

## Genetic analysis of traits of interest in wine grapes.

A. Bayo-Canha<sup>(1)</sup>, J.I. Fernández-Fernández<sup>(2)</sup>, A. Martínez-Cutillas<sup>(2)</sup>, L. Ruiz-García<sup>(1)</sup>

(1) Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos, IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario), c/Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia, Spain  
e-mail: almu.bayo@gmail.com

(2) Departamento de Viticultura y Enología, IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario), c/Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia, Spain

### RESUMEN

La competencia actual en los mercados vinícolas hace necesaria la búsqueda de nuevas variedades bien adaptadas y con propiedades exclusivas para la creación de vinos de calidad. Desde el IMIDA se lleva a cabo un programa de mejora de uva de vinificación que pretende dotar de nuevas variedades a los agricultores de la región. La optimización de los programas de mejora pasa por el desarrollo de marcadores moleculares que permitan una temprana selección de los genotipos. El presente trabajo expone el estudio a nivel fenotípico y genotípico de una población híbrida con el objetivo final de encontrar nuevas variedades y posibles marcadores que ayuden en los programas de mejora.

**Palabras clave:** fenotipado, genotipado, población híbrida, QTLs

### ABSTRACT

Currently, the competitive in the wine markets makes necessary seek new varieties well adapted and with exclusive proprieties for high quality wines. The IMIDA's wine grape breeding program has the aim to obtain new varieties for our region's growers. The optimization of breeding programs needs the molecular markers development that allows an early genotypic selection. The present work shows the study of a hybrid progeny at phenotypic and genetic level with the final goal to obtain new varieties and molecular markers that help in breeding programs.

**Keywords:** phenotyping, genotyping, hybrid population, QTLs

## 1. Introducción

Las exigencias del mercado y las demandas de la industria vinícola crean la necesidad de obtener nuevas variedades de uva de vinificación mejor adaptadas y más competitivas. Por un lado, los problemas que vendrán derivados del cambio climático [1] hacen necesaria la adaptación de las variedades a las nuevas condiciones; por otro, la dura competición en los mercados vinícolas actuales hacen que los viticultores de la Región de Murcia necesiten contar con las herramientas adecuadas para ser competitivos. Para ello, se han diseñado diversos cruces de uva de vinificación desde el IMIDA. La variedad madre usada ha sido Monastrell, debido a su buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la región, siendo el sureste español la zona de mayor producción de esta variedad. Las herramientas biotecnológicas se hacen cada día más patentes en los programas clásicos de mejora, ya que, ayudan a agilizar la selección de los caracteres de interés. El análisis de poblaciones híbridas tanto a nivel fenotípico como genotípico, permite correlacionar el fenotipo observado con un determinado genotipo, e identificar así marcadores basados

en el ADN que sean útiles para la selección temprana de dichos caracteres. En el caso de la uva de vinificación diversos caracteres son importantes, a nivel fenológico una brotación más o menos temprana conlleva una buena o mala adaptación de la planta a las condiciones climáticas. Lo mismo sucede con el momento de la vendimia, la fecha puede ser crucial para evitar un exceso de calor durante la maduración que de lugar a vinos con alto contenido alcohólico, planos y con pocos aromas y color. Además, los caracteres particulares de cada variedad confieren a los vinos unas propiedades únicas que los diferencian en el mercado, por ello, su composición química adquiere un gran interés a la hora de su futura selección como variedades comerciales. Por todas estas razones se ha desarrollado el estudio de esta población híbrida en las condiciones de la D.O. Bullas para, por un lado, encontrar nuevas variedades y, por otro, localizar marcadores moleculares que optimicen los programas de mejora en esta especie.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material vegetal y fenotipado

Para la realización de este trabajo se usó una población híbrida proveniente del cruce dirigido entre las variedades de uva comerciales Monastrell y Syrah. Dicha población consta de 230 individuos plantados en un marco de preselección sobre sus propias raíces en la finca experimental Hacienda Nueva (Cehegín), situada en el noroeste de la Región de Murcia. Durante tres campañas consecutivas (2008-2010) se tomaron diversos datos fenológicos: brotación, floración, envero y maduración. Del mismo modo se tomaron datos de producción (peso del racimo, peso de la baya, índice de fertilidad) y morfológicos (forma y compacidad del racimo, forma de la baya y número de semillas por baya). Otros parámetros fueron analizados en la Bodega experimental situada en Jumilla: acidez total, ácido málico, ácido tartárico, pH, potasio, antocianos totales, antocianos extraíbles, polifenoles. Los datos de acidez (total, málico y tartárico) así como los datos de antocianos se analizaron también durante los años 2011-2013.

### 2.2 Mapa de ligamiento

La construcción del mapa de ligamiento se llevo a cabo con dos tipos de marcadores moleculares; SSR (microsatélites) y SNPs (polimorfismo de una sola base). Para ello se extrajo el ADN (con kit comercial) de la población híbrida y de los parentales. Se usaron los marcadores microsatélites más polimórficos para la población a la vez que se intentó que estuvieran equitativamente distribuidos por los 19 grupos de ligamiento o cromosomas que componen el genoma de la vid. Los SNPs se analizaron en una plataforma externa (CEGEN) con la tecnología SNPlex, utilizando un chip obtenido en el laboratorio de Martínez-Zapater [2]. Se construyeron tres mapas de ligamiento, uno para cada parental y otro consenso, con todos los marcadores útiles analizados y el software JoinMap 3.0.

### 2.3 Análisis QTL

Los análisis para encontrar zonas cromosómicas ligadas a los caracteres estudiados se realizaron para cada mapa por separado y para cada año y carácter estudiado individualmente. Se llevaron a cabo tres tipos de análisis, uno no paramétrico de Kruskal-Wallis, un Intervalo Simple de Mapeo (SIM) y un Intervalo Múltiple de Mapeo (MQM). Con el análisis SIM obtenemos la LOD, parámetro que nos indica la probabilidad de que un marcador este significativamente ligado a un carácter. En nuestro estudio se establece un valor umbral de LOD al 95% de confianza, tanto a nivel de grupo de ligamiento como a nivel genómico,

obtenido mediante un test de mil permutaciones. Los QTLs que han superado la LOD umbral a nivel genómico en todos los grupos de ligamiento, se analizan en conjunto mediante el método MQM, utilizando los marcadores próximos como cofactores. El mismo análisis se hace para los que han superado la LOD umbral solo a nivel de grupo de ligamiento. Cuando obtenemos un mismo QTL a nivel genómico durante varios años se dice que el QTL es significativo y consistente; si el QTL aparece diversos años solo a nivel de grupo de ligamiento se define como un QTL sugerente. Los análisis se realizaron con el software MapQTL 4.0.

## **3. Resultados y Discusión**

### 3.1 Fenotipado

Los resultados obtenidos del fenotipado de la población muestran una segregación para todos los caracteres estudiados. Se encontraron segregaciones transgresivas con individuos que superaban la media de los progenitores (Figura 1.). Para la fecha de maduración un 15% de los híbridos maduraron en una fecha posterior al parental mas tardío que fue Monastrell. Para la fertilidad la mayoría de los híbridos mostraron una menor producción que los padres, aunque hubo un 5% de híbridos con la misma producción que Monastrell que fue el parental mas productivo. En el caso de la acidez total un 20% de híbridos obtuvo valores por debajo de los parentales y un 40% de la población tuvo valores superiores. Para los antocianos totales un 20% mostró una concentración inferior a los padres y un 12% tuvo concentraciones superiores. Las segregaciones observadas están en la línea de las obtenidas para otras progenies híbridas estudiadas tanto en uva de mesa [3] como en uva de vinificación [4]. La obtención de híbridos con caracteres extremos ayuda a seleccionar estos caracteres en los programas de mejora, y dichos híbridos pueden ser usados como parentales en futuros programas.

### 3.2 Mapas

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los marcadores utilizados para la construcción de los mapas de ligamiento. Un total de 177 SSR fueron analizados de los cuales se usaron 104. De los 335 SNPs muestreados fueron polimórficos 137 para esta población. Para el mapa de Monastrell se usaron 166 marcadores de los cuales se posicionaron 160 dando lugar a una longitud total del mapa de 1035cM, con una longitud media de grupo de ligamiento de 54,72cM. En el mapa de Syrah se usaron 196 marcadores de los

cuales 186 se posicionaron dando una longitud de 1039cM, con una longitud media de grupo de ligamiento de 54,54cM. Para el mapa consenso se usaron 251 marcadores de los cuales se posicionaron 238, la longitud del mapa fue de 1175cM, con una longitud media de grupo de ligamiento de 60,14cM. Los resultados obtenidos de los mapas están en concordancia con otros mapas publicados [5,6].

### 3.2 QTLs

En la Tabla 2 se muestra un resumen de los QTLs encontrados a nivel genómico para los caracteres destacados en la Figura 1. Para la maduración, el QTL principal se encontró en el grupo de ligamiento 2 próximo al gen que controla el color en vid [7]. Pero también se localizó otro QTL en el mapa de Monastrell en el grupo 17, cuyo análisis en conjunto con el QTL del grupo 2 dio como resultado una explicación de la varianza fenotípica del 20%. El QTL encontrado en el grupo 17 es nuevo para este carácter; respecto a la maduración, otros trabajos ya habían detectado la importancia del QTL en el grupo 2 y otros grupos. Para el índice de fertilidad se encontraron dos QTLs en los grupos 3 y 5; el QTL del grupo 3 solamente se detectó en el mapa de Syrah, mientras que el del grupo 5 se localizó en los tres mapas analizados, con una explicación de la varianza que osciló entre un 14-26%. Estos QTLs vienen a confirmar los resultados de otros trabajos [8,9]. En la acidez de la uva intervienen dos ácidos principales que son el ácido málico y el ácido tartárico. Hemos comprobado, por análisis de correlaciones, que el ácido málico es el que más influye en la acidez total del mosto (datos no mostrados). Para este tipo de compuesto se encontraron diversos QTLs pero destacan dos principalmente, en los grupos 5 y 8, que explican un 20% de la varianza. Estos QTLs se localizaron en dos mapas (consenso y Syrah) y se repitieron varios años, dando consistencia al resultado. En el caso de los antocianos totales analizados, solamente se encontró un QTL que explica un elevado porcentaje de la variación fenotípica (datos no mostrados), coincidiendo con el gen que controla la producción de antocianos en uva [7], siendo fundamental su activación para la producción de los mismos. Estudios posteriores [10] concluyeron que en esa región cromosómica se encuentra una familia de factores de transcripción MYB que controlan hasta el 84% de la producción de antocianos en vid; el estudio se realizó en una colección de germoplasma que incluye diversas procedencias del material vegetal.

## **4. Conclusiones**

El estudio durante varias campañas de esta población híbrida permite la preselección de nuevos genotipos con caracteres especiales y de interés, que pueden ser evaluados como nuevas variedades o ser utilizados como parentales en cruces posteriores, ayudando a fijar en las futuras selecciones caracteres de interés para el viticultor o el enólogo. La construcción del mapa de ligamiento de esta población permite seguir estudiando y comparando los resultados con otras poblaciones analizadas en otros centros de investigación. Los QTLs son una potente herramienta para los programas de mejora vegetal, sobre todo para los frutales cuyas fases juveniles demoran el estudio de sus frutos que es el objetivo final. Encontrar marcadores ligados a caracteres de interés en frutales supone un esfuerzo de años consecutivos de análisis. En el estudio de esta población se han encontrado QTLs prometedores para diversos caracteres pero sobre todo destacamos los encontrados para la acidez, ya que hasta el momento no se han publicado estudios al respecto. Estos resultados pueden ser el primer paso para encontrar marcadores que nos ayuden a seleccionar nuevas variedades en función de su acidez.

## **5. Agradecimientos**

Ana Fuentes por su ayuda en el laboratorio y al equipo técnico de la finca Hacienda Nueva por el mantenimiento y conservación de la progenie en campo.

## **6. Referencias bibliográficas**

- [1] Jones G.V., White M.A., Cooper OR., Storchmann K .2005 Climate change and global wine quality. *Climatic Changes*. 73:319-343.
- [2] Lijavetzky D., Cabezas J.A., Ibáñez A., Rodríguez V., Martínez-Zapater J.M. 2007. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combing a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC genomics*. 8:424.
- [3] Costantini L., Battilana J., Lamaj F., Fanizza G., Grando M.S. 2008. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): from quantitative traits to underlying genes. *BMC Plant Biology*. 8:38.
- [4] Liu H.F., Wu B.H., Fan P.G., Xu H.Y., Li S.H. 2007 Inheritance of sugars and acids in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) *Euphytica*. 153:99-107.
- [5] Adam-Blondon A., Roux C., Claux D., Butterlin G., Merdinoglu D., This P. 2004. Mapping 245 SSR

markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theor Appl Genet.* 109:1017-27.

[6] Doligez A., Bouquet A., Danglot Y., Lahogue F., Riaz S., Meredith P., Edwards J., This P. 2002. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor Appl Genet.* 105:780-795.

[7] Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. 2004. Retrotransposon-Induced mutations in grape skin color. *Science.* 304:982.

[8] Doligez A., Bertrand Y., Dias S., Grolier M., Ballester J., Bouquet A., This P. 2010. QTLs for fertility in table grape (*Vitis vinifera* L.). *Tree Genet Genomes.* 6:413-422.

[9] Grzeslowski L., Costantini L., Lorenzi S., Grando M.S. 2013. Candidate loci for phenology and fruitfulness contributing to the phenotypic variability observed in grapevine. *Theor Appl Genet.* 126:2763-2776.

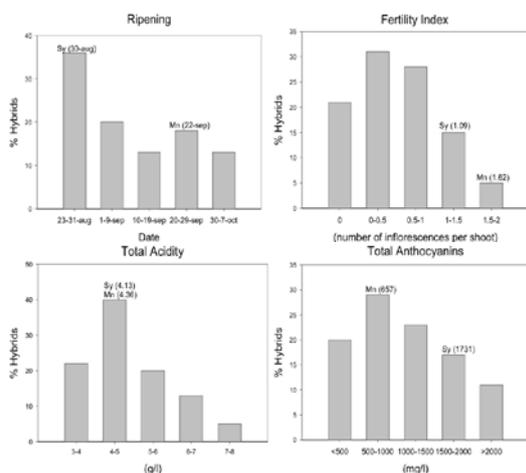
[10] Fournier-Level A., Le Cunff L., Gomez C., Doligez A., Ageorges A., Roux C., Bertrand Y., Souquet J.M., Cheynier V., This P. 2009. Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. Ssp. *Sativa*) berry: a quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study. *Genetics Society of America.* 183:1127-1139.

Marker type	Maternal	Paternal	1:2:1	1:3	1:1:1	1:1:1:1	Total
	1:1	1:1					
SSRs	<absaa>	<absab>	<absab>	<aaaaf>	<absac>	<absacd>	
	12	15	4	1*	49	23	104
SNPs	43	69	34	--	--	--	146
CAPS	--	--	1	--	--	--	1
Total	55	84	39	1	49	23	251

**Tabla 2.** Resumen de los QTLs encontrados a nivel genómico para la maduración el índice de fertilidad y la acidez.

Trait	Map	Year	LG	LOD max	cM	Confidence interval	Cofactor	GW LOD & variance & variance			
								95%	QTL	model	
Ripening	C	2010	2	6.86	51.2	38-60	20D18CB9	5.4	18.1		
	Hn	2009	2	2.91	31.9	24-48	vnc5g7	2.5	9		
		2010	2	5.5	31.9	18-50	vnc5g7	2.7	13.8	20.6	
		17	3.38	0	0-6	SNP677_509	2.7	7.7			
		Hn	2008	5	4.31	0.0	0-7	SNP1027_69	2.7	8.4	
Fertility Index		2009	5	4.14	0.0	0-8	SNP1027_69	2.7	8.1		
		2013	5	7.22	0.0	0-17	SNP1027_69	2.7	14.3		
	Sy	2008	3	4.04	20.1	9-25	ndv_043	2.8	7.4	13.5	
		5	3.79	12.7	0-21	Wvi_5316		7.2			
		2009	5	3.22	0	5-16	Wvi_5316	2.6	6.6		
		2010	5	3.08	12.7	9-15	Wvi_5316	2.7	6.5		
		2013	5	3.38	0.0	0-12	vrzaq47	2.7	6.9		
		Cp	2008	5	9.08	0.0	0-16	SNP1027_69	4.8	21.6	
		2013	5	11.67	0.0	0-32	SNP1027_69	4.4	26.4		
	Malic acid	C	2010	5	4.85	43.9	42-54	vnc16d4	4.3	15.5	25.6
		15	4.56	56.5	48-58	SNP555_132		29.3			
		2013	8	6.22	7.1	0-20	SNP699_311	4.2	19.6		
Hn		2011	4	2.83	52.4	52-55	Wvi_2543	2.7	14.1	22.8	
		9	2.81	70.3	62-75	Wvi_10329		14.9			
		2012	17	3.08	0.0	0-3.5	SNP677_509	2.7	17.3	32.3	
		18	2.92	2.6	2-4	vnc3e5		16.3			
		Sy	2010	5	3.91	41.0	26-44	vnc4c6	2.7	13	24.0
	8	3.52	13.5	6-18	SNP853_312		11.1				
	2013	8	6.21	7.1	0-24	wvip04	2.6	19.5			

**Tablas y Figuras**



**Figura 1.** Gráficas de maduración, índice de fertilidad, acidez total y antocianos totales para el año 2010.

**Tabla 1.** Número y tipo de segregación de los marcadores polimórficos genotipados en la progenie.