

V06 - TECNENOL (Grupo de Investigación en Tecnología Enológica): BASE DE DATOS DE SSR O MICROSTÉLITES DE *Vitis* (Universidad Rovira i Virgili (URV))

G. Marsal, N. Boronat, J. Sabaté, L. Gómez, JM. Canals, F. Zamora, F.Fort

Universidad Rovira i Virgili, Departamento de Bioquímica i Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Campus Sescelades, C/ Marcel·lí Domingo nº1, 43007 Tarragona, España.
mariafrancesca.fort@urv.cat

RESUMEN:

La creación de colecciones de plantas "in vivo" es una de las estrategias más extendidas para la preservación de los recursos fitogenéticos "ex situ", ya que permite además de la caracterización molecular, fenotípica y agronómica, el seguimiento evolutivo de los individuos en cuestión. Actualmente se han desarrollado diversas colecciones o germoplasmas de *Vitis* en todo el mundo que han generado una gran cantidad de datos. La utilización eficiente de esta información se canaliza en la creación de Bases de Datos ampelográficas y/o de SSR o Microsatélites (técnica molecular más ampliamente utilizada) de uso habitual para científicos, expertos del sector y público interesado. El Grupo de Investigación en Tecnología Enológica (TECNENOL) está desarrollando una Base de Datos de SSR para *Vitis*, propia que en breve (2016) se presentará para su utilización universal.

Palabras clave: Base de Datos, *Vitis vinifera*, SSR o Microsatélites, variedades, identificación

1. Introducción

La biodiversidad de *Vitis vinifera* L. se estima en unas 5000 variedades (This y col. 2006). Esta sería una de las estimaciones más fiables realizada a partir de datos procedentes del estudio directo del genoma, es decir, de la utilización de Marcadores Moleculares. La actual erosión genética de esta especie tiene diferentes orígenes, pero el denominador común de todos ellos, es el intento desmesurado por parte del hombre, de controlar la naturaleza y sacar el máximo provecho de ella. Esta actitud le ha conducido inexorablemente a alterar el equilibrio natural del ecosistema en este caso, vitícola (introducción de especies invasoras, como la filoxera; cambio en el encepamiento, como la introducción de variedades francesas....), y este cambio, ha causado la acusada pérdida de diversidad de la vid (Schneider and Raimondi, 2014). Ante esta problemática y en estos últimos tiempos, se ha reaccionado favoreciendo la recuperación de variedades locales o minoritarias. Pero además, esta estrategia pasa por la caracterización y conservación de las mismas en colecciones de plantas ("in vivo"). Tanto a nivel europeo como español, podemos hablar de diversas colecciones de vides (Figura 1). Las colecciones ampelográficas son la solución más extendida mundialmente, ya que permiten estudiar al individuo, a nivel molecular (genoma), ampelográfico, caracterizarlo agronómicamente, ver su adaptación y su evolución..., pero no debemos olvidar otras estrategias que aunque menos usadas, también tienen

su importancia, como puede ser la crioconservación o la conservación “in vitro” (Schneider and Raimondi, 2014).

RELACIÓN DE BANCOS DE GERMOPLASMA EUROPEOS DE VID		RELACIÓN DE BANCOS DE GERMOPLAMA ESPAÑOLES DE VID			
Instituto	Número de accesiones	Comunidad Autónoma	Centro	Nº de acces.	Año de fundación
INRA-ENSA Montpellier, France	7230	Comunidad de Madrid	IMA Alcalá de Henares	3207	1896
IMIA El Encin. España	3207	Andalucía	EVEX Jerez de la Frontera	1579	1940
ISV, Conegliano. Italia	2800	Castilla-La Mancha	CEV Tomelloso	639	1987
I.R. Geilweilerhof. Alemania	2559	Aragón	CTA Movera	381	1990
I. V. Pleven. Bulgaria.	1600	La Rioja	CEA Agoncillo	197	1982
EVEX Rancho de la Merced. España	1579	Galicia	EVE Leiro	166	1988
I A di San Michele all'Adige. Italia.	1250	Castilla y León	SIA Valladolid	162	1990
DSZBKI, Pecs, Hongrie.	1123	Murcia	ODA La Alberca	110	1988
VI of Athens. Lycovrissi. Grèce.	820	Comunidad Valenciana	EVE Requena	84	1983
EVN. Dois Portos. Portugal.	633	Extremadura	SET Guadajira	60	1988
HBLA u BA Klosterneuburg. Austriche	340				

Figura 1: Relación de colecciones “in vivo” de vides europeas y españolas (Félix Cabello Sáenz de Santamaría: Recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Santander.(2008))

Para optimizar y canalizar toda la información generada a partir del uso de estas estrategias de conservación, se han creado diferentes Bases de Datos, de las cuales la más importante es el VIVC (Vitis International Variety Catalogue) (Maül, 2015). Se trata de una Base de Datos que en sus inicios era ampelográfica (con más de 19.000 accesiones) y que, hace unos pocos años se ha incorporado en paralelo una Base de Datos Molecular (que actualmente está en construcción y que pretende incorporar más de 1500 perfiles genómicos basados en la técnica de los SSR (Simple Sequence Repeats) o Microsatélites). En esta Base de Datos participan 130 instituciones de 45 países. A parte de ella, existen actualmente otras Bases de Datos menores (Ampelográficas y/o de SSR), que visualizan información sobre variedades locales, por lo tanto, más específicas de una zona en concreto (Figura 2).

The image shows the homepage of the Vitis International Variety Catalogue (VIVC). It features a navigation menu on the left with options like 'HOME', 'About VIVC', 'Database search', 'Important links', 'Contact', and 'Disclaimer'. The main content area includes a central banner for 'Genetic fingerprints' with a red background, stating that more than 1,300 varieties were validated. Below this, there is a section for 'Important Links' listing various international databases such as the Castilla-La Mancha Vitis Database, Croatian Vitis Database, Czech Republic Vitis Database, European Vitis Database, French Plant Grape Database, French Vitis Database, Greek Vitis Database, Italian Vitis Database, Italian Vitis National Register, Portuguese Vitis Database, Slovenian Vitis Database, Spain: Uva de mesa Vitis Database, Spanish Vitis Database, Vitis Vea, US National Grape Registry, Grape Microsatellite Collection - FEM, Swiss National Database, Swiss Vitis Microsatellite Database, Deutsche Genbank Reben, and COST Action FA1003. The right sidebar contains a 'HOME' section with 'About VIVC', 'Database search', and 'Important links'.

Figura 2: Página principal de la Base de Datos VIVC. Relación de otras Bases de Datos mundiales (“Important Links” (VIVC)).

Nuestro objetivo es generar una Base de Datos de perfiles genómicos obtenidos mediante la técnica más utilizada actualmente para caracterizar el género *Vitis*, se trata de los SSR o Microsatélites. Esta Base de Datos estaría especializada en variedades procedentes de las Islas Baleares, de las Islas Canarias, de Cataluña y de Italia.

2. Material y métodos

Se han analizado 1022 accesiones del género *Vitis* (variedades de vinífera, variedades e híbridos de especies americanas (patrones de vid e Híbridos Productores Directos) y variedades asiáticas) procedentes de 24 países. Se recogieron hojas o sarmientos y se almacenaron inmediatamente a -20°C. Se extrajo el ADN de acuerdo con uno de los dos métodos propios del Grupo de Investigación TECNENOL (Marsal y col. 2011 y 2013). Estos individuos se genotiparon con 20 marcadores SSR o Microsatélites. Las amplificaciones de microsatélites se realizaron por medio del análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de amplificación se separaron por electroforesis capilar mediante un secuenciador ABI PRISM 3730® Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los fragmentos amplificados fueron medidos mediante Pick Scanner software (Applied Biosystems, Nueva Jersey, EEUU). Cada cultivar se analizó dos veces para evitar posibles errores.

3. Resultados

A partir de más de un millar de entradas o accesiones pertenecientes tanto a vides europeas, americanas y asiáticas procedentes de 24 países (Figura 3), se han generado unos 700 perfiles genómicos.

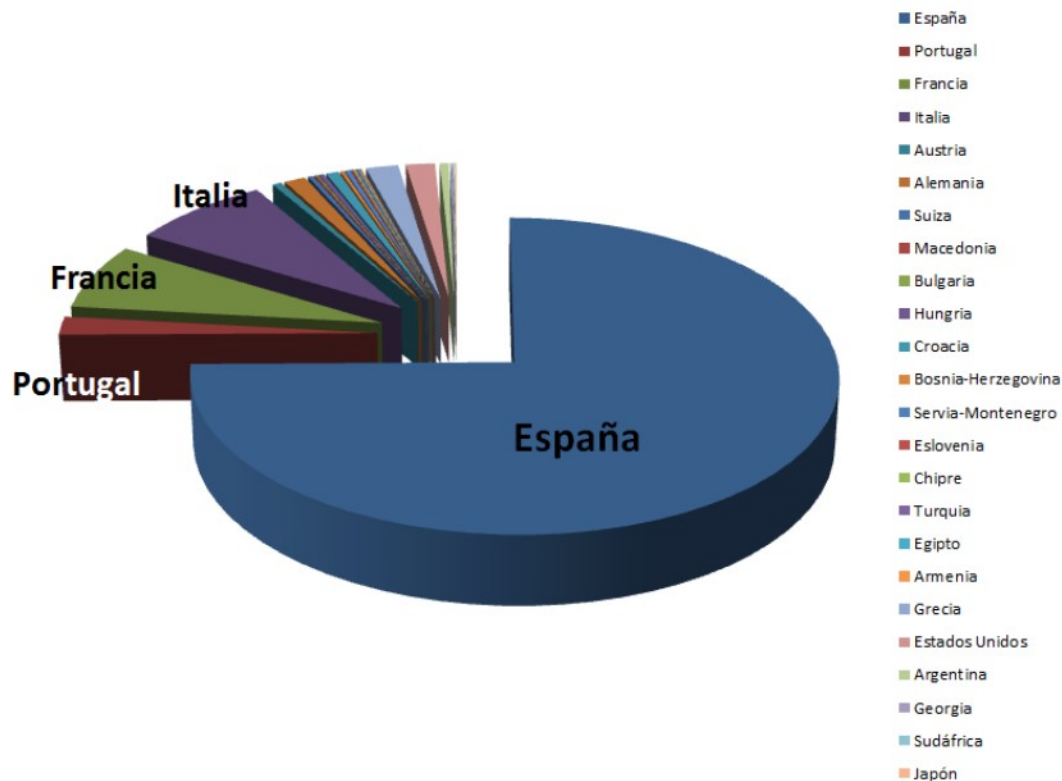


Figura 3: Accesiones agrupadas por países de la Base de Datos de TECNENOL (URV).

La principal contribución a esta Base de Datos corresponde a España con un 75% aproximadamente de las accesiones, seguida de Italia con casi un 8% de las entradas. Por Comunidades Autónomas (CCAA), serían las Islas Canarias las que han aportado más entradas (un 56% aproximadamente), seguida de Cataluña (con 22% aproximadamente), y de las Islas Baleares (con un 15%). El 7% restante procede del resto de CCAA (Figura 4).

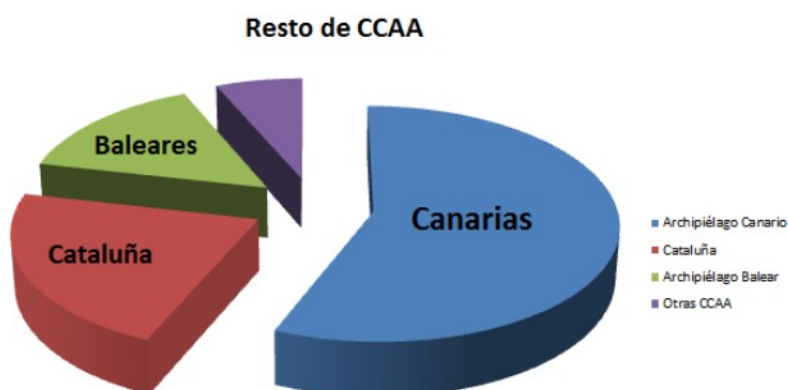


Figura 4: entradas agrupadas por CCAA españolas de la Base de Datos de TECNENOL (URV).

Esta Base de Datos se presentará a la comunidad científica y al sector vitivinícola el próximo año 2016. Además se confeccionará una página web adaptada a las necesidades de consulta de sus perfiles genómicos y que contendrá información adicional de interés general, esta se estrenará el mismo día de la presentación de la Base de Datos.

5. Bibliografía

1. 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. *Am. J. Enol. Vitic.*, 62, 376-381 (2011)
2. 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
3. Maül, E., Töpfer, R., Eibach, R. (2015). VIVC: *Vitis* International Variety Catalogue. <http://www.vivc.de/>
4. Schneider, A. and Raimondi S. (2014). Preservation and characterization of *Vitis vinifera* cultivated germplasm. In: Exploitation of autochthonous and more common vine varieties. Genetic pedigree and phenotyping, tolerance and stress, diseases to control, rootstocks. 2nd International Symposium: OENOVITI INTERNATIONAL network, 3 - 5 November 2014 – Geisenheim (DEU)
5. This, P., Lacombe, T., Thomas MR. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics* 22 (9), 511-519

6. Agradecimientos

Esta Base de Datos ha contado con financiación procedente de Bodegas Sumarroca S.L. (proyecto CDTI) y los Cabildos de Lanzarote y La Gomera (aportaciones procedentes de la UE y propias). Nuestro más sincero agradecimiento a los Consejos Reguladores de los Vinos de Lanzarote, de La Gomera, a Bodegas Viñátigo, al Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera” (IRFAP) de Mallorca, Vinyes Binitord de Menorca S.L., a Bodegas Albet i Noya S.L. (DO Penedés), Celler Frisach (DO Terra Alta) y a todos los particulares, alumnos, amigos y conocidos que han aportado material vegetal.