



Sociedad
Española
de **Ciencias**
Hortícolas

91

Octubre 2022



ACTA DE HORTICULTURA

**Comunicaciones Técnicas
Sociedad Española de
Ciencias Hortícolas**

IV Jornadas del Grupo de Viticultura

Editores:

**Gonzaga Santesteban
Nazareth Torres**

26-28 de octubre 2022, Pamplona/Iruña

ACTAS DE HORTICULTURA N° 91

Comunicaciones Técnicas Sociedad Española de Ciencias Hortícolas

IV Jornadas del Grupo de Viticultura de la SECH

Actas de las IV Jornadas del Grupo de Viticultura de la SECH celebrado en octubre del 2022 en Pamplona/Iruña

Sociedad Española de Ciencias Hortícolas

Editores:

Gonzaga Santesteban

Nazareth Torres

ISBN: 978-84-09-38456-3

Caracterización genética y de caracteres reproductivos en variedades de vid sin semilla de Armenia

A. Nebish^{1,2*}, P. Carbonell-Bejerano¹, C. Royo¹, J. Tello¹, Y. Ferradás¹, J. Valera³, M.-T. Coronado-Parra⁴, C. Obón⁵, D. Rivera³, J. Ibáñez¹ y J. M. Martínez-Zapater¹

¹ Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, UR, Gobierno de la Rioja), 26007, Logroño, España

² Departamento de Genética y Citología, Universidad Estatal de Ereván, 0025, Ereván, Armenia

³ Departamento Biología Vegetal, Facultad Biología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España

⁴ Servicio de Microscopía, Área Científica y Técnica de Investigación, Microscopía, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España

⁵ Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández, 03312, Orihuela, Alicante, España

* anna.nebish@icvv.es

Resumen

La apirenia de la mayoría de las variedades comerciales de la vid (*Vitis vinifera* L.) procede de 'Sultanina', una variedad con origen en Asia Menor. El principal objetivo de este trabajo ha sido la caracterización de posibles fuentes alternativas de apirenia en el germoplasma armenio. Se han estudiado 40 accesiones apirenas de las colecciones armenias de vid en Echmiadzin (ARM006) y en Nalbandyan (ARM011), así como de explotaciones privadas de la región de Armavir (Armenia). El análisis fenotípico de bayas se realizó de acuerdo con los descriptores de la OIV, y el análisis genético mediante el estudio de la mutación causal de apirenia en Sultanina en el gen *VviAGL11* y del marcador *VviAPT3* ligado al locus del sexo. El análisis de viabilidad y morfología de los granos de polen se visualizó por microscopía óptica y electrónica de barrido. El análisis fenotípico de bayas reveló una amplia variación en el peso de las mismas, así como en la formación de rudimentos seminales. Las flores de nueve cultivares son hermafroditas con un alto nivel de viabilidad del polen. La accesión 'Karmir kishmish' se caracterizó por tener flores funcionalmente femeninas con baja viabilidad de polen y se confirmó genéticamente con *VviAPT3*. El análisis de microscopía mostró que los granos de polen de las flores hermafroditas tienen forma esférica con 3 colporaciones y numerosas perforaciones, mientras que el de la variedad 'Karmir kishmish' es también esférico, pero acolporado y con menos perforaciones. El análisis genético reveló que todas las accesiones portan la mutación puntual dominante en *VviAGL11* que causa la estenospermocarpia en 'Sultanina'. De hecho, el análisis de 7 marcadores SSR y 48 SNPs demostró que todas son descendientes de la misma. Este estudio confirma que las variedades apirenas armenias descienden de 'Sultanina', y motiva la búsqueda de otros determinantes genéticos que causen variación en el contenido de semillas de las uvas para utilizar como fuentes alternativas en programas de mejora de uva de mesa.

Palabras clave: *Vitis vinifera* L., 'Sultanina', Polen, Genes *VviAGL11* y *VviAPT3*,



Microscopía electrónica de barrido.

INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los principales cultivos frutales de gran difusión y de importancia comercial en el mundo. Su cultivo comenzó durante el Neolítico (> 6000 a. C.) en las tierras altas de la región de Transcaucasia a partir de su progenitor silvestre *V. vinifera* L. subsp. *sylvestris* (Arroyo-García et al., 2006). La apirenia en uvas es un rasgo muy apreciado para producción de uva de mesa o pasas y la mayoría de variedades comerciales apirenas procede de 'Sultanina', una variedad estenospermocarpica con origen en Asia Menor. La mutación responsable se localizó en el gen *VvAGL11*, Arg197Leu, que se requiere para el normal desarrollo de la cubierta de la semilla. Esta mutación es la causa principal de la falta de semillas en variedades estenospermocárpicas de vid cultivadas (Malabarba et al., 2017; Royo et al., 2018). Por otra parte, el sexo de la flor, determinado por un conjunto de genes en el locus del sexo (Fechter et al., 2012), puede afectar indirectamente al número de semillas, ya que las flores femeninas necesitan la polinización externa y, por lo tanto, tienen una fertilización menos efectiva (Ocares et al., 2020). El principal objetivo de este trabajo ha sido la caracterización genética y de caracteres reproductivos del germoplasma de vid armenio sin semilla.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Los materiales de partida fueron plantas de 40 accesiones apirenas procedentes de las colecciones armenias de vid del Centro Científico de Agricultura de Ministerio de Agricultura e Echmiadzin (ARM006) y de la Academia Nacional de Viticultura, Enología y Pomología en Nalbandyan (ARM011), así como de explotaciones privadas de la región de Armavir (Armenia).

Análisis fenotípico

En cada accesión se realizó el análisis fenotípico de 30 bayas de 4 racimos. Las bayas y rudimentos seminales se caracterizaron cualitativamente con unos descriptores de la OIV, peso de bayas y número de rudimentos de semillas y residuos de óvulos. Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa IBM SPSS Statística 19.

Análisis genético

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de hojas jóvenes de 40 accesiones con el protocolo de NZY Plant/Fungi gDNA Isolación kit (NZYTech). Para identificar las distintas accesiones las accesiones se genotiparon con siete marcadores microsatélites (Simple Sequence Repeats, SSR): VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD32, VVS2, VrZAG62 y VrZAG79 (www.vivc.de) y 48 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) (Ibañez et al., 2009; Cabezas et al., 2011). El análisis genético de la mutación causal de apirenia y el sexo de la flor se realizó con el genotipado del gen *VviAGL11* y del marcador microsatélite *VviAPT3* ligado al locus sexual mediante PCR y secuenciación Sanger (Fechter et al., 2012; Royo et al., 2018).

Análisis microscópico de polen

El estereomicroscopio Zeiss SteREO Discovery V20, y las imágenes con una cámara Zeiss AxioCam y el software AxioVision (v. 4.8, Zeiss) se usaron para analizar la viabilidad del polen de 10 genotipos únicos con tinción de Alexander (Peterson et al., 2010). El análisis de la morfología de los granos de polen se realizó con microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (ApreoS, Thermofisher) en la Universidad de Murcia.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización genética de las 40 accesiones incluidas en este trabajo para 7 SSRs y 48 SNPs reveló 10 perfiles genéticos distintos (Tabla 1). Tras comparar estos perfiles con los almacenados en las bases de datos del VIVC y del ICVV, se identificaron nueve de estos perfiles como variedades de uva de mesa ('Sultanina', 'Kishmish Chernyi', 'Anush', 'Eskeri', 'Hrushaki', 'Karmir Yerevani', 'Kishmish Khishrau', 'Kishmish Moldavskii', y 'Parvana'), mientras que el perfil de la accesión 'Karmir Kishmish' no coincidió con ninguno de los perfiles incluidos en dichas bases de datos. El análisis fenotípico de las bayas de estas variedades reveló una amplia variación en su peso, así como en la formación de los rudimentos de las semillas y residuos de óvulos. Las medias obtenidas para los parámetros analizados se muestran en la Tabla 1. Las tres variedades ('Sultanina', 'Karmir Kishmish' y 'Karmir Yerevani') sólo produjeron bayas pequeñas con un peso medio de 0.89-1.14g y hasta 1,02 rudimentos seminales por baya. Por el contrario, los valores más altos se observaron en variedades con un peso de baya de entre 2 y 3.7 g, como es el caso de 'Parvana'. Las bayas de 'Anush', 'Eskeri', 'Kishmish Khishrau', 'Kishmish Chernyi', 'Kishmish Moldavskii' y 'Parvana' en su mayoría contienen rudimentos seminales flotantes, grandes y vacíos, y ocasionalmente unos residuos de óvulo.

Las flores de nueve variedades resultaron hermafroditas y presentaron viabilidad de polen superior al 70%. Sin embargo, la accesión 'Karmir kishmish' se caracterizó por presentar baja viabilidad de polen ($49,9 \pm 8,76\%$). Genéticamente las variedades con viabilidad de polen alta son heterocigotas para los alelos femenino de *VviAPT3* (con un fragmento 269 o dos fragmentos: 269 y 396) y hermafrodita (465) (Fechter et al., 2012). En el caso de 'Karmir kishmish' las flores resultaron femeninas, así como el genotipo de *VviAPT3* (269/396) en el locus del sexo. Los parámetros fenotípicos de baya y rudimentos seminales no se diferenciaron en base al sexo de la flor entre 'Karmir Kishmish', con las flores femeninas, y 'Sultanina', con flores hermafroditas. El análisis de microscopía mostró que los granos de polen de las flores hermafroditas tienen forma esférica con 3 colporaciones y numerosas perforaciones, especialmente en 'Sultanina', mientras que el de la variedad 'Karmir kishmish' es también esférica, pero acolporado, funcionalmente estéril y con menos perforaciones (Fig. 1). La secuenciación dirigida del gen *VviAGL11* mostró que todos los genotipos analizados presentan la mutación puntual dominante (C>A) que causa la estenospermocarpia en 'Sultanina' y los cultivares apirenos derivados de 'Sultanina'. Esta mutación se presentó en heterocigosis en todos los casos. De hecho, el pedigrí descrito para las variedades identificadas pone de manifiesto su relación con 'Sultanina'.

Este estudio confirma que las variedades apirenas armenias analizadas en este trabajo descienden de 'Sultanina', y motiva la búsqueda de otros determinantes genéticos que causen variación en el contenido de semillas de las uvas y que puedan ser utilizados como fuentes alternativas de apirenia en programas de mejora de uva de mesa.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha podido realizarse gracias al soporte con muestras de la Fundación de la Vid y del Vino de Armenia y Voskehat centro científico de educación de ANAU. A.N. agradece la financiación del programa MSCA-IF (IF-EF-ST/0685-896290, GRAPEINNOVATION).



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., Ibáñez, J., etc. 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Mol. Ecol.*, 15(12), 3707-3714.
- Cabezas, J.A., Cervera, M.T., Ruiz-García, L., Carreño, J. and Martínez-Zapater, J.M. 2006. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome* 49 (12):1572-1585.
- 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., & Martínez-Zapater, J. M. 2011. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC Plant Biol.*, 11, 153.
- Fechter, I., Hausmann, L., Daum, M. Rosleff Sørensen, T., Viehöver, P., Weisshaar, B. and Töpfer, R. 2012. Candidate genes within a 143 kb region of the flower sex locus in *Vitis*. *Mol. Genet. Genomics* 287, 247–259.
- Ibáñez, J., Vélez, M., de Andrés, M. T. and Borrego, J. 2009. Molecular markers for establishing distinctness in vegetatively propagated crops: a case study in grapevine. *Theor. and Appl. Genet.*, 119(7), 1213-1222.
- Malabarba, J., Buffon, V., Mariath, J.E.A., Gaeta, M.L., Dornelas, M.C., Margis-Pinheiro, M., Pasquali, G. and Revers, L.F. The MADS-box gene *Agamous-like 11* is essential for seed morphogenesis in grapevine. *J. Exp. Bot.* 2017; 68(7):1493-1506.
- Melyan, G. and Nersisyan, A. 2019. *Ampelography: the short ampelographic description of the indigenous and selection grapevine varieties cultivated and prospective of the Republic of Armenia*. Edgar print.
- Nebish, A., Tello, J., Ferradás, Y., Muradyan, Z., Ibáñez, J. and Martínez-Zapater, J.M. 2022. Phenotypic variation and genetic origin of seedless grapevine varieties in Armenia. IV Annual Meeting of COST Action CA17111 INTEGRAPPE: International Conference on Data integration for grapevine research in the context of environmental transition. Lemesos, Cyprus, March, p. 20.
- Ocarez, N., Jiménez, N., Núñez, R., Perniola, R., Marsico, A.D., Cardone, M.F., Bergamini, C. and Mejía, N. 2020. Unraveling the Deep Genetic Architecture for Seedlessness in Grapevine and the Development and Validation of a New Set of Markers for *VviAGL11*-Based Gene-Assisted Selection. *Genes (Basel)*. 11(2):151.
- Peterson, R., Slovin, J.P. and Chen, C. 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *Int. J. of Plant Biol.*; 1, 13:66-69.
- Royo, C., Torres-Pérez, R., Mauri, N., Diestro N., Cabezas, J.A., Marchal, C., Lacombe, T., Ibáñez, J., Tornel, M., Carreño, J., Martínez-Zapater, J.M. and Carbonell-Bejerano, P. 2018. The Major Origin of Seedless Grapes Is Associated with a Missense Mutation in the MADS-Box Gene *VviAGL11*. *Plant Physiol.* 177(3):1234-1253.



Tabla 1. Características fenotípicas de las accesiones apirenas

Variedad, VIVC	Codig oVIV C	Numero de muestras	Origen genético VIVC	Peso de bayas, g ±DM	Numero de rudimentos por baya	Numero de residuos de óvulo por baya
Sultanina	12051	13	Desconocido	1.14±0.08	0	1.02
Karmir	N/A	2	Desconocido	1.13±0.12	0	0.87
Kishmish	6256	4	Desconocido	2.03±0.10	0.65	1.04
Chernyi	3960	5	Sultanina x Blanc D'iran	2.37±0.13	0.92	0.23
Eskeri	10412	4	Mskhali x Sultanina	1.77±0.12	0.52	1.05
Hrushaki	12896	4	Arevik Spitak x Sultanina	0.89±0.11	0	0.86
Karmir	16457	2	Armenia x Eskeri	1.75±0.15	0.48	0.2
Yerevani	6258	2	Angur Kalan x Kishmish Chernyi	2.72±0.19	1.95	0.21
Anush	14053	1	Pobeda x Kishmish	1.95±0.14	1.38	0
Kishmish	14068	3	Rozovyi x Katta Kurgan Kishmish	3.74±0.36	1.80	0
Moldavskii			Khishrau	6		
Parvana						

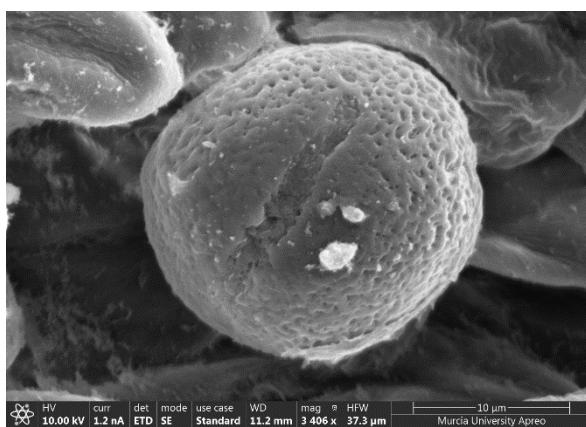


Figura 1. Micrografías en MEB del polen de las variedades 'Sultanina' (A) y 'Karmir Kishmish' (B).

Impacto de la localización geográfica en el perfil fenológico de variedades blancas

