

RESULTATS DE LA TÈCNICA DELS MICROSATÈLLITS O SSR APLICADA AL TREPAT

Francesca Fort,¹ Catalina Baig,¹ Tomàs Puig,² Gemma Marsal,¹
Eloy Alfonso,¹ Bet Janer,¹ Joan M. Canals¹ i Fernando Zamora¹

RESUM

L'objectiu d'aquest treball és fer la caracterització de la varietat trepat mitjançant la tècnica dels microsatèl·lits (SSR), i a partir del germoplasma de Bodegues Sumarroca, SL. Es tracta, doncs, de fer una exhaustiva revisió de les bases de dades ampelogràfiques, de la bibliografia i de tota la informació en línia, i comparar-la amb els resultats obtinguts a partir de l'estudi del genoma (microsatèl·lits en aquest cas).

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es hacer la caracterización de la variedad *trepat* mediante la técnica de microsatélites (S. S. R.) y a partir del germoplasma de Bodegas Sumarroca, S. L. Se trata, pues, de hacer una exhaustiva revisión de las bases de datos ampelográficas, de la bibliografía y de toda la información en

línea y compararla con los resultados obtenidos a partir del estudio del genoma (microsatélites en este caso).

INTRODUCCIÓ

En els darrers anys, el nombre de varietats de vinya conreada ha disminuït dràsticament en la majoria dels països d'Europa, perquè les tendències actuals del mercat han impulsat la producció de vins utilitzant només un nombre reduït de varietats seleccionades (Ortiz *et al.*, 2004), fet que ha posat en perill la supervivència d'una gran quantitat de varietats autòctones (Ulanovsky *et al.*, 2002), de manera que molts països s'enfronten a la ràpida erosió del seu germoplasma i per tant a una gran pèrdua de la biodiversitat de l'espècie *Vitis vinifera*. Encara que algunes d'aquestes varietats autòctones poden produir vins d'alta qualitat, estan infrautilitzades a causa de l'insuficient coneixement de les seves característiques agronòmiques i del seu ús en l'elaboració del vi (Hidalgo, 1993).

El primer pas per a la preservació del patrimoni natural de les varietats autòctones és la seva correcta i fidel catalogació, entesa com la identificació i

1. Grup de Tecnologia Enològica. Dept. Bioquímica i Biotecnologia. Unitat d'Enologia del CERTA. Facultat d'Enologia de Tarragona. Universitat Rovira i Virgili. C/ Marcel·lí Domingo, s/n. 43007 Tarragona. Tel. 977 558 976. A/e: mariafrancesca.fort@urv.cat.
2. Bodegues Sumarroca, SL. El Rebato, s/n. 08739 Subirats, Barcelona.

tipificació d'una varietat en qüestió, per evitar els errors coneguts com a sinonímies i/o homonímies, procedents de la classificació ampelogràfica que es basa en l'estudi dels caràcters externs de la planta (fenotip) (Bowers *et al.*, 1996; Pollefeys i Bousquet, 2003). El terme *sinonímia* fa referència a quan un mateix individu (genotipus) rep o se'l coneix per més d'un nom a causa de la seva redenominació durant el període de dispersió geogràfica. Per exemple, la varietat monestrell també es coneix amb els noms de *garrut* i de *morastrell*, i concretament a l'Espluga de Francolí li donen el nom de *mataró* (Favà, 2001). En canvi, el terme *homonímia* fa referència a quan a un sol nom li corresponen diferents individus (genotipus). Per exemple, el nom *subirat* s'utilitza tant per a anomenar la varietat macabeu com la varietat malvasia blanca (coneguda també amb el nom de *subirat parent*) (Favà, 2001).

L'objectiu d'aquest treball és fer una bona catalogació de la varietat trepat utilitzant l'estratègia d'estudiar l'única font d'informació que tenim invariable els éssers vius: el genoma (ADN). Per a tal finalitat es farà servir una tècnica de marcadors moleculars coneguda amb el nom de microsatèl·lits (Lopes *et al.*, 1999; Upadhyay, 2007), i l'estudi es realitzarà a partir del germoplasma que té l'empresa Bodegues Sumarroca SL a la comarca del Penedès (que disposa de 338 varietats procedents de països de tot el món).

MATERIAL I MÈTODES

—S'ha aïllat l'ADN de 338 varietats de *Vitis vinifera*, fent servir l'equip d'ex-

tracció de QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit).

—L'amplificació dels fragments s'ha fet en un termociclador MyCycler (Bio-Rad), utilitzant els següents primers marcats amb diferents fluorocroms: VVS2, VVS3, VVMD6, VVMD7, VVMD28, VVMD5, VVMD36 (Bowers *et al.*, 1996); ZAG47, ZAG62, ZAG64, ZAG83, ZAG21 (Sefc *et al.*, 1999); SCU 06 (Scott *et al.*, 2000); UCH11, UCH12, UCH19 (Lefort *et al.*, 2002).

—Els fragments amplificats s'han analitzat en un seqüenciador ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems) (electroforesi capil·lar).

—Els programes utilitzats per a analitzar les dades han estat: el programari IDENTITY (Wagner i Sefc, 1999) i el programari MICROSAT (Minch, 1997), el qual permet realitzar la identificació dels genotipus existents. Per a la construcció del fenograma i l'arbre filogenètic s'ha fet servir el programa Treeview (Page, 1996).

—L'estudi de les homonímies ha estat bibliogràfic, utilitzant diferents bases de dades ampelogràfiques, com ara *Vitis International Variety Catalogue* (Maul *et al.*, 2007), *European Vitis Database* (Maul *et al.*, 2006), etc., i diversos diccionaris ampelogràfics.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Si fem una cerca a les principals bases de dades que existeixen amb l'entrada de *trepat* trobem els sinònims següents:

—Maul *et al.* (2007), *Vitis International Variety Catalogue: trapat, trepán.*

—Maul *et al.* (2006), *European Vitis Database: trapat, trepán.*

— *Wein-Plus Wein-Glossar* (2008): sense referències a sinònims.

— Viquipèdia (2007): *trepó, criatendra, cuatendra, pansa, borda, pansa roja, panser negre, pansó, tarragoní*.

— Favà (2001), *Diccionari dels noms de ceps i raïms*, Institut d'Estudis Catalans: *trapat, trepadell*.

Per tant, hi ha els següents termes publicats com a sinònims de la varietat *trepat*: *trapat, trepán, trepadell, trepó, criatendra, cuatendra, pansa borda, pansa roja, panser negre, pansó, tarragoní*.

Si fem un estudi de cadascun d'aquests termes a la base de dades ampelogràfica *Vitis International Variety Catalogue* (que és de les més fiables a criteri nostre), obtenim que *trapat* i *trepán* continuen constant com a sinònims. En canvi, els termes *cuatendra* (= *carcajolo nero* (França)), *pansa roja* (= *xarel·lo vermell*), *pansó* (= *trobat*), *tarragoní* (= *trobat*) apareixen com a sinònims d'altres varietats. De la resta de sinònims (*trepadell, trepó, criatendra, pansa borda, panser negre*) no n'hem trobat referències.

Per tant, segons aquesta cerca podem concloure que són homònims els termes següents: *pansó* perquè fa referència tant al *trepat* com al *trobat*, *tarragoní* perquè fa referència tant al *trepat* com al *trobat*, *pansa roja* perquè fa referència tant al *trepat* com al *xarel·lo vermell* i *cuatendra* perquè fa referència tant al *trepat* com al *carcajolo nero*.

En el germoplasma de Bodegues Sumarroca, SL es disposa de les varietats *trepat*, *xarel·lo vermell*, *trobat* i *tarragoní*, i les seves corresponents anàlisis de microsatèl·lits ens diuen que es trac-

ta de quatre varietats diferents. Aquests resultats coincideixen amb els de Martín *et al.* (2003). L'estudi d'aquest germoplasma també ens indica que el *trepat* coincideix completament en els disset microsatèl·lits analitzats amb les varietats anomenades *traput* i *isidrós*, per tant podem afirmar que aquestes darreres varietats són sinònims de *trepat*.

Tanmateix, quan iniciem la cerca en les diferents bases de dades i també a la bibliografia de la varietat *isidrós* no en trobem cap mena d'informació. En el cas de la varietat *traput*, el *Vitis International Variety Catalogue* la presenta com una varietat nova, sense cap relació amb el *trepat*. L'única referència que trobem que relacioni aquests dos termes és en línia, concretament Nacho Bueno (2006), a la web de les Bodegues Laureano Serres Montagut, afirma que la varietat *trepat* presenta els sinònims següents: *bonicaire, embolicaire, mandó, parrel* i *traput*. Fent la cerca en el *Vitis International Variety Catalogue*, trobem que el terme *bonicaire* és una nova varietat que presenta com a sinònim el terme *embolicaire*; *parrel* també és una nova varietat però sense cap sinònim conegut; i finalment, *mandó* es presenta amb dues entrades, una com a sinònim de *monastrell*, i l'altra com a varietat nova amb el sinònim de *mandon*. Segons els resultats obtinguts a partir de l'estudi dels microsatèl·lits es pot concloure que són varietats diferents, tant el *trepat*, com el *monestrell*, com el *mandó*.

Les varietats de la col·lecció ampelogràfica (germoplasma) de Bodegues Sumarroca, SL més emparentades amb el *trepat* són les que es presenten en la taula següent:

	TREPAT			% d'al·l els coincidents	Núm. d'al·l els coincidents
	COLOR	PAÍS	ÚS		
ESPERÓ DE GALL	N	IBAL	V	79,4	27/34
PARELLADA	B	CAT	V	64,7	22/34
CJA DE MOLTÓ	B	CAT	V		
FORCALLAT	N	ESP	V		
CAMES DE GARSA	N	CAT	V		
ISO	B	ESP	V	58,8	20/34
MANDÓ	N	CAT	W		
MANTO NEGRO	N	IBAL	V		
PRIMITIVO	N	HRV	V		
TRESSOT NOIR	N	FRA	V		
CHELVA	B	ESP	T/W	55,9	19/34
GIRO	N	ESP	T/W		
MACABEU	B	CAT	V		
MALVAR	B	ESP	V		
MALVASIA DE SITGES	B	CAT	V		
MASSECAMP	B	CAT	V		
MATEU	B	CAT	V		
MOLINERA	B	ESP	T		
MORENILLO	N	ESP	V		
TARRAGONÍ	N	CAT	V		
TERRET NOIR	N	FRA	V		

	TREPAT			% d'al·l els coincidents	Núm. d'al·l els coincidents
	COLOR	PAÍS	ÚS		
CALITOR NOIR	N	FRA	V	52,9	18/34
CEVEROLA	B	CAT	?		
DABOUKI	B	ARM	T		
DOLCETTO NERO	N	ITA	V		
FLAMENCA	B	ESP	V		
FORASTERA	B	ITA	V		
GRINGOLINO	N	ITA	V		
MARIENSTEINER	B	DEU	V		
QUIGAT	B	IBAL	V		
RUBY CABERNET	N	USA	T/W		
SALZENC	N	CAT	V		
SANT JAUME	B	CAT	T		
SUSCAN	N	HRV	V		
VERDIELL	B	CAT	V		
XAREL·L O	B	CAT	V		
XAREL·L O VERMELL	N	CAT	V		
AFARTAPOBRES	B	ESP	V	50	17/34
CEP DE LA MARIA	B	CAT	?		
COUNOISE	N	FRA	V		
EMPEROR SEEDLESS	N	USA	T		
GARRIDO FINO	B	ESP	V		
GRACIANO	N	ESP	V		
GROULLEAU NOIR	N	FRA	V		
KOTSIFALI	N	GRE	V		
MAGDALENS	B	CAT	T/W		
MONESTRELL	N	PVAL	T/W		
PIEDIROSSO	N	ITA	V		
PIQUEPOUL NOIR	N	FRA	V		
SABATE NEGRE	N	IBAL	V		
SCHEUREBE	B	DEU	V		
ZILAVKA	B	BIH	W		

BIBLIOGRAFIA

- BUENO, N. (2006). En línia a: <<http://www.serres.net/forum/topic.asp?TOPIC ID=66>>.
- 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*, núm. 39, p. 628-633.
- FAVÀ, X. (2001). *Diccionari dels noms de ceps i raïms: L'ampelonímia catalana*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans.
- HIDALGO, L. (1993). *Tratado de viticultura general*. Madrid: Mundi Prensas.
- LEFORT, F.; KYVELOU, C. J.; ZERVOU, M.; EDWARDS, K. J.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. (2002). «Characterization of new microsatellite loci from *Vitis vinifera* and their conservation in some *Vitis* species and hybrids». *Molecular Ecology Notes*, núm. 2, p. 20-21.
- LOPES, M. S.; SEFC, K. M.; DIAS, E. E.; STEINKELLNER, H.; MACHADO, M. L. D.; MACHADO, A. D. (1999). «The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection». *Theoretical and Applied Genetics*, núm. 99, p. 733-739.
- MARTÍN, J. P.; BORREGO, J.; CABELLO, F.; ORTIZ, J. M. (2003). «Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers». *Genome*, núm. 46, p. 10-18.
- MAUL, E.; TÖPFER, R.; EIBACH, R. (2006). *European vitis database (EVD)*. En línia a: <<http://www.genres.de/eccdb/vitis/>>.
- (2007). *Vitis International Variety Catalogue (VIVC)*. En línia a: <<http://www.vivc.bafz.de/index.php>>.
- MINCH, E. (1997). MICROSAT, version 1.5b. Stanford University Medical Center: Stanford, California. En línia a: <<http://lotka.stanford.edu/microsat.html>>.
- ORTIZ, J. M.; MARTÍN, J. P.; BORREGO, J.; CHÁVEZ, J.; RODRÍGUEZ, I.; MUÑOZ, G.; CABELLO, F. (2004). «Molecular and morphological characterization of a *Vitis* gene bank for the establishment of a base collection». *Genetic Resources and Crop Evolution*, núm. 51, p. 403-409.
- PAGE, R. D. M. (1996). «TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers». *Comput. Applic. Biosci.*, núm. 12, p. 357-358.
- POLLEFEYS, P.; BOUSQUET, J. (2003). «Molecular genetic diversity of the French-American grapevine hybrids cultivated in North America». *Genome*, núm. 46, p. 1037-1048.
- SCOTT, K. D.; EGGLE, P.; SEATON, G.; ROSSETTO, M.; ABLETT, E. M.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. (2000). «Analysis of SSRs derived from grape ESTs». *Theoretical and Applied Genetics*, núm. 100, p. 723-726.
- SEFC, K. M.; REGNER, F.; TURETSCHKE, E.; GLOSSL, J.; STEINKELLNER, H. (1999). «Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species». *Genome*, núm. 42, p. 367-373.
- ULANOVSKY, S.; GOGORCENA, Y.; DE TODA, F. M.; ORTIZ, J. M. (2002). «Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.)». *Scientia Horticulturae*, núm. 92, p. 241-254.

- UPADHYAY, A. (2007). «AFLP and SSR marker analysis of grape rootstocks in Indian grape germplasm». *Scientia Horticulturae*, núm. 112, p. 176-183.
- WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. (1999). IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Viena. En línia a: <http://www.boku.ac.at/zag/steink_ssr_frames-neu.htm>.
- WEIN-PLUS WEIN GLOSSAR (2008). En línia a: <<http://www.wein-plus.de/glossar/A.htm>>.