

Base genética y molecular de la variación somática en la vid

J.M. Martínez-Zapater¹, L. Fernández², R. Torres-Pérez¹, C. Royo¹, J. Grimplet¹, P. Carbonell-Bejerano¹, D. Lijavetzky³, E. Baroja¹, J. Martínez¹, E. García-Escudero¹, y J. Ibáñez¹.

1 Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja), Complejo Científico Tecnológico, C/Madre de Dios 51, 26006, Logroño, La Rioja, (España). *E-mail: zapater@icvv.es

2 INRA, UMR Biologie du Fruit et Pathologie, B.P. 81, 33883, Villenave d'Ornon Cedex (France).

3 Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Cuyo (FCA-UNCuyo), Almirante Brown 500, M5528AHB, Chacras de Coria, Mendoza (Argentina).

Resumen

La variación genética somática puede contribuir a la variación fenotípica en plantas perennes. Esto es particularmente importante en especies cultivadas como la vid en la que muchas variedades se han propagado vegetativamente durante siglos. La variación fenotípica entre las líneas y clones que derivan de un cigoto original se deben a mutaciones y epimutaciones somáticas que afectan específicamente a células y líneas celulares de la planta. En la vid, se ha descrito la existencia de variación somática para muchos caracteres de las hojas, racimos o bayas. De hecho, esta variación somática es la fuente de diversidad empleada para la selección clonal, y ha contribuido a la mejora de las variedades de vinificación para su adaptación a nuevos requerimientos de calidad o de producción. Las herramientas genómicas disponibles pueden ayudar a conocer la base molecular de la variación somática. En los últimos años, varias investigaciones han identificado las mutaciones causantes de variantes somáticas en distintas variedades, que incluyen mutaciones puntuales, mutaciones causadas por elementos transponibles y reorganizaciones cromosómicas. El análisis comparativo de estos resultados permite extraer algunas conclusiones generales sobre el origen y amplitud de esta variación y sus posibilidades de utilización en la mejora genética de las variedades de vinificación.

Palabras clave: Variación somática, selección clonal; elementos transponibles; reorganizaciones cromosómicas, herramientas genómicas.

INTRODUCCIÓN

Los resultados de los trabajos ampelográficos y más recientemente los análisis genéticos con marcadores moleculares permiten considerar que pueden existir entre 5000 y 10000 genotipos varietales distintos en la vid (This et al., 2006). De ellos, casi 1500 se cultivan en diversas partes del mundo. Sin embargo, cuando se considera la superficie de cultivo dedicada a cada variedad se observa que tan sólo 16 variedades ocupan más de la mitad de la superficie mundial de cultivo (Tabla 1). Seis de ellas (Airén, Tempranillo, Bobal, Garnacha Tinta, Carignan Noir (Mazuelo) y Monastrell) son españolas y las tres primeras ocupan más de la mitad de la superficie de viñedo en nuestro país.

Tabla 1. Superficie mundial de cultivo de las variedades de vid más representadas.

<i>Orden</i>	<i>Variedad</i>	<i>Color</i>	<i>Origen</i>	<i>Área (ha)</i>	<i>%</i>	<i>% acumulado</i>
1	Cabernet Sauvignon	T	Francia	290091	6,3	6,30
2	Merlot	T	Francia	267169	5,8	12,11
3	Airén	B	España	252364	5,5	17,60
4	Tempranillo	T	España	232561	5,1	22,65
5	Chardonnay	B	Francia	198793	4,3	26,97
6	Syrah	T	Francia	185568	4,0	31,00
7	Garnacha Tinta	T	España	184735	4,0	35,02
8	Sauvignon Blanc	B	Francia	110138	2,4	37,41
9	Trebbiano Toscano	B	Italia	109772	2,4	39,80
10	Pinot Noir	T	Francia	86662	1,9	41,68
11	Mazuelo	T	España	80178	1,7	43,42
12	Bobal	T	España	80120	1,7	45,16
13	Sangiovese	T	Italia	77709	1,7	46,85
14	Monastrell	T	España	69850	1,5	48,37
15	Grasevina	B	Croacia	61200	1,3	49,70
16	Rkatsiteli	B	Georgia	58641	1,3	50,97

Dadas las relevancia económica de estas variedades en la elaboración de vino de calidad y sus genotipos únicos altamente heterocigóticos, su mejora genética en ausencia de transformación genética está limitada a la variación que muestren a nivel somático. Esta variación somática, bien sea espontánea o inducida, es la única fuente de variación que permite mejorar estas variedades conservando el genotipo varietal (Torregrosa et al., 2011). Esta variación somática puede permitir la adaptación de una variedad a nuevas condiciones de cultivo o a nuevas situaciones climáticas o sanitarias. Además, cuando aparece una variación cualitativa que genera la posibilidad de elaborar un nuevo producto puede ser la base para el desarrollo de nuevas variedades. Algunos ejemplos de estas nuevas variedades lo constituyen la serie de variedades derivadas de Pinot Noir, (Pinot Blanc, Pinot Gris, Pinot Meunier, etc.) o de Chasselas (Chasselas Doré, Chasselas Apyrène, Chasselas Ciutat, Chasselas Musqué, etc.) o la más reciente Tempranillo Blanco derivada de Tempranillo.

La variación somática es consecuencia de mutaciones que se producen en cualquier célula del organismo durante el proceso de división celular. Puede afectar a cualquier célula de la planta con capacidad de proliferación (generalmente células meristemáticas) y se transmitirá a todas las células descendientes. Si la mutación afecta a una de las células madres de las líneas celulares L1 o L2 de los meristemos apicales, la mutación se transmitirá a la mayor parte de las células generadas por ese meristemo en la línea celular correspondiente (Figura 1). Cuando la mutación llega a afectar a todas las células de la L1 o la L2 de una yema, puede transmitirse mediante reproducción vegetativa a una nueva planta. Además, si afecta a la L2 en un meristemo apical que genere flores y frutos, puede pasar a los gametos y transmitirse por vía sexual.



Figura 1. Variación somática afectando a sectores de la hoja y del fruto en la vid.

La mutación se produce espontáneamente con una cierta frecuencia y consecuentemente, los clones de una misma variedad que se han multiplicado vegetativamente, a veces durante siglos, siempre son quimeras portadoras de diferentes mutaciones en distintas líneas y grupos celulares. El uso de marcadores moleculares como microsatélites (Pelsy, 2010) o AFLP (Cervera et al., 2002) permite identificar variación en la secuencia nucleotídica entre clones de la misma variedad o entre brazos de la misma cepa. La secuenciación masiva ha permitido cuantificar la variación en la secuencia nucleotídica existente entre clones de Pinot Noir (Carrier et al., 2012). En cualquier caso, lo más relevante es identificar los cambios en la secuencia nucleotídica que son responsables de la variación fenotípica observada. En los últimos años, la disponibilidad de las secuencias genómicas de especies modelo de plantas y más recientemente de *Vitis vinifera*, ha generado información sobre los genomas vegetales y herramientas genómicas que en la actualidad permiten la identificación y caracterización de los genes y variantes génicas responsables de la variación somática observada en la vid. En la presente comunicación pretendemos revisar los resultados aportados por distintos grupos de investigación incluido el nuestro en la caracterización de variantes somáticas de vid y extraer conclusiones sobre la utilidad de este tipo de variación genética en la mejora genética de variedades de elite.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales de estudio en este trabajo fueron las variantes somáticas y las plantas madre, o las líneas o clones originales. La comparación entre plantas originales y variantes somáticas se estableció a tres niveles: fenotípico, genético y genómico/transcriptómico (Fernández et al., 2010). El análisis fenotípico detallado de la variante somática tiene como fin establecer el momento y el tipo celular, tejido u órgano en el que la mutación somática afecta al desarrollo con consecuencias en el fenotipo final. Este análisis es fundamental para orientar los estudios genéticos y genómicos posteriores.

El análisis genético se basa en el estudio de la segregación del fenotipo. El objetivo es identificar si la variación fenotípica segrega en la descendencia de autofecundaciones o cruzamientos con otras variedades y su patrón de segregación. Los resultados informan de la dominancia del fenotipo, su control genético (mono- o poligénico) y de la línea celular afectada. La disponibilidad de plantas segregantes también será de utilidad para localizar a nivel cromosómico la variación genética responsable, caracterizar el alelo mutante del gen afectado y demostrar la relación entre la presencia de la mutación y el fenotipo.

El análisis genómico se basa en el uso de estrategias de análisis global de la expresión génica y/o estrategias de re-secuenciación genómica mediante secuenciación masiva. La primera aproximación permite la identificación de genes candidatos a estar afectados por mutaciones que alteren la expresión en *cis*. La secuenciación masiva permite identificar polimorfismos asociados a la variante y en algunos casos identificar la propia mutación causante de la variación fenotípica, ya sea puntual o consecuencia de reorganizaciones cromosómicas.

En ausencia de procedimientos eficientes de transformación genética de la vid, la confirmación de la relación causa efecto entre la mutación detectada y el fenotipo observado, puede obtenerse de la identificación de mutaciones independientes que generan un mismo fenotipo, del análisis de expresión alelo-específica, de la co-segregación de mutación y fenotipo en las progenies generadas y, en el caso de elementos transponibles, de la identificación de sucesos de reversión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hasta el momento en la vid se han podido identificar las causas moleculares de seis variaciones somáticas relevantes que afectan fundamentalmente a caracteres de la baya y que en muchos casos han dado lugar a nuevas variedades. Las mutaciones identificadas se agrupan en tres clases, mutaciones puntuales, inserciones/delecciones de elementos transponibles y reorganizaciones cromosómicas (Tabla 2).

Una mutación puntual que provoca un cambio aminoacídico en el dominio DELLA de la proteína GAI de *Vitis vinifera* provoca insensibilidad a giberelinas y es la causante del fenotipo dominante de entrenudo corto y elevada pilosidad característico de la variedad Pinot Meunier. Esta mutación se encuentra en células de la L1, y cuando se regeneran plantas completas a partir de ellas, tienen el desarrollo vegetativo y reproductivo alterado (Boss y Thomas, 2002). El aroma moscatel que presentan algunas variedades se ha podido asociar a la presencia de mutaciones dominantes que provocan sustituciones aminoacídicas en un dominio de la proteína DXS (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa) que cataliza la primera reacción enzimática en la síntesis de compuestos terpénicos (Emanuelli et al., 2010). Estas mutaciones provocan que la actividad de la proteína no sea sensible a inhibición por el producto de la reacción (Battilana et al., 2011).

El origen de distintas variantes somáticas se ha asociado a la movilidad de elementos transponibles de distintos tipos. El primer caso identificado corresponde a la variación para el color rojo detectada en algunas variedades blancas de vid. La recuperación de color en estas variedades se asoció a la recombinación del elemento transponible de tipo I, *Gret1* que se encuentra insertado en el promotor del gen *VvMybA1*, un regulador fundamental de la síntesis de antocianos en la vid (Kobayashi et al., 2004), lo que impide su funcionalidad. La recombinación de *Gret1*, pese a que deja una secuencia LTR (*Long Terminal Repeat*) de unos 800 nt, permite una cierta recuperación de la expresión de *VvMybA1* y la producción de color. Inserciones de elementos transponibles de tipo II, se asociaron en la variedad Mazuelo (Carignan Noir) a la variante somática denominada RRM (*Reiterated Reproductive Meristems*) (Fernández et al., 2010) y a la variante FLB (*Fleshless Berry*) identificada en la variedad Ugni Blanc (Trebiano Toscano) (Fernández et al., 2013). En el primer caso, la inserción de un elemento transponible de la familia Hatvine-1 en el promotor del gen *VvTFL1A* provoca su sobreexpresión en el ápice de la planta y de la inflorescencia ampliando el desarrollo

vegetativo y la ramificación de zarcillos y racimos. En el segundo, la inserción de un elemento transponible de la familia Mila en el promotor del gen *VvPI* provoca su expresión ectópica durante el desarrollo del fruto. Cuando esta expresión afecta a la línea celular L2 como en la variante FLB, las uvas resultantes apenas presentan células diferenciadas en la pulpa. Cuando la mutación afecta a todas las líneas celulares las flores son estériles. En ambos casos, se ha demostrado que la inserción de los elementos transponibles provoca un aumento de la expresión del alelo correspondiente del gen afectado o una desregulación de su expresión que genera un fenotipo dominante.

Tabla 2. Información genética y molecular disponible sobre variantes somáticas en la vid. FRT: Factor de regulación transcripcional. SC: Secuencia codificante. TI: Transposón de clase I. TII: Transposón de clase II. D: Dominante. R: Recesivo.

Variedad	Variante	Fenotipo	Gen	Función molecular	Polimorfismo funcional		Alteración funcional	Efecto
					Posición	Mutación		
Pinot Noir	Meunier	Enanismo	<i>VvGAI</i>	FRT	SC	Sustitución	Proteína modificada	D
Italia	Ruby O.	Uva roja	<i>VvMYBA1</i>	FRT	Promotor	TI	Expresión génica	D
Variedades	Rojas	Uva roja	<i>VvMYBA1</i>	FRT	Promotor	TI	Expresión génica	D
Cab. Sauvignon	Shalistin	Uva blanca	<i>VvMYBA</i>	FRT	Genes	Delección	Pérdida génica	R
Pinot Noir	Blanc	Uva blanca	<i>VvMYBA</i>	FRT	Genes	Delección	Pérdida génica	R
Carignan Noir	RRM	Racimo	<i>VvTFLIA</i>	FRT	Promotor	TII	Expresión génica	D
Variedades	Moscatel	Aroma	<i>VvDXS</i>	Enzima	SC	Sustitución	Proteína modificada	D
Treb. Toscano	FLB	Pulpa	<i>VvPI</i>	FRT	Promotor	TII	Expresión génica	D

Finalmente, variaciones somáticas de pérdida de color en la uva de variedades tintas se han asociado a la presencia de delecciones que afectan al alelo funcional del locus que controla el color de la uva en el cromosoma 2. En este locus complejo se localizan cuatro genes de la familia Myb y dos de ellos, *VvMybA1*, mencionado anteriormente, y *VvMybA2* regulan la síntesis de antocianos en el hollejo de la uva. La mayoría de las variedades tintas son heterocigóticas para este locus (Lijavetzky et al., 2006) y portadoras de un alelo nulo en el que ambos genes *VvMybA1* y *VvMybA2* son portadores de mutaciones que anulan su función (Walker et al., 2007). La pérdida de color por delección del alelo funcional se ha descrito en la variante Shalistin de Cabernet Sauvignon (Walker et al., 2006), y en el origen de Pinot Blanc a partir de Pinot Noir (Furiya et al., 2008; Vezzulli et al., 2012). En el caso de Tempranillo Blanco, nuestro grupo ha identificado la presencia de delecciones que afectan a los cromosomas 2 y 5 asociadas a la pérdida de color. Estas delecciones se relacionan con una serie de reorganizaciones cromosómicas que incluyen translocaciones e inversiones y que están relacionadas con la presencia de elementos transponibles de tipo I y II. Las delecciones provocan la pérdida de una de las copias de un gran número de genes y afectan a la meiosis y la viabilidad de los gametos masculinos y femeninos con posibles efectos en el cuajado del fruto y en la producción.

CONCLUSIONES

El estudio de las causas genéticas y moleculares de la variación somática en la vid permite establecer algunas conclusiones generales. Con la excepción de las delecciones que afectan a alelos funcionales en *loci* heterocigóticos (locus de color en el cromosoma

2) que corresponden a mutaciones de pérdida de función, la mayor parte de los fenotipos observados son dominantes y producidos por mutaciones de ganancia de función. La dominancia es una condición necesaria para que una mutación en heterocigosis tenga un efecto fenotípico observable y seleccionable, bien afecte a una línea celular específica o a toda la planta. Estas mutaciones pueden afectar a la expresión del gen (caso de las variantes generadas por elementos transponibles), o a la función de la proteína (mutaciones puntuales). Las mutaciones de ganancia de función no están limitadas por la posible redundancia génica o funcional que exista en el genoma de la vid y pueden generar fenotipos nuevos no relacionados con la función biológica original de los genes afectados. Consecuentemente, cualquier fenotipo puede ser posible como resultado de este tipo de mutaciones y su producción e identificación depende exclusivamente del número de individuos para seleccionar y de una selección fenotípica eficiente. Por tanto la variación somática puede representar una herramienta muy útil en la mejora genética de variedades élite al generar nuevos fenotipos para un genotipo varietal mayoritariamente conservado.

Referencias

- Battilana, J., Emanuelli, F., Gambino, G., Gribaudo, I., Gasperi, F., Boss, P.K., Grando, M.S. (2011). Functional effect of grapevine 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase substitution K284N on Muscat flavour formation. *Journal of Experimental Botany*, 62, 5497–5508.
- Boss, P.K., Thomas, M.R. (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape ‘green revolution’ mutation. *Nature*, 416, 847–850.
- Carrier, G., Le Cunff, L., Dereeper, A., Legrand, D., Sabot, F., Bouchez, O., Audeguin, L., Boursiquot, J.M., This, P. (2012). Transposable elements are a major cause of somatic polymorphism in *Vitis vinifera* L. *PLoS ONE*, 7, e32973.
- Cervera, M.T., Cabezas, J.A., Rodríguez-Torres, I., Chavez, J., Cabello, F., Martínez-Zapater, J.M. (2002). Varietal diversity within grapevine accessions known as Tempranillo. *Vitis*, 41, 33-36.
- Emanuelli, F., Battilana, J., Costantini, L., Le Cunff, L., This, P., Grando, M.S. (2010). A candidate gene association study for muscat flavor in grapevine *Vitis vinifera* L. *BMC Plant Biology*, 10, 241.
- Fernández, L., Torregrosa, L., Segura, V., Bouquet, A., Martínez Zapater, J.M. (2010). Transposon induced gene activation as a mechanism generating cluster shape somatic variation in grapevine. *The Plant Journal*, 61, 545-557.
- Fernandez, L., Chaib, J., Martínez-Zapater, J.M., Thomas, M.R., Torregrosa, L. (2013). Misexpression of a *PISTILLATA-like* MADS-box gene prevents fruit development in grapevine. *The Plant Journal*, 73, 918-928.
- Furiya, T., Suzuki, S., Sueta, T., Takayanagi, T. (2008). Molecular characterization of bud sport of Pinot Gris bearing white berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 66–73.
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., Hirochika, H. (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, 304, 982–982.

- Lijavetzky, D., Ruiz-García, L., Cabezas, J.A., De Andrés, M.T., Bravo, G., Ibáñez, A., Carreño, J., Cabello, F., Ibáñez, J., Martínez-Zapater, J.M. (2006). Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 427-435.
- Pelsy, F. (2010). Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. *Heredity*, 104, 331–340.
- This, P., Lacombe, T., Thomas, M.R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22, 511-519.
- Torregrosa, L., Fernández, L., Bouquet, A., Boursiquot, J.M., Pelsy, F., Martínez-Zapater, J.M. (2011). Origins and consequences of somatic variation in grapevine, in *Genetics, Genomics, and Breeding of Grapes*. Science Publishers, 68-92.
- Vezzulli, S., Leonardelli, L., Malossini, U., Stefanini, M., Velasco, R., Moser, C. (2012). Pinot blanc and Pinot gris arose as independent somatic mutations of Pinot noir. *Journal of Experimental Botany*, 63, 6359–6369.
- Walker, A.R., Lee, E., Robinson, S.P. (2006). Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant Molecular Biology*, 62, 623–635.
- Walker, A.R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D.A.J., Thomas, M.R., Robinson, S.P. (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal*, 49, 772–785.