1 |
| C | Bijela Krivaja | 1 |

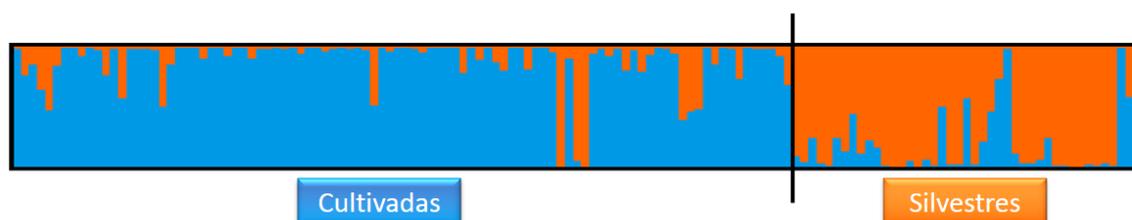


Figura 1: Estructura genética de las vides montenegrinas cultivadas y silvestres. Cada planta está representada por una barra vertical. Para cada una, la fracción de color azul y naranja representa la fracción de pertenencia de ese genotipo a la población cultivada (azul) y silvestre (naranja).