



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Caracterización molecular de cultivares locales de *Vitis vinifera* L.
en áreas volcánicas (La Gomera / Islas Canarias) empleando
marcadores SSR

Miguel Gimeno Coll

TRABAJO DE FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGIA

Tutor académico: Maria Francesca Fort
Departamento de Bioquímica y Biotecnología
mariafrancesca.fort@urv.cat
En cooperación con Tecnología Enológica (TECNENOL)
Campus Sescellades

Fecha de la convocatoria:
Junio 2023

Jo, Miguel Gimeno Coll, amb DNI 47749231-N , sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV "Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants" (aprovada el juliol 2017) <https://www.crai.urv.cat/ca/serveis/suport-aprenentatge/plagi/> i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de Juny de 2023



(signatura)

Índice:

1.- Datos del centro.....	5
2.- Resumen y palabras clave	6
3.- Introducción	7
4.- Hipótesis y objetivos	13
5.- Materiales y métodos	14
5.1. Material vegetal.....	14
5.2. Genotipado de microsátélites.....	14
5.3 Análisis de datos.....	15
6.- Resultados y discusión.....	17
6.1. Polimorfismo de Microsátélites.....	17
6.2. Análisis de cultivares.....	17
6.3. Análisis poblacional de La Gomera.....	18
6.4. Estructura poblacional de La Gomera a escala mundial.....	18
6.5. Discusión.....	20
7.- Conclusiones.....	21
8.- Bibliografía y Webgrafía.....	22
9.- Autoevaluación.....	28

Anexos

1-Datos del centro

El grupo de investigación TECNENOL (Tecnología Enológica) es un grupo de investigación del Departamento de Bioquímica y Biotecnología (DBB), ubicado en la planta nº 1 del Campus Sescellades (Calle Marcel·lí Domingo, 1, 43007 Tarragona) de la Universitat Rovira i Virgili.

TECNENOL se creó en 2001, integrando 3 miembros, entre ellos Fernando Zamora (catedrático de universidad), Joan Miquel (profesor titular de universidad) y Francesca Fort (profesora titular de universidad). En 2005 el grupo se expandió incorporando diversos investigadores y becarios. Este mismo año TECNENOL obtuvo la acreditación de Grupo de Investigación de Calidad por parte de la Generalitat de Catalunya (REF: 2005SGR-00644).

En la actualidad, TECNENOL comprende múltiples miembros temporales, 2 áreas de investigación definidas (Área de Enología y Área de Biología de la Viña/Viticultura) y 40 publicaciones en revistas internacionales del periodo 2018-2022.

2-Resumen y palabras clave

El cultivo de variedades de la especie *Vitis vinifera* L. es uno de los más destacados a nivel mundial en términos económicos y productivos. No obstante, sólo se empela el 1% del total de sus variedades, lo cual deja a la viticultura en una posición de vulnerabilidad frente a cambios súbitos más allá de su rango de tolerancia, por ejemplo, el cambio climático.

En este trabajo se responde a esta necesidad a través de la búsqueda, catálogo e informe de nuevas variedades de *Vitis vinifera* L. vía la prospección de La Gomera, isla perteneciente al archipiélago de las Islas Canarias y un importante reducto de biodiversidad de la vid en toda Europa debido a su historia.

Se examinaron 110 muestras, de las cuales algunas eran perfiles genéticos únicos, empleando 20 Microsatélites para su categorización y búsqueda de nuevas variedades, y programas estadísticos como *Structure* 2.3.4 o GenAIEx 6.503 para su estudio a nivel poblacional.

Se obtuvieron variedades propuestas como locales, e información poblacional de La Gomera que demuestra su singularidad e idoneidad como lugar de estudio y reservorio de la biodiversidad.

Palabras clave: *Vitis vinifera* L., SSR, La Gomera, Variedades, Islas Canarias.

3-Introducción

El cultivo de las variedades de la especie *Vitis vinifera* L. es uno de los más antiguos y en la actualidad más relevantes a nivel mundial. La FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) afirma que el cultivo mejor valorado económicamente es el de la vid para la vinificación de vinos de media y alta calidad (Wolkovich y col., 2018). Además, la NASS (*National Agricultural Statistics Service*) reafirma su importancia como el 6º cultivo de mayor valor económico de 2021 en Estados Unidos (NASS, 2021). En términos de volumen de producción, a nivel mundial de las 26,675,006 toneladas producidas en 2020, más del 64% provenían del conjunto de países europeos (Our world in data, 2020) de los cuales a su vez, Italia, Francia y España encabezaban, en ese orden, con holgada diferencia, la producción europea sumando el 79% del total de esta.

No obstante, si se examina la biodiversidad y variedades cultivadas, se observa que en la mayoría de los países las 12 variedades principales del mercado (las cuales suman el 1% del total de variedades) ocupan entre un 70-90% de la superficie en hectáreas (Wolkovich y col., 2018). Este hecho pone en evidencia la necesidad de una mayor exploración y estudio del resto de variedades en busca de fenotipos de interés que ayuden a ampliar el elenco de vinos que ofrece el mercado y a mitigar los efectos del cambio climático.

Un lugar de partida para este propósito, ubicado en territorio de ultramar de una potencia productora de vino europea, es sin duda La Gomera. La Gomera es una isla perteneciente al archipiélago volcánico de las Islas Canarias, agrupación de 8 islas españolas situadas en el Océano Atlántico formando parte del conjunto de islas volcánicas conocido con el nombre de Macaronesia, próximas al Sahara Occidental (Figuras 1 y 2). Pertenece a la provincia de Santa Cruz de Tenerife y es la penúltima isla en población de esta provincia (INE, 2021).

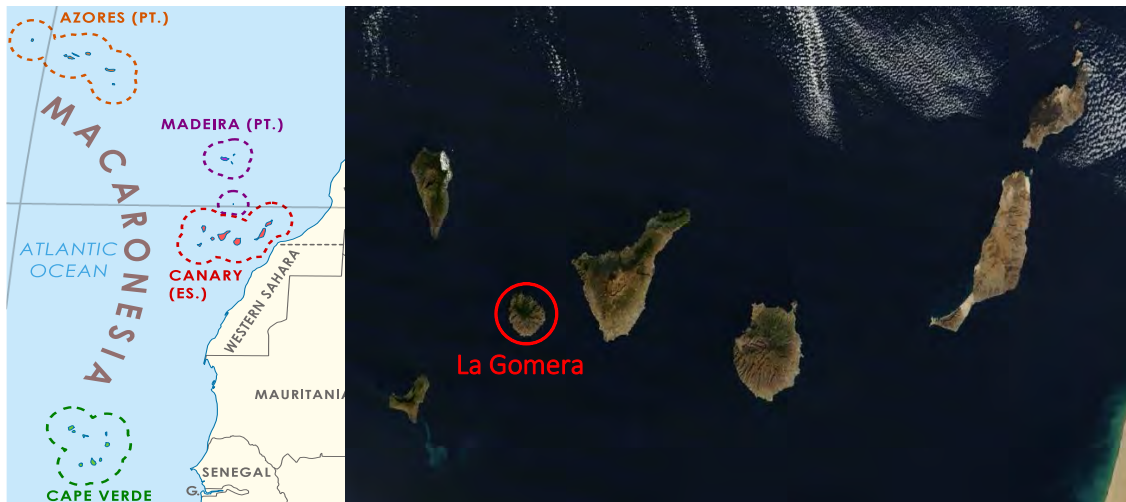


Figura 1: Mapa de Macaronesia (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=33566121#file>)
 Figura 2: Islas canarias y La Gomera (<https://www.flickr.com/photos/gsfsc/6630087415/in/photostream/>)

Estaba ampliamente aceptado que la vid no había formado parte de la flora propia de las Islas Canarias hasta su colonización en el siglo XIV e introducción posterior en el siglo XV. Esta creencia fue cuestionada con el descubrimiento de semillas fosilizadas de *Vitis* (Arco et al., 2000) en excavaciones arqueológicas. No obstante, igual que mucha de la flora de las islas, *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* no aparece en la actualidad y se conoce, además, que la vid de la isla proviene de aquellas variedades cultivadas (es decir, domesticadas) introducidas por los europeos, lo cual se esperaría que se tradujera en una baja diversidad respecto a otras regiones. En la realidad, se observa el fenómeno contrario. Debido a la plaga de filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) que recorrió Europa a finales del siglo XIX, la pérdida de variedades de *Vitis vinifera* L. resultó ser mucho más acentuada en el territorio continental que en las Islas Canarias, que permaneció mayormente sin afección por la plaga. Es por este motivo que las Islas Canarias, incluida La Gomera, son con toda seguridad uno de los últimos reductos de las variedades de vid europeas previas a esta plaga (Hidalgo, 2011), y si a esto se le suman 500 años de propagación asexual de vid en la isla, sea natural o antropogénica, la idoneidad de La Gomera como candidata para el estudio de variedades queda contrastada.



Figura 3: La Gomera, vista de satélite obtenida del programa "World Wind". Dominio Público.

La Gomera (también conocida como la Isla Redonda) es una isla que posee un clima similar a La Palma y el Hierro (climas semiáridos calientes, Bsh Köppen) con precipitaciones incidentes en zonas elevadas (Figura 3) y escasas cerca de la costa (Climate Data, 2021) Esto junto a su orografía implica que, más allá de posibilitar el microclima de humedad del Parque del Garajonai (Bosque de laurisilva que data del periodo Terciario y Patrimonio de la Humanidad), las únicas zonas aptas para cultivo agrícola sean las laderas y barrancos de las montañas, que en un principio no serían nada idóneas para este propósito. Los agricultores tradicionales sortearon este problema con una viticultura heroica basada en la construcción de bancales de piedra seca (Figura 4). Se tratan de construcciones escalonadas de piedra sobre las pendientes sin cemento o mortero que posibilitan la plantación, y los cultivos a su vez al enraizar, fortalecen la construcción y evitan desprendimientos.



Figura 4: Bancal de piedra seca en La Gomera (<http://www.lagomera.es/images/stories/huertos.jpg>)

En lo que respecta a producción vinícola, en la actualidad constituye uno de los cultivos más relevantes del sector agrario de la isla. Dentro de los cultivos permanentes (cítricos, frutales no cítricos, viñedo, olivar...), de las 139,7 hectáreas destinadas al cultivo secano, se destinan 117,9 hectáreas a la uva, de las cuales prácticamente toda la producción se destina a vinos (Instituto Canario de Estadística, 2021).

En términos de cosecha estrictamente vitícola, su producción en 2020 data de 53.576Kg de uva, y más en concreto 38.834Kg uva blanca. Si se examina por variedades, la variedad "Albillo Forastero" se sitúa como la variedad predilecta de esta categoría, con más del 82% del total de la uva blanca de la isla (Consejo Regulador de la Gomera, 2020) y con el 85% de la superficie vitícola de La Gomera ocupada por esta variedad (Pliego de condiciones de la denominación de origen protegida de vinos "La Gomera", 2013). Actualmente se conoce que esta variedad tan importante procede del cruce entre la variedad andaluza Palomino fino (conocida en las Islas Canarias como Listán blanco) y la variedad portuguesa Verdelho branco (conocida en las Islas Canarias como Verdello). Además de este cruce, también se generó otra variedad canaria, local de la Isla de La Palma, conocida como Albillo criollo (Rodríguez-Torres, 2018; Marsal et al., 2019).

Es tal la relevancia de la viticultura que La Gomera posee su propia Denominación de Origen Protegida (DOP) vigente desde 2003, la cual incluye 31 variedades aceptadas bajo esta DOP (Consejo Regulador de la Gomera, 2020). No obstante, si se intentara buscar el término Albillo Forastero, la variedad mencionada anteriormente por su gran relevancia y papel prioritario en el listado anterior, no sería posible encontrarlo. Es más, el Consejo Regulador citado listaría en su lugar el nombre de “Forastera blanca” como la variedad más representativa de los vinos blancos locales. Esta aparente contradicción de fuentes se debe a que los vocablos Albillo forastero y Forastera blanca hacen referencia, en realidad, a la misma variedad. El término Forastera blanca sería el nombre sinónimo de Albillo forastero, termino listado en el *Vitis International Variety Calalogue (VIVC)* (Maul, E., & Röckel, R., 2015). Históricamente, la ampelografía se basaba únicamente en caracteres morfológicos de las hojas y bayas de la vid para clasificar y delimitar variedades, un método abierto a errores de interpretación de carácter subjetivo, tales como el uso de sinónimos para la misma variedad, o de la creación de un homónimo que recoge diferentes especies muy similares. Por ello, en la actualidad se utilizan criterios genéticos para caracterizar e identificar variedades.

Este cambio ha favorecido y promovido la correcta delimitación de variedades, pero aún hay un segundo obstáculo que se ha de considerar: la correcta delimitación histórico-geográfica. En la mayoría de ocasiones, las variedades de mayor interés o más peculiares aparecerán listadas como “variedades autóctonas” de aquella región o territorio. Esta definición aplicada al mundo de la vid no es siempre la más acertada, puesto que en lugar de basarse en la examinación objetiva a través de la documentación histórica y evidencias disponibles, se suele dar lugar a la especulación o al elevamiento del “sentir popular” sobre a fuentes contrastadas. Es por ello que tal y como se sugiere en el 2º Simposio de OENOVITI (2nd OENOVITI International Symposium, 2014), sería más adecuado hablar de “variedades locales”, pues así denotamos únicamente su ubicación actual exclusiva en aquella región o territorio y dejamos la trazabilidad de su procedencia a criterios genéticos, la gran mayoría de las veces difícilmente justificables.

El objetivo de este estudio sería realizar una prospección de la isla con la finalidad de catalogar las variedades actuales (describiendo si es posible nuevas variedades), la diversidad existente en el momento del muestreo, y nuevas mutaciones de variedades conocidas.

El análisis de los individuos seleccionados se realizaría a partir de marcadores moleculares, más exactamente aquellos conocidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) o Microsatélites. Los resultados se contrastarán frente a diferentes bases de datos preexistentes especializadas en variedades de la vid con tal de caracterizar e identificar cada entrada.

4-Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

Dentro de las muestras recolectadas de la isla de La Gomera, se percibirán un número significativo de mutaciones y nuevas variedades previamente no registradas, en línea con las anteriores publicaciones.

Objetivos propuestos:

- Realizar una prospección de la isla de La Gomera en busca de nuevos individuos registrando simultáneamente la diversidad existente, y nuevos clones de variedades conocidas.
- Validar los resultados obtenidos mediante el empleo de programas estadísticos.
- Estudiar una mutación de especial interés.

5-Materiales y métodos

5.1-Material vegetal

Ciento diez sarmientos maduros de *Vitis vinifera* L. fueron recolectados en la isla de La Gomera, siendo catalogados provisionalmente en base a la información de los viticultores. Estos viñedos contienen diferentes variedades cultivadas en una misma parcela a raíz de las costumbres tradicionales de la isla. Por ello, los viñedos son pluricultivares. Una vez recogidas las muestras, se conservaron a -20°C para su transporte y almacenamiento hasta su procesado. Finalmente, se incluyeron como control cuatro cultivares bien caracterizados (Marsal et al., 2011): Chardonnay, Garnacha blanca, Tempranillo tinto y Cabernet sauvignon, ejemplares del viñedo en Constantí de la URV [AOC Tarragona, España; 41°9'16.04" (N) y 1°11'1.28" (E)].

5.2-Genotipado de microsatélites

El ADN se extrajo utilizando el método descrito por Marsal et al. (2011). Las muestras de vid se genotiparon utilizando 20 marcadores SSR, que fueron seleccionados por su capacidad para discriminación y polimorfismo de acuerdo con estudios anteriores: VVS2, VVS3, VVS29 (Thomas y Scott, 1993); VVMD5, VVMD6, VVMD7 (Bowers et al., 1996); VVMD27, VVMD28, VVMD36 (Bowers et al., 1999b); VrZAG21, VrZAG47, VrZAG62, VrZAG64, VrZAG79, VrZAG83 (Sefc y col., 1999); scu06vv (Scott et al., 2000b); VvUCH11, VvUCH12, VvUCH19 (Lefort et al., 2002); VChr19a (Cipriani et al., 2010). Estos 20 SSR no son loci independientes, ya que VrZAG47 y VVMD27 emplean la misma zona de microsatélites con diferentes cebadores (Dalbó et al., 2000). La comunidad científica internacional (This et al., 2004; Maul y Röckel, 2015) utiliza 7 de estos como referencia marcadores genéticos.

Las amplificaciones de Microsatélites se realizaron utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un MyCycler termociclador (BioRad Laboratories, Hercules, California, EE.UU). Se realizó PCR con 50 ng de ADN y 1 µM de cada cebador usando AmpliTaq DNA Kit de polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA). El cebador superior contiene adjunto un tinte fluorescente asociado a un color en el resultado de electrofenograma:

[6-FAM(azul): VVS3, VVMD7, VVMD28, VVMD36, VrZAG47, VrZAG62, VrZAG83, VvUCH11, y VvUCH19; HEX(verde): VVS2, VVS29, VVMD6, VVMD27, VrZAG21, VrZAG79 y VChr19a; NED(negro): VVMD5, VrZAG64, scu06vv, VvUCH12)].

Los SSR se dividieron en cinco grupos según sus diferentes condiciones requeridas de termociclación basadas en su temperatura de *annealing* (50 °C, 52 °C, 56,1 °C, 56,6 °C y 58 °C). El programa empleado fue de 95 °C por 5 min, 40 ciclos (95 °C por 45 seg; T^a por 30 seg; 72 °C durante 1 min 30 s) y 72 °C durante 7 minutos.

Los productos de amplificación se mezclaron con 20 µL de formamida desionizada y 0,25 µL de patrón interno de ADN (GeneScan 500-ROX, Applied Biosystems, Foster City, CA) y desnaturalizaron a 95 °C por 3 min (Marsal et al., 2011; Marsal et al., 2013). Los fragmentos se separaron por electroforesis capilar con un analizador genético ABI PRISM 3730[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA). Peak Scanner Software (Applied Biosystems, Nueva Jersey, USA) para dimensionar los fragmentos amplificados. Cada cultivo se analizó dos veces para evitar posibles errores.

5.3-Análisis de datos

Se utilizó el *software* GenAlEx 6.503 (Peakall y Smouse, 2012) para estimar los cinco parámetros genéticos estadísticos: número de diferentes alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) o Índice de Diversidad y la probabilidad de identidad (PI). Adicionalmente, se calculó la frecuencia estimada de alelos nulos (F) utilizando nuevamente GenAlEx 6.503. Con tal de distinguir homocigotos y heterocigotos para cada locus y poder realizar todos los cálculos anteriores, los alelos se consideraron de expresión codominante para el análisis de datos.

El estudio poblacional y la identificación de individuos puros y mestizos para una población determinada se realizaron utilizando el programa de estudio de modelos *Structure* 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003), que utiliza un método estadístico de agrupamiento bayesiano basado en modelos, en el cual se supone que cierto número de poblaciones (K) son presentes, y cada una de ellas se caracteriza por un conjunto de frecuencias alélicas en cada locus.

Los individuos son asignados a poblaciones (*clusters*), o conjuntamente a múltiples poblaciones si sus genotipos indican que están mezclados. Todos los *loci* se presuponen independientes, y cada población K se presupone que sigue la ley de Hardy-Weinberg de herencia mendeliana (Hardy, G. H., 1908). Las probabilidades subsecuentes se estimaron usando el Método de Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC). Las cadenas se ejecutaron con un “período de quemado” de 100,000, seguido de 1,000,000 de iteraciones que permiten la mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas. *Structure* 2.3.4 se ejecutó con diferentes valores (iteraciones) dependiendo del análisis al establecer K de 1 a n , y la probabilidad promedio [valor, L (K)] se calculó en todas las ejecuciones para cada K. La probabilidad logarítmica media de los datos para cada K fue calculada para determinar el número más adecuado de clústeres, y el valor de K para el cual esta probabilidad fue se seleccionó la más alta. Luego se calculó el ΔK usando el método descrito por Evanno et al. (2005). ΔK es una cantidad basada en la tasa de cambio en la probabilidad logarítmica de los datos entre valores sucesivos de K.

La prueba de asignación ajustada por frecuencia (Paetkau et al., 1995; Paetkau et al., 2004), también disponible en GenAEx 6.5, fue la primera utilizada para mediar la bondad de las accesiones a cada subpoblación generada por *Structure* 2.3.4. Para cada accesión, se calculó un valor logarítmico de verosimilitud, calculado para cada subpoblación utilizando las frecuencias alélicas de las respectivas subpoblaciones. Se asignó un individuo a la subpoblación con el logaritmo de probabilidad más alto valor.

Finalmente, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) en GenAEx 6.5 para examinar en profundidad las relaciones genéticas entre subpoblaciones basadas en los mismos datos SSR. PCoA se basó en la covarianza estandarizada de la genética distancias calculadas para marcadores co-dominantes.

6-Resultados y discusión

Las 110 muestras obtenidas a partir de la prospección de toda la isla fueron genotipadas con los 20 SSR mencionados anteriormente y comparadas con entradas registradas en la base de datos TECNENOL (Marsal et al., 2016; Marsal et al., 2017 Marsal et al., 2019; Fort, F., 2022). Los perfiles moleculares de Microsatélites no coincidentes se cotejaron también, con los perfiles en la base de datos del VIVC.

6.1-Polimorfismo de Microsatélites

Empleando GenAEx 6.503, se normalizaron las 110 muestras iniciales con tal de descartar aquellos perfiles genéticos idénticos. Tras este paso, el resultado obtenido fueron algunos perfiles moleculares SSR únicos.

Se obtuvieron también los parámetros estadísticos de estos perfiles moleculares SSR

6.2-Análisis de cultivares

De los perfiles moleculares SSR analizados, podemos cuantificar el grado de mutación de un perfil determinado frente a su perfil canónico basándonos en el total de 40 alelos (el doble de Microsatélites). Cada mutación en un alelo representa $1/40$, es decir, un 2,5% del total.

De esta forma, 1 mutación equivaldrá a un 97,5% de similitud, 2 mutaciones a un 95%, 3 mutaciones a un 92,5%... y así sucesivamente. Una cifra de interés es 87,5% de similitud, pues valores de similitud inferiores a este valor son considerados como evidencia de que el perfil corresponde a una nueva variedad (Cabezas y col. 2011).

6.3-Análisis poblacional de La Gomera

Se realizó una 2ª normalización de datos para retirar los perfiles moleculares SSR que fueran mutaciones del perfil canónico, obteniendo varios perfiles moleculares SSR independientes y únicos de referencia. Este paso es de especial importancia para el estudio poblacional, ya que en caso de no realizarse desplazaría los resultados poblacionales en función de variedades con más mutaciones. Se empleó el programa *Structure* 2.3.4 de 1-7K manteniendo los mismos valores indicados de “periodo de quema” e iteraciones para los perfiles moleculares SSR, del cual, K=3 resultó ser el más significativo (Anexo 6) y que no se observa al haberse retirado la figura.

Se realizó posteriormente un análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles moleculares SSR (Figura 6). Estos gráficos reflejan la distancia genética entre las poblaciones obtenidas mediante una transformación vectorial de 40 dimensiones (40 ejes hipotéticos ligados a cada uno de los 40 posibles alelos de cada perfil molecular SSR) a 2 dimensiones que combinan todos los valores de los SSR. Cada eje reúne un porcentaje de variación entre 0 y 100%, y su suma no ha de ser necesariamente 100%.

6.4-Estructura poblacional de La Gomera a escala mundial

Con el fin de ampliar la información presentada, se realizó un *Structure* 2.3.4 de 1-9K con muestras mundiales de la base de datos TECNENOL y en las que se incluyeron las muestras desconocidas del estudio y la mutación especial con tal de poder validar si estas eran o no variedades locales de La Gomera (perfiles moleculares SSR) en total. Los valores más significativos de K obtenidos resultaron ser K=2 y K=6 (Anexo 8).

En la simulación de K=2 se obtuvieron 2 poblaciones diferenciadas, POP1 y POP2 (Anexo 9). Todos los perfiles moleculares SSR mestizos se retiraron dejando perfiles moleculares puros. A partir de POP1, se realizó un test de asignación, obteniendo un 93% de buena asignación. Se procedió con un análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles moleculares SSR. En el gráfico se observa la separación de las poblaciones.

Al representar el gráfico por individuos y no por poblaciones, se obtiene que muchos de estos perfiles comparten proximidad con perfiles de poblaciones diferentes. Es por esto que la bondad de ambas coordenadas baja sustancialmente pero continúan considerándose valores óptimos si sopesamos que publicaciones de gran prestigio con mayor cantidad de puntos obtienen menos de 2% en cada eje y no pierden ninguna validez por ello (Dong et al., 2023). Por el motivo anterior, hay una redistribución de las poblaciones respecto a la gráfica anterior, pero si se examina minuciosamente se aprecian las mismas tendencias.

En la simulación de $K=6$ se obtuvieron 6 poblaciones diferenciadas.

POP1, POP2, POP3, POP4, POP5 y POP6.

Todos los perfiles moleculares SSR mestizos se retiraron dejando perfiles puros. Se realizó un test de asignación con el total de poblaciones,. Se procedió con un análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles moleculares SSR. En el gráfico se aprecia la distribución de las poblaciones.

En la representación por individuos a nivel mundial ($K=6$), quedan nuevamente diferenciadas las poblaciones.

A fin de ratificar la información presentada, se optó por repetir los pasos anteriores introduciendo un componente geográfico de origen de acuerdo con el VIVC, agrupando los perfiles de la siguiente forma: EASTMED-CAU (Algeria, Chipre, Georgia, Israel, Lévano, Túnez, Turquía), BP (Bosnia y Herzegovina, Bulgaria, Croacia, Serbia, Eslovenia y Montenegro), ITA (Italia), FRA-CEU (Austria, Francia, Alemania y Suiza), IP (España y Portugal), IC (Islas Canarias), LZ (Lanzarote), GO (La Gomera). Se retiraron aquellos que no fueron asignados correctamente respecto a la población descrita en el VIVC al considerarse mestizos. De esta normalización se obtuvieron perfiles. Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) de los perfiles anteriores.

6.5-Discusión

La gran conclusión a la que se puede llegar observando las tendencias que se nos muestran en estas representaciones, es que siempre hay una gran separación entre las variedades españolas respecto a las variedades francesas y centroeuropeas. Las poblaciones de vides como las italianas quedan más o menos repartidas en diferentes grupos en función de si su origen es septentrional o meridional. Lo mismo pasa con las variedades portuguesas, habitualmente agrupadas o bien con las españolas o bien con el grupo de Francia-Centro Europa como resultado de los cientos de años de existencia del Camino de Santiago. El trasvase bidireccional de madera permanece en los perfiles genéticos de gran parte de variedades del noroeste de Península Ibérica. La población balcánica, incluyendo una gran parte de variedades griegas (excepto los moscateles) y la población del este del Mediterráneo, a menudo se posiciona a media distancia entre las dos grandes agrupaciones anteriores, evidenciando de esta manera, la gran expansión de pueblos de tradición navegante y culturas mucho más desarrolladas (griegos, fenicios...) hacia el Mediterráneo Occidental. Estas tendencias se correlacionarían curiosamente con la nueva teoría de origen dual de la vid (Dong et al., 2023), según la cual, parte del orden secuencial de cultivo y dispersión de *Vitis vinifera* L. seguiría el orden cronológico (acortado) de Península Balcánica y Europa del Este, Península Ibérica y Europa Oeste, orden que coincide con las tendencias encontradas en el estudio y afianzan aún más la confianza en estos.

7-Conclusiones

Los varietales de la isla de La Gomera han seguido la tónica prevista para los varietales insulares canarios, cumpliéndose todos los objetivos propuestos al inicio de este estudio.

8-Bibliografía

2nd OENOVITI International Symposium, 2014 [consulta en Abril 2023] <https://www.calameo.com/books/003503752f575f124dc11>

Arco M.C., Arco MM, González C, Rosario MC, Atiénzar E and Arco M.J., 2000. El Menceyato de Icod en el poblamiento de Tenerife: D. Gaspar; Las Palomas y Los Guanches. Sobre el poblamiento y las estrategias de alimentación vegetal entre los Guanches. *Eres* 9:67–129.

Bowers, J.E., Dangl, G.S., & Meredith, C.P. (1999b). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 243-246.

Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R., & Meredith, C.P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39, 628-633. <https://doi.org/10.1139/g96-080>

Cabezas, A., Ibañez, J., Lijavetzky, D., Vélez, 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 Biology*, 11, 153. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-153>

Cipriani, G., Spadotto, A., Jurman, I., Di Gaspero, G., Crespan, M., Meneghetti, S., Frare, E., Vignani, R., Cresti, M., Morgante, M., Pezzotti, M., Pe, E., Policriti, A., & Testolin, R. (2010). The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origins. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 1569-1585. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1411-9>

Climate Data, 2021 [consulta en Abril 2023] <https://es.climate-data.org/europe/espana/la-gomera-10273/>).

Consejo Regulador de la Gomera, 2020 [consulta en Abril 2023]
<https://vinoslagomera.com/vendimias/> y <https://vinoslagomera.com/viticultura/>

Dalbó, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Steinkellner, H., Sefc, K.M., & Reisch, B.I. (2000). A gene controlling sex in grapevines is placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome*, 43, 333-340.

Dong, Y., Duan, S., Xia, Q., Liang, Z., Dong, X., Margaryan, K., Musayev, M., Goryslavets, S., Zdunić, G., Bert, P.-F., Lacombe, T., Maul, E., Nick, P., Bitskinashvili, K., Bisztray, G. D., Drori, E., De Lorenzis, G., Cunha, J., Popescu, C. F., ... Chen, W. (2023). Dual domestications and origin of traits in grapevine evolution. In *Science* (Vol. 379, Issue 6635, pp. 892–901). American Association for the Advancement of Science (AAAS).
<https://doi.org/10.1126/science.add8655>

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.
<https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>

Fort, F., Marsal, G., Mateo-Sanz, J. M., Pena, V., Canals, J. M., & Zamora, F. (2022). Molecular characterisation of the current cultivars of *Vitis vinifera* L. in Lanzarote (Canary Islands, Spain) reveals nine individuals which correspond to eight new varieties and two new sports. In *OENO One* (Vol. 56, Issue 3, pp. 281–295). Université de Bordeaux.
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.3.5519>

Hardy, G. H. (1908). Mendelian Proportions in a Mixed Population. In *Science* (Vol. 28, Issue 706, pp. 49–50). American Association for the Advancement of Science (AAAS). <https://doi.org/10.1126/science.28.706.49>

Hidalgo, L., Hidalgo, J. *Tratado de enología*, 4edn. Mundi-Presa, Madrid, España. 2011 ISBN: 9788484767527

INE, 2021 [consulta en Abril 2023] <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=2910>

Instituto Canario de Estadística, 2021 [consulta en Abril 2023] https://www3.gobiernodecanarias.org/istac/statistical-visualizer/visualizer/data.html?resourceType=dataset&agencyId=ISTAC&resourceId=E01135A_000004&version=1.0#

Lefort, F., Kyvelos, C., Zervou, M., Edwards, K., & Roubelakis-Angelakis, K. (2002). Characterization of new microsatellite loci from *Vitis vinifera* and their conservation in some *Vitis* species and hybrids. *Molecular Ecology Resources*, 2, 20-21. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00130.x>

Marsal, G., Baiges, I., Canals, J.M., Zamora, F., & Fort, F. (2011). A fast, efficient method for extracting DNA from leaves, stems, and seeds of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 376-381. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10082>

Marsal, G., Boronat, N., Canals, J.M., Zamora, F., & Fort, F. (2013). Comparison of the efficiency of some of the most usual DNA extraction methods for woody plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. *J Int Sci Vigne Vin*, 47, 227–237. <https://doi.org/10.20870/oenone.2013.47.4.1559>

Marsal, G., Bota., J, Martorell., A, Canals, J.M., Zamora, F., & Fort, F. (2017). Local cultivars of *Vitis vinifera* L. in Spanish Islands: Balearic Archipelago. *Scientia Horticulturae* 226, 122-132. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.021>

Marsal, G., Mateo, J.M., Canals, J.M., Zamora, F., & Fort, F. (2016). SSR analysis of 338 accessions planted in Penedes (Spain) reveals 28 unreported molecular profiles of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67, 466-470. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16013>

Marsal, G., Mendez, J.J., Mateo-Sanz, J.M., Ferrer, S., Canals, J.M., Zamora, F., & Fort F. (2019). Molecular characterization of *Vitis vinifera* L. local cultivars from volcanic areas (the Canary Islands and Madeira) using SSR markers. *Oeno One*, 4, 667-680. <https://doi.org/10.20870/oenone.2019.53.4.2404>

Maul, E., & Röckel, R. (2015). *Vitis International Variety Catalogue (VIVC): A cultivar database referenced by genetic profiles and morphology*. In J.-M. Aurand (Ed.), *BIO Web of Conferences* (Vol. 5, p. 01009). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20150501009>

NASS, 2021 [consulta en Abril 2023] <https://quickstats.nass.usda.gov/results/9E7FD873-AD79-3190-8C62-0B7B559A0F68>

Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am Nat.*, 106, 283–291

Our world in data, 2020 [consulta en Abril 2023] <https://ourworldindata.org/grapher/wine-production>

Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4, 347-354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1995.tb00227.x>

Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., & Estoup, A. (2004). Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 13, 55-65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2004.02008.x>

Peakall, R., & Smouse, P.E. (2012). GenAEx 6.5: genetic análisis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

Pliego de condiciones de la denominación de origen protegida de vinos "La Gomera", 2013 [consulta en Abril 2023] [https://vinoslagomera.com/wp-content/uploads/2013/03/Pliego de condiciones DOP de vinos La Gomera.pdf](https://vinoslagomera.com/wp-content/uploads/2013/03/Pliego_de_condiciones_DOP_de_vinos_La_Gomera.pdf)

Pritchard, J.K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>

Rodriguez-Torres, I. (2018). Variedades de vid cultivadas en Canarias. Descriptores Morfológicos. Caracterización morfológica, molecular, agronómica y enológica. Ed. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Gobierno de Canarias. Santa Cruz de Tenerife. ISBN 9788469754184

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rosseto, M., Abblet, E.M., Lee, L.S., & Henry, R.J. (2000b). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 723-726. <https://doi.org/10.1007/s001220051344>

Sefc, K.M., Regner, F., Turetschek, E., Glössl, J., & Steinkellner, H. (1999). Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*, 42, 367-373. <https://doi.org/10.1139/g98-168>

This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangl, G.S., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibañez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, R., Meredith, C.P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., & Maul, E. (2004). Development of a standard set of microsatellite reference alleles for the identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1448-1458. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1760-3>

Thomas, M.R., & Scott, N.S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequencetagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* 86, 985-990. <https://doi.org/10.1007/BF00211051>

Wolkovich, E.M., García de Cortázar-Atauri, I., Morales-Castilla, I. et al. From Pinot to Xinomavro in the world's future wine-growing regions. *Nature Clim Change* 8, 29–37 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41558-017-0016-6>

9-Autoevaluación

La realización de este trabajo y su redacción en este manuscrito han representado una experiencia de aprendizaje muy agradable pero exigente.

Las prácticas realizadas a las que están ligadas el trabajo, representaron mi primer acercamiento al mundo de la investigación y el laboral, de las que salí habiendo aplicado los conocimientos de 4 años de carrera, habiendo entablado relaciones significativas con mis compañeros de laboratorio y habiendo participado activamente en la aportación de ideas y sugerencias que fueron bien recibidas. Estas fueron una experiencia gratamente positiva.

Estos sentimientos y experiencias resultaron aún más importantes al final debido al contexto global no tan positivo (e independiente del lugar de trabajo) en que se realizaron: extenuación, hastío, sacrificio... no su idealización romántica de “adorno” y que menciona para ensalzar una historia como un edulcorante, hablo de mi experiencia personal, única y subjetiva, dejando de lado las prácticas externas y el TFG. Este año ha sido complicado, igual que el anterior, y el que lo precedía, y que el primero, no desde el punto puramente académico si no el global.

Lo importante de este punto para mí no es añadir sinónimos para explicar esta idea complicada y abstracta para “ganar puntos” y que parezca bonito, si así fuera lo redactaría de forma ortodoxa y diferente pues me sobra material de referencia del repositorio para ello. Este apartado está redactado así porque es un fragmento de texto personal para poder recordar no exclusivamente el TFG o las Prácticas externas, quiero poder leer este trabajo y recordar todo aquello que me ha condicionado y definido hasta este punto más allá de la tinta y del papel. Mis expectativas, mis lecciones, mis vigiliadas, mis amistades... Creo que con suficientes líneas de texto seré capaz de recordar como me siento en este instante (a punto de acabar el TFG y la carrera) y tal vez transmitir de forma eludida mi sentir a otras personas.

Este trabajo y este curso han sido una prueba continua e ininterrumpida de resistencia y perseverancia, de la cual he aprendido y dejado por escrito todo lo humanamente posible y que deseo no olvidar nunca, y por mi bien espero que no lo haga.

Anexos:

Anexo 1: Resultados en muestras iniciales.

Información conclusiva de la variedad ^a: Contiene información sobre su nombre oficial, origen y color de acuerdo con Vitis International Variety Catalogue (VIVC)

Código de país ^b: ESP (España), ESP-CAN (Islas Canarias), ESP-GO (La Gomera), EST-MED (Mediterráneo Este), FRA (Francia), GRC (Grecia), PRT (Portugal), USA (EEUU)

Color ^c: T: Tinta; Rs: Rosada; B:Blanca

% Similitud al genoma más próximo ^e: IDENTITY (100%); MUTATION-97,5% (1 alelo diferente/40 alelos); MUTATION-95% (2 alelos diferente/40 alelos); MUTATION-92,5% (3 alelos diferente/40 alelos); MUTATION-90% (4 alelos diferente/40 alelos); MUTATION-87,5% (5 alelos diferente/40 alelos).
NEW VARIETY (Similitud <87,5% o alelos diferentes ≥6/40 alelos)

CodeORI: Código asignado en La Gomera

CodeLAB: Código asignado en el laboratorio

Nombre principal: Nombre principal de acuerdo con VIVC

Nombre principal (resaltado): Variedad local de las Islas Canarias

Nombre principal (resaltado): Variedad propuesta como local para La Gomera

Nombre principal (resaltado): Mutación de porte propuesta como local para La Gomera

Nombre de entrada: Nombre principal en VIVC

Nombre de entrada (resaltado): Sinónimo registrado en VIVC

Nombre de entrada (resaltado): Nombres de entrada propuestos como nuevos sinónimos.

Nombre de entrada: Nombre de entrada preexistente en otras variedades, propuesto como sinónimo para otra variedad.

Nombre de entrada: Nombre de entrada detectado como erróneo.

Nombre de entrada: Variedad desconocida. Sin nombre de entrada.

Nombre de entrada (resaltado): nombres de entrada propuestos como nombres para variedades locales.

Nombre de entrada (resaltado): nombres de entrada propuestos como nombres para mutaciones de porte locales de La Gomera.

MUTACIÓN

TRIALELO

CUATRIALELO

Anexo 2: Microsatélites empleados y características

Anexo 3: Resultado de análisis de muestras redundantes.

Anexo 4: Resultado de análisis de muestras redundantes.

Anexo 5: Resultados en muestras independientes.

Información conclusiva de la variedad ^a: Contiene información sobre su nombre oficial, origen y color de acuerdo con Vitis International Variety Catalogue (VIVC)

Código de país ^b: ESP (España), ESP-CAN (Islas Canarias), ESP-GO (La Gomera), EST-MED (Mediterráneo Este), FRA (Francia), GRC (Grecia), PRT (Portugal), USA (EEUU)

Color ^c: T: Tinta; Rs: Rosada; B:Blanca

% Similitud al genoma más próximo ^e: IDENTITY (100%); MUTATION-97,5% (1 alelo diferente/40 alelos); MUTATION-95% (2 alelos diferente/40 alelos); MUTATION-92,5% (3 alelos diferente/40 alelos); MUTATION-90% (4 alelos diferente/40 alelos); MUTATION-87,5% (5 alelos diferente/40 alelos).
NEW VARIETY (Similitud <87,5% o alelos diferentes ≥6/40 alelos)

CodeORI: Código asignado en La Gomera

CodeLAB: Código asignado en el laboratorio

Nombre principal: Nombre principal de acuerdo con VIVC

Nombre principal (resaltado): Variedad local de las Islas Canarias

Nombre principal (resaltado): Variedad propuesta como local para La Gomera

Nombre principal (resaltado): Mutación de porte propuesta como local para La Gomera

Nombre de entrada: Nombre principal en VIVC

Nombre de entrada (resaltado): Sinónimo registrado en VIVC

Nombre de entrada (resaltado): Nombres de entrada propuestos como nuevos sinónimos.

Nombre de entrada: Nombre de entrada preexistente en otras variedades, propuesto como sinónimo para otra variedad.

Nombre de entrada: Nombre de entrada detectado como erróneo.

Nombre de entrada: Variedad desconocida. Sin nombre de entrada.

Nombre de entrada (resaltado): nombres de entrada propuestos como nombres para variedades locales.

Nombre de entrada (resaltado): nombres de entrada propuestos como nombres para mutaciones de porte locales de La Gomera.

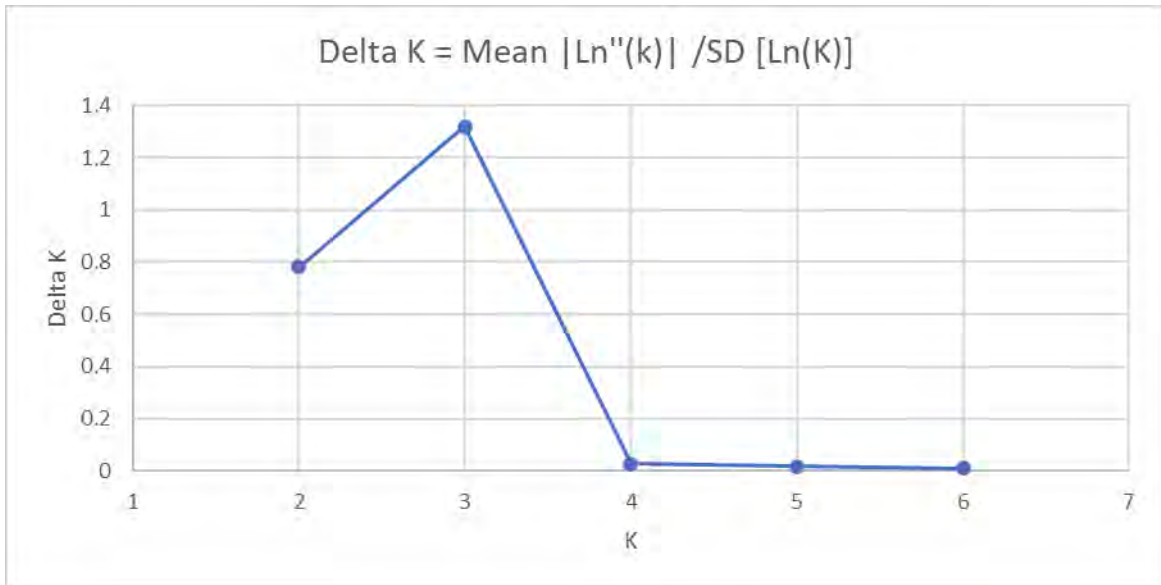
MUTACIÓN

TRIALELO

CUATRIALELO

Anexo 6: Gráficos de K para diversas entradas

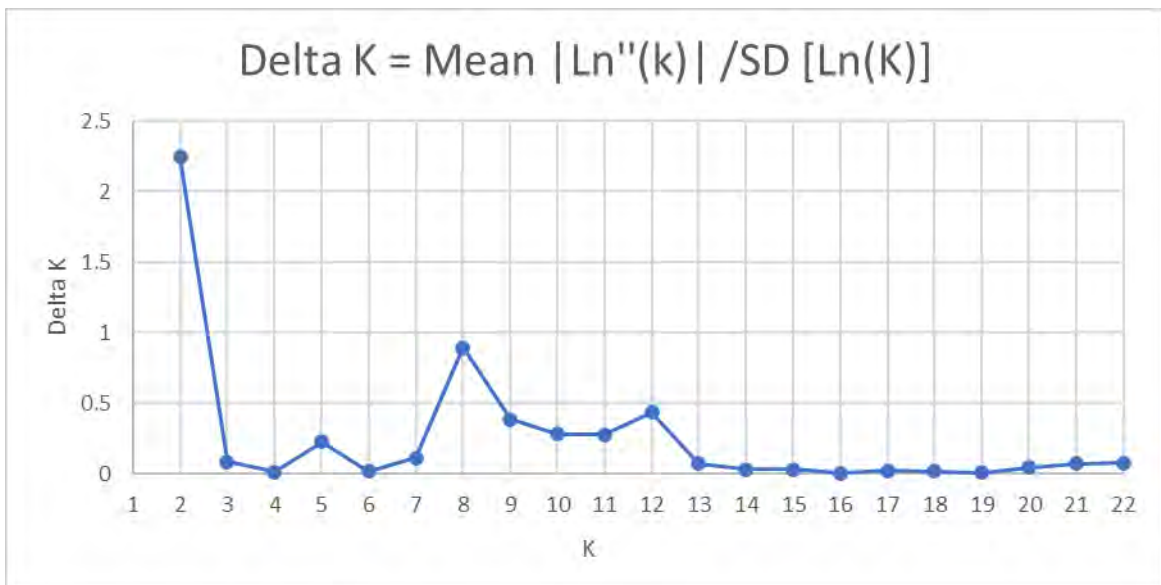
Gráfico K 1-7 (algunos perfiles moleculares SSR únicos sin mutaciones):



Delta K: Valor calculado para cuantificar la idoneidad de cada valor de K.

K: Número de poblaciones supuesto dentro del conjunto de muestras

Gráfico K 1-23 (otros perfiles moleculares SSR únicos incluyendo mutaciones):



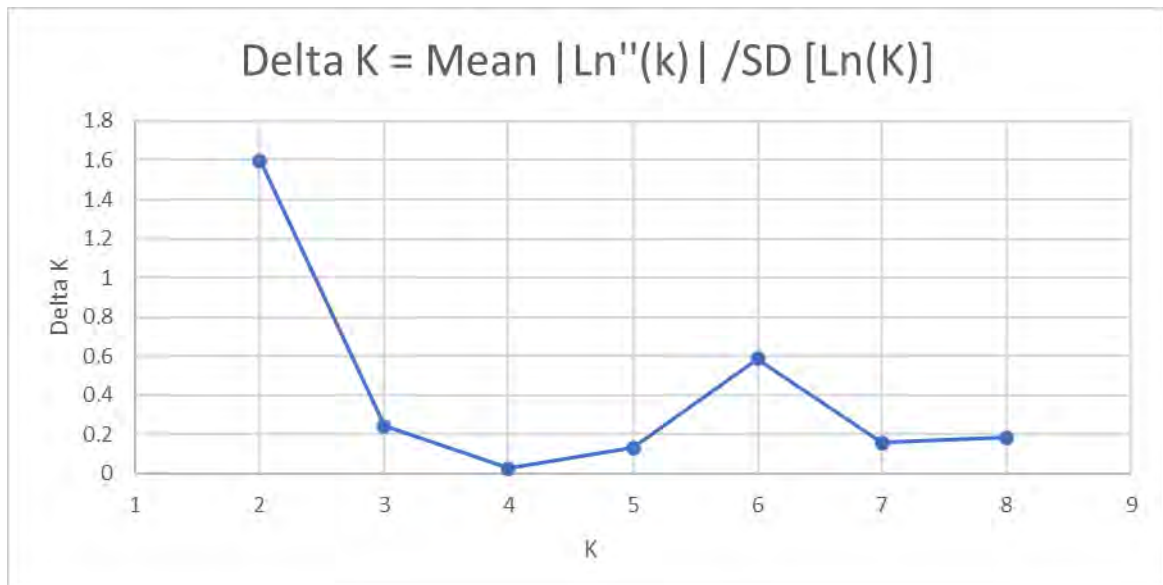
Delta K: Valor calculado para cuantificar la idoneidad de cada valor de K.

K: Número de poblaciones supuesto dentro del conjunto de muestras

Anexo 7: Simulación K=12 de perfiles moleculares SSR

Anexo 8: Gráfico de K para muchas entradas

Gráfico K 1-9 (muchos perfiles moleculares SSR únicos con mutaciones):



Delta K: Valor calculado para cuantificar la idoneidad de cada valor de K.

K: Número de poblaciones supuesto dentro del conjunto de muestras

Anexo 9: Tabla de muchos perfiles poblacional (2K)

AUT=Austria, BGR=Bulgaria, BIH=Bosnia y Herzegovina, CHE=Suiza, CYP=Chipre, DEU=Alemania, DZA=Algeria, ESP=España, ESP-CAN=Islas Canarias, ESP-GO=La Gomera, ESP-LZ=Lanzarote, FRA=Francia, GEO=Georgia, GRE=Grecia, HRV=Croacia, HUN= Hungría, ISR=Israel, ITA=Italia, LBN=Líbano, MNT=Montenegro, PRT=Portugal, SRB=Serbia, SVN=Eslovenia, TUN=Túnez, TUR=Turquía.

Anexo 10: Tabla de muchos perfiles poblacional (6K)

Anexo 11: Perfiles moleculares SSR de poblaciones (6K)