

## **Análisis genético y molecular de la forma de la uva en la vid**

E. Borzecka<sup>1</sup>, N. Diestro<sup>1</sup>, C. Royo<sup>1</sup>, J. Carreño<sup>2</sup>, P. Carbonell-Bejerano\*<sup>1</sup>, y J.M. Martínez-Zapater<sup>1</sup>.

1 Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja). C/ Madre de Dios, 51, 26006, Logroño. \*E-mail: [pablo.carbonell@icvv.es](mailto:pablo.carbonell@icvv.es)

2 Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Estación Sericícola. C/Mayor, s/n. 30150, La Alberca. Murcia.

### **Resumen**

**Las variedades de vid muestran un amplio rango de variación en la forma de la uva. El determinismo genético de la forma del fruto es desconocido en la vid aunque se trata de un carácter relevante en la mejora genética de la uva de mesa.**

**La forma de la baya se ha analizado en una progenie F<sub>1</sub> derivada de un cruzamiento entre las variedades de uva de mesa Red Globe y Crimson Seedless (RGxCS). Uno de los ‘Quantitative trait loci’ (QTLs) con mayor efecto para la forma de la baya, medida como la relación entre el diámetro polar y el ecuatorial, se localizó en el grupo de ligamiento 5 (GL5) y explicó hasta un 30% de la variación para este carácter (QTL *SHAPE*). Además, el análisis de las flores recién abiertas de individuos de la progenie indica la existencia de correlación entre la forma de la uva y la forma del ovario. Ello sugiere que la forma final de la uva en esta progenie se determina parcialmente durante el desarrollo del ovario. Esta correlación no se observó sobre una selección de variedades de vid con formas diversas, lo que sugiere que el control genético de la forma de la uva presenta componentes comunes y no comunes con el control genético de la forma del ovario.**

**Con el fin de identificar posibles genes candidatos responsables del QTL *SHAPE* se llevó a cabo un análisis global de la expresión génica. En este experimento se compararon flores pre-antesis de individuos en los dos extremos de la distribución de la F<sub>1</sub> RGxCS, con bayas esféricas o elipsoidales y seleccionados además para su genotipo en el QTL *SHAPE*. Se identificaron 55 genes expresados diferencialmente entre las flores de los dos grupos de plantas. Diez de estos genes se localizaron en el intervalo de confianza del QTL sugiriendo un efecto de la selección genotípica y/o fenotípica. La expresión relativa de varios genes seleccionados dentro del intervalo de confianza se analizó mediante PCR cuantitativa en flores pre-antesis y en frutos cuajados. La combinación de los resultados de expresión con los genéticos apunta al gen con mayores diferencias de expresión como candidato a ser responsable de este QTL.**

**Palabras clave:** Uva de mesa, forma de uva, forma de ovario, control genético, expresión génica.

### **INTRODUCCIÓN**

El fruto de las vides (genero *Vitis*) es una baya con el mesocarpo carnoso dirigido a la dispersión frugívora de las semillas. Escriba aquí la ecuación. En las especies de vid silvestre originales este fruto es de pequeño tamaño y forma esférica. En cambio, entre las vides cultivadas (principalmente la vid europea *Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) se encuentra

una gran diversidad de tamaños y formas de fruto característicos de cada variedad (Boursiquot et al., 1995). La mayor variación se presenta entre las variedades de uva de mesa que son las que alcanzan mayores tamaños de fruto con formas que pueden ir desde esféricas a cilíndricas, pasando por tipos ovoides y elipsoidales o incluso formas exageradas tipo cuerno. Esta gran diversidad apareció posiblemente como consecuencia de variaciones somáticas que fueron seleccionadas por el ser humano durante el proceso de domesticación asociadas a la búsqueda de frutos con mayor tamaño (This et al., 2006; Houel et al., 2013). Actualmente, el mercado de uva de mesa reclama frutas de gran tamaño. Además en programas de mejora de uva de mesa se desean uvas con formas que den exclusividad al producto y lo hagan atractivo y reconocible para el consumidor, y así, fácilmente asociable a otros valores añadidos que pueda incorporar el genotipo mejorado.

En la vid, el gineceo u órgano reproductivo femenino de la flor es un pistilo con un ovario bicarpelar. A partir de los tejidos del ovario se desarrolla el fruto. Se ha descrito que la variación de la forma y el tamaño de la uva se puede determinar a través de los procesos de división que tienen lugar en el desarrollo pre-antesis del pistilo o en la fase inicial del desarrollo del fruto, al igual que mediante procesos de expansión celular, que suceden principalmente en dos fases del desarrollo del fruto (Coombe, 1973; Houel et al., 2013)

Las bases genéticas de la variación en la forma de baya de la vid se desconocen a pesar de su relevancia en la mejora de la uva de mesa. Con el objetivo de profundizar en la identificación de estos determinantes genéticos, en este estudio se realizó un análisis de QTLs sobre una progenie  $F_1$  que segrega para el carácter. Se trató de identificar la fase de desarrollo y el mecanismo celular implicados en la variación asociada al QTL de efecto mayor identificado. Se diseñó una comparación transcriptómica para tratar de identificar genes candidatos a determinar las diferencias de fenotipo y a portar los polimorfismos responsables.

## MATERIAL Y MÉTODOS

*Material vegetal:* se utilizó una progenie  $F_1$  de 292 individuos procedentes de un cruzamiento RGxCS. La progenie segrega, entre otros caracteres, para la forma de la baya (Figura 1A) y se analizó a nivel fenotípico, genético y molecular. Esta progenie se generó en 2003, está plantada sobre pie franco y se ubica en la parcela experimental de ITUM en la Estación de Blanca (Murcia). También se analizó el fenotipo en una selección de 17 accesiones, la mayoría de uva de mesa, que difieren en la forma de baya según datos que fueron registrados previamente. Las accesiones utilizadas fueron Chasselas Doré, Rey, Muscat Ottonel, Garnacha Blanca, Eva, Paraiso, Alfonso Lavallée, Planta Nova y Marisancha con baya esférica y Pizutello Blanco, Dattier Beyrouth, Dominga, Quiebratinajas Blanco, Naparo, Auxerrois, Italia y Ragol seleccionadas por su baya alargada. Estas accesiones se hallan en la colección del ICVV de la finca de La Grajera (Logroño).

*Análisis fenotípico:* se estimaron los índices de forma de ovario (OS) y forma de baya (BS) en flores en antesis y en bayas maduras respectivamente. Los índices se estimaron como el cociente entre los diámetros polares y ecuatoriales del ovario en el primer caso y de la baya en el segundo. Las medidas de ovario se realizaron usando la aplicación ImageJ sobre flores en antesis escaneadas (30 flores/genotipo procedentes de al menos dos inflorescencias) y las de baya con un calibre electrónico Mitutoyo®. Las

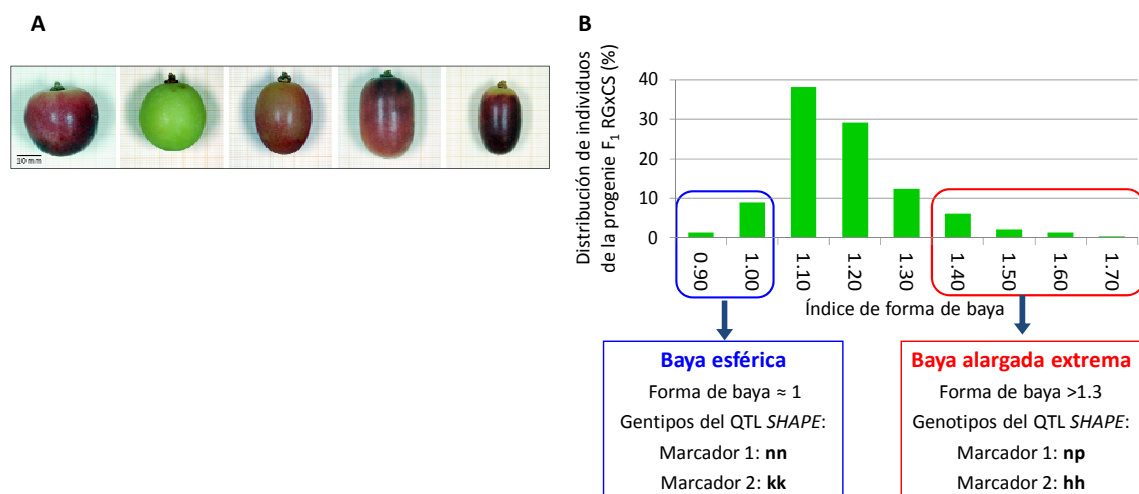
medidas de baya se realizaron sobre toda la progenie durante tres años (2007-2009) y se utilizaron para el análisis de QTLs. En cada año, los datos fueron obtenidos a partir de una muestra de 25 uvas tomadas al azar de una mezcla de tres racimos representativos de cada planta y promediados para cada individuo. Sobre la progenie se realizaron medidas de ovario en 2012 sobre una selección de 13 individuos, seis del extremo del índice BS correspondiente a bayas esféricas y siete del extremo correspondiente a elipsoidales, que además fueron seleccionados para el genotipo correspondiente a ese extremo en los marcadores del QTL *SHAPE* (Figura 1B). Las medidas sobre la selección de individuos fueron realizadas en 2013, en el ovario de igual modo al descrito para la progenie y en fruto a partir de 150 bayas procedentes de 5 racimos distintos (30 bayas/racimo). La significación estadística de las diferencias se analizó mediante tests ANOVA anidado y *t* de Student. Además se analizó la asociación entre las variables mediante matrices de correlación. Los análisis se realizaron usando las aplicaciones SPSS y Statistica y en todos los casos se aplicó un umbral  $P < 0.05$ .

*Análisis genético:* para toda la progenie RGxCS y los progenitores se analizaron 223 SSR seleccionados en base a su posición conocida en el genoma de la vid. Además se analizaron siete pools de 48 SNP en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen). La construcción de los mapas de ligamiento de los marcadores SNP y SSR se realizó utilizando el programa informático JoinMap 3.0. Los análisis de QTL se realizaron de forma independiente para cada variable (longitud, diámetro y forma de baya) en los tres mapas, el de cada progenitor y el consenso, usando el programa MapQTL 4.0. Para la detección de QTLs se utilizó el umbral de LOD (logaritmo de la probabilidad de que exista un QTL en esa posición) correspondiente a un nivel de significación  $\alpha = 0.05$  para cada GL. Se consideraron QTL significativos aquellos cuyos valores LOD superaron el umbral establecido a un nivel de significación del 99% ( $\alpha = 0.01$ ) para cada GL y/o 95% ( $\alpha = 0.05$ ) para el genoma completo.

*Análisis global de expresión génica:* se pulverizó material congelado de flores cerradas (~3 semanas pre-antesis). Se comparó la expresión entre nueve individuos de la progenie RGxCS con baya esférica y nueve con baya elipsoidal seleccionados siguiendo los mismos criterios descritos para el análisis de fenotipos (Figura 1). Se obtuvo ARN utilizando el kit Plant RNA Spektrum Kit de Sigma, el ARN se trató con DNase I (QIAGEN) y su calidad se testó mediante Bioanalyzer. Para los análisis de expresión se utilizó la micromatriz de Nimblegen *Vitis exp.* HX12 con sondas de ADN representativas de todos los genes anotados sobre la secuencia genómica de la vid, empleando el protocolo de hibridación recomendado por los fabricantes. Se realizó una normalización 'Robust Multi-array average' sobre las intensidades de hibridación y la identificación de genes diferenciales se realizó mediante análisis estadístico '*t* de Student' implementado en la aplicación TMeV.

*Análisis de expresión mediante RT-qPCR:* Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación del gen seleccionado como candidato a portar la mutación responsable del QTL de efecto mayor en la forma de baya en la progenie RGxCS. Se analizó la expresión en muestras de flores cerradas (~3 semanas pre-antesis) como en el análisis de micromatrices. Adicionalmente, se analizaron muestras de frutos en cuajado para comprobar la evolución temporal de la expresión. Se analizó una selección de individuos de la progenie similar a la empleada para el análisis de micromatrices, además de los

progenitores. Se usó el protocolo y el método de análisis descrito anteriormente (Carbonell-Bejerano et al., 2013).



**Figura 1.** Distribución de la forma de baya en la progenie RGxCS y criterios de selección. **A)** Ejemplos de diversidad de forma de fruto en la progenie. **B)** Distribución del promedio de forma de baya de tres años y se indica el umbral del índice de forma y los genotipos seleccionados para cada extremo de la distribución.

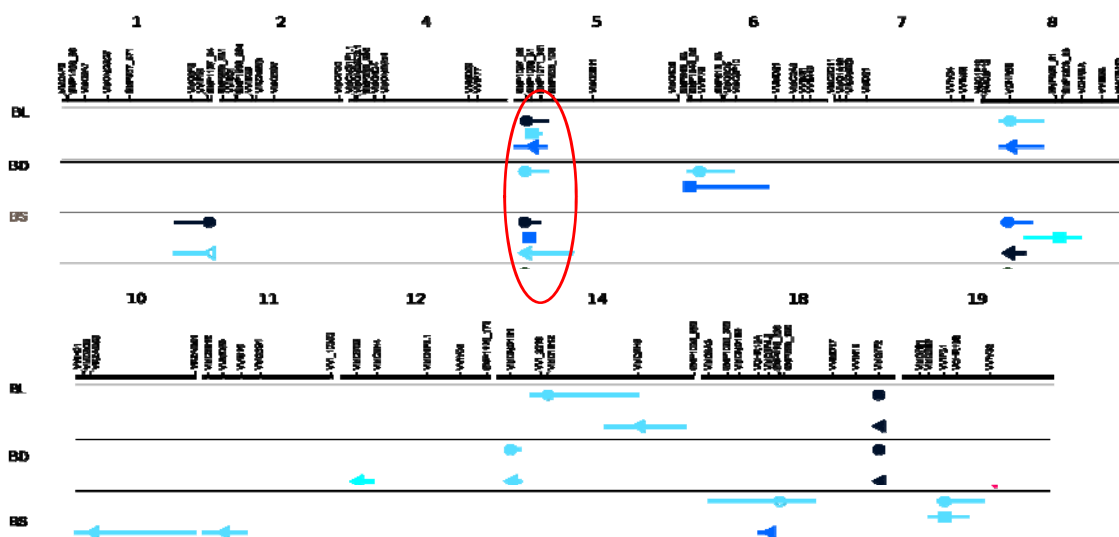
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis genético cuantitativo de la forma de baya

El análisis genético cuantitativo permitió identificar un control genético poligénico tanto para longitud (BL) como para diámetro de baya (BD) incluyendo un par de QTLs de efecto mayor en el GL5 (hasta 15% de la variación de BL) y en el GL18b (hasta el 50 y el 60% de la variación de BL y BD respectivamente). Además, se hallaron QTLs de efecto menor en los GL 6, 8, 12 y 14 para estos parámetros (Figura 2). Sin embargo, cuando se analizó el índice de forma de baya (BS), el QTL de efecto mayor en el GL5 (QTL *SHAPE*) llegó a explicar hasta el 30% de la variación) junto con otros QTLs de menor efecto en los grupos de ligamiento 1 (13%), 8 (10%), 10, 11, 18a y 19.

### Análisis del fenotipo de ovario y correlación entre formas de ovario y fruto

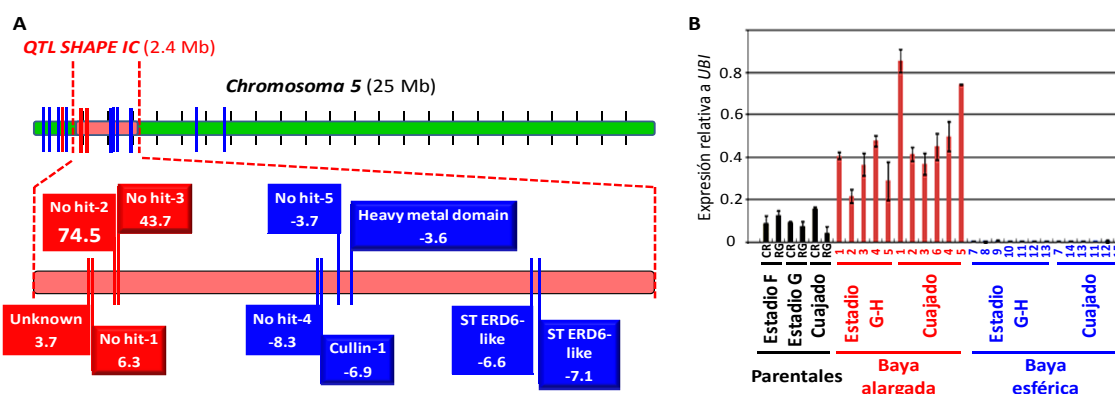
El análisis de la forma de flores y frutos en individuos F<sub>1</sub> de los dos extremos de la distribución para forma de baya mostró una correlación positiva significativa entre la forma del ovario y la del fruto ( $P$  de Pearson <0.01), lo que sugiere que el QTL *SHAPE* puede influir en la forma de la baya a partir de su efecto en el desarrollo pre-antesis del ovario. En la selección de accesiones también se encontraron diferencias significativas para las variables analizadas. Por el contrario, no se detectó correlación significativa entre las formas de ovario y fruto coincidiendo con estudios anteriores (Houel et al., 2013), lo que sugiere que en la vid existen otros determinantes genéticos que pueden controlar la forma de la baya en momentos de desarrollo distintos a los que actuaría el QTL *SHAPE*.



**Figura 2.** QTLs para longitud (BL), diámetro (BD) y forma de baya (BS) en la progenie RGxCS. Se muestra el efecto de los marcadores distribuidos en los 19 GLs. Se distingue entre los resultados del mapa consenso (círculos), el de Red Globe (cuadrados) y el de Crimson (triángulos). Las líneas delimitan la extensión del intervalo de confianza y el color la variación explicada (azul claro <5%, azul oscuro 5-10%, negro >10%).

### Análisis transcriptómico para la identificación de genes implicados en la determinación de la forma de baya por el QTL *SHAPE*

Con el fin de identificar posibles genes candidatos para el QTL *SHAPE* se realizó un análisis transcriptómico comparando el transcriptoma de flores en desarrollo de individuos de baya alargada con el equivalente de individuos de baya esférica seleccionados según los criterios descritos anteriormente (Figura 1B). Se analizaron flores en la fase de desarrollo en la que tiene lugar el crecimiento del pistilo teniendo en cuenta la relación observada entre las formas de ovario y fruto. Este análisis permitió la identificación de 55 genes expresados diferencialmente ( $P < 0.05$  y nivel de cambio  $> 2$ -veces). Cabe destacar la localización de diez de estos genes dentro del intervalo de confianza del QTL *SHAPE* y entre ellos se encuentra el gen que mostró la mayor diferencia de expresión (Figura 3A).



**Figura 3.** Efecto del locus *SHAPE* en la expresión génica. A, genes diferenciales en el GL5 resaltando los incluidos en el intervalo de confianza del QTL para los que se muestra su anotación y cambio de expresión. B, Análisis de expresión mediante RT-qPCR del gen con mayores diferencias de expresión en individuos de la progenie y en los progenitores.

Un análisis pormenorizado de la secuencia de la proteína codificada por este gen según la anotación del genoma (datos no mostrados) muestra similitud con proteínas pertenecientes a una familia conservada en eucariotas y que se ha implicado en complejos de remodelación de cromatina (Messina et al., 2014). Sin embargo, en plantas esta familia es prácticamente desconocida. Mediante PCR cuantitativa se comprobó que este gen muestra una sobreexpresión en individuos de baya alargada frente a individuos con baya esférica de 70 veces en flores y de 100 en frutos en cuajado (Figura 3B). En ambos progenitores del cruzamiento este gen presentó una expresión intermedia entre los dos grupos contemplados (Figura 3B).

## CONCLUSIONES

El QTL *SHAPE*, situado en el GL5, explica gran parte de la variación de la longitud y la forma de baya en la progenie RGxCS.

El locus *SHAPE* puede determinar la forma de la baya durante el desarrollo pre-antesis del pistilo. En otras variedades la forma de la baya podría determinarse durante el desarrollo del fruto.

El gen más sobreexpresado en flores de individuos con baya alargada se encuentra en el intervalo de confianza del QTL *SHAPE*. Una mutación que cause la sobreexpresión en *cis* del alelo portador de este gen podría ser responsable del QTL, teniendo en cuenta su efecto dominante y que la expresión de este gen en los progenitores, heterocigóticos para el locus, es intermedia entre la de individuos homocigóticos para el alelo responsable e individuos no portadores de este alelo.

## Agradecimientos

El trabajo ha sido financiado por los proyectos *BIO2008-03892* y *BIO2011-26229*.

## Referencias

- Boursiquot, J.M., Dessup, M., Rennes, C. (1995). Distribution des principaux caractères phénologiques, agronomiques et technologiques chez *Vitis vinifera* L. *Vitis*, 34, 31-35.
- Carbonell-Bejerano, P., Santa María, E., Torres-Pérez, R., Royo, C., Lijavetzky, D., Bravo, G., Aguirreola, J., Sánchez-Díaz, M., Antolín, M.C., Martínez-Zapater, J.M. (2013). Thermotolerance responses in ripening berries of *Vitis vinifera* L. cv Muscat Hamburg. *Plant Cell Physiology*, 54, 1200-1216.
- Coombe, B.G. (1973). The regulation of set and development of the grape berry. *Acta Horticulturae*, 34, 261-271.
- Messina, G., Damia, E., Fanti, L., Atterrato, M.T., Celauro, E., Mariotti, F.R., Accardo, M.C., Walther, M., Verni, F., Picchioni, D., Moschetti, R., Caizzi, R., Piacentini, L., Cenci, G., Giordano, E., Dimitri, P. (2014). Yeti, an essential *Drosophila melanogaster* gene, encodes a protein required for chromatin organization. *Journal of Cell Sciences*, 127, 2577-2588.
- This, P., Lacombe, T., Thomas, M.R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22, 511-519.