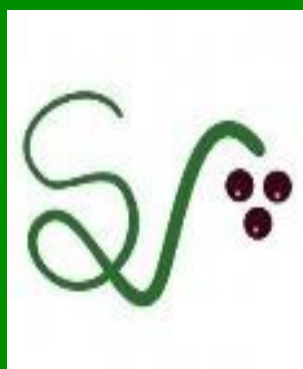




Sociedad
Española
de **Ciencias
Hortícolas**

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

SESIÓN 1. Caracterización agronómica, genética y molecular del material vegetal.

Identificación de variación clonal funcional en Tempranillo y Garnacha mediante el uso de ensamblajes de genomas de referencia varietales

P. Carbonell-Bejerano^{1*}, C. Royo¹, Y. Ferradás¹, M. Rodríguez-Lorenzo¹, N. Alañón¹, I. Bezrukov², C. Lanz², J. Ibáñez¹, D. Weigel² y J. M. Martínez-Zapater¹

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

² Department of Molecular Biology, Max-Planck-Institute for Biology, 72076 Tuebingen, Germany

*Autor: pablo.carbonell@icvv.es

Resumen

Las variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) se caracterizan por su alta heterocigosidad (variación entre sus copias genómicas de herencia materna y paterna), lo que obliga a la propagación vegetativa como única vía posible para reproducir su genotipo y sus características varietales. Sin embargo, la propagación vegetativa prolongada da lugar a la acumulación de mutaciones somáticas que en ocasiones pueden producir fenotipos de interés que son la base para la mejora mediante selección clonal. En este trabajo hemos producido ensamblajes de los genomas de Tempranillo y Garnacha. Usando los ensamblajes como referencia, pudimos identificar variación genómica responsable de caracteres de interés en clones o variantes somáticas seleccionadas de cada variedad. En Tempranillo se identificó una delección de gran tamaño en un clon con color de baya más oscuro de lo normal, relacionada con una reducción en la acumulación de ceras en la cutícula de la baya. En Garnacha se identificaron dos patrones de delección distintos que causan la pérdida de los genes *MYB* necesarios para la síntesis de antocianinas en el hollejo, que suponen dos orígenes independientes de la variedad Garnacha Blanca. Estos resultados muestran como el ensamblaje de genoma puede ayudar a conocer el origen de las características varietales y posibilitar la trazabilidad de variación genética clonal útil para la innovación intravarietal.

Palabras clave: ensamblaje de genomas, Garnacha, selección clonal, Tempranillo, variación genética somática.

INTRODUCCIÓN

Las variedades de vid se reproducen vegetativamente para acortar los ciclos de propagación y porque, dada la heterocigosidad de sus genomas, la reproducción sexual da lugar a una segregación alélica que no permite mantener los atributos varietales. Las variedades tradicionales han sido propagadas vegetativamente durante periodos largos desde que germinó la semilla ancestral, lo que en ocasiones puede haber ocurrido hace varios siglos. Estos procesos prolongados de propagación permiten la acumulación de un número reducido de mutaciones somáticas que dan lugar a distintos linajes clonales de la misma variedad (Calderon et al. 2021). En ocasiones, alguna de estas mutaciones puede producir fenotipos de interés, siendo ésta la fuente de variación que sirve de base para la mejora mediante selección clonal (Carbonell-Bejerano et al. 2019). De este modo, la selección clonal puede perseguir la identificación de variantes que permitan incrementar la calidad de la producción y adaptarla a



condiciones cambiantes como las que representa el contexto de cambio climático y de nuevas demandas de la sociedad a las que se enfrenta la viticultura actualmente.

La selección clonal permite la evolución y mejora de las variedades tradicionales locales, manteniendo a su vez los atributos varietales de calidad que otorgan tipicidad a las regiones en las que llevan cultivándose incluso durante siglos. Sin embargo, dado su carácter clonal, se requiere identificar las mutaciones responsables de los fenotipos variantes seleccionados para poder desarrollar marcadores moleculares que garanticen la trazabilidad de los clones mejorados. Para facilitar esta tarea, en este trabajo nos propusimos producir el ensamblado *de novo* de los genomas de Tempranillo y Garnacha, que son respectivamente, la tercera y la quinta variedad de vinificación de tintos con mayor superficie de cultivo en el mundo (OIV, 2018). Usando estos ensamblajes como referencia, tratamos de identificar mutaciones responsables de variantes somáticas con fenotipos mejorados o innovadores en cuanto al color de la baya y de los vinos que producen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensamblaje de genomas

Se obtuvo ADN de alto peso molecular tras el aislamiento de núcleos de células de hoja que fueron procesado con el kit de extracción de ADN ‘Nanobind Plant Nuclei Big DNA Kit’ (Circulomics). En Tempranillo, el ADN se secuenció con las tecnologías de lecturas largas de PacBio CLR y Oxford Nanopore Technologies (ONT); y para Garnacha, usando la tecnología de última generación PacBio HiFi que no solo produce lecturas largas, sino que incrementa su fiabilidad hasta >99%. Para el ensamblaje de genoma de Tempranillo se siguió la estrategia de ‘Canu trio binning’ usando información de su pedigrí y para Garnacha la aplicación Hifiasm (Cheng et al. 2021; Koren et al. 2018). Las copias genómicas ensambladas se compararon usando la herramienta bioinformática SyRI (Goel et al. 2019).

Búsqueda de mutaciones responsables de variación somática

Mediante lecturas cortas de Illumina, se re-secuenció el genoma de una variante de uva más oscura de Tempranillo y utilizando ONT, el de variantes de uva Blanca de Garnacha, junto con accesiones control. El ADN se extrajo con el kit Plant Mini kit de Qiagen. Los genomas re-secuenciados se alinearon a los ensamblajes de genoma de cada variedad para identificar mutaciones somáticas de pequeño tamaño (SNVs e InDels) y variación estructural de genoma usando las herramientas bioinformáticas GATK, DELLY y Sniffles.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

En Tempranillo aprovechamos el conocimiento de su pedigrí para reconstruir por separado sus dos copias genómicas para los 19 cromosomas. En Garnacha se pudieron separar las dos copias de cada región genómica en ausencia de información de pedigrí, gracias a la precisión de la tecnología de secuenciación de lecturas largas PacBio HiFi. En ambas variedades, la variación entre las copias genómicas ensambladas es del 2% en cuanto a variantes de pequeño tamaño (SNP e InDel) y >12% en cuanto a reorganizaciones genómicas estructurales (Tabla 1). Estos resultados muestran que la variación entre las dos copias genómicas presentes en una variedad de vid está en torno al 15% del tamaño del genoma, lo que corrobora su alta heterocigosidad. Estos resultados apuntan a la necesidad de ensamblajes específicos de cada variedad y en los que se resuelvan los dos haplotipos (o copias genómicas) para poder representar la totalidad de la diversidad de sus genomas.



En Tempranillo se identificó una delección de gran tamaño (>10 Mb) en el cromosoma 11 como la mutación responsable del fenotipo del clon de baya oscura (Fig. 1A). Esta variación se confirmó tanto con la detección de los puntos de rotura, como con la caída del número de lecturas de secuenciación y de la heterocigosidad. El punto de rotura de la delección se validó mediante una PCR que puede usarse como marcador molecular para la identificación del clon. A su vez, estudiando la secuencia del ensamblaje de genoma de Tempranillo se halló que esta delección desenmascara una copia no funcional de un gen de acumulación de ceras en la cutícula que podría ser responsable directo del color de baya más intenso del clon.

Un análisis de variación estructural sobre secuenciación ONT del genoma de accesiones de Garnacha Blanca de origen independiente identificó puntos de rotura de patrones distintos de delección en el cromosoma 2. Se identificó patrón de delección simple de 1 Mb y otro con una delección de 1.5 Mb repartidas en dos fragmentos que se hallan discontinuos en el genoma ancestral de Garnacha, lo que se asocia a una inversión de la región (Fig. 1B). En ambos patrones, las delecciones eliminan la única copia del alelo funcional de los genes *MYBA1* y *MYBA2* presentes en el genoma de Garnacha, genes que son esenciales para la acumulación de antocianinas en el hollejo (Walker et al., 2007). Los puntos de rotura ocurren en regiones específicas del genoma de Garnacha frente al genoma de referencia derivado de Pinot Noir, por lo que solo han podido identificarse gracias a disponer del ensamblaje *de novo* de Garnacha. Estas delecciones también se validaron mediante amplificaciones PCR que pueden utilizarse para la trazabilidad de accesiones de Garnacha Blanca que procedan de alguno de estos dos orígenes mutacionales que son los únicos que se han identificado para esta variedad.

REFERENCIAS

- Calderon, L., Mauri, N., Munoz, C., Carbonell-Bejerano, P., Bree, L., Bergamin, D., Sola, C., Gomez-Talquenca, S., Royo, C., Ibanez, J., Martinez-Zapater, J. M., and Lijavetzky, D. (2021). Whole genome resequencing and custom genotyping unveil clonal lineages in 'Malbec' grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Rep.* **11**, 7775.
- Carbonell-Bejerano, P., Royo, C., Mauri, N., Ibáñez, J., Martínez-Zapater, J. M. (2019). Somatic Variation and Cultivar Innovation in Grapevine. *In* "Advances in Grape and Wine Biotechnology" (A. Morata, Loira, I., ed.). IntechOpen, Rijeka.
- Cheng, H., Concepcion, G. T., Feng, X., Zhang, H., and Li, H. (2021). Haplotype-resolved *de novo* assembly using phased assembly graphs with hifiasm. *Nat. Methods* **18**, 170-175.
- Goel, M., Sun, H., Jiao, W. B., and Schneeberger, K. (2019). SyRI: finding genomic rearrangements and local sequence differences from whole-genome assemblies. *Genome Biol.* **20**, 277.
- Koren, S., Rhie, A., Walenz, B. P., Dilthey, A. T., Bickhart, D. M., Kingan, S. B., Hiendleder, S., Williams, J. L., Smith, T. P. L., and Phillippy, A. M. (2018). *De novo* assembly of haplotype-resolved genomes with trio binning. *Nat. Biotechnol.* **36**, 1174-1182
- OIV (2018). Distribution of the world's grapevine varieties. *In* "Focus OIV 2017" (O.-I. o. o. v. a. wine, ed.). OIV, Paris – France.
- Walker, A. R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D. A., Thomas, M. R., and Robinson, S. P. (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J.* **49**, 772-85.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada con fondos EU de la Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowship (SomaGrapeGenome,



79460) y de los proyectos del Ministerio de Economía (SOMAVID, BIO2014-59324) y del Ministerio de Ciencia e Innovación (DIGEVIDA, PID2020-120183RB-I00), así como con fondos de la ‘Max Planck Society’.

Tabla 1. Variación entre las dos copias genómicas ensambladas en cada variedad

Variedad	SNP	InDel	Variación estructural	Total
Tempranillo	0.6%	1.4%	15.4%	17.4%
Garnacha	0.8%	1.6%	12.6%	15.0%

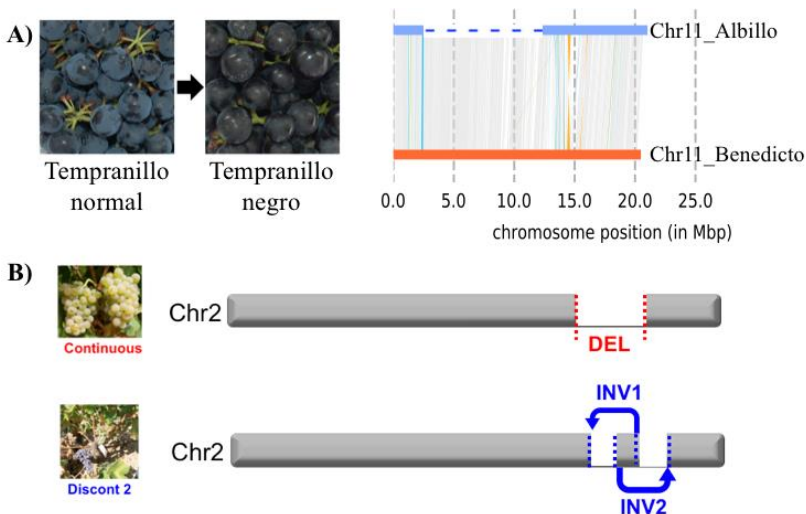


Fig. 1. Mutaciones asociadas a los fenotipos seleccionados en las variantes clonales. A) Deleción asociada al origen del Tempranillo de uva oscura. B) Dos patrones de deleción que suponen dos orígenes genéticos independientes de Garnacha Blanca.