



Estudio del origen **genético**  
de la variedad de vid **Garnacha Blanca**,  
de su diversidad **fenotípica**  
y de los efectos moleculares asociados  
a la **variación en el color** de la uva





# Estudio del origen genético de la variedad de vid Garnacha Blanca, de su diversidad fenotípica y de los efectos moleculares asociados a la variación en el color de la uva

Maite Rodríguez Lorenzo

Doctorado en Enología, Viticultura y Sostenibilidad

Universidad de La Rioja

ICVV

Directores:

José Miguel Martínez Zapater

Javier Ibañez Marcos

Pablo Carbonell Bejerano

Abril 2019



JOSÉ MIGUEL MARTÍNEZ ZAPATER, doctor en ciencias biológicas, profesor de investigación y director del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino,

JAVIER IBAÑEZ MARCOS, doctor en ciencias biológicas e investigador científico titular en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, y

PABLO CARBONELL BEJERANO, doctor en ciencias biológicas e investigador postdoctoral Marie Skłodowska-Curie en el Max Planck Institute for Developmental Biology,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, de título “Estudio del origen genético de la variedad de vid Garnacha Blanca, de su diversidad fenotípica y de los efectos moleculares asociados a la variación en el color de la uva”, que presenta MAITE RODRÍGUEZ LORENZO, ha sido realizada en el Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja, bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con “Mención Internacional”.

Logroño, 8 de abril de 2019

Fdo.: Dr. José Miguel Martínez Zapater

Fdo.: Dr. Javier Ibañez Marcos

Fdo.: Dr. Pablo Carbonell Bejerano





El trabajo expuesto en la presente memoria ha dado lugar hasta la fecha a la siguiente publicación científica:

- Rodríguez-Lorenzo, M., Cibrián, J. F., Sagües, A., Abad, F. J., Martínez-Zapater, J., Ibáñez, J. (2019). Intra-varietal diversity for agronomic traits in 'Garnacha Blanca'. *Vitis*, 58, 33–35. <https://doi.org/10.5073/vitis.2019.58.33-35>



## FINANCIACIÓN

El trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral se ha financiado a través de una beca de formación en el Negociado de Viticultura de la Sección de Viticultura y Enología del Gobierno de Navarra (EVENA) (mayo 2015 – septiembre 2016) y a través de un contrato pre-doctoral FPI de la Universidad de La Rioja (octubre 2016 – finalización de la tesis).

La tesis se enmarca en el proyecto BIO2014-59324-R Bases moleculares de la variación genética para el color, tamaño y forma de la baya en la vid. Proyecto I+D Retos de Investigación MINECO.



## AGRADECIMIENTOS

Si algo he aprendido a lo largo de estos cuatro años es que una tesis doctoral es un trabajo en equipo. Un equipo multidisciplinar, formado por personas de distintas edades, con diferentes roles en el proyecto y distintas formas de ver la vida, pero todas ellas necesarias en este largo proceso. Me gustaría agradecer a todas las personas que han formado parte de mi equipo durante estos cuatro años y sin los cuales nada de esto hubiera sido posible. GRACIAS.

A mi padre, por sembrar la semilla del doctorado. Gracias, porque no me cabe duda de que esto tenía que formar parte de mi camino.

A Félix Cibriáin, por regar esa semilla y hacer que brotara. La semilla estaba ahí, pero si la Garnacha Blanca y tú no os hubierais puesto en mi camino esto no habría pasado. Gracias también a ti, Ana Sagüés. Gracias porque has sido un punto de apoyo importante en los últimos meses. Gracias en especial a ambos. Gracias por hacerme un hueco a vuestro lado y enseñarme tanto sobre la viticultura, con tanta pasión y dedicación.

A mis directores, José Miguel Martínez Zapater, Javier Ibañez y Pablo Carbonell. Gracias por aceptarme como vuestra aprendiz, por confiar en mí, por transmitirme vuestro conocimiento, por enseñarme a pensar y ayudarme a crecer y por hacerlo siempre con suma paciencia. Gracias José Miguel, gracias Javier y gracias Pablo.

A todos los que, de una forma u otra, con su ayuda, han hecho posible que todo el trabajo saliera adelante.

-En EVENA: Leyre, Javi Abad, Andrea, Andoni, Aitor, Gaizka, Javier Echeagaray, Blanca, Alberto, Iker Uriz, Iker Tres, Nerea, Ramiro, Pili, Paqui, Jacinto, Koldo, Laura, Karmele. Gracias por contar flores y bayas y por sacar semillas o extraer ADN conmigo, por ayudarme a luchar contra el viento en Baretón a la hora de embolsar racimos o coger madera... Y gracias también a ti Begoña Vidaurre. Gracias por preocuparte siempre por mí. Igual que vosotros, Soraya, Jon y Amaia.

-En el ICVV: Nachi, Miguel, Silvia, Rufino, Pepe, Elisa y, en especial, Carol y Nuria. Gracias Carol por tu incondicional ayuda y tu incondicional sonrisa; gracias Nuria por tu inmensa paciencia; gracias a las dos por vuestras clases de genética y bioinformática, ¿qué hubiera sido de mí sin ellas? Y gracias también a ti Cristina Manso. Gracias porque has sido un punto de apoyo muy importante. Y a Jérôme, Yolanda y Cristina Pesquera, gracias por interesaros siempre por mí y mis avances.

-En el ISVV de Burdeos gracias a Ghislaine, a Christel y a Claud. A Ghislaine y Christel, por permitirme trabajar en vuestro laboratorio, enseñarme y ayudarme; a Claud, por tu ayuda, pero sobre todo por tu sonrisa y por tu gran corazón.

A mis queridísimas amigas. Gracias por seguir queriéndome a pesar de que haber sido un poco fantasma para vosotras en los últimos meses.

A mi familia, simplemente por ser mi familia. En especial, gracias Camino. Gracias por aguantar mis interminables monólogos, sobre todo en malas rachas. Gracias también a mis hermanos. En especial, gracias Gorka y gracias María. Gracias por recordarme SIEMPRE que la tesis doctoral no es el centro del universo.

Y no por ser el último el menos importante, a Mikel. GRACIAS Mikel. Gracias por ser el sol que siempre está ahí, tanto en días soleados como en días nublados. ¡¡GRACIAS EQUIPO!!

Quisiera agradecer al Gobierno de Navarra la beca concedida, gracias a la cual comencé el proyecto de tesis doctoral, y también a la Univerisdad de La Rioja por el contrato predoctoral concedido, sin el cual hubiera sido difícil finalizar la tesis.

Agradecer también el convenio establecido entre el Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias (INITIA), órgano instrumental del Gobierno de Navarra para la asistencia técnica, la experimentación y la investigación en materias de agricultura y ganadería, y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), gracias al cual el trabajo se ha podido desarrollar entre el Negociado de Viticultura de la Sección de Viticultura y Enología del Gobierno de Navarra (EVENA) y el Instituto de las Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja, CSIC y Universidad de La Rioja).

Agradecer al *Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV)* de Burdeos por permitirme realizar una estancia en su laboratorio, gracias a la cual se han obtenido los resultados de metabolitos primarios, antocianinas y flavonoles de la tesis.

Por último, agradecer al personal encargado de los análisis de compuestos volátiles en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de Valencia, Antonio Granell y José Luis Rambla; y del análisis de precurosres volátiles en el *Casaccia Research Centre de Roma*, Gianfranco Diretto.

# INDICE

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	BIOLOGÍA DE LA VID .....	1
1.1.1	La especie <i>Vitis vinifera</i> .....	1
1.1.2	Origen y evolución del cultivo .....	1
1.1.3	Variación somática .....	2
1.1.3.1	Variación somática en la selección clonal y la generación de nuevas variedades 2	
1.1.4	Ciclo biológico de la vid .....	4
1.1.4.1	Desarrollo reproductivo .....	4
1.1.5	El genoma de la vid y sus aplicaciones .....	6
1.1.5.1	SNP .....	8
1.2	CARACTERES RELEVANTES PARA LA PRODUCCIÓN VITIVINÍCOLA.....	8
1.2.1	Componentes del rendimiento y de la calidad de la producción.....	8
1.2.1.1	El rendimiento .....	8
1.2.1.2	La baya.....	9
1.2.1.3	La compacidad del racimo.....	10
1.2.2	Composición y calidad de la baya .....	10
1.2.2.1	Color de la baya.....	11
1.2.2.1.1	Fenilpropanoides y antocianinas.....	11
1.2.2.1.1.1	Ruta de los fenilpropanoides y síntesis de antocianinas .....	13
1.2.2.1.2	Control genético del color de la baya.....	15
1.2.2.1.2.1	Variación somática para el color de la baya.....	16
1.2.2.1.3	Efectos de la variación del color en la composición de la baya .....	18
1.2.2.2	Compuestos volátiles y precursores aromáticos en la baya .....	19
1.2.2.2.1	Monoterpenos.....	20
1.2.2.2.2	C-13 norisoprenoides .....	21
1.2.2.2.3	Compuestos C6 derivados de ácidos grasos.....	23
1.2.2.2.4	Precusores aromáticos fenólicos: Ácidos hidroxicinámicos .....	24
1.2.2.2.5	Precusores aromáticos aminoacídicos.....	25

1.3	LA VITICULTURA EN ESPAÑA Y EN EL MUNDO.....	25
1.3.1	La variedad Garnacha Blanca .....	27
1.3.1.1	Situación del cultivo .....	27
1.3.1.2	Características varietales.....	28
2	OBJETIVOS .....	33
3	MATERIAL Y MÉTODOS .....	37
3.1	MATERIAL VEGETAL .....	37
3.1.1	Condiciones de cultivo del material en campo .....	40
3.1.2	Poblaciones de autofecundación .....	45
3.1.2.1	Generación de las autofecundaciones .....	45
3.1.2.2	Germinación de las semillas.....	45
3.1.3	Enraizamiento de estaquillas .....	45
3.2	EVALUACIÓN DE CARACTERES AGRONÓMICOS .....	46
3.2.1	Análisis de caracteres de producción y de compacidad.....	46
3.2.1.1	Caracteres de planta .....	47
3.2.1.2	Caracteres de racimo .....	48
3.2.1.3	Caracteres de baya .....	50
3.2.2	Análisis estadísticos.....	51
3.3	SELECCIÓN DE UVAS PARA ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y METABOLÓMICO .....	52
3.3.1	Recolección de las muestras .....	52
3.3.2	Selección del estado de maduración de las bayas en base a densidad .....	52
3.4	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA UVA.....	53
3.4.1	Análisis de metabolitos primarios .....	53
3.4.1.1	Preparación de las muestras .....	53
3.4.1.2	Análisis de azúcares.....	54
3.4.1.3	Análisis de ácidos orgánicos .....	54
3.4.1.4	Análisis de aminoácidos .....	54
3.4.2	Análisis de antocianinas y flavonoles .....	55
3.4.3	Análisis de compuestos volátiles y sus precursores.....	55
3.4.3.1	Preparación de las muestras .....	55
3.4.3.2	Análisis de compuestos apolares y semipolares .....	56
3.4.3.3	Análisis de compuestos volátiles.....	57
3.4.4	Análisis estadísticos.....	57
3.4.4.1	Comparación de la concentración media de los metabolitos entre variantes blancas y tintas.....	57
3.4.4.2	Análisis multivariante de la composición de las uvas .....	58

3.5	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS Y ANÁLISIS DE SNP .....	58
3.5.1	Extracción de ADN .....	58
3.5.2	Extracción de ARN .....	58
3.5.3	Análisis de SNP .....	59
3.6	ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA .....	62
3.6.1	Re-secuenciación de genomas de accesiones de Garnacha .....	62
3.6.1.1	Alineamiento .....	62
3.6.1.2	Análisis de la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 2 .....	63
3.6.1.3	Análisis de número de copias en el cromosoma 2 a partir de los datos de secuenciación del genoma .....	63
3.6.2	Secuenciación de ARN .....	63
3.6.2.1	Alineamiento de las secuencias de ARN .....	64
3.6.2.2	Análisis de expresión diferencial del transcriptoma .....	64
3.6.2.3	Análisis de enriquecimiento funcional .....	64
4	RESULTADOS .....	69
4.1	VARIACIÓN PARA CARACTERES RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN Y LA COMPACIDAD DEL RACIMO EN UNA COLECCIÓN DE ACCESIONES DE GARNACHA BLANCA .	69
4.1.1	Selección de accesiones y caracteres .....	69
4.1.2	Variabilidad, estabilidad y relaciones entre los caracteres .....	70
4.1.3	Variabilidad y estabilidad de las accesiones .....	73
4.1.3.1	Análisis de viabilidad del polen .....	78
4.2	CARACTERIZACIÓN DEL ORIGEN DE LA PÉRDIDA DE COLOR DE LA BAYA EN LA VARIEDAD GARNACHA .....	80
4.2.1	Selección de un conjunto de marcadores SNP para el seguimiento de la heterocigosidad a lo largo del cromosoma 2 de la vid .....	80
4.2.2	Caracterización de patrones de pérdida de heterocigosidad del cromosoma 2 en distintas accesiones de Garnacha Blanca .....	82
4.2.3	Análisis de la secuencia genómica de variantes de Garnacha Blanca representativas de cada patrón de pérdida de heterocigosidad .....	84
4.2.3.1	Pérdida de heterocigosidad .....	85
4.2.3.2	Variación en el número de copias .....	85
4.2.4	Análisis de la segregación de los marcadores SNP a lo largo del cromosoma 2 .	92
4.3	CONSECUENCIAS DE LA VARIACIÓN DEL COLOR DE LA UVA EN SU DESARROLLO Y COMPOSICIÓN .....	95
4.3.1	Efecto de la variación del color en la composición de la uva .....	95
4.3.1.1	Metabolitos primarios .....	95
4.3.1.1.1	Azúcares y ácidos orgánicos .....	95
4.3.1.1.2	Aminoácidos .....	98

4.3.1.2	Fenilpropanoides.....	104
4.3.1.2.1	Antocianinas .....	104
4.3.1.2.2	Flavonoles.....	104
4.3.1.3	Precusores de compuestos volátiles y compuestos volátiles .....	106
4.3.1.3.1	Precusores apolares .....	106
4.3.1.3.2	Precusores semipolares .....	110
4.3.1.3.3	Compuestos volátiles .....	115
4.3.2	Análisis transcriptómico del efecto de la variación en el color de la baya .....	120
4.3.2.1	Análisis MDS de la variación de la expresión génica en los datos RNA-seq 121	
4.3.2.2	Identificación y caracterización de genes expresados diferencialmente entre variantes de color de baya .....	121
4.3.2.3	Análisis de los perfiles de expresión y caracterización funcional de los genes expresados diferencialmente entre variantes somáticas de color de baya .....	124
4.3.2.4	Niveles de expresión de los genes que se encuentran en hemicigosis en las variantes de uva blanca.....	132
4.3.3	Relación entre los cambios del transcriptoma y de la composición de la baya resultantes de la variación para el color .....	133
4.3.3.1	Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de flavonoides y factores de transcripción relacionados.....	134
4.3.3.2	Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de ácidos hidroxicinámicos y derivados hidroxicinámicos.....	137
4.3.3.3	Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de carotenoides.....	140
4.3.3.4	Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de clorofilas .....	142
4.3.3.5	Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de monoterpenos.....	144
4.3.3.6	Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de compuestos C6 volátiles derivados de ácidos grasos .....	145
5	DISCUSIÓN.....	151
5.1	INFLUENCIA DE FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN LA VARIACIÓN PARA CARACTERES DE PRODUCCIÓN Y COMPACIDAD EN GARNACHA BLANCA.....	151
5.2	ORIGEN GENÉTICO DE GARNACHA BLANCA .....	154
5.2.1	Las variantes blancas de la variedad Garnacha se originan como consecuencia de deleciones en el cromosoma 2.....	154
5.2.2	La pérdida de color se ha producido de manera independiente en múltiples ocasiones en Garnacha .....	155
5.2.3	La presencia de las deleciones identificadas en GB no se asocia con una disminución de la viabilidad del polen ni con efectos deletéreos en la producción. ....	160

5.3	RELACIONES ENTRE EL COLOR DE LA UVA Y SU COMPOSICIÓN .....	160
5.3.1	La función de los genes <i>VviMYBA</i> se asocia a la activación de mecanismos de protección durante la maduración del hollejo.....	161
5.3.1.1	Los genes <i>VviMYBA</i> activan la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides a distintos niveles.....	161
5.3.1.1.1	Los genes <i>VviMYBA</i> activan mecanismos de protección frente a estrés biótico y abiótico .....	164
5.3.2	La ausencia de antocianinas desencadena efectos indirectos relacionados con una mayor percepción de la radiación solar en uvas blancas.....	167
5.3.2.1	La ausencia de antocianinas en uvas blancas da lugar a un carácter más afrutado y floral en relación con la mayor radiación que incide en la baya .....	170
5.3.3	Factores genéticos varietales modulan los efectos del cambio de color de la baya.	174
6	CONCLUSIONS .....	177
	BIBLIOGRAFIA.....	179
	ANEXOS, en CD adjunto a la memoria	



## ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.1. Variedades de vid para vinificación más cultivadas en el mundo	3
Tabla 1.2. Clasificación general de los fenilpropanoides	12
Tabla 1.3. Compuestos obtenidos por las diferentes levaduras a partir de los ácidos hidroxicinámicos	25
Tabla 1.4. Principales compuestos derivados de aminoácidos a través de la ruta Ehrlich-Neubauer llevada a cabo por levaduras	25
Tabla 1.5. Superficie cultivada de Garnacha Blanca en el mundo en el año 2015	27
Tabla 3.1. Accesiones analizadas en este trabajo	38
Tabla 3.2. Caracteres de producción y compacidad evaluados en las accesiones de GB	46
Tabla 3.3. Asignación de genotipo en función de la fluorescencia para cada alelo para dos de los SNP analizados	60
Tabla 3.4. Ejemplo de segregación en individuos de la población de autofecundación de la accesión GB71 de un SNP que se halla en heterocigosis en el parental	62
Tabla 3.5. Ejemplo de segregación en individuos de la población de autofecundación de la accesión GB71 de un SNP que se halla en hemicigosis en el parental (y heterocigosis en GT)	62
Tabla 4.1. Estadística descriptiva para los caracteres estudiados en 2015 y 2017	70
Tabla 4.2. Correlación Tau-b de Kendall entre caracteres	72
Tabla 4.3. Variación entre accesiones por carácter y año	73
Tabla 4.4. Variabilidad interanual entre el año 2015 y el año 2017 por carácter y accesión	76
Tabla 4.5. Análisis de los factores año y accesión en la variación de GB	78
Tabla 4.6. Viabilidad del polen en distintas accesiones de GB	79
Tabla 4.7. Resumen de la cantidad de lecturas de secuenciación obtenidas para las muestras de de DNA genómico de Garnacha y de su alineamiento con el genoma de referencia	85
Tabla 4.8. Segregación alélica de los SNP analizados mediante el chip de SNP del cromosoma 2 en las autofecundaciones de GB y de GT	93
Tabla 4.9. Segregación del fenotipo de fluorescencia en el chip de SNP del cromosoma 2 en las autofecundaciones de GB para los SNP que muestran pérdida de heterocigosis en los respectivos progenitores GB	94
Tabla 4.10. Características de las uvas muestreadas	96
Tabla 4.11. DEG en hollejo y pulpa de Tempranillo y de Garnacha	123

## ÍNDICE FIGURAS

Página

Figura 1.1. Fases de desarrollo de la baya	6
Figura 1.2. Partes de la baya	6
Figura 1.3. Tipos de flavonoles y su forma química	12
Figura 1.4. Tipos de antocianinas y su forma química	13
Figura 1.5. Rutas de síntesis de los principales grupos de fenilpropanoides a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina	13
Figura 1.6. Ruta de síntesis de antocianinas a partir de fenilalanina	14
Figura 1.7. Variación somática para el color de baya	17
Figura 1.8. Ruta del fosfato de metileritritol (MEP) y síntesis de monoterpenos	21
Figura 1.9. Ruta de síntesis de carotenoides	22
Figura 1.10. Ruta de síntesis de alcoholes, aldehídos y ésteres volátiles derivados de los ácidos grasos ácido linoleico y ácido linolénico	24
Figura 1.11. Superficie cultivada de vid ( <i>Vitis vinífera</i> subsp. <i>vinífera</i> ) en el mundo en 2017	26
Figura 1.12. Racimo de Garnacha Blanca	29
Figura 3.1. Áreas de prospección	37
Figura 3.2. Plantación de las accesiones de GB en la finca de Baretón	40
Figura 3.3. Diagrama ombrotérmico tipo de Olite	41
Figura 3.4. Gráfico de temperaturas y precipitaciones durante el periodo vegetativo de 2015 (A), 2016 (B) y 2017 (C) en Olite	42
Figura 3.5. Diagrama ombrotérmico tipo de Logroño	43
Figura 3.6. Gráfico de temperaturas y precipitaciones durante el periodo vegetativo de 2015 (A), 2016 (B) y 2017 (C) en Logroño	44
Figura 3.7. Tinción de Alexander de polen de Garnacha Blanca	47
Figura 3.8. Detalle del marcaje del brote para seguimiento de los racimos	48
Figura 3.9. Detalle del conteo de botones florales	49
Figura 3.10. Representación de los caracteres de anchura (A) y longitud del racimo (B)	49
Figura 3.11. Representación de los caracteres de dimensiones del raquis: longitud de la primera y de la segunda rama, longitud del raquis y longitud del pedicelo	50
Figura 3.12. Anchura (A) y longitud de la baya (B)	51
Figura 3.13. Selección de uvas en base a la densidad	53
Figura 3.14. Representación gráfica de resultados de fluorescencia del chip de genotipado del cromosoma 2 para un SNP dado.	61
Figura 4.1. Diferenciación de las accesiones de GB en 2015 (A) y en 2017 (B) mediante análisis de componentes principales en función de los caracteres diferenciales en cada año.	75
Figura 4.2. Diferenciación de las accesiones en función de sus valores fenotípicos en los dos años de estudio mediante análisis de componentes principales	77
Figura 4.3. Marcadores SNP seleccionados para el chip de análisis de pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 2	81
Figura 4.4. Patrones de pérdida de heterocigosidad identificados para el cromosoma 2 en accesiones de GB y GR	83
Figura 4.5. Mapa de distribución de los municipios de origen de las GB recolectadas en La Rioja y Navarra	84
Figura 4.6. Pérdida de heterocigosidad (LOH) y variación en el número de copias a lo largo del cromosoma 2 en GB77	87

Figura 4.7. Pérdida de heterocigosidad (LOH) y variación en el número de copias a lo largo del cromosoma 2 en GB1662	88
Figura 4.8. Esquema de los patrones de delección identificados del cromosoma 2 en las accesiones GB77 y GB1662	89
Figura 4.9. Presencia de lecturas con alineamiento parcial en la región de inserción de Gret1 del cromosoma 2 en las accesiones de GT	90
Figura 4.10. Alineamiento de lecturas con distancia anómala con respecto del genoma de referencia de la vid en la región de Gret1 en accesiones de GT	91
Figura 4.11. Ejemplo de los fenotipos de fluorescencia para un SNP en hemicigosis en los parentales GB y segregación no esperada en sus progenies de autofecundación	94
Figura 4.12. Contenido de azúcares y ácidos orgánicos en la pulpa	97
Figura 4.13. Contenido en azúcares y ácidos orgánicos en el hollejo	98
Figura 4.14. Contenido en aminoácidos totales en hollejo (A) y en pulpa (B)	99
Figura 4.15. Análisis de componentes principales para la variación en el contenido en aminoácidos	100
Figura 4.16. Análisis PLS-DA para la variación en el contenido en aminoácidos según el factor color de baya	101
Figura 4.17. Aminoácidos que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas	102
Figura 4.18. Aminoácidos que contribuyen a la variación entre TT y GT	103
Figura 4.19. Contenido en antocianinas totales en Tempranillo y Garnacha	104
Figura 4.20. Contenido en flavonoles totales	105
Figura 4.21. Contenido en flavonoles tri-hidroxilados	105
Figura 4.22. Contenido en quercetina y en kaemperol	106
Figura 4.23. Análisis de Componentes Principales y análisis multivariante PLS-DA en el estudio del efecto del color sobre la composición de precursores apolares	107
Figura 4.24. Precursores apolares que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en el hollejo	108
Figura 4.25. Precursores apolares que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en la pulpa	109
Figura 4.26. Análisis de Componentes Principales y análisis PLS-DA para el efecto color sobre los precursores semipolares	111
Figura 4.27. Precursores semipolares que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en hollejo	112
Figura 4.28. Precursores semipolares que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en pulpa	113
Figura 4.29. Precursores semipolares que contribuyen a la variación entre TT y GT	114
Figura 4.30. Análisis de Componentes Principales y análisis PLS-DA para el efecto del color sobre la composición de compuestos volátiles	115
Figura 4.31. Compuestos volátiles que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en hollejo	117
Figura 4.32. Compuestos volátiles que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en pulpa	118
Figura 4.33. Compuestos volátiles que contribuyen a la variación entre TT y GT	120
Figura 4.34. Análisis MDS de la variación de los datos RNA-seq	122

Figura 4.35. Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados entre variantes blancas y tintas a lo largo de la maduración para hollejo y pulpa en Tempranillo (Temp) y Garnacha (Gar).	124
Figura 4.36. Agrupamiento según su perfil de expresión de los genes expresados diferencialmente entre TB y TT en el hollejo a lo largo de la maduración	126
Figura 4.37. Agrupamiento según su perfil de expresión de los genes expresados diferencialmente entre TB y TT en la pulpa a lo largo de la maduración	128
Figura 4.38. Agrupamiento según su perfil de expresión de los genes expresados diferencialmente entre GB y GT en el hollejo a lo largo de la maduración	130
Figura 4.39. Agrupamiento según su perfil de expresión de los genes expresados diferencialmente entre GB y GT en la pulpa a lo largo de la maduración	131
Figura 4.40. Diferencias de expresión génica y de composición entre variantes de color de baya en la ruta de biosíntesis de flavonoides y factores de transcripción relacionados	136
Figura 4.41. Diferencias de expresión génica y de composición entre variantes de color de baya en la ruta de biosíntesis de ácidos fenólicos	138
Figura 4.42. Diferencias de expresión génica y de composición entre variantes de color de baya en la ruta de síntesis de carotenoides	141
Figura 4.43. Diferencias de expresión génica y de composición entre variantes de color de baya en la ruta de biosíntesis de clorofilas	143
Figura 4.44. Diferencias de expresión génica y de composición en la ruta de biosíntesis de monoterpenos entre variantes de color de baya	145
Figura 4.45. Diferencias de expresión génica y de composición entre variantes de color de baya en la ruta de síntesis de alcoholes, aldehídos y ésteres volátiles derivados de los ácidos grasos ácido linoleico y ácido linolénico	146
Figura 5.1. Resumen de los patrones de pérdida de heterocigosidad identificados en el cromosoma 2 en accesiones de Garnacha Blanca (GB), Garnacha Roya (GR), Pinot Blanc (PB), Pinot Gris (PG) y Tempranillo Blanco (TB)	157
Figura 5.2. Resumen de los procesos activados en uvas tintas	166
Figura 5.3. Resumen de los procesos activados en uvas blancas	173

## RESUMEN

La vid cultivada se propaga mediante reproducción vegetativa ya que, dada su alta heterocigosidad, es el único modo de mantener las características varietales. En relación con esto, la variación somática es la principal fuente de diversidad genética para la mejora de las variedades tradicionales de vid mediante selección clonal y para la obtención de nuevas variedades derivadas como es el caso de las variantes de color de la uva. Garnacha Blanca (GB) es una variedad de uva blanca derivada de Garnacha Tinta (GT), ambas caracterizadas por problemas en el cuajado de frutos que limitan su producción. Con el objetivo de estudiar el potencial de la variación intravarietal recolectada en GB para la mejora mediante selección clonal de su producción y compacidad de racimo, se estudió el comportamiento de distintas accesiones a lo largo de dos años para variables relacionadas a nivel de planta, racimo y baya. También se analizó, mediante estrategias de genotipado de SNP y de secuenciación masiva, el origen genético y molecular de la pérdida de color de la uva y su posible relación con la producción y la compacidad. Además, la disponibilidad de variantes blancas tanto en Garnacha como en Tempranillo se utilizó para estudiar en detalle los efectos directos e indirectos que la pérdida de antocianinas determina en la composición de la baya, tanto a nivel metabólico como de expresión génica. Los resultados ponen de manifiesto que la tasa de cuajado es la variable más determinante de la variación para la compacidad y la producción en GB y que tiene además una gran dependencia ambiental. Otras variables relacionadas con el tamaño de los frutos tienen sin embargo un menor impacto en la producción y en la compacidad de los racimos. En lo relativo al origen genético de GB, el desarrollo de un chip de genotipado de SNP para el cromosoma 2 ha permitido detectar regiones de pérdida de heterocigosidad alrededor de la posición en la que se encuentra el locus que regula la síntesis de antocianinas en el fruto. La secuenciación y comparación de genomas de GT y GB confirmaron que dicha pérdida de heterocigosidad se da como resultado de deleciones que incluyen la copia funcional de los genes *VviMYBA1* y *VviMYBA2*. Los resultados indican que la presencia de deleciones en hemicigosis no afecta a la transmisión de las regiones mutadas ni reduce la viabilidad de los gametos y por lo tanto no tiene consecuencias a nivel de producción ni de compacidad en GB. Finalmente, la comparación de metaboloma y transcriptoma entre variantes somáticas de color tanto en Garnacha como en Tempranillo identificó el papel regulador de los genes *VviMYBA1* y *VviMYBA2* en la ruta de síntesis de fenilpropanoides y en rutas de respuesta de defensa y protección frente a condiciones de estrés en el hollejo durante la maduración de la baya. Además, en ausencia de antocianos, las uvas blancas acumularon mayores niveles de moléculas fotoprotectoras y antioxidantes alternativas (carotenoides, fenilpropanoides y terpenoides), lo que correlaciona con un aumento de respuestas transcricptómicas a la luz en las bayas blancas. Estas respuestas se asocian con cambios importantes en la composición de las bayas que pueden contribuir al carácter aromático floral, de fruta blanca y herbáceo que caracteriza a los vinos blancos. En conjunto, los resultados contribuyen a un conocimiento más profundo de la variación somática y de sus efectos fenotípicos en lo relativo a la producción del cultivo de la vid y su calidad. Este conocimiento puede servir para optimizar el diseño de los programas de selección clonal y mejorar su eficacia.



## ABSTRACT

Because of their high heterozygosity, grapevine cultivars are reproduced by vegetative multiplication in order to keep their varietal characteristic traits. In this way, somatic variation is the main source of genetic diversity to improve traditional varieties either by clonal selection, or for the generation of new derivative varieties, like berry color variants. Garnacha Blanca (GB) is a white-berried variety derived from Garnacha Tinta (GT). Both varieties display fruit set problems that can limit production. In order to understand potential in GB for clonal selection improvement regarding production and bunch compactness, we studied the variation of related traits at plant, bunch and berry level, in several accessions during two years. We also analyzed the genetic and molecular origin of color loss variation and its relation with production and bunch compactness by SNP genotyping of chromosome 2 and next-generation sequencing strategies. In addition, we used white variants of Garnacha and Tempranillo to assess for direct and indirect consequences of the absence of anthocyanins in berry composition using metabolomic and transcriptomic analyses. Results showed us that the main variable determining variation in production and bunch compactness is fruitset rate and it has strong environmental dependence. Traits related with berry size are less relevant in determining production and bunch compactness. Regarding the genetic origin of GB, the SNP genotyping chip for chromosome 2, allowed us to detect loss of heterozygosity around the region of the berry color locus that regulates anthocyanin biosynthesis in the berry. Sequencing and comparison of GT and GB genomes confirmed that the loss of heterozygosity was caused by deletions of the functional copies of *VviMYBA1* and *VviMYBA2* genes. Segregation and gamete viability analyses showed that these deletions have no negative effects neither in gamete transmission nor in gamete viability, and consequently do not affect production and bunch compactness in GB. Finally, metabolome and transcriptome comparisons between berry color somatic variants unveiled the regulatory role of *VviMYBA1* and *VviMYBA2* genes in phenylpropanoid biosynthesis pathway and in triggering protection against pathogens and abiotic stress in the berry skin during berry ripening. In addition, white grapes accumulated higher levels of alternative photoprotective molecules (carotenoids, phenylpropanoids and terpenoids) correlating with the transcriptional activation of light responses in white berries. These responses associate with important changes in the berry composition and may contribute to floral, white fruit and herbaceous aromatic character, typical of white wines. Altogether, the results contribute to a deeper understanding of somatic variation mechanisms and its phenotypic effects in terms of production and quality in grapes. This knowledge could help to optimize clonal selection programs and increase their efficiency.



# 1.Introducción



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 BIOLOGÍA DE LA VID

### 1.1.1 La especie *Vitis vinifera*

La vid (*Vitis vinifera* L.) pertenece a la familia de las Vitáceas. Las plantas de esta familia son arbustos trepadores, a modo de lianas, de tallo frecuentemente sarmentoso, aunque a veces herbáceo, que presentan zarcillos opuestos a las hojas. La familia comprende aproximadamente 1.000 especies pertenecientes a 17 géneros (Reyner, 2012), entre los que se encuentra el género *Vitis*, que es el de mayor importancia agronómica. De las aproximadamente 60 especies que engloba el género *Vitis*, *V. vinifera* subsp. *vinifera* es la única especie ampliamente utilizada en la industria vitivinícola mundial (This *et al.*, 2006). La especie *V. vinifera* L. es originaria de Eurasia y se cree que apareció hace 65 millones de años (de Saporta, 1879) y su forma silvestre se considera el ancestro de la vid cultivada que conocemos en la actualidad (Levadoux 1956; Zohary,1995). En Eurasia y en el norte de África todavía coexisten la forma cultivada, *V. vinifera* subsp. *vinifera* (o *sativa*) y la forma silvestre *V. vinifera* subsp. *silvestris* (o *sylvestris*). La vid silvestre presenta una distribución amplia, pero discontinua, limitada a riberas arenosas desde Portugal hasta las estribaciones del Himalaya y desde el valle del Rin hasta los bosques del norte de Túnez (This *et al.*, 2006). En algunos países se considera en peligro de extinción, principalmente debido a la destrucción de su hábitat natural y a su susceptibilidad a plagas y enfermedades exóticas procedentes de América como la filoxera, el oídio y el mildiu que el cultivo de la vid ha expandido por su área de distribución (Keller, 2010). Se reproduce por semillas, que germinan en el suelo del bosque. Las plantas utilizan zarcillos para trepar sobre los árboles y alcanzar el dosel del bosque dónde florecen y fructifican al percibir luz. La vid silvestre es dioica y las bayas producidas por las plantas femeninas son pequeñas en comparación con las de la vid cultivada, al igual que los racimos (Carmona *et al.*, 2008). Sus uvas son negras (Royer, 1988) y lo suficientemente dulces para atraer a las aves, que contribuyen a la diseminación de las semillas (This *et al.*, 2006).

### 1.1.2 Origen y evolución del cultivo

La domesticación de la vid se considera ligada al descubrimiento del vino (McGovern *et al.*, 1996; McGovern, 2004). Durante este proceso, la biología de la vid sufrió cambios importantes. Uno de los rasgos más importantes que fue seleccionado por los seres humanos fue la aparición de flores hermafroditas (Doazan y Rives, 1967). Este carácter aumenta la eficacia de la polinización (This *et al.*, 2006; Carmona *et al.*, 2008; Keller *et al.*, 2010). Los cambios en el tamaño de la baya y del racimo también fueron cruciales durante la domesticación (This *et al.*, 2006). Otro cambio importante fue la aparición de plantas con uvas blancas, las cuales fueron seleccionadas y mantenidas durante este proceso (Zohary y Hopf, 2000; Fournier-Level *et al.*, 2009).

Al desarrollo de las variedades cultivadas han contribuido tanto la reproducción sexual, como la propagación vegetativa y las mutaciones somáticas que se producen durante este proceso (This *et al.*, 2006). De hecho, estudios de parentesco demuestran la importancia del uso de semillas en la propagación de la vid (Bowers *et al.*, 1999; Sefc *et al.*, 2001). El cruzamiento forzado por el sistema original de apareamiento dioico en las formas silvestres se relaciona con los altos niveles de heterocigosidad observados en las vides cultivadas (Thomas y Scott, 1993; Zhou *et al.*, 2017). Derivado de ello, cualquier individuo producido a partir de semillas es una combinación novedosa de alelos, resultando en una variación fenotípica respecto a sus progenitores. Así, las

plantas de vid muestran una gran variación en el tamaño de inflorescencia, tamaño de baya, forma y color (This *et al.*, 2006). La reproducción asexual por esquejes (propagación vegetativa) permite mantener el genotipo y conservar los caracteres fenotípicos estables, que segregarían con la reproducción sexual de genotipos heterocigóticos. Este método es el que ha mantenido las variedades a lo largo del tiempo, cada una resultado de la multiplicación de una única planta original procedente de la germinación de una semilla. Sin embargo, la aparición de mutaciones somáticas y su propagación con la multiplicación vegetativa puede conducir a plantas de la misma variedad con distintos fenotipos (This *et al.*, 2006; Pelsy *et al.*, 2010).

### 1.1.3 Variación somática

Ocasionalmente emergen variaciones morfológicas y fisiológicas de manera espontánea en ciertas plantas. Estos cambios fenotípicos pueden ser estables y transmitirse vegetativamente a plantas hijas cuando tienen su origen en mutaciones endógenas que afectan a la codificación y a la expresión de la información genética. Es lo que se conoce como variación somática, ya que tiene su origen en mutaciones que ocurren en las células somáticas durante la proliferación celular en la planta. Las mutaciones somáticas pueden ocurrir por la variación de un solo nucleótido (SNP), por la pérdida (delección) o incorporación (inserción) de secuencias en los cromosomas (INDEL) o por variación estructural del genoma (SV) originada a partir de recombinaciones mitóticas, movimiento de elementos transponibles o reordenamientos cromosómicos relacionados con procesos de rotura y reparación del ADN o alteraciones en la replicación (Fernández *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2013; Emanuelli *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017; Foster y Aranzana, 2018).

Las mutaciones somáticas se producen inicialmente en una única célula y se van multiplicando por división celular. Es decir, sólo si aparecen en células meristemáticas con capacidad de división pueden extenderse por el resto de la planta. En los meristemas de las yemas de la vid se pueden reconocer dos capas independientes: la L1 es la capa celular externa que da lugar a todos los tejidos epidérmicos de la planta y la L2 es la capa subepidérmica que genera los tejidos internos de los distintos órganos como el mesófilo en la hoja, la pulpa de la baya y el periciclo o meristemo vascular que genera las raíces laterales. La L2 también da lugar a los gametos que se transmiten a la siguiente generación sexual, ya que, a diferencia de lo que ocurre en muchos animales, en plantas no hay una línea germinal separada. Las hojas y el hollejo de las uvas están formados por células de ambas capas. De esta manera, al producirse el cambio en el genoma solamente en una de las capas, las mutaciones somáticas dan lugar a tejidos o plantas quiméricas, que contienen células con diversos genotipos que a veces pueden tener efectos funcionales en el fenotipo. Si tras la mutación ocurre una fase de substitución por la que las células de la capa con la mutación dan lugar a la otra capa celular del meristemo, las mutaciones somáticas pueden llegar a estabilizarse en toda la planta de vid. En ocasiones puede darse el proceso celular inverso de reversión de la mutación, cuando son las células de la capa no mutada las que acaban sustituyendo a la capa mutada (Torregrosa *et al.*, 2011).

#### 1.1.3.1 Variación somática en la selección clonal y la generación de nuevas variedades

En la actualidad, a pesar de cultivarse hasta 1.200 variedades de vid para vinificación en las distintas regiones vitivinícolas del mundo (<https://www.adelaide.edu.au/wine-econ/databases/winegrapes/>), solo catorce ocupan más del 50% de la superficie total cultivada

de viña para vinificación (Tabla 1.1). Esto pone en evidencia la preferencia del sector por un número reducido de variedades tradicionales.

**Tabla 1.1. Variedades de vid para vinificación más cultivadas en el mundo. Fuente:** [www.adelaide.edu.au](http://www.adelaide.edu.au)

Variedad	Color	Superficie cultivada (ha)
Cabernet Sauvignon	Tinta	290.091
Merlot	Tinta	267.169
Airén	Blanca	252.364
Tempranillo	Tinta	232.561
Chardonnay	Blanca	198.793
Syrah	Tinta	185.568
Garnacha Tinta	Tinta	184.735
Sauvignon Blanc	Blanca	110.138
Trebbiano Toscano	Blanca	109.772
Pinot Noir	Tinta	86.662
Mazuelo	Tinta	80.178
Bobal	Tinta	80.120
Sangiovese	Tinta	77.709
Monastrell	Tinta	69.850

La variación somática permite desarrollar programas de selección clonal de las variedades tradicionales basados en la diversidad genética acumulada por el material cultivado de cada variedad (variación intravarietal). La propagación vegetativa durante periodos prolongados, como es el caso de la multiplicación varietal en la vid y otros cultivos leñosos, permite que las mutaciones que se producen en distintos ciclos de mitosis se vayan acumulando a lo largo de la historia de una variedad (This *et al.*, 2006). De esta manera, todas las variedades que han pasado por procesos de multiplicación vegetativa pueden considerarse como poblaciones de plantas muy similares, pero con mutaciones en diferentes regiones de su secuencia de ADN y con diferentes grados de quimerismo (Torregrosa *et al.*, 2011), de tal manera que es posible encontrar alta variación dentro de una misma variedad (Anderson *et al.*, 2008; Pelsy *et al.*, 2010; Meneghetti *et al.*, 2012; Ruehl *et al.*, 2015; De Lorenzis *et al.*, 2017; Mercenaro *et al.*, 2016). Esta variación puede darse en cualquier rasgo de interés relacionado con el rendimiento, la calidad y la tolerancia a enfermedades y a diversos tipos de estrés abiótico (Torregrosa *et al.*, 2011). Los programas de selección clonal, método tradicional utilizado para la mejora de una variedad (Reyner, 2012), tratan de explotar esta variación seleccionando plantas sanas con características de interés para la producción vitivinícola y conservando el activo genético a nivel intravarietal.

Por otro lado, en algunas ocasiones, las mutaciones pueden generar nuevos rasgos tan interesantes y diferentes del genotipo original que den lugar a nuevas variedades derivadas (This *et al.*, 2006; Pelsy, 2010). Una ventaja de las variantes somáticas con nuevos caracteres es que probablemente se pueden adaptar a condiciones de cultivo similares a las conocidas para sus variedades ancestrales, además de poder heredar parte del nombre y el reconocimiento de la variedad ancestral por productores y consumidores, lo que facilita su introducción. Este es, por ejemplo, el caso de Pinot Meunier (Franks *et al.*, 2002). Esta variedad es una variante somática

de Pinot Noir que presenta un mayor número de tricomas en sus hojas que su parental. Es de brotación más tardía que Pinot Noir, por lo que es menos propensa a las heladas (Robinson *et al.*, 2012). De maduración más temprana que Pinot Noir, sus vinos son más sabrosos que los de este (Robinson *et al.*, 2012). Durante el año 2010 la superficie cultivada de Pinot Meunier correspondió al 13% de la cultivada de Pinot Noir (<https://www.adelaide.edu.au/wine-econ/databases/winegrapes/>). La variedad Garnacha Peluda, variante somática de Garnacha Tinta, es una variedad que también presenta una mayor pilosidad que su parental (Moreno *et al.*, 1999). Alcanza la madurez fenólica a niveles más bajos de azúcar que la Garnacha Tinta, por lo que sus vinos generalmente tienen menor grado alcohólico (Robinson *et al.*, 2012). Tienden además a tener mayor nivel de acidez. La pilosidad de sus hojas protege a la planta de la transpiración con altas temperaturas, conservando la humedad y reduciendo el estrés. La superficie cultivada en este caso respecto a su parental en 2010 fue mucho menor, no llegando al 1% (<https://www.adelaide.edu.au/wine-econ/databases/winegrapes/>). Así, la variación genética somática ha permitido la diversificación también de la oferta con la elaboración de nuevos vinos. En esta línea, las variantes somáticas para el color de la uva tienen una gran importancia porque suponen la aparición de caracteres varietales nuevos que permiten elaborar distintos tipos de vino.

#### 1.1.4 Ciclo biológico de la vid

La vid es una planta perenne cuyos ciclos anuales son interdependientes, pues las condiciones de un año tienen influencia en los ciclos vegetativos y reproductivos siguientes (Reyner, 2012), debido a que las yemas se diferencian vegetativa y fructíferamente un año y se desarrollan en el siguiente. Durante el periodo de actividad anual se distinguen el desarrollo vegetativo y el desarrollo reproductivo, ambos simultáneos en el tiempo.

Durante el ciclo vegetativo se desarrollan los órganos vegetativos, como son pámpanos, hojas, zarcillos y raíces. El ciclo se inicia cuando la temperatura del suelo es suficientemente alta para que el sistema radical inicie su actividad tras el periodo de reposo invernal, las raíces comienzan a absorber agua. Posteriormente, cuando las temperaturas son superiores a 10°C de manera continua se produce el desborre y la brotación de las yemas de manera acrótona (Reyner, 2012). El desarrollo del pámpano está marcado por tres periodos (aceleración lenta, crecimiento rápido y crecimiento ralentizado) y está influenciado por distintos factores, como la disponibilidad hídrica, la temperatura y el manejo (Reyner, 2012). Al final del ciclo vegetativo se produce el agostamiento, por el cual los pámpanos se lignifican. Durante este proceso la planta pierde humedad, por lo que se produce una concentración de solutos, aumento de la presión osmótica y de la resistencia al frío (Reyner, 2012). La acumulación de sustancias de reserva durante esta fase garantiza una buena brotación y el desarrollo de los pámpanos en las primeras fases del ciclo siguiente.

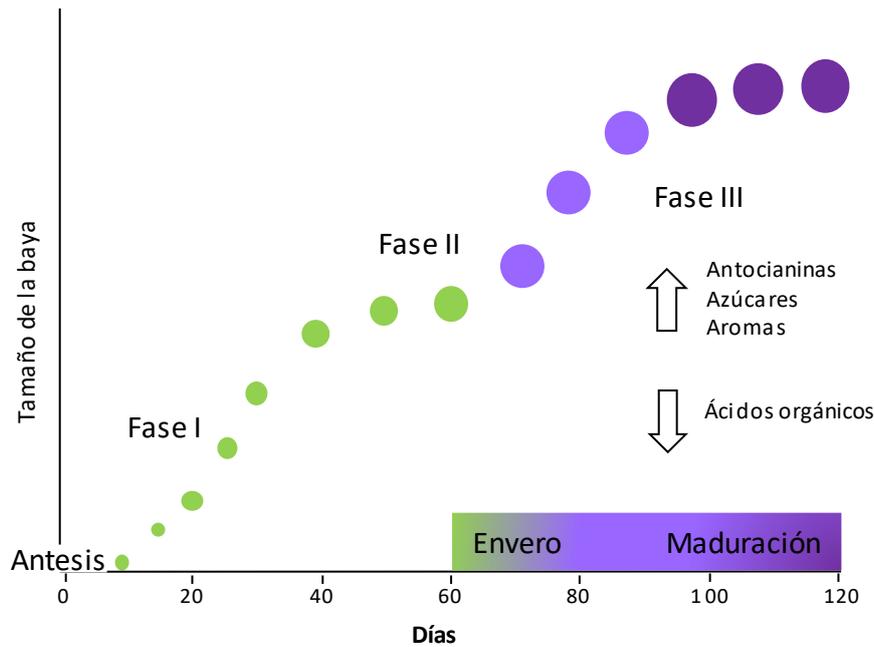
##### 1.1.4.1 Desarrollo reproductivo

El desarrollo reproductivo de la vid se extiende a lo largo de dos ciclos. La diferenciación de los primordios florales se produce durante la primavera y el verano en el primer ciclo en los meristemos laterales de las axilas de las hojas de los brotes en crecimiento (Srinivasan y Mullins 1981; Vasconcelos *et al.*, 2009). Durante el segundo ciclo tiene lugar la floración, polinización y fecundación. La diferenciación de los primordios reproductivos en las yemas se inicia en torno a la antesis de las inflorescencias de los brotes del año, dependiendo el momento de inicio de la

posición en el brote en desarrollo (diferenciación floral acropetal) (Vasconcelos *et al.*, 2009; Eltom *et al.*, 2014, 2015). Esta diferenciación continúa hasta que las yemas entran en latencia (Swanepoel y Archer, 1988; Morrison, 1991), momento en el que las inflorescencias alcanzan un nivel de organización a nivel de ramificaciones, pero todavía no se diferencian los primordios florales (Eltom *et al.*, 2017). El desarrollo de las flores se inicia en la primavera del segundo ciclo, poco antes de la brotación (Eltom *et al.*, 2017). Las flores comienzan a aparecer en la base de las inflorescencias al comienzo de la entrada en vegetación, cuando las escamas de las yemas se abren y dejan pasar al brote. Durante este periodo que va desde el desborre a la antesis, las inflorescencias van gradualmente aumentando de tamaño. El número de flores es muy variable entre las inflorescencias de una misma planta, siendo incluso variable entre inflorescencias de un mismo pámpano (Keller, 2010). La floración sigue una dirección basipétala, abriéndose todas las flores de una misma inflorescencia en un periodo entre cinco y siete días aproximadamente (Keller, 2010). La proporción de flores que se desarrollan en bayas, también conocido como el porcentaje de cuajado, se encuentra normalmente en el rango de 30-50% (Shavrukov *et al.*, 2004; Dry *et al.*, 2010; Ibañez *et al.*, 2018).

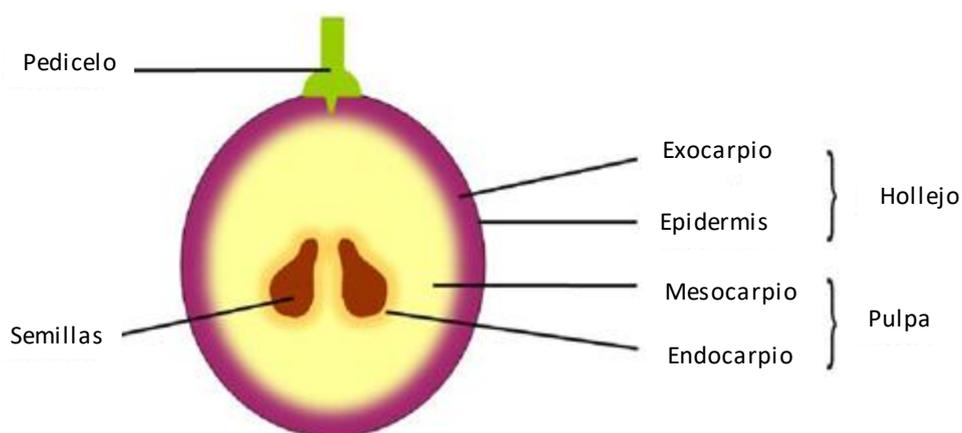
Las altas temperaturas y la buena iluminación tienen un efecto positivo en la inducción y desarrollo de la inflorescencia inmadura en el brote latente en el año uno del ciclo reproductor (Buttrose, 1974; Mullins *et al.*, 1992; May, 2004). Sin embargo, las altas temperaturas alrededor de la brotación pueden disminuir el número de flores por inflorescencia (Petrie y Clingeffer, 2005; Keller *et al.*, 2010; Eltom *et al.*, 2017). También hay evidencia de que las temperaturas bajas después de la brotación pueden aumentar el tamaño de la inflorescencia y el número de flores (Petrie y Clingeffer, 2005). Las condiciones climáticas afectan además al proceso de floración, polinización y cuajado de los frutos, condicionando desde la caída de la caliptra de la flor (Galet, 2000; May, 2004), hasta la germinación del polen y el desarrollo del tubo polínico (Keller *et al.*, 2010). Las temperaturas en el rango de 20 – 30°C son óptimas, mientras que temperaturas mayores o menores afectan negativamente (Keller *et al.*, 2010). Por último, la lluvia también reduce la polinización y el cuajado (May, 2004).

El desarrollo de la baya se inicia tras la polinización y fecundación. La evolución del tamaño de la baya sigue una doble curva sigmoideal que se divide en dos fases de crecimiento activo separadas por una fase de retardo en torno al envero (Coombe y Hale, 1973) (Figura 1.1). La fase I se caracteriza por el crecimiento de la baya, debido a procesos de división y expansión celular que generan el desarrollo y diferenciación del fruto y las semillas. En esta etapa se determina el número de células que tendrá la futura baya y, por tanto, su tamaño potencial (Ojeda *et al.*, 1999; Houel *et al.*, 2013) (Figura 1.1). La temperatura es el principal factor que afecta a esta fase de crecimiento, siendo óptimo el rango 20 – 25°C (Ollat *et al.*, 2002). El crecimiento de la baya se detiene durante la fase estacionaria o fase II que finaliza en el envero, proceso caracterizado por el inicio del ablandamiento de la baya y de su coloración en las variedades tintas, y que marca el cambio fisiológico y metabólico que tiene lugar durante la última fase, la maduración de la baya. Esta última fase, fase III, se caracteriza por el crecimiento de la baya que en este caso se basa principalmente en procesos de expansión celular, y la acumulación de antocianinas (en variedades tintas), azúcares y aromas y degradación de ácidos orgánicos (Figura 1.1).



**Figura 1.1. Fases de desarrollo de la baya.**

Los tejidos de la baya derivan directamente de la pared del ovario y comprenden, de fuera hacia dentro, el exocarpio, el mesocarpio y el endocarpio (Figura 1.2). Las células del exocarpio (hollejo), que comprenden las células de la epidermis y células sub-epidérmicas, acumulan, entre otros polifenoles, antocianinas en sus vacuolas, responsables del color en frutos rojos o negros. El mesocarpio se desarrolla como resultado de múltiples divisiones celulares seguidas de expansión celular. Las células del mesocarpio constituyen la carne o pulpa de la baya y se especializan en la acumulación de azúcares (principalmente glucosa y fructosa), ácidos orgánicos (principalmente ácidos tartárico y málico) y agua. Representan la mayor parte del volumen de la baya. El endocarpio está compuesto por células en capas alrededor de los lóculos que contienen las semillas.



**Figura 1.2. Partes de la baya.**

### 1.1.5 El genoma de la vid y sus aplicaciones

La vid es una especie diploide, con un genoma organizado en 19 pares de cromosomas ( $2n=38$ ). Los primeros análisis del tamaño del genoma se realizaron mediante citometría de flujo, y estimaron un tamaño de entre 415 Mb y 483 Mb para el genoma haploide (Lodhi y Reisch, 1995).

Gracias a una colaboración franco-italiana, Jaillon *et al.*, (2007) generaron la secuencia del genoma completo de una línea cuasi homocigótica (PN40024) obtenida por autofecundación de Pinot Noir a lo largo de nueve generaciones. Sin embargo, el genotipo de algunos marcadores microsatélites de esta línea indica que en alguna de las generaciones hubo polinización externa. Esta línea todavía conserva alrededor de un 7% de heterocigosidad que ha sido enmascarada en la secuencia del genoma de referencia. El tamaño del genoma de esta línea se estimó en 487 Mb, con una cobertura 8X que posteriormente se amplió hasta 12X (12X.v0) (Adam-Blondon *et al.*, 2011). Paralelamente, Velasco *et al.*, (2007) secuenciaron el genoma heterocigótico de la variedad Pinot Noir para la que estimaron un tamaño de genoma haploide de 504,6 Mb. En comparación con el genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, el genoma de la vid es cuatro veces mayor. Recientemente se ha actualizado el ensamblaje 12X con una nueva versión (12X.v2) en la que se ha identificado la localización cromosómica de algunos segmentos genómicos para los que todavía se desconocía su posición (Canaguier *et al.*, 2017). La secuencia original del genoma de PN40024 sigue siendo de momento el genoma de referencia en uso en la mayoría de los estudios moleculares de la vid. El desarrollo de nuevos métodos de secuenciación de moléculas de ADN de alto peso molecular y de nuevos procedimientos bioinformáticos está permitiendo la secuenciación y el ensamblaje *de novo* de distintos genomas varietales como Cabernet Sauvignon (Chin *et al.*, 2017) y Chardonnay (Roach *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018). Esto permite aumentar la información sobre el genoma de la especie y utilizar estos genomas como referencia en aquellas ocasiones en que pueda ser más conveniente.

Existen distintas versiones para la anotación de los genes del genoma de la vid. La versión 12Xv0 se desarrolló inicialmente mediante el programa de anotación automática GAZE (Howe *et al.*, 2002) en Genoscope, Centro Nacional de Secuenciación de Francia. Posteriormente, tras combinar la v0 con otra predicción adicional desarrollada con el programa JISAW (Allen y Salzberg, 2005) en el centro Biotecnológico de la Universidad de Padova, Italia (CRIBI, *Centro di Ricerca Interdipartimentale per le Biotecnologie Innovate*) se desarrolló la versión 12Xv1 (Grimplet *et al.*, 2012). Esta versión 12Xv1 de la anotación del genoma es la más utilizada actualmente e identifica un total de 29.971 genes. En los últimos años se trabaja también con una nueva anotación del genoma, la versión VCostV3 (Canaguier *et al.*, 2017). A diferencia de las anteriores, esta anotación no solo involucró una nueva predicción automática de los genes, sino que fusionó las predicciones anteriores identificando un número mucho mayor de genes, 42.414, aunque no se descarta que parte de ellos sean pseudogenes (Canaguier *et al.*, 2017).

El genoma de referencia sirve como marco sobre el que alinear lecturas de DNA obtenidas mediante secuenciación masiva (NGS). Esta re-secuenciación permite detectar polimorfismos específicos en el genoma de las variedades o variantes somáticas analizadas respecto al genoma de referencia y, en consecuencia, detectar diferencias entre distintos genotipos. De esta manera se pueden abordar estudios que identifiquen las diferencias entre el genoma de una variedad y una variante somática de ésta, con el fin de detectar cambios que puedan ser la causa de determinadas variantes fenotípicas (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017). La disponibilidad del genoma de referencia permite además llevar a cabo estudios de expresión de los todos genes del genoma en la planta, alineando respecto a él las lecturas obtenidas de la secuenciación de RNA (RNA-seq). A partir de los genes que se están expresando en cada momento y de sus niveles de expresión, los análisis de RNA-seq permiten estimar los procesos fisiológicos y metabólicos que tienen lugar en una determinada parte de la planta en un determinado momento del

desarrollo. Gracias a ello, se puede ampliar el conocimiento de los eventos moleculares responsables de los procesos fisiológicos y respuestas de las plantas (Lijavetzky *et al.*, 2012; Royo *et al.*, 2015; Grimplet *et al.*, 2017; Massonet *et al.*, 2017; Grimplet *et al.*, 2019).

#### 1.1.5.1 SNP

Los SNP (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) son posiciones nucleotídicas del genoma que muestran variación entre distintos genotipos. Entre variedades de vid se identifican SNP que se distribuyen a lo largo de toda la secuencia del genoma con una frecuencia extremadamente alta de aproximadamente uno cada 47 pb (Salmaso *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2014; Chin *et al.*, 2017). Esto hace que el uso de polimorfismos tipo SNP tenga múltiples aplicaciones en viticultura, como la identificación genética de variedades, la caracterización de la diversidad genética y el análisis de pedigrís varietales, o el análisis de las bases genéticas de la variación para caracteres agronómicos a través de mapas de ligamiento o análisis de asociación (Myles *et al.*, 2009; Myles *et al.*, 2011; Cabezas *et al.*, 2011; Emanuelli *et al.*, 2013; Laucou *et al.*, 2018). Durante el Proyecto Europeo GrapeReSeq (<https://urgi.versailles.inra.fr/Projects/Achieved-projects/GrapeReSeq>) se desarrolló un chip de genotipado de 18K SNPs como herramienta para la mejora, los estudios de asociación en el genoma y los análisis de diversidad genética (Le Paslier *et al.*, 2013; De Lorenzis *et al.*, 2015; Laucou *et al.*, 2018).

## 1.2 CARACTERES RELEVANTES PARA LA PRODUCCIÓN VITIVINÍCOLA

### 1.2.1 Componentes del rendimiento y de la calidad de la producción

El rendimiento y la calidad son los caracteres que determinan los resultados económicos de una explotación vitivinícola. El reparto de los compuestos orgánicos producidos durante la fotosíntesis, los fotoasimilados, durante el desarrollo de la planta es fundamental para el equilibrio entre el desarrollo vegetativo y el desarrollo reproductivo, influyendo tanto en el rendimiento como en la calidad (Keller, 2010). Los fotoasimilados son transportados desde los órganos productores, las fuentes, a los órganos donde se van a almacenar o a utilizar, los sumideros. La importancia relativa de los diferentes sumideros cambia durante el ciclo anual. El crecimiento de los pámpanos y hojas es de máxima prioridad después de la brotación, cuando la planta necesita desarrollar su vegetación (Hale y Weaver, 1962). Por el contrario, los racimos no son importantes en el reparto de asimilados hasta el momento de la floración (Keller, 2010). Después del cuajado, los racimos se convierten en sumideros importantes y dominan la jerarquía de sumideros durante el desarrollo de las uvas (Keller, 2010). Tras el envero, los racimos son inicialmente fuertes sumideros, pero gradualmente la vid cambia su prioridad hacia el tallo y las raíces para almacenar reservas para la próxima fase de crecimiento (Candolfi-Vasconcelos *et al.*, 1994).

#### 1.2.1.1 El rendimiento

El rendimiento determina el volumen de vino producido, lo que hace necesaria una cantidad mínima de producción para que las operaciones sean viables para el productor. Este parámetro viene determinado por varios componentes. El número de racimos por planta es el principal componente del rendimiento (Keller *et al.*, 2004; Clingeffer, 2006). Este, junto con el peso del racimo, determina la producción total por planta. El peso del racimo depende a su vez tanto del número de bayas como de su peso. El cuajado es el proceso que determina cuantitativamente los ovarios que se convierten en bayas (May, 2004). Un cuajado normal en la vid se considera en torno a un 50%, mientras que por debajo de un 30% se consideraría un cuajado pobre (Bessis

1993). Un bajo cuajado como consecuencia de un excesivo aborto de flores y ovarios se denomina corrimiento. Por otra parte, el exceso de cuajado de frutos sin semillas y/o de ovarios que permanecen verdes en el racimo da lugar al millerandage (Fougère-Rifot *et al.*, 1995; Galet, 2000; May, 2004). Los racimos con millerandage contienen bayas normales (con al menos una semilla viable) junto con bayas pequeñas que no desarrollan semilla y/u ovarios verdes vivos (LGO, que no se han transformado en bayas y no maduran). El índice de corrimiento y el índice de millerandage son índices que proporcionan información sobre el rendimiento en lo que respecta al peso del racimo. El índice de corrimiento mide la proporción de flores que no se desarrollan en una baya o en un LGO (Dry *et al.*, 2010). El índice de millerandage es una medida de la proporción de órganos en el racimo maduro que no corresponden a frutos maduros con semilla (Dry *et al.*, 2010). Altos niveles de millerandage tienen como consecuencia bajos pesos de racimo, debido al bajo peso total de las bayas. El análisis de los componentes del rendimiento demuestra que el número de racimos por vid explica entre el 58 y el 88% de la variación para la producción, mientras que el peso del racimo explica entre el 11 y el 38% (Clingeffer, 2006). En números redondos, para Li-Maillet *et al.*, (2016) el número de racimos por cepa explicaría el 60% de la variación en el rendimiento, el número de bayas por racimo el 30% y el peso de las bayas el 10% restante.

El genotipo, los factores ambientales y el manejo del cultivo, y la interacción entre ellos, son los factores que influyen en los diferentes componentes del rendimiento. Así, el genotipo tiene un efecto importante con diferencias observadas entre variedades en el número de brotes fructíferos y en el número de racimos por brote (Carmona *et al.*, 2008), así como en el número de flores desarrolladas por racimo (Keller *et al.*, 2010; Eltom *et al.*, 2017). El cuajado es también altamente variable entre variedades, siendo unas más sensibles que otras a los efectos climatológicos adversos (Keller *et al.*, 2001). En lo que respecta al peso de la baya, se observa variación tanto entre distintas variedades como entre clones de una misma variedad (Dai *et al.*, 2011). El tamaño de la baya parece ser dependiente tanto del tamaño inicial del ovario como de la división y expansión celular durante su crecimiento (Houel *et al.*, 2013). A pesar de la gestión activa a nivel de planta, la variación estacional en el rendimiento observado para la vid es debida a las condiciones ambientales y su interacción con el genotipo (Carmona *et al.*, 2008). Las condiciones de luz y temperatura durante la diferenciación floral influyen tanto en el número de inflorescencias por planta como en el número de flores por inflorescencia (Carmona *et al.*, 2008), mientras que las condiciones meteorológicas que se dan durante la floración afectan al cuajado (Carbonneau *et al.*, 2007). Además, problemas en el cuajado del fruto pueden estar relacionados con un menor número de semillas por baya, lo que a su vez influye en el peso de la baya (Ollat *et al.*, 2002; May, 2004). El equilibrio entre la vegetación y el número de uvas también influye en el peso de las bayas. Así, a menor número de uvas por unidad de superficie foliar, mayor será el tamaño de las uvas (Santesteban y Royo, 2006; Keller *et al.*, 2008).

#### 1.2.1.2 La baya

En lo que respecta a la calidad, las características de la uva, sus dimensiones y composición, son los principales determinantes, dado que establecen las características del mosto con el que se va a elaborar el vino. Las dimensiones de la baya establecen la relación hollejo/pulpa, que a su vez condiciona la concentración de los solutos presentes en el hollejo que pasan al mosto (Melo *et al.*, 2015; Gil *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2018). La composición de la uva viene determinada, además de por el genotipo de la variedad, por las condiciones edafoclimáticas y de manejo

realizado (Dai *et al.*, 2011), y por su interacción genética y ambiental con otros caracteres agronómicos de la planta, como la producción y la compacidad del racimo. Así, la producción de uva por planta influye en la composición de tal manera que, a mayor producción, menor es la concentración de azúcares y polifenoles y mayor es la concentración de ácidos orgánicos (Jackson y Lombard, 1993). Pero no es tanto el rendimiento *per se* como la relación entre éste y la vegetación, la carga del cultivo, que es un reflejo de la relación fuente: sumidero (Jackson y Lombard, 1993; Santesteban y Royo, 2006) lo que determina la composición de la baya, y por tanto, la calidad. Como norma general, se requiere un área foliar de 10-15 cm<sup>2</sup> para madurar completamente un gramo de uva (Kliewer y Dokoozlian, 2005).

### 1.2.1.3 La compacidad del racimo

La compacidad del racimo tiene una gran influencia en la calidad de las uvas (Tello e Ibañez, 2018). El desarrollo del hongo *Botrytis cinerea* Pers. es más probable en variedades con racimos muy compactos (Vail y Moris, 1991; Vail *et al.*, 1998; Hed *et al.*, 2009). El íntimo contacto de las bayas en racimos muy compactos impide el correcto desarrollo de la capa de cera de la cutícula (Marois *et al.*, 1986), lo que disminuye su resistencia a patógenos. Además, en el interior de este tipo de racimos, debido a la falta de aireación, se acumula más humedad que favorece la formación de microfisuras en la cutícula generada por la alta presión entre las bayas (Becker y Knoche, 2012). Estas condiciones son ideales para el desarrollo de la podredumbre causada por este hongo. La presencia de *Botrytis* disminuye tanto la calidad como el rendimiento, dado que las características indeseables que se desarrollan en las uvas por la presencia del hongo y que pueden ser transmitidas a los vinos (Ky *et al.*, 2012), hacen que se rechacen para vinificación los lotes o parcelas de uva con alta afección de la enfermedad. Por otro lado, la maduración no es homogénea en racimos con alta compacidad, madurando antes las bayas externas que las internas, debido a la deficiente incidencia de luz solar en las últimas (Vail y Moris, 1991). La heterogeneidad en la maduración puede provocar que los análisis de maduración, previos a la vendimia, no sean lo suficientemente representativos del estado de madurez de las uvas y por lo tanto que la calidad obtenida en vendimia no coincida con la esperada.

La compacidad del racimo depende de las características del mismo. En términos morfológicos, la compacidad se define como la diferencia entre el volumen de las bayas y el raquis y el volumen tridimensional que ocupa el racimo (Sepahi 1980; Shavrukov *et al.*, 2004). Tello *et al.*, (2015) estudiaron un total de 125 accesiones de 118 variedades de vid diferentes y observaron que la arquitectura del raquis, el número de bayas por racimo y el tamaño de las bayas son los componentes principales que determinan la compacidad del racimo. La longitud de la primera ramificación del racimo logró explicar un 33,4 % de la varianza en la compacidad, el número de bayas por racimo un 29,7% y el tamaño de las bayas un 2% (Tello *et al.*, 2015).

### 1.2.2 Composición y calidad de la baya

La calidad de la uva viene determinada por su composición en metabolitos primarios, como azúcares y ácidos orgánicos, y en metabolitos secundarios tales como fenilpropanoides y compuestos volátiles. Todos estos compuestos contribuyen a las características organolépticas de uvas y vinos. Así, en los mostos, el aspecto visual depende tanto del contenido en antocianinas y en flavonoles como del pH; las sensaciones en nariz dependen de la composición de moléculas volátiles. Finalmente, las sensaciones en boca están relacionadas tanto con el contenido en azúcares y ácidos orgánicos, como en fenilpropanoides, principalmente taninos.

### 1.2.2.1 Color de la baya

El color de la uva es un rasgo relevante en la vitivinicultura debido a que determina el tipo de vino que se puede elaborar. La presencia o ausencia de antocianinas en el hollejo de las uvas es un rasgo varietal genético que determina el color de la baya y con ello, el tipo de elaboración que se puede realizar y, por tanto, el producto final obtenido. En el proceso de elaboración de vino blanco con variedades blancas, la fermentación se lleva a cabo sin presencia de los hollejos, mientras que en la elaboración de vino tinto con variedades tintas la fermentación se realiza con los hollejos. La presencia de los hollejos durante la fermentación permite que pasen al mosto los compuestos presentes en ellos, tanto fenólicos como aromáticos.

#### 1.2.2.1.1 Fenilpropanoides y antocianinas

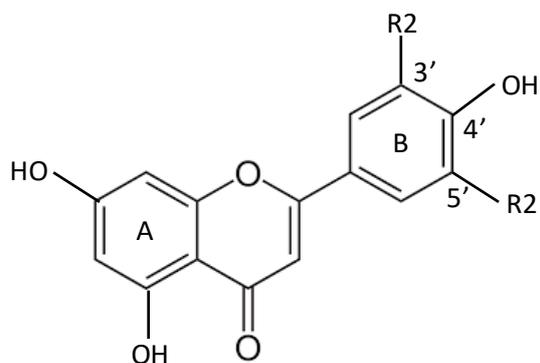
El color tinto de la uva se debe a la acumulación de antocianinas en las vacuolas de las células del hollejo (Boss *et al.*, 1996). Las células de la pulpa no acumulan pigmentos más que en las variedades tintoreras (Xie *et al.*, 2015). Las antocianinas pertenecen al grupo de metabolitos secundarios de los fenilpropanoides, los cuales constan de un anillo bencénico que contiene al menos un grupo hidroxilo. Éstos son de gran importancia en uvas y vinos dado que intervienen en propiedades sensoriales como color, astringencia, amargor y aspereza (Moreno y Peinado, 2010). Los fenilpropanoides se clasifican en dos grandes grupos: no flavonoides, que se acumulan principalmente en la pulpa, y flavonoides, que se acumulan principalmente en el hollejo, las semillas y los tallos (Keller, 2010). Los no flavonoides constan de un anillo bencénico mientras que los flavonoides constan de dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo. En el grupo de los no flavonoides se encuentran los ácidos fenólicos y los estilbenos, mientras que en el de los flavonoides se encuentran los flavonoles (heterociclo tipo pirona), los flavanoles (heterociclo tipo pirano) y las antocianinas (heterociclo tipo pirilo) (Tabla 1.2). Los taninos son el resultado de la polimerización de los flavanoles.

Los flavonoles y las antocianinas se clasifican a su vez por el número y el tipo de sustitución en el anillo B. Los flavonoles se distinguen en monohidroxilados, dihidroxilados y trihidroxilados (Figura 1.3). El kaempferol está monohidroxilado en la posición 4'; la quercitina está dihidroxilada en las posiciones 3' y 4'; la miricetina está trihidroxilada en las posiciones 3', 4' y 5'; y laricitrina y siringetina son las formas metiladas de miricetina. En la misma línea, las antocianinas se dividen en dihidroxiladas y trihidroxiladas (Figura 1.4). La cianidina está dihidroxilada en las posiciones 3' y 4'; la delphinidina está trihidroxilada en las posiciones 3', 4' y 5'; peonidina es la forma metilada de cianidina; y malvidina y petunidina son las formas metiladas de delphinidina. Ambos grupos muestran diferente coloración, siendo cianidina y peonidina de colores rojizos y delphinidina, petunidina y malvidina de colores más azulados y morados (Flamini *et al.*, 2013). La malvidina es la antocianina más abundante en todas las variedades de uva tinta o roja. Sin embargo, la concentración del resto de antocianinas, así como las distintas combinaciones que pueden formar es muy variable entre variedades. Esta variabilidad permite explicar las diferentes tonalidades que se observan entre variedades, debido a su diferente composición, tanto cualitativa como cuantitativa (Moreno y Peinado, 2010).

**Tabla 1.2. Clasificación general de los fenilpropanoides** (Moreno y Peinado, 2010; Flamini et al., 2013).

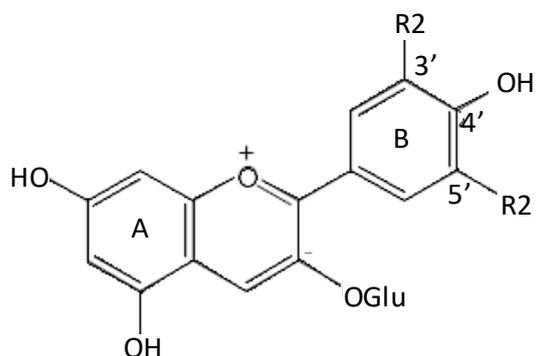
<b>No flavonoides</b>	<b>Ácidos fenólicos</b>	<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>	Ácido cinámico
			Ácido cumárico
			Ácido cafeico
			Ácido ferúlico
			Ácido 5-hidroxiferúlico
			Ácido sinápico
	<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>	Ácido p-hidroxibenzoico	
		Ácido gálico	
		Ácido siríngico	
		Ácido vainílico	
	<b>Estilbenos</b>	Resveratrol	
		Pterostilbeno	
		Piceida	
Viniferinas			
<b>Flavonoides</b>	<b>Flavonoles</b>	Miricetina	
		Laricitrina	
		Siringetina	
		Quercitina	
		Kaempferol	
	<b>Flavanoles</b>	Catequinas	
		Epicatequinas	
		Epigalocatequinas	
	<b>Antocianinas</b>	Cianidina	
		Delfinidina	
		Peonidina	
		Petunidina	
		Malvidina	

Flavonoles	R1	R2
Kaempferol	H	H
Quercitina	OH	H
Miricetina	OH	OH
Laricitrina	OCH <sub>3</sub>	OH
Siringetina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



**Figura 1.3. Tipos de flavonoles y su forma química** (Moreno y Peinado, 2010; Flamini et al., 2013).

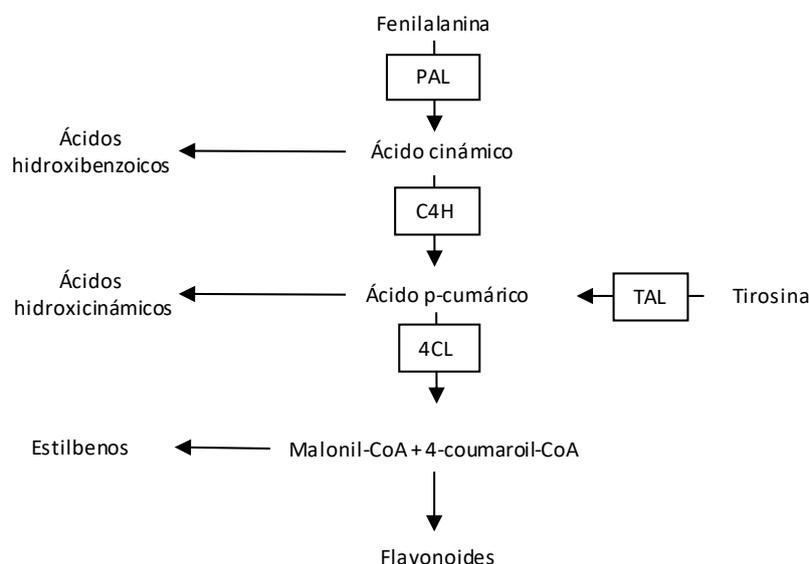
Antocianinas	R1	R2
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



**Figura 1.4. Tipos de antocianinas y su forma química** (Moreno y Peinado, 2010; Flamini et al., 2013).

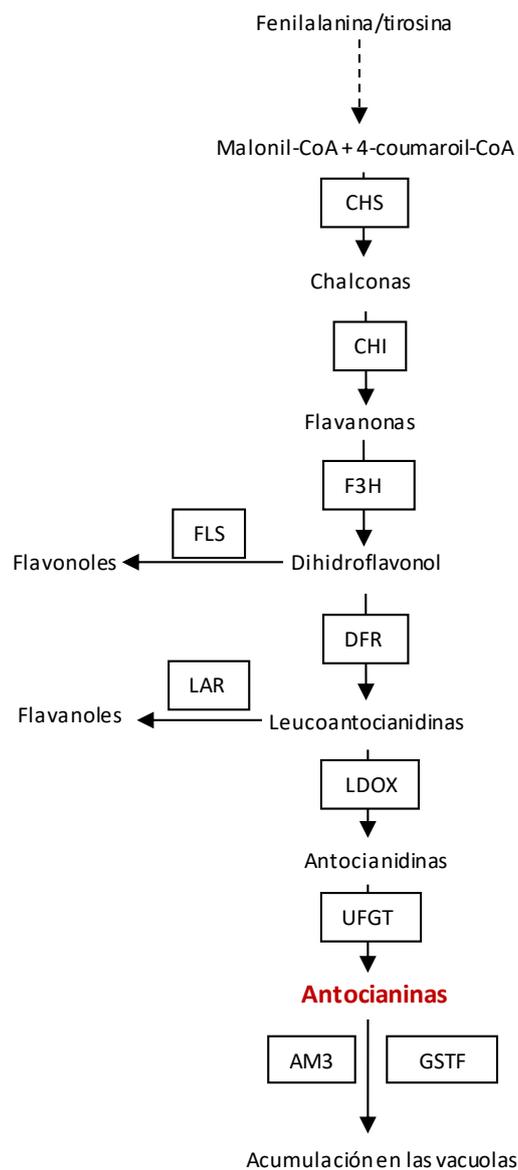
#### 1.2.2.1.1.1 Ruta de los fenilpropanoides y síntesis de antocianinas

La ruta de síntesis de fenilpropanoides en general y de antocianinas en particular deriva principalmente de la ruta del shikimato. Esta ruta se localiza en los cloroplastos de las plantas y transforma el fosfoenol piruvato y la eritrosa 4-fosfato en los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (precursores de la ruta). La síntesis de fenilpropanoides tiene lugar en el retículo endoplasmático de las células como consecuencia de la actividad de varios enzimas (Boss *et al.*, 1996a, 1996b). La síntesis comienza con la conversión de fenilalanina en ácido cinámico mediante la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave en la ruta (Figura 1.5).



**Figura 1.5. Rutas de síntesis de los principales grupos de fenilpropanoides a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina.** PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; TAL, tirosina amonio liasa; 4CL, 4-cumarato-CoA ligasa (Boss *et al.*, 1996b; Navadi *et al.*, 2018).

A partir del ácido cinámico la ruta se ramifica hacia la síntesis de los ácidos hidroxibenzoicos o continúa hacia el resto de fenilpropanoides con la síntesis del ácido p-cumárico mediante la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H). De manera similar, a partir del ácido p-cumárico surge una ramificación que deriva hacia la síntesis de los ácidos hidroxicinámicos o continúa hacia el resto de fenilpropanoides. La tirosina también puede actuar como aminoácido precursor de fenilpropanoides, transformándose en ácido p-cumárico mediante la enzima tirosina amonio liasa (TAL). A partir del ácido p-cumárico se forma 4-coumaroil-CoA mediante la enzima 4-cumarato-CoA ligasa (4CL). La ruta muestra otra ramificación importante a partir del ácido p-cumárico que da lugar por un lado a la síntesis de estilbenos mediante la actividad de estilbeno sintasas (STS) o continúa hacia la síntesis de flavonoides (grupo al cual pertenecen las antocianinas), mediante la acción de la chalcona sintasa (CHS) (Figura 1.6).



**Figura 1.6. Ruta de síntesis de antocianinas a partir de fenilalanina.** CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavanona- 3-hidroxilasa; FLS, flavonol sintasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; LAR leucoantocianidina reductasa; LDOX, leucoantocianidina dioxigenasa; UFGT, UDP-glucosa:flavonoide 3-O-glucosiltransferasa; GSTF, glutation S-transferasa y AM3, AnthoMATE3 (Boss et al., 1996a; Flamini et al., 2013; Kobayashi et al., 2002; Gomez et al., 2009).

A partir de 4-coumaroil-CoA y 3-malonil-CoA la enzima chalcona sintasa (CHS) da a lugar a las chalconas. Estas a su vez, mediante una reacción de isomerización, son transformadas en flavanonas por la chalcona isomerasa (CHI). Posteriormente las flavanonas son hidroxiladas por la enzima flavonona-3-hidroxilasa (F3H) a dihidroflavonoles, a partir de los cuales puede producirse la síntesis de flavonoles mediada por la flavonol sintasa (FLS) o la síntesis de antocianinas con la reducción de los dihidroflavonoles a leucoantocianidinas mediante la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR). Éstas últimas pueden ser reducidas a flavanoles mediante la leucoantocianidina reductasa (LAR) o dioxigenadas a antocianidinas mediante la leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX). Finalmente, las antocianidinas se transforman en antocianinas mediante la enzima UDP-glucosa:flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (UFGT), pasando de la forma aglicona e incolora a la glucosilada coloreada. La UFGT es la enzima limitante en la síntesis de las antocianinas (Kobayashi *et al.*, 2002). Las antocianinas se acumulan en las vacuolas de las células mediante la acción de transportadores tonoplásticos como las enzimas glutatión S-transferasa o las proteínas transmembrana AnthoMATE (Gomez *et al.*, 2009).

#### 1.2.2.1.2 Control genético del color de la baya

En la uva, la síntesis de antocianinas está regulada por genes localizados en un locus genético de efecto mayor en el cromosoma 2 (Doligez *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2004). En él se encuentran varios genes de la familia MYB (Matus *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2016), dos de los cuales *VviMYBA1* y *VviMYBA2* son necesarios para la pigmentación del hollejo durante la maduración, ya que codifican activadores transcripcionales de los genes que participan en la ruta de síntesis de antocianinas (Kobayashi *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2007). La expresión de los genes *VviMYBA1* y *VviMYBA2* se activa en el hollejo de la baya de las variedades de uva tinta en el envero, el inicio de la maduración (Kobayashi *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2007) y su acción desencadena la expresión de genes diana que codifican actividades enzimáticas tales como UFGT y otras enzimas de la ruta (Kobayashi *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2007; Cutanda-Perez *et al.*, 2009; Rinaldo *et al.*, 2015; Matus *et al.*, 2017).

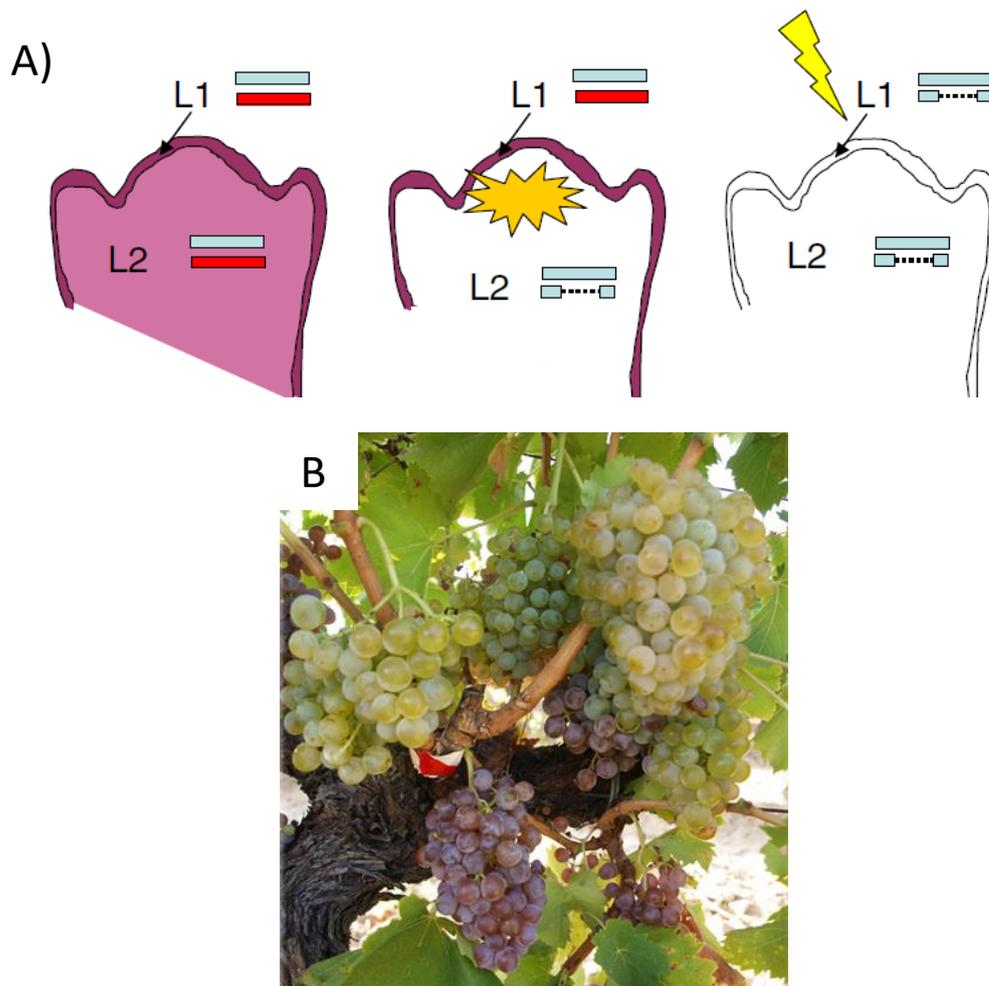
Las variedades blancas son homocigóticas para un alelo nulo del locus de color que presenta mutaciones de pérdida de función en ambos genes *VviMYBA* (Walker *et al.*, 2007). Concretamente, en ese haplotipo el gen *VviMYBA1* es portador de una inserción del retrotransposón *Gret1* en su promotor, que inactiva su expresión (Kobayashi *et al.*, 2004) mientras que *VviMYBA2* presenta un pequeño INDEL que provoca una pérdida del marco de lectura abierta, responsable de su pérdida de funcionalidad (Walker *et al.*, 2007). La presencia de un alelo funcional para el locus de color en heterocigosis es suficiente para la acumulación de antocianinas en variedades tintas. De hecho, el alelo nulo del locus de color es muy frecuente en heterocigosis en variedades tintas (Lijavetzky *et al.*, 2006; Azuma *et al.*, 2007).

Además de *VviMYBA1* y *VviMYBA2*, otros genes de la familia MYB, compuesta en la vid por 134 miembros (Wong *et al.*, 2016) se relacionan con la síntesis de antocianinas, bien como activadores (*VviMYB5a*, Deluc *et al.*, 2006; *VviMYB5b*, Deluc *et al.*, 2008; *VviMYBA6* y *VviMYBA7*, Matus *et al.*, 2017) o como represores (*VviMYBC2-L1* y *VviMYBC2-L3*, Cavallini *et al.*, 2015), con la regulación de la síntesis de proantocianidinas (*VviMYBPA1*, Bogs *et al.*, 2007 y *VviMYBPA2*, Terrier *et al.*, 2009) así como de la de flavonoles (*VviMYBF1*, Czernemmel *et al.*, 2009).

#### 1.2.2.1.2.1 Variación somática para el color de la baya

Tanto en variedades de uva de mesa como en variedades de vinificación aparecen con cierta frecuencia uvas o racimos que muestran un color diferente al de la variedad original. Así, las variantes somáticas de color de la baya descritas en la vid se pueden clasificar en dos grupos (Torregrosa *et al.*, 2011). Por un lado, en variedades blancas aparecen variantes somáticas rosas, rojas o incluso tintas como consecuencia de sucesos de recombinación en el locus de color. Concretamente, la recombinación del retrotransposón *Gret1* que abandona el promotor del gen *VviMYBA1* dejando un solo LTR que permite cierta expresión del gen (Kobayashi *et al.*, 2004; Lijavetzky *et al.*, 2006) es frecuente en variedades de uva de mesa, pero también en variedades de vinificación como Moscatel, Xarello, Malvasia o Chasselas (Lijavetzky *et al.*, 2006; Migliaro *et al.*, 2014). Esta recombinación genera uvas rosas o rojas a partir de uvas blancas. En otros casos, recombinaciones entre distintos genes *VviMYBA* del locus de color reconstituyen nuevos genes funcionales recombinantes que provocan la aparición de uvas tintas en variedades blancas (Azuma *et al.*, 2009).

Por otro lado, las variedades tintas que son heterocigóticas para un alelo funcional y un alelo nulo del locus de color suelen desarrollar variantes somáticas de color gris o blanco como en el caso de Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, Tempranillo Tinto o Garnacha Tinta (Lijavetzky *et al.*, 2006; Vezzulli *et al.*, 2012; Migliaro *et al.*, 2014; Pelsy *et al.*, 2015; Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017). La aparición de uva blanca en variedades tintas tiene lugar generalmente en dos etapas. En una primera etapa se produce la mutación, generalmente una delección, en una célula de la L2 de los meristemas de un sarmiento. Cuando solamente las células de la L2 son mutantes, las uvas muestran una tonalidad grisácea o rojiza debido a la presencia de antocianinas en las células de la epidermis, que proceden de las células no mutadas de la L1 (Figura 1.7) (Walker *et al.*, 2006). La movilidad celular entre las capas L1 y L2 de los meristemas apicales es infrecuente, por ello es posible contar con variedades como Pinot Gris o Garnacha Roja en las que sus dos capas celulares L1 y L2 tienen un genotipo diferente para el locus de color y, a pesar de ello, son lo suficientemente estables como para ser consideradas variedades. Cuando la capa celular L1 es también mutante, el fenotipo de la uva es completamente blanco (Walker *et al.*, 2006). Para ello, se requiere una segunda etapa celular en la que las células mutantes de la L2 colonizan la capa celular L1. En estos casos el fruto deja de sintetizar antocianinas y se obtienen las variantes blancas, como Pinot Blanc o Garnacha Blanca.



**Figura 1.7. Variación somática para el color de baya.** A, modelo por el cual se generan variantes somáticas de uva blanca a partir de variedades de una tinta heterocigóticas para el locus del color, pasando por un estado intermedio de quimerismo en el que la uva es gris o roja (tomado de Walker *et al.*, 2006). B, cepa de Garnacha Roja (quimérica) con un pulgar en el que se ha producido la colonización de las células de la capa L1 por las de la L2 y produce racimos con uvas blancas.

Los primeros estudios de variantes somáticas de pérdida de color en las variedades Cabernet Sauvignon (Walker *et al.*, 2006) y Pinot Noir (Yakushiji *et al.*, 2006), usaron técnicas de Southern blot para demostrar que la pérdida de color estaba relacionada con la delección del alelo funcional de los genes *VviMYBA* del locus de color. Posteriormente, se han utilizado análisis de pérdida de heterocigosidad (*loss of heterozygosity*, LOH) de marcadores moleculares a lo largo del cromosoma 2 para valorar el tamaño de estas delecciones que, aunque siempre incluyen ambos genes *VviMYBA* responsables de la función del locus, pueden presentar una longitud muy variable en cada variante blanca o gris independiente (Vezzulli *et al.*, 2012; Migliaro *et al.*, 2014; Pelsy *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2018). Los marcadores SNP son un tipo de marcador molecular útil a la hora de detectar la presencia de posibles delecciones mediante análisis LOH. Este tipo de análisis representa una primera aproximación en la identificación de posibles delecciones aparecidas en variantes somáticas y en la estimación de su longitud (Vezzulli *et al.*, 2012). La pérdida de heterocigosidad puede deberse a 1) procesos de conversión génica o recombinación somática en los que el alelo nulo sustituye al alelo funcional o, 2) una delección que provoca la

pérdida del alelo funcional dejando al no funcional en hemigosis. La distinción entre ambos procesos requiere la combinación del análisis de secuencias con un análisis de número de copias como el que se realizó en Tempranillo Blanco demostrando que se trata del segundo caso. Así, la secuenciación y comparación de los genomas de Tempranillo Tinto y Tempranillo Blanco ha permitido identificar que un mecanismo molecular complejo descrito como cromotripsis en células animales fue responsable de la pérdida de color en esta variante (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017). La cromotripsis implica la fragmentación masiva de algunos de los cromosomas que forman parte del genoma del organismo y su reordenación aleatoria por parte de la maquinaria de reparación celular. Este fenómeno conlleva frecuentemente la pérdida de información genética. El proceso de reparación se basa en procesos de recombinación de fragmentos no homólogos o que presentan trazas mínimas de microhomología, como se identificó en los puntos de rotura y fusión de Tempranillo Blanco que no se asocian con la presencia de ninguna secuencia particular (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017). En el resto de variedades analizadas por otros grupos, el número de variantes blancas analizadas es bajo y no permite establecer conclusiones sobre la existencia de secuencias específicas con mayor frecuencia de recombinación o puntos calientes a lo largo del cromosoma 2 (Vezzulli *et al.*, 2012; Migliaro *et al.*, 2014; Pelsy *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2018). En este sentido, el caso de la variedad Garnacha Blanca no parece ser una excepción. Hasta ahora se han analizado tres accesiones de Garnacha Blanca y cuatro de Garnacha Roya que globalmente implican cuatro tipos distintos de pérdida de heterocigosidad en la región de los *VviMYBA* (Migliaro *et al.*, 2014). El análisis de un mayor número de individuos de esta variedad, así como la secuenciación de su genoma permitirían, por un lado, identificar, si los hubiere, distintos eventos de mutación y, por otro, confirmar que la pérdida de heterocigosidad se debe, en efecto, a una delección.

La presencia de delecciones de gran tamaño o de reorganizaciones cromosómicas que dan lugar a variantes blancas a partir de variedades tintas, como las descubiertas en Tempranillo Blanco, puede afectar a la viabilidad de los gametos (Carbonell-Bejarano *et al.*, 2017). En el caso de Tempranillo Blanco, se observó una segregación anómala tanto a lo largo del cromosoma 2, como del cromosoma 5, ambos afectados por los procesos de delección y translocación. Esta alteración en la transmisión cromosómica se asocia con un descenso en la viabilidad del polen y una reducción en el cuajado de los frutos, provocando una reducción en la producción.

#### 1.2.2.1.3 Efectos de la variación del color en la composición de la baya

Aparte de la diferencia en la composición de antocianinas, las uvas blancas y tintas presentan ciertas características diferenciales en la composición de sus mostos, aunque no está claro el origen de todas las posibles diferencias. Así, se ha descrito que las uvas blancas acumulan en mayor medida que las tintas compuestos como la fenilalanina (Degu *et al.*, 2015), o fenilpropanoides como ácidos hidroxicinámicos (Degu *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2017) y flavonoles (Degu *et al.*, 2015). En el caso de los flavonoles, cambia además la proporción entre las formas di-hidroxiladas y tri-hidroxiladas respecto a las variantes tintas, aumentando en las uvas blancas la proporción de las formas di-hidroxiladas (Mattivi *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2016). A su vez, la acumulación de antocianinas en las variedades tintas se correlaciona con cambios en el transcriptoma de la baya entre uvas tintas y blancas, que incluyen diferencias importantes en la ruta de fenilpropanoides, especialmente en la rama de síntesis de flavonoides (Massonnet *et al.*, 2017). Así, las variedades tintas muestran mayor expresión respecto de las blancas de los genes codificantes de enzimas a lo largo de toda la ruta de síntesis de antocianinas

a partir del precursor fenilalanina (PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H, F3'H, DFR, LDOX, UFGT) y genes de transporte de las antocianinas a las vacuolas (Castellarin *et al.*, 2007; Cutanda-Perez *et al.* 2008; Rinaldo *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2015; Massonnet *et al.*, 2017). En lo que respecta a cambios en el transcriptoma en relación a los flavonoles, el aumento en la síntesis de formas trihidroxiladas en las variantes tintas se relaciona con la sobre-expresión de isogenes de F3'5'H (Rinaldo *et al.* 2015; Massonnet *et al.* 2017). En la misma línea, en la rama de la ruta de los fenilpropanoides hacia la síntesis de estilbenos, las variedades tintas también muestran mayor expresión respecto a las blancas de genes codificantes de estilbeno sintasas (Rinaldo *et al.*, 2015; Massonnet *et al.* 2017).

Las diferencias entre variedades blancas y tintas en general o entre variantes de color de una misma variedad en lo que respecta a los compuestos volátiles del aroma no han sido muy estudiadas en uva (De Lorenzis *et al.*, 2015; Rambla *et al.*, 2016), ya que los estudios existentes se han focalizado principalmente en la composición fenólica (Mattivi *et al.*, 2006; Degu *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha observado que las uvas de ciertas variedades tintas y blancas tienen perfiles aromáticos diferentes (Rambla *et al.*, 2016), algo que también se observa en los vinos (Genovese *et al.*, 2008; Hernanz *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2015; Cibriain *et al.*, datos no publicados). Así, por ejemplo, en uvas de la variedad tinta Tempranillo se han detectado niveles más altos de compuestos derivados de aminoácidos de cadena ramificada y de lípidos respecto a la variedad blanca Airén, la cual muestra mayores niveles de norisoprenoides y monoterpenos (Rambla *et al.*, 2016). El perfil de compuestos volátiles C6 procedentes de ácidos grasos es además diferente entre ambas variedades. En el estudio del perfil aromático de las variedades tintas Cabernet Sauvignon y Merlot y de las variedades blancas Chardonnay e Italian Riesling, se observa cómo algunos compuestos se acumulan en mayor medida en las tintas (1-hexanol, ácido octanoico, ácido decanoico), mientras que otros lo hacen en las blancas (ácido hexanoico, hexanal, (E)-2-hexenal) (Cheng *et al.*, 2015). Estas diferencias pueden deberse al distinto genotipo de las variedades o también a la influencia en la composición de la uva que pueda tener la presencia o ausencia de antocianinas. En este sentido, las uvas de variedades blancas muestran mayor expresión que las de variedades tintas en genes relacionados tanto con la síntesis de terpenos como con la lipoxigenación de los ácidos grasos que dan lugar a compuestos volátiles C6 (Massonnet *et al.*, 2017). El estudio de uvas blancas y tintas procedentes de variantes somáticas cuasi-isogénicas de la misma variedad permitiría conocer si el color de la uva condiciona su composición más allá de la presencia o ausencia de antocianinas, influyendo así, tanto aromática como fenólicamente en los vinos que se pueden elaborar. En esta línea, la disponibilidad de variantes somáticas de color, como son la Garnacha Tinta y la Garnacha Blanca o el Tempranillo Tinto y el Tempranillo Blanco suponen una oportunidad para llevar a cabo este tipo de estudio y determinar posibles consecuencias adicionales de la variación en el color de la baya.

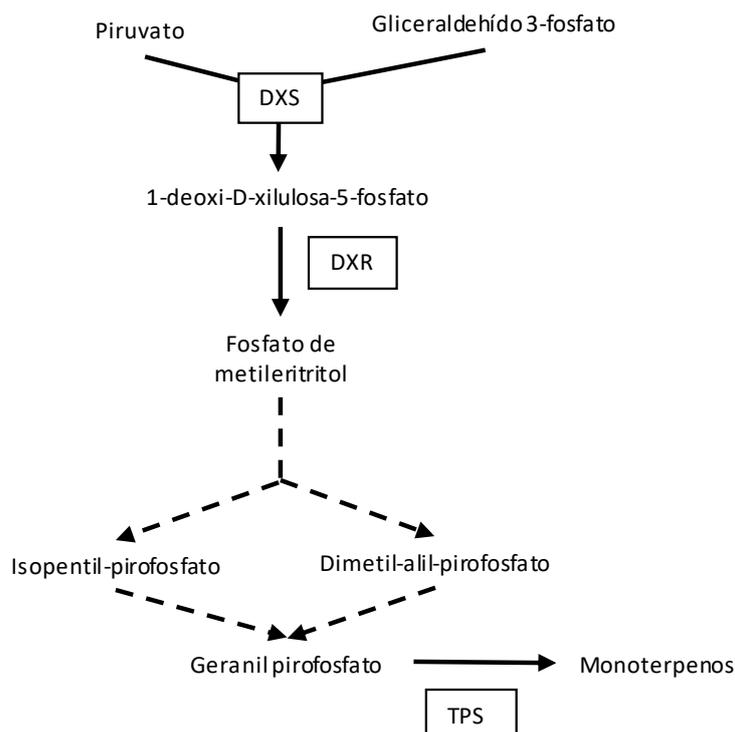
#### 1.2.2.2 Compuestos volátiles y precursores aromáticos en la baya

Los compuestos volátiles de los vinos pueden clasificarse de diversas maneras: en función de su origen varietal o fermentativo, en función de su estructura química o en base a sus rutas biosintéticas. El aroma primario de los vinos viene determinado por compuestos volátiles y precursores de los mismos que se encuentran en las uvas, mientras que los aromas secundarios proceden de la modificación microbiológica de substratos precursores presentes en las uvas y el mosto. Por último, el aroma terciario procede de elementos externos a la uva, como es el

intercambio bioquímico con los compuestos de la madera de la barrica durante la crianza de los vinos. Atendiendo a las rutas de biosíntesis de los aromas primarios, se pueden considerar tres grandes grupos de compuestos volátiles en la uva: los monoterpenos, los norisoprenoides y los compuestos C6 derivados de los ácidos grasos (ácido linoleico y ácido linolénico principalmente). Además de los compuestos C6, a partir de los ácidos grasos se derivan otros compuestos tipo alcoholes, ésteres y aldehídos, cetonas, ácidos o lactonas, producto de la oxidación de los ácidos grasos, cuyas rutas de biosíntesis están menos definidas en uva. Las pirazinas son otro tipo de compuesto volátil del aroma primario con especial relevancia solamente en unas pocas variedades (Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Carmenere) (Flancy, 2003; Moreno y Peinado, 2010; Lei *et al.*, 2018) y cuyas rutas de biosíntesis tampoco están claramente definidas (Lei *et al.*, 2018). Por otro lado, compuestos fenólicos y aminoácidos son precursores destacados de aromas secundarios.

#### 1.2.2.2.1 Monoterpenos

Los monoterpenos pertenecen al grupo del metabolismo secundario de los terpenos, que se clasifican según el número de unidades isopreno que contengan. Así, los monoterpenos contienen dos unidades de isopreno (10 carbonos); los sesquiterpenos, tres (15 C); los diterpenos, cuatro (20 C); los triterpenos, seis (30 C); y los tetraterpenos, ocho (40 C). Los monoterpenos y los sesquiterpenos son los únicos terpenos volátiles. Ambos constituyen la mayor parte de los compuestos volátiles liberados por las plantas tras sufrir daño por herbívoros, atrayendo artrópodos que actúan como enemigos naturales de los primeros (Cheng *et al.*, 2007). Tienen además función antimicrobiana (Cheng *et al.*, 2007). Los monoterpenos derivan del geranil pirofosfato (GPP), que se sintetiza por la condensación del isopentil-pirofosfato (IPP) y del dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP), producidos en la ruta de síntesis del mevalonato (MVA) en el citoplasma celular y en la ruta de síntesis del fosfato de metileritritol (MEP) en los plastos (Figura 1.8). La vía del MEP es la ruta principal de síntesis de monoterpenos en la vid (Luan y Wüst, 2002), y su síntesis se realiza a partir de GPP mediante enzimas terpenos sintasas (TPS). Las enzimas 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXS) y 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) catalizan pasos limitantes en la ruta del MEP. En vid, se ha observado que variedades con elevados aromas terpénicos poseen variantes de la enzima DXS, que determina los niveles de acumulación de monoterpenos junto con las TPS (Duchêne *et al.*, 2009; Emanuelli *et al.*, 2010; Battilana *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015; Sasaki *et al.*, 2016).



**Figura 1.8. Ruta del fosfato de metileritritol (MEP) y síntesis de monoterpenos.** *DXS*, 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; *DXR*, 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa; *TPS*, terpenos sintasas (Sapir-Mir et al., 2008).

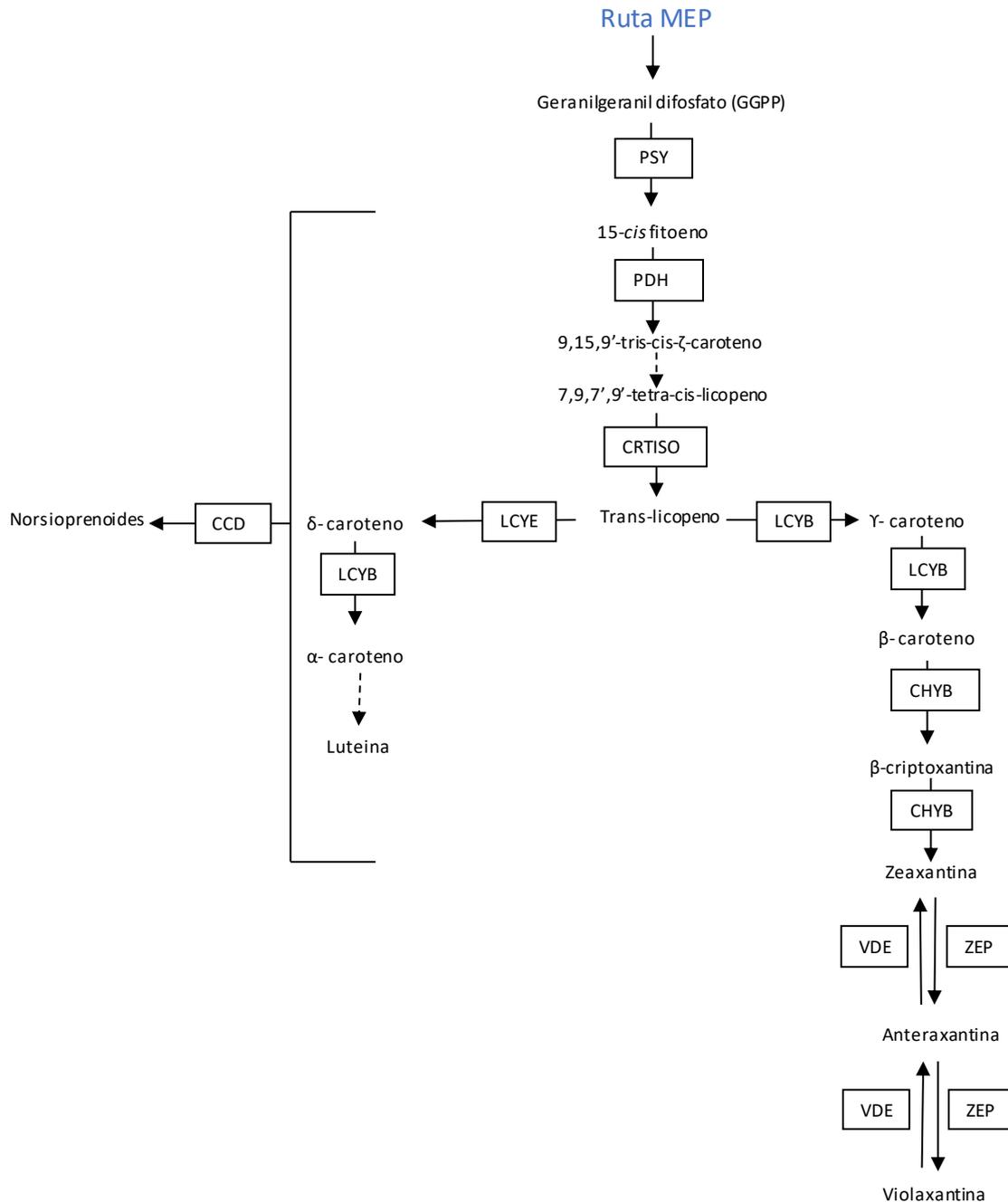
Los monoterpenos forman parte del aroma primario del vino y son responsables en gran medida del llamado carácter varietal (Moreno y Peinado, 2010). A pesar de que la mayor parte de las variedades acumulan monoterpenos, muchas de ellas, como Tempranillo y Garnacha, los acumulan en una cantidad muy baja, no llegando al 1% de la concentración total de compuestos aromáticos en sus vinos (Moreno y Peinado, 2010; Balda, 2014; Oria; 2016). En este sentido, destacan las variedades del grupo Moscatel, con altas concentraciones de monoterpenos, hasta 6 mg/l, en las que estos pueden llegar hasta el 50% de la concentración total de compuestos aromáticos en mostos (Flancy, 2003; Moreno y Peinado, 2010). Estos compuestos se acumulan de manera similar tanto en hollejo como en pulpa (Moreno y Peinado, 2010).

La forma química de los monoterpenos influye en sus características odorantes. Así, los hidrocarburos monoterpénicos, como el limoneno o el p-cimeno, no son muy odorantes, siendo los más importantes en este sentido los alcoholes monoterpénicos, destacando el  $\alpha$ -terpineol, el terpinen-4-ol, el linalol, el nerol, el  $\beta$ -citronelol, el geraniol o el ho-trienol. Presentan aromas florales que recuerdan a rosa, lila, nardos, pero también a miel y cera de abeja (Moreno y Peinado, 2010). Además, los monoterpenos se pueden encontrar libres o unidos a un glucósido, esto es, glicosilados, pero solamente los monoterpenos libres son volátiles, por lo que son los que contribuyen al aroma de manera directa. Los monoterpenos se acumulan en el fruto en forma glucosilada. La hidrólisis de estas formas puede liberar los aromas, por lo que se les considera como precursores aromáticos en las uvas.

#### 1.2.2.2.2 C-13 norisoprenoides

Los C-13 norisoprenoides son hidrocarburos derivados de los carotenoides, que pertenecen a la familia de los terpenos de 40 átomos de carbono (tetraterpenos). Los carotenoides son

pigmentos accesorios en organismos fotosintéticos que se acumulan en hojas, flores y frutos y que tienen una función fotoprotectora para evitar el exceso de radiación y proteger las membranas fotosintéticas. El hollejo es hasta tres veces más rico en carotenoides que la pulpa (Flanzy, 2003).



**Figura 1.9. Ruta de síntesis de carotenoides.** PDH, fitoeno dehidrogenasa; PSY, fitoeno sintasa; CRTISO, carotenoides isomerasa; LCYE, ξ-licopeno ciclasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; CHYB, β-caroteno hidroxilasa; VDE, violaxantina de-epoxidasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa y CCD, dioxigenasa de ruptura de carotenoides (Brandi et al., 2011; Young et al., 2016).

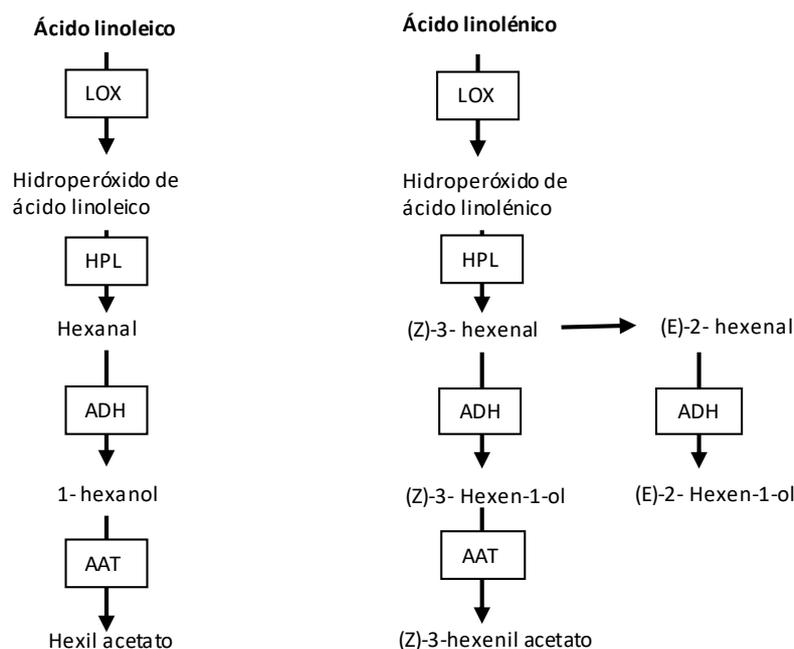
A partir del geranilgeranil difosfato (GGPP) sintetizado a partir de la ruta MEP se sintetiza el fitoeno y, con la deshidrogenación y la isomerización de éste, se obtiene el licopeno. A partir

del licopeno se sintetiza por un lado el  $\delta$ -caroteno, que enlaza con la síntesis de la luteína, y por el otro el  $\gamma$ -caroteno, que enlaza con la síntesis de la zeaxantina, mediada por la enzima violaxantina de-epoxidasa (VED) y la zeaxantina epoxidasa (ZEP) (Figura 1.9). La ruptura enzimática u oxidativa de los carotenoides da lugar a compuestos de menor número de carbonos como son los C-13 norisoprenoides. La enzima responsable de esta ruptura es la dioxigenasa de carotenoides (CCD, del inglés Carotenoid Cleavage Dioxigenase) (Mathieu *et al.*, 2005). Conforme avanza la maduración, los carotenoides se van degradando, aumentando el contenido en C-13 norisoprenoides (Baumes *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2005; Rambla *et al.*, 2016). Los carotenoides, por lo tanto, son precursores de los C-13 norisoprenoides. Estos, al igual que los monoterpenos, pueden presentarse libres o glicosilados, siendo volátil la fracción libre. Tanto los carotenoides como los C-13 norisoprenoides glicosilados constituyen, al igual que los monoterpenos glicosilados, formas de acumulación y son también precursores aromáticos.

Los carotenoides y sus derivados forman, al igual que los monoterpenos, parte del aroma varietal o primario, derivado del perfil propio de cada variedad en este tipo de compuestos (Schwab *et al.*, 2008). Los C-13 norisoprenoides más importantes en las uvas son la  $\beta$ -damascenona (tipo floral),  $\alpha$ - y  $\beta$ -ionona (tipo violeta), vitispirano (tipo eucalipto) y 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN) (Jackson, 2017). En vinos de Garnacha Blanca, de Garnacha Tinta y de Tempranillo Tinto se ha detectado  $\beta$ -ionona y  $\beta$ -damascenona (Garde *et al.*, 2013; Cibriain, datos no publicados).

#### 1.2.2.2.3 Compuestos C6 derivados de ácidos grasos

En la uva aparecen alcoholes y aldehídos, saturados e insaturados, de 6 átomos de carbono originados enzimáticamente por oxidación aeróbica de los ácidos linoleico y linolénico. Estos ácidos grasos se encuentran en las membranas tanto de hollejo como de pulpa. Sin embargo, el hollejo es hasta tres veces más rico que la pulpa, aportando entre el 30-40% de los ácidos grasos de la uva (Flanzy, 2003). La oxidación de los ácidos linoleico y linolénico en sus derivados volátiles está catalizada por enzimas lipoxigenasa (LOX), que los transforma en sus respectivos peróxidos. A partir ellos, la enzima hidroperóxido liasa (HPL) sintetiza los respectivos aldehídos y la alcohol deshidrogenasa (ADH) los transforma en alcoholes. Finalmente, la alcohol acil transferasa (AAT) genera los ésteres (Figura 1.10). Al igual que los monoterpenos, los compuestos volátiles C6 tienen funciones de respuesta antimicrobiana y frente a insectos herbívoros en la planta. Estos compuestos pueden contribuir a potenciar el olor y sabor herbáceo en los vinos (Moreno y Peinado, 2010). Se encuentran en vinos tanto de Tempranillo como de Garnacha (Martínez *et al.*, 2015; Garde *et al.*, 2013; Balda, 2014; Oria, 2016; Cibriain, datos no publicados).



**Figura 1.10. Ruta de síntesis de alcoholes, aldehídos y ésteres volátiles C6 derivados de los ácidos grasos ácido linoleico y ácido linolénico.** LOX, lipoxigenasa; HPL, hidroperóxido liasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; y AAT, alcohol acil transferasa (Qiang et al., 2016; Klee et al., 2018).

#### 1.2.2.2.4 Precursores aromáticos fenólicos: Ácidos hidroxicinámicos

Durante el proceso de fermentación, determinados ácidos hidroxicinámicos pueden ser transformados por las levaduras en compuestos volátiles. Por tanto, los ácidos hidroxicinámicos funcionan también como precursores aromáticos.

Como se ha explicado en el apartado 1.2.2.1.1, los ácidos hidroxicinámicos son fenilpropanoides pertenecientes al grupo de los ácidos fenólicos que se sintetizan a partir del ácido p-cumárico en la ruta de síntesis de antocianinas. Así, a partir del ácido p-cumárico se sintetiza el ácido cafeico y a partir de éste el ácido ferúlico.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* transforma los ácidos ferúlico y p-cumárico en 4-vinilguaicol y 4-vinilfenol respectivamente. Otras levaduras como *Brettanomyces* pueden actuar durante la crianza de los vinos produciendo los fenoles volátiles 4-etilguaicol y 4-etilfenol. Los vinilfenoles (4-vinilguaicol y 4-vinilfenol) y etilfenoles (4-etilfenol y 4-etilguaicol) pueden aportar olores picantes, farmacéuticos, de clavo, y ahumados, fenólicos, a animal, respectivamente (Tabla 1.3). El 4-vinilguaicol y 4-vinilfenol han sido detectados en vinos de Garnacha Blanca, de Garnacha Tinta y de Tempranillo Blanco (Oria, 2016; Cibriain, datos no publicados).

**Tabla 1.3. Compuestos obtenidos por las diferentes levaduras a partir de los ácidos hidroxicinámicos. Se indican las notas aromáticas para cada grupo de compuesto.**

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Brettanomyces</i>
<b>Ácido ferúlico</b>	4-vinilguaiacol	4-etilguaiacol
<b>Ácido p-cumárico</b>	4-vinilfenol	4-etilfenol
<b>Notas aromáticas</b>	Picantes, farmacéuticos, de clavo	Ahumados, fenólicos, a animal

#### 1.2.2.2.5 Precusores aromáticos aminoacídicos

Al igual que en el caso de los ácidos fenólicos, algunos aminoácidos también pueden ser transformados en compuestos volátiles durante el proceso de fermentación por las levaduras (Ehrlich, 1907; Neubauer & Fromherz, 1911) (Tabla 1.4). En condiciones oxidativas, estos precursores aminoacídicos se convierten en ácidos, mientras que en condiciones reductoras se reducen a alcoholes, en ambos casos pasando por aldehídos, los cuales son menos estables.

**Tabla 1.4. Principales compuestos derivados de aminoácidos a través de la ruta Ehrlich-Neubauer llevada a cabo por levaduras.**

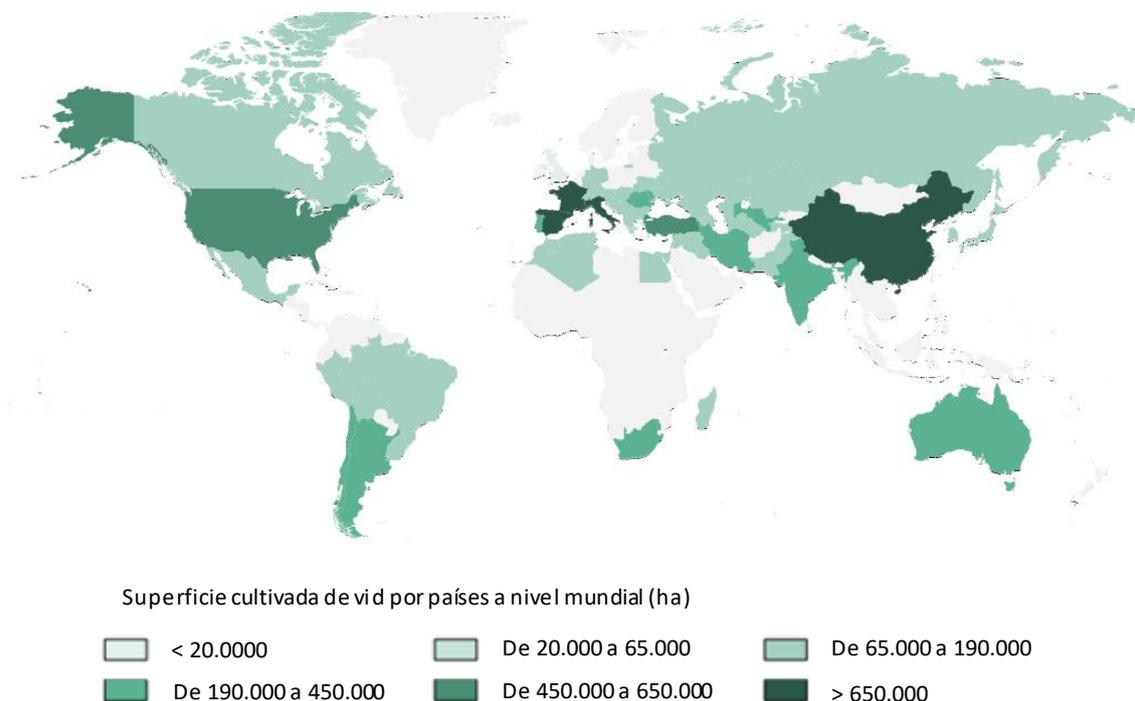
Aminoácido	Aldehído	Alcohol	Ácido
<b>Leucina</b>	3-metil butanal	3-metil butanol	Ácido 3-metil butanoico
<b>Isoleucina</b>	2-metil butanal	2-metil butanol	Ácido 2-metil butanoico
<b>Valina</b>	Isobutanal	Isobutanol	Ácido isobutanoico
<b>Alanina</b>	Acetaldehído	Ethanol	Ácido acético
<b>Metionina</b>	3-metil-tio-propionaldehído	3-metil-tio-propil alcohol	Ácido 3-metiltio propinoico
	Metil-tio-etanal	Metil-tio-etanol	Ácido metil-tio acético
<b>Cisteína</b>	Mercapto-etanal	2-mercapto-etanol	Ácido mercapto acético
<b>Fenilalanina</b>	Fenil-acetaldehído	2-fenil etanol	Ácido fenil acético
	Benzaldehído	Benzil alcohol	Ácido benzoico
<b>Tirosina</b>	(4-hidroxifenil) acetaldehído	2-(4-hidroxifenil) etanol	Ácido (4-hidroxifenil) acético
	Indil acetaldehído	2-indil etanol	Ácido indil acético

Estos compuestos pueden aportar aromas florales o afrutados (Flanzy *et al.*, 2003). Algunos de ellos, como el fenil etanol, el benzil alcohol y el 3-metil butanol se ha detectado en vinos de Garnacha Blanca, de Garnacha Tinta, de Tempranillo Blanco y de Tempranillo Royo (Martínez *et al.*, 2015; Balda, 2014; Oria, 2016; Cibriain, datos no publicados).

### 1.3 LA VITICULTURA EN ESPAÑA Y EN EL MUNDO

La vid, *V. vinifera* subsp. *vinifera*, es una de las especies de frutales más ampliamente cultivadas en el mundo (Figura 1.11) con diferentes aplicaciones, consumo en fresco, producción de pasas y elaboración de vino fundamentalmente. La superficie total cultivada de vid en el mundo fue de 7,5 millones de ha en 2017 (OIV 2018a), lo que supone el 0,15% de la superficie agrícola

mundial (ONU, <https://datos.bancomundial.org>). El 50% de la superficie de viñedo se localiza en 5 países, siendo España el país con mayor superficie cultivada (13% respecto del total), seguido por China (11%), Francia (10%), Italia (9%) y Turquía (7%) (OIV 2018a).



**Figura 1.11. Superficie cultivada de vid (*Vitis vinifera subsp. vinifera*) en el mundo en 2017. Adaptado de OIV 2018a.**

Esta superficie de cultivo generó una producción total de 73,3 millones de toneladas (Mt) de uva en 2017, produciéndose en Europa el 37% del total, el 34% en Asia y el 19% en América. De estos 73,3 Mt el 52% corresponde a uva de vinificación, mostos y zumos, el 42% a uva de mesa y el 7% a uva pasa (OIV 2018a). En el año 2018, la producción de vino se estimó en 282 millones de hectolitros (M hl) a nivel mundial, una de las más altas desde el año 2000 (OIV 2018a).

En España, la actividad vitivinícola es una de las más importantes dentro del sector agroalimentario. Durante 2017, se registró una superficie total de viñedo de 939.283 ha, de las cuales 921.642 correspondían a uva de vinificación (MAPA, 2018). Esta superficie representó el 5,4% de la superficie total dedicada a tierras de cultivo y al 19% de la superficie dedicada a cultivos leñosos (MAPA, 2018). Durante el año 2017 se produjeron en España 5.119.117 de toneladas de uva para vinificación, y una producción de 32.970.178 hl de vino (MAPA, 2017), siendo uno de los países con mayor producción de vino, solamente por detrás de Francia e Italia (OIV 2018). España fue además el principal exportador, con un volumen de 23,2 M hl durante 2017, un 26,1% más respecto a 2013, situándose en tercer lugar en cuanto al valor de las exportaciones por detrás de Francia e Italia (OIV 2018a). Según el último informe publicado en diciembre de 2018 por el Observatorio Español del Mercado del Vino (OEMV) respecto a la exportación de vinos a granel, de enero a octubre de 2018, España exportó 852,5 millones de litros por valor de 513,8 millones de euros.

En España, el 54% de la superficie de viñedo de vinificación se dedica a variedades tintas (MAPA, 2015). La producción de vinos refleja este reparto en la superficie, correspondiendo el 51% de

la producción a vinos blancos y el resto a rosados y tintos (MAPA, 2018). Tempranillo Tinto es la principal variedad tinta (21% de la superficie de viñedo), seguido por Bobal (6,5%) y Garnacha Tinta (6%) (MAPA, 2015). Entre las variedades blancas, Airén es la principal variedad cultivada (23% de la superficie de viñedo), seguida por Macabeo o Viura (4,8%) y Cayetana Blanca (4,2%) (MAPA, 2015).

### 1.3.1 La variedad Garnacha Blanca

La variedad Garnacha Blanca es una variante somática de la variedad Garnacha Tinta (*Vitis International Variety Catalogue, VIVC*) que ha perdido la capacidad de sintetizar antocianinas. Las primeras referencias a su cultivo datan de hace más de 150 años en España, donde Castellet (1865) la nombra en su libro “Enología española o tratado sobre los vinos de España”. Desde entonces, es una variedad que se cultiva en España, principalmente en torno al Valle del Ebro. En 1870 se localiza su cultivo en Rioja, Navarra y Aragón (Hidalgo, 1870). Posteriormente, García de los Salmones (1914) cita su presencia en Logroño, Lugo, Barcelona y Gerona en el Congreso Nacional de Viticultura de 1912, mientras que unos años después Pacottet (1918) la cita entre las variedades blancas cultivadas en Cataluña y en Aragón. En el Anuario de la Vid publicado en 1946 la Garnacha Blanca se cita como una de las variedades cultivadas en España (Xandri *et al.*, 1946). Estas referencias son anteriores a la aparición de Tempranillo Blanco, del cual se tiene constancia en el año 1988 en La Rioja (Martínez *et al.*, 2014). Todas estas referencias son posteriores a las que describen el cultivo de Mazuelo Blanco (*Prime name* en VIVC, Carignan Blanc), cuya primera referencia es de finales del S. XVIII en el Penedés (Domingo y Puig, 2015).

#### 1.3.1.1 Situación del cultivo

En los últimos 20 años, la superficie de Garnacha Blanca cultivada en el mundo ha descendido casi a la mitad. Este descenso ha sido paralelo al descenso en la superficie cultivada de viña a nivel mundial de los últimos quince años (OIV, 2018b). En el año 1999 se cultivaban alrededor de 15.000 ha de Garnacha Blanca (Galet, 2000), mientras que en la actualidad se cultivan unas 8.000 ha (OIV, 2018c). Según describe Galet (2000), el descenso en la superficie de la variedad Garnacha Blanca ha podido ser consecuencia de que los vinos dulces blancos que se elaboraban con ella tuvieron bajo éxito entre los consumidores. En la actualidad, se cultiva en cuatro países del mundo (Tabla 1.5), siendo la región mediterránea europea su principal zona productora (98,3% del total). Francia es el principal país productor, seguido por España en segundo lugar (OIV, 2018c). En el año 2014, la superficie cultivada de Garnacha Blanca en el mundo se situaba en el número 88 del ranking de las ~1.200 variedades para vinificación cultivadas en todo el mundo (<https://www.adelaide.edu.au/wine-econ/databases/winegrapes/>).

**Tabla 1.5. Superficie cultivada de Garnacha Blanca en el mundo en el año 2015 (OIV 2018c).**

País	Superficie cultivada GB (ha)
Francia	5.589
España	2.297
EEUU	135
Macedonia del Norte	70

En España, se cultivan en la actualidad 2.856 ha. Esta superficie la sitúa en el 32º lugar respecto del total de las 174 variedades cultivadas y en el 19º lugar de las 80 variedades blancas cultivadas en España (MAPA, 2015). Siguiendo la línea marcada por las referencias históricas, su cultivo se

localiza principalmente en el Valle del Ebro, región geográfica que incluye a las Comunidades Autónomas de La Rioja, Navarra, Aragón y Cataluña. Las 2.856 ha se distribuyen de la siguiente manera: 159 ha en La Rioja, 115 ha en Navarra, 394 ha en Aragón y 2.188 ha en Cataluña, donde tiene especial relevancia en la provincia de Tarragona. En concreto, en la Denominación de Origen Terra Alta, en la que se adscriben 1.721 ha de Garnacha Blanca, superficie que supone el 60% de la superficie total cultivada en España con esta variedad.

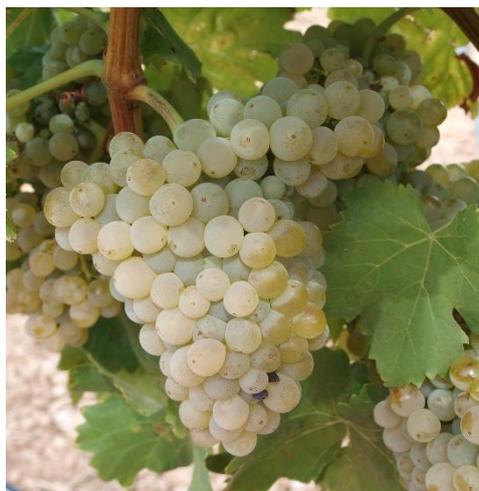
Siguiendo una tendencia a nivel mundial, la superficie cultivada de Garnacha Blanca en las distintas regiones de España experimentó un descenso importante a finales del siglo pasado, excepto en Cataluña. En Navarra disminuyó a la mitad en 25 años, en 2005 quedaban 2,5 ha de las 5,61 que había en 1980; en Aragón se cultivaban 4.155 ha en 1982, mientras que en 2016 esta cifra era de 245 ha; en La Rioja alcanzó un valor mínimo en 2008 con 14,10 ha. Este descenso en la superficie llevó a que los distintos organismos públicos con competencias en materias de agricultura presentes en estas comunidades comenzaran a localizar y recopilar material vegetal de Garnacha Blanca existente en viñas de cierta edad con el fin de conservar la diversidad genética acumulada en la variedad. En los últimos años la tendencia se ha invertido y la superficie cultivada ha comenzado a aumentar en las cuatro Comunidades, lo que refleja el interés creciente hacia esta variedad por parte del sector. En Navarra este aumento ha sido de 112 ha en 14 años y en La Rioja de 145 ha en 11 años. En el caso de Aragón, 164 ha de las 394 ha cultivadas corresponden a plantaciones jóvenes. En Cataluña, 1.056 ha de las 2.188 ha corresponden a plantaciones realizadas a partir del 2005.

La disponibilidad de material vegetal para estas nuevas plantaciones es, sin embargo, baja. En el último listado existente del sistema de certificación español (año 2013) aparecen solo cuatro clones de Garnacha Blanca: 141 y 143, seleccionados por el INRA en 1972 en Francia; y TORRES1 y TORRES2, seleccionados recientemente por Bodegas Torres, pero que no están disponibles en el mercado. La baja disponibilidad de material certificado, así como el interés creciente por esta variedad, llevaron a la Sección de Viticultura y Enología del Gobierno de Navarra (EVENA) a iniciar un proceso de selección clonal a partir del material recopilado en viñedos viejos, con el objetivo de seleccionar y certificar aquellas accesiones que, manteniendo cierta diversidad entre ellas, mejor representaran los criterios de selección establecidos. Los primeros trabajos de caracterización llevados a cabo sobre este material han mostrados que existe diversidad tanto en caracteres agronómicos como en caracteres enológicos del mosto (Andreu *et al.*, 2016).

#### 1.3.1.2 Características varietales

La variedad Garnacha Blanca presenta características agronómicas y enológicas similares a la Garnacha Tinta. De ciclo semilargo, es una variedad de brotación semitemprana, con una fenología referenciada en la región de Navarra de floración en la primera decena de junio, envero a mediados de agosto y maduración de segunda o tercera época, a finales de septiembre primeros de octubre, en función de la tipología de vino deseado (Cibriain *et al.*, 2014). Susceptible a *Botrytis* en floración y, sobre todo, en la maduración. A pesar de ser sensible al corrimiento, se describe como menos susceptible a este que Garnacha Tinta, pero más susceptible a oídio que ésta (Robinson *et al.*, 2012; Cabello *et al.*, 2012; Cibriain *et al.*, 2014; Balda y Martínez de Toda, 2017). Es una variedad muy rústica, adaptable a diferentes climas y suelos y tolera condiciones severas de restricción hídrica (Cibriain *et al.*, 2014; Balda y Martínez de Toda, 2017). Su racimo es de tamaño medio (250-350 g), con tendencia a ser compacto

(Figura 1.12). Sus bayas son esféricas, de tamaño mediano (1,3-1,7 g) (Cabello *et al.*, 2012; Cibriain *et al.*, 2014).



**Figura 1.12. Racimo de Garnacha Blanca.**

Al igual que Garnacha Tinta, sus principales características enológicas son, por un lado, la capacidad para mantener un pH muy bajo y una acidez alta con graduaciones alcohólicas altas (Balda y Martínez de Toda, 2017) y, por otro, la presencia de oxidasas que hacen que sea muy sensible a la oxidación (Cabello *et al.*, 2012; Cibriain *et al.*, 2014). En el color de sus vinos predominan matices amarillos, con notas verdes, dependiendo del grado de evolución. A nivel aromático, presenta una intensidad media, de carácter floral, con notas más frescas o de fruta madura en función del momento de vendimia. En boca es equilibrado, con notable persistencia (Cibriain *et al.*, 2014; Balda y Martínez de Toda, 2017). Se pueden obtener distintos tipos de vino, en función del momento de vendimia y de la elaboración realizada (Cabello *et al.*, 2012; Cibriain *et al.*, 2014).

La falta de homogeneidad en la maduración entre bayas de racimos compactos se vuelve crítica en esta variedad, debido a su bajo pH. En consecuencia, Garnacha Blanca requiere alcanzar un mayor contenido en azúcares para conseguir un mejor equilibrio en boca lo cual prolonga su ciclo de maduración. Su tendencia a la compacidad junto con su maduración tardía incrementa notablemente el riesgo de sufrir infección por *Botrytis*. Por otro lado, de su tendencia al corrimiento se deriva un especial interés en la producción. Por otro lado, su tendencia al corrimiento puede acarrear mermas en la producción. Teniendo en cuenta estas características y que estudios preliminares indican que existe variación intravarietal en GB (Andreu *et al.*, 2006), resulta de interés profundizar en el conocimiento de la variabilidad existente tanto en caracteres relacionados con la producción como con la compacidad y su potencial para la mejora clonal en esta variedad.



## 2.Objetivos



## 2 OBJETIVOS

La variación somática es la fuente de variación genética que permite la innovación varietal en las variedades tradicionales de vid. Esta innovación se basa fundamentalmente en la selección de clones comerciales con caracteres mejorados y, dependiendo de la magnitud o relevancia del carácter, en el desarrollo de variedades derivadas. Este es el caso de las variantes somáticas para el color de la uva que en muchas variedades han generado variedades derivadas.

En la actualidad el interés en la variedad derivada Garnacha Blanca por parte del sector vitivinícola está en auge. Sin embargo, la disponibilidad de clones certificados para realizar nuevas plantaciones es baja, existiendo solamente dos en el mercado. Esto requiere la puesta en marcha de nuevas selecciones clonales que tienen la mejora de la compacidad y la producción como objetivos de interés, dada su influencia directa e indirecta en la calidad y en los resultados económicos de la explotación.

Trabajos recientes en Tempranillo Blanco han puesto de manifiesto que la pérdida del color puede ir asociada a reorganizaciones cromosómicas y que éstas, dependiendo de su origen, pueden ocasionar reducción de la producción y de la compacidad del racimo, y estudios previos indican que posiblemente, Garnacha Blanca también se ha generado como resultado de variación estructural a partir de la variedad Garnacha Tinta. Por otra parte, asociado a la pérdida de la capacidad de acumular antocianinas en la baya, se ha observado una composición diferencial tanto fenólica como aromática entre variedades de uva blanca y variedades de uva tinta que podría contribuir a las diferencias aromáticas entre vinos tintos y blancos.

En este contexto, el objetivo general de esta tesis es el de conocer algunos de los mecanismos que generan variación somática en la variedad Garnacha y utilizar esta variación para avanzar en el conocimiento de la relación entre el color de la baya y su composición. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar el grado de variación en caracteres relacionados con la producción y la compacidad del racimo en una colección de Garnacha Blanca utilizada como material de partida para selección clonal.
2. Determinar si sucesos de delección independientes en el locus del color presente en el cromosoma 2 han dado lugar a múltiples orígenes convergentes en el fenotipo de pérdida de color de la baya en Garnacha y si los mismos tienen consecuencias en la producción.
3. Determinar si la variación en el color de la uva altera su desarrollo y composición más allá de la presencia/ausencia de antocianinas aprovechando el fondo genético cuasi isogénico entre variantes somáticas.



# 3. Material y métodos



### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Todas las accesiones de vid utilizadas en este trabajo se recogen en la Tabla 3.1 junto con datos del lugar de recolección y la finca en la que se encuentra actualmente el material y de donde se tomaron las muestras para este trabajo. La mayor parte de las accesiones de Garnacha Blanca (GB), Garnacha Roja (GR) y Garnacha Tinta (GT) estudiadas en este trabajo se localizan en colecciones establecidas en fincas experimentales en las comunidades autónomas de Navarra y de La Rioja con fines de conservación y estudio con anterioridad a la realización de este trabajo. Estas dos colecciones proceden a su vez de prospecciones de material vegetal realizadas en la Comunidad Foral de Navarra o en la región geográfica que abarca la D. O. Ca. Rioja, respectivamente (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Áreas de prospección.** Se muestran las regiones prospectadas para establecer las colecciones de GB de Rioja (naranja) y de Navarra (azul) estudiadas en esta tesis. Las áreas de prospección fueron solapantes en la región navarra de la D. O. Ca. Rioja.

En el caso de la colección de Navarra, se recopilaron 41 accesiones de GB, procedentes de catorce parcelas distintas, y dos de GR, cada una de una parcela diferente. La recopilación de todas las accesiones se realizó a partir de 2008 en viñedos viejos de GT por la Sección de Viticultura y Enología del Gobierno de Navarra (EVENA). También se incluyó en la colección una accesión de GT (GT77) por ser la planta origen de una GB (GB77). Por su parte, en Rioja se recopilaron 22 accesiones de GB recolectadas en seis parcelas diferentes. También se estudió una accesión de GT de la colección de Rioja. La recolección se realizó entre los años 2001 y 2007 en viñedos viejos en los que se encontraron diversas variedades además de GB. Se llevó a cabo por parte del antiguo Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agroalimentario del Gobierno de La Rioja (CIDA). A estas accesiones estudiadas en este trabajo se añadieron clones de GB o GT utilizados como referencia en los diferentes experimentos procedentes de ambas fincas experimentales. También para el estudio del efecto de la varaiación en el color sobre la composición de la baya se utilizaron accesiones de las variedades Tempranillo Blanco (TB) y Tempranillo Tinto (TT) procedentes de la finca de La Rioja.

**Tabla 3.1. Accesiones de vid analizadas en este trabajo.** Para cada accesión se indica la variedad, las coordenadas GPS y el municipio de su localización original, la parcela en la que se cultiva y los análisis realizados. GB, Garnacha Blanca; GR, Garnacha Roja; GT, Garnacha Tinta; TB, Tempranillo Blanco; TT, Tempranillo Tinto; \*, accesión utilizada para la secuenciación de genoma completo y análisis de la composición y el transcriptoma de la baya; \*\*, accesión utilizada para la secuenciación de genoma completo; \*\*\*, accesión utilizada para el análisis de la composición y el transcriptoma de la baya.

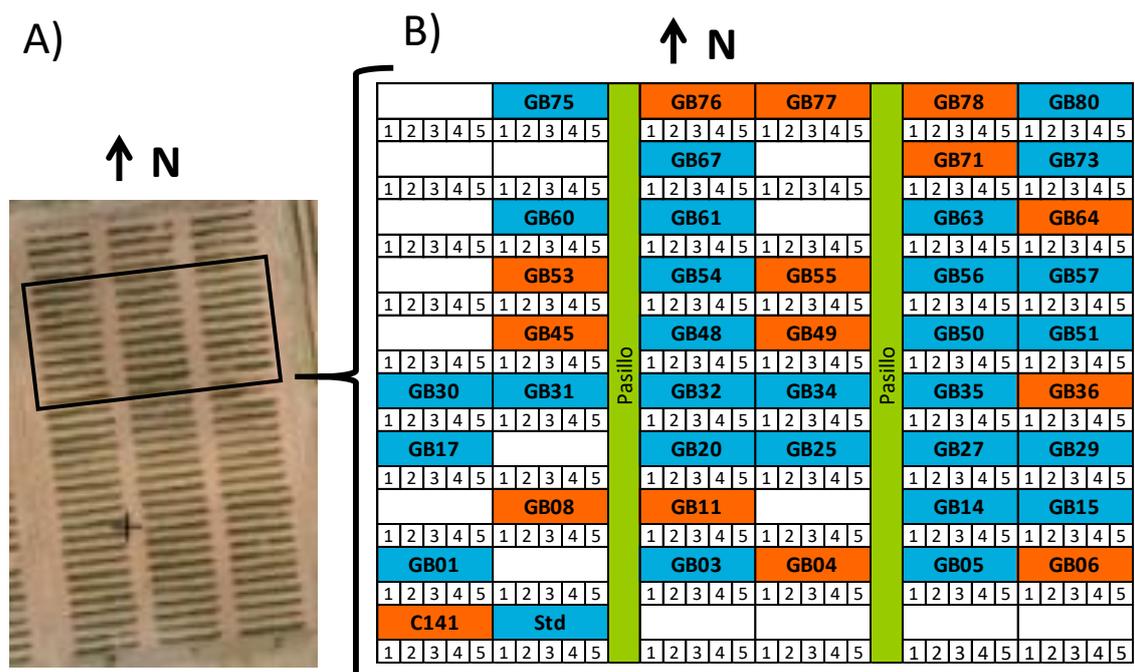
Accesión	Variedad	Coordenada lugar de origen		Municipio origen	Parcela conservación	Caracterización agronómica	Análisis SNP Chr 2
		Latitud	Longitud				
GB01	GB	42° 28'47"N	1° 34' 7"O	Beire	Baretón		Sí
GB03	GB	42° 28'47"N	1° 34' 7"O	Beire	Baretón		Sí
GB04	GB	42° 28'47"N	1° 34' 7"O	Beire	Baretón	Si	Sí
GB05	GB	42° 28'47"N	1° 34' 7"O	Beire	Baretón		Sí
GB06	GB	42° 32' 57"N	1° 32' 0"O	San Martín de Unx	Baretón	Si	Sí
GB08	GB	42° 29' 10"N	1° 36' 5"O	San Martín de Unx	Baretón	Sí	Sí
GB11	GB	42° 29' 18"N	1° 36' 47'O	San Martín de Unx	Baretón	Si	Sí
GB14	GB	42° 29' 18"N	1° 36' 47'O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB15	GB	42° 29' 18"N	1° 36' 47'O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB17	GB	42° 29' 18"N	1° 36' 47'O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB20	GB	42° 29' 18"N	1° 36' 47'O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB25	GB	42° 30' 9"N	1° 35' 48"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB27	GB	42° 30' 9"N	1° 35' 48"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB29	GB	42° 30' 9"N	1° 35' 48"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB30	GB	42° 30' 9"N	1° 35' 48"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB31	GB	42° 30' 9"N	1° 35' 48"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB32	GB	42° 30' 9"N	1° 35' 48"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB34	GB	42° 30' 9"N	1° 35' 48"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB35	GB	42° 30' 9"N	1° 35' 48"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB36	GB	42° 30' 9"N	1° 35' 48"O	San Martín de Unx	Baretón	Si	Sí
GB45	GB	42° 30'28"N	1° 36' 27"O	San Martín de Unx	Baretón	Si	Sí
GB49	GB	42° 30' 44"N	1° 36' 42"O	San Martín de Unx	Baretón	Si	Sí
GB50	GB	42° 30' 44"N	1° 36' 42"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB51	GB	42° 30' 44"N	1° 36' 42"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB53	GB	42° 30' 43"N	1° 36' 49"O	San Martín de Unx	Baretón	Si	Sí
GB54	GB	42° 39' 40"N	1° 51' 33"O	Mañeru	Baretón		Sí
GB55	GB	42° 39' 40"N	1° 51' 33"O	Mañeru	Baretón	Si	Sí
GB56	GB	42° 39' 40"N	1° 51' 33"O	Mañeru	Baretón		Sí
GB57	GB	42° 39' 40"N	1° 51' 33"O	Mañeru	Baretón		Sí
GB60	GB	42° 39' 40"N	1° 51' 33"O	Mañeru	Baretón		Sí
GB61	GB	42° 39' 40"N	1° 51' 33"O	Mañeru	Baretón		Sí
GB63	GB	42° 31' 17"N	2° 25' 19"O	Moreda	Baretón		Sí
GB64	GB	42° 31' 17"N	2° 25' 19"O	Moreda	Baretón	Si	Sí

Accesión	Variedad	Coordenada lugar de origen		Municipio origen	Parcela conservación	Caracterización agronómica	Análisis SNP Chr 2
		Latitud	Longitud				
GB67	GB	42° 31' 17"N	2° 25' 19"O	Moreda	Baretón		Sí
GB71	GB	42° 32' 22"N	2° 18' 28"N	Bargota	Baretón	Sí	Sí
GB73	GB	42° 30' 44"N	1° 36' 42"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB75	GB	42° 32' 56"N	1° 31' 59"O	San Martín de Unx	Baretón		Sí
GB76	GB	42° 32' 56"N	1° 31' 59"O	San Martín de Unx	Baretón	Sí	Sí
GB77**	GB	42° 33' 38"N	1° 26' 53"O	Eslava	Baretón	Sí	Sí
GB78	GB	42° 34' 2"N	2° 18' 19"O	Bargota	Baretón	Sí	Sí
GB80	GB	42° 34' 2"N	2° 18' 19"O	Bargota	Baretón		Sí
GB428	GB	SIN DATO		Ollauri	La Grajera		Sí
GB429	GB	SIN DATO		Ollauri	La Grajera		Sí
GB430	GB	SIN DATO		Ollauri	La Grajera		Sí
GB431	GB	SIN DATO		Ollauri	La Grajera		Sí
GB432	GB	SIN DATO		Ollauri	La Grajera		Sí
GB433	GB	SIN DATO		Ollauri	La Grajera		Sí
GB434	GB	SIN DATO		Ollauri	La Grajera		Sí
GB435	GB	SIN DATO		Ollauri	La Grajera		Sí
GB436	GB	SIN DATO		Ollauri	La Grajera		Sí
GB1655	GB	SIN DATO		Cuzcurrita de Río Tirón	La Grajera		Sí
GB1656	GB	SIN DATO		Cuzcurrita de Río Tirón	La Grajera		Sí
GB1657	GB	SIN DATO		Cuzcurrita de Río Tirón	La Grajera		Sí
GB1658	GB	SIN DATO		Cuzcurrita de Río Tirón	La Grajera		Sí
GB1659	GB	SIN DATO		Cuzcurrita de Río Tirón	La Grajera		Sí
GB1660	GB	SIN DATO		Cuzcurrita de Río Tirón	La Grajera		Sí
GB1661	GB	SIN DATO		Cuzcurrita de Río Tirón	La Grajera		Sí
GB1662*	GB	SIN DATO		Bargota	La Grajera		Sí
GB1663	GB	SIN DATO		Villar de Torre	La Grajera		Sí
GB1664	GB	SIN DATO		Villar de Torre	La Grajera		Sí
GB1665	GB	SIN DATO		Villar de Torre	La Grajera		Sí
GB1666	GB	SIN DATO		Villar de Torre	La Grajera		Sí
GB1667	GB	SIN DATO		Villar de Torre	La Grajera		Sí
C141	GB	CLON COMERCIAL		FRANCIA	Baretón	Sí	Sí
Std	GB	SIN DATO		Tarragona	Baretón		Sí
GBB1	GB	SIN DATO		Vilafranca del Penedes	Muestra externa		
GBB2	GB	SIN DATO		Vilafranca del Penedes	Muestra externa		
GR27	GR	42° 35' 45"N	2° 1' 42"O	Dicastillo	Baretón		
GR84	GR	42° 30' 54"N	2° 22' 18"O	Viana	Baretón		

Accesión	Variedad	Coordenada lugar de origen		Municipio origen	Parcela conservación	Caracterización agronómica	Análisis SNP Chr 2
		Latitud	Longitud				
EV15	GT	CLON COMERCIAL			Baretón		Sí
EV34	GT	CLON COMERCIAL			Baretón		Sí
2D	GT	CLON COMERCIAL			Baretón		Sí
GT77**	GT	42° 33' 38"N	1° 26' 53"O	Eslava	Baretón		Sí
GT1608*	GT	SIN DATO		Bargota	La Grajera		Sí
TT***	TT	SIN DATO			La Grajera		
TB***	TB	CLON COMERCIAL			La Grajera		

### 3.1.1 Condiciones de cultivo del material en campo

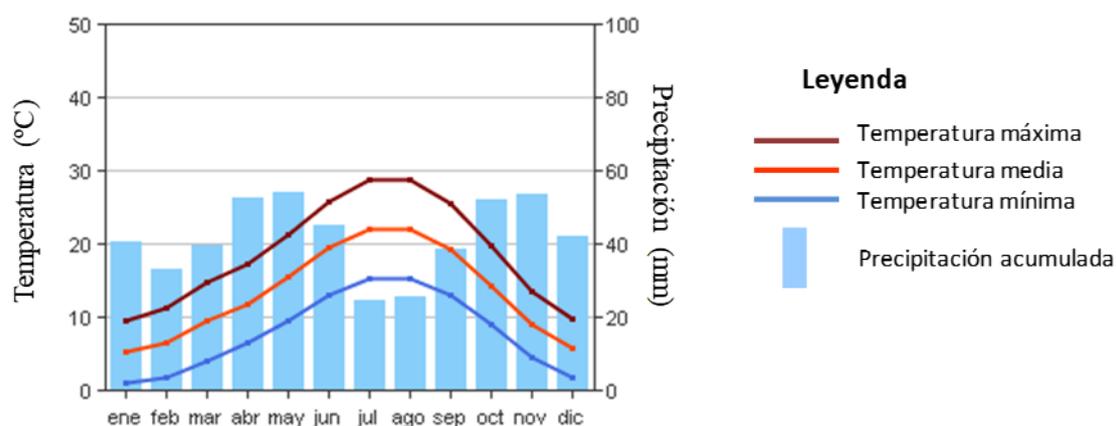
El material vegetal conservado en Navarra se encuentra en la subparcela de Referencias I de la finca experimental Baretón que la Comunidad Foral de Navarra gestiona en Olite (42° 25' 28,43" N; 1° 39' 44" O). En dicha parcela se mantienen cinco plantas tanto de cada una de las 41 accesiones de GB (Figura 3.2) como de las accesiones de GR y GT (Tabla 3.1). Fueron plantadas en 2011, junto con el clon-141 de GB y material vegetal de categoría "estándar" de dicha variedad procedente de Tarragona a modo de referencia (Std). En la misma subparcela Referencias I se plantaron también en 2010 clones de Garnacha Tinta seleccionados en EVENA previamente (EV15, EV34) y el clon de GT procedente de California 2D. Todas las accesiones están injertadas sobre Richter 110, plantadas con una orientación de las filas Este-Oeste a una densidad de 2.958 plantas ha<sup>-1</sup> y conducidas en espaldera en doble cordón de Royat. La poda es a seis pulgares, con tres pulgares en cada brazo y dos yemas por pulgar. El suelo se maneja mediante laboreo. El riego es por goteo y desde antes de la floración hasta la vendimia, las plantas recibieron 13 riegos en 2015, 16 en 2016 y 15 en 2017 (alrededor de 435 m<sup>3</sup>/ha, 528 m<sup>3</sup>/ha y de 500 m<sup>3</sup>/ha respectivamente). En esta finca se mantiene además la planta original de GT77 (Tabla 3.1).



**Figura 3.2. Plantación de las accesiones de GB en la finca de Baretón.** Se representa la localización del conjunto de las plantas de GB dentro de la subparcela Referencias I (A) y el croquis de las accesiones de GB (B). En color naranja se indican las accesiones estudiadas en la caracterización agronómica.

La parcela de Baretón presenta un suelo calcáreo de terraza, de textura franco arcillosa en el primer horizonte y franca en el resto. La profundidad es de 40 cm en el primer horizonte, 60 cm en el segundo y 75 cm en el tercero. Las raíces se extienden hasta el segundo horizonte, pero en éste ya son pocas, finas y muy finas. Aparecen un 25% de elementos gruesos en el primer horizonte, 60% en el segundo y 80% en el tercero. El tercer horizonte está moderadamente cementado. El primer horizonte presenta un drenaje alto con una capacidad de almacenamiento de agua media. En cuanto a las características químicas del primer horizonte, es un suelo básico (pH = 8,25) con un buen contenido de materia orgánica (2,39%), un contenido en carbonatos totales del 23,05% y en caliza activa del 6,83%.

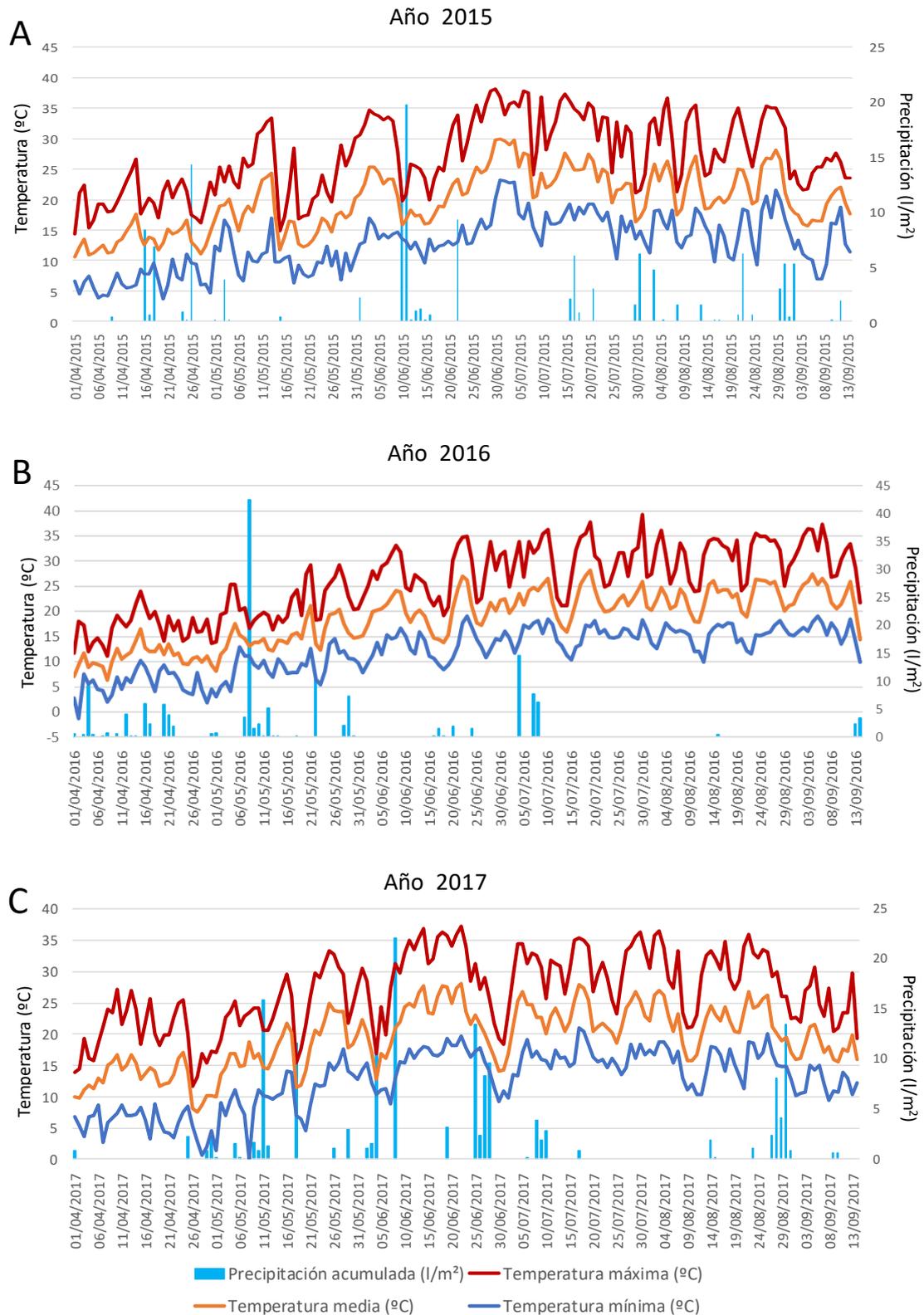
En lo relativo a las condiciones climáticas, según la clasificación de Papadakis (1966), el clima de Olite corresponde al grupo Mediterráneo templado (seco) (Mets), con tipo de invierno avena (Av), tipo de verano maíz (M) y un régimen hídrico Mediterráneo seco (Me) cuya fórmula climática sería AvMMe (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Diagrama ombrotérmico tipo de Olite.** Diagrama obtenido a partir de series de datos de los últimos 80 años en la Estación Meteorológica de Olite (Latitud: 4.704.973; Longitud: 610.487; Altitud: 389 m). Fuente: [meteo.navarra.es](http://meteo.navarra.es)

En los tres años de duración de los diferentes trabajos, según datos de la Estación Meteorológica de Olite, la temperatura promedio durante la fase vegetativa fue de 19,7°C en 2015, 18,7°C en 2016 y 19,3°C en 2017, mientras que la precipitación acumulada fue de 133,8 l/m<sup>2</sup> en 2015, 154,7 l/m<sup>2</sup> y 159,2 l/m<sup>2</sup> en 2017 (Figura 3.4).

El material de GB de la colección de La Rioja utilizado en este trabajo se conserva en la parcela Banco de Clones de la finca institucional de La Grajera de la Comunidad Autónoma de La Rioja (42° 26' 9,91" N; 2° 30' 57" O) y fue plantado entre los años 2002 y 2008. En la misma parcela y en las mismas condiciones también se establecieron distintas accesiones de GT (Tabla 3.1).



**Figura 3.4. Gráfico de temperaturas y precipitaciones durante el periodo vegetativo de 2015 (A), 2016 (B) y 2017 (C) en Olite. Elaboración propia a partir de datos de la Estación Meteorológica de Olite en: [meteo.navarra.es](http://meteo.navarra.es)**

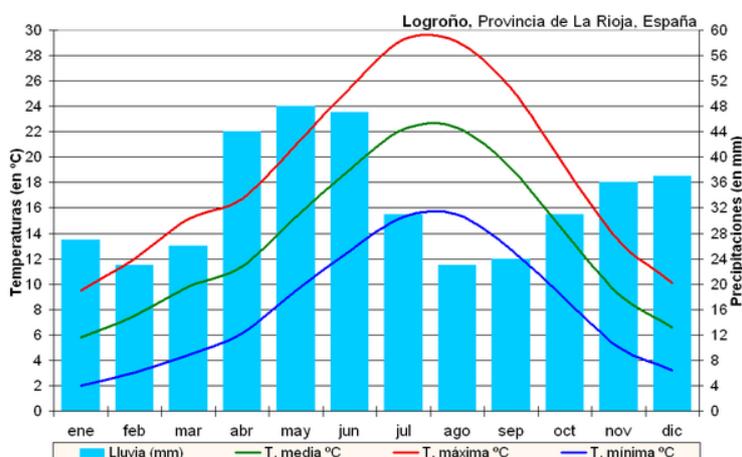
Además de las accesiones recolectadas propiamente en la comunidad autónoma de La Rioja, de esta colección también se estudió una accesión de GB (GB1662) y una de GT (GT1608) recolectadas en el municipio navarro de Barga, cercano a Rioja e incluido en la D.O.Ca. Rioja,

del que también proceden algunas accesiones conservadas en Baretón (Tabla 3.1). Para cada accesión se mantienen cinco cepas injertadas sobre Richter 110, con una orientación de las filas Norte – Sur, conducido en espaldera en doble cordón de Royat, a una densidad de 2.873 plantas ha<sup>-1</sup>. La poda es a seis pulgares, con tres pulgares en cada brazo y dos yemas por pulgar. El suelo se maneja mediante laboreo y el riego es por goteo. Todas las accesiones están sometidas a las mismas prácticas de cultivo.

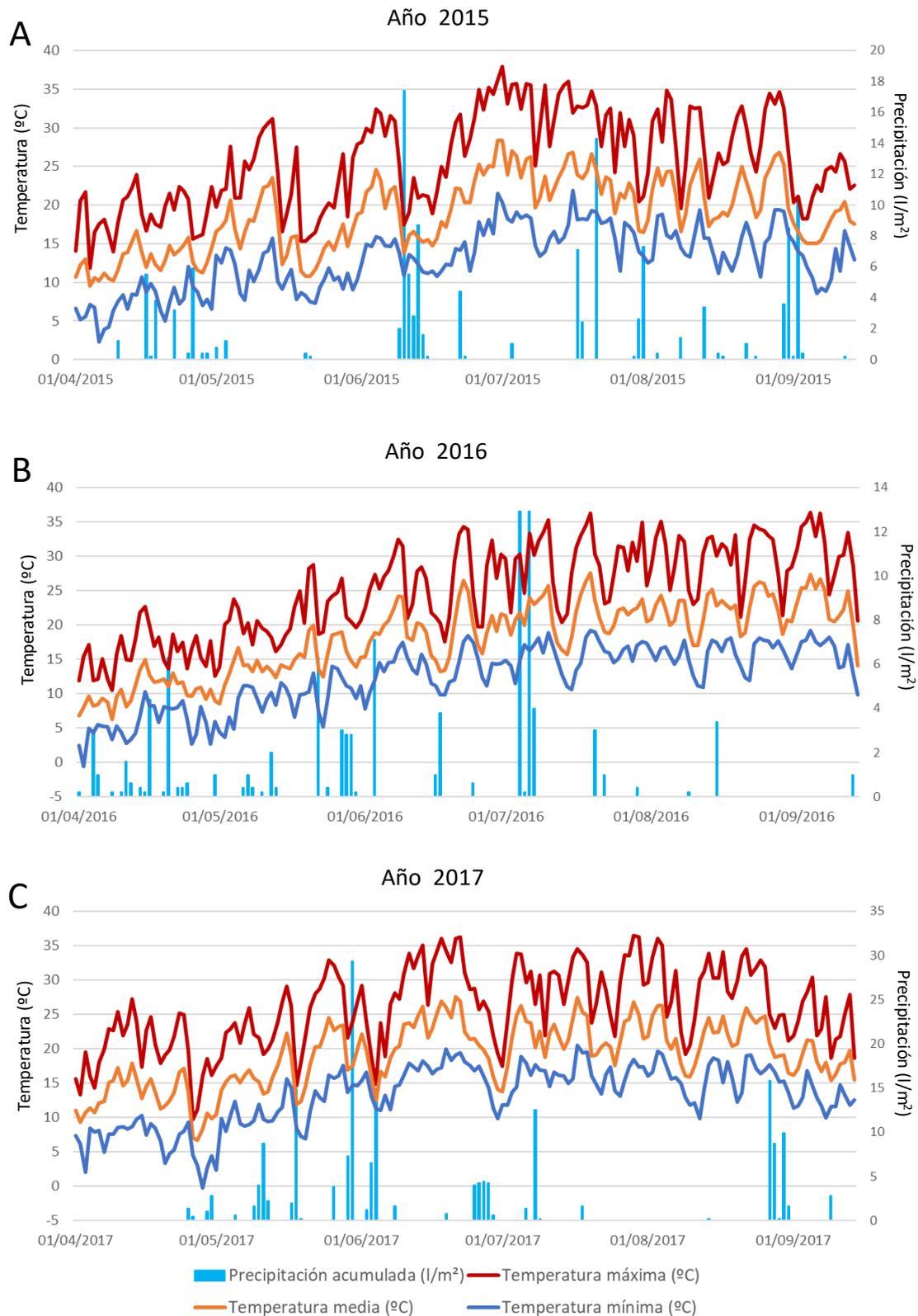
Las plantas de TB y TT utilizadas se encuentran en la Finca de La Grajera (La Rioja) en una parcela de variedades minoritarias adyacente al banco de Clones, formada por distintas variedades, que se estableció en 2004. Las variedades están injertadas sobre Richter 110, con una orientación de las filas Este – Oeste, conducidas en espaldera en doble cordón de Royat, a una densidad de 2.873 plantas ha<sup>-1</sup>. La poda es a seis pulgares, con tres pulgares en cada brazo y dos yemas por pulgar. El suelo se maneja mediante laboreo y el riego es por goteo. Todas las accesiones están sometidas a las mismas prácticas de cultivo.

El suelo de la parcela Banco de Clones del Gobierno de La Rioja presenta una textura franco-limosa en sus cuatro horizontes. La profundidad es de 42 cm en el primer horizonte, 30 cm en el segundo, 65 cm en el tercero y 63 cm en el cuarto. Las raíces son frecuentes hasta el tercer horizonte. No se observan elementos gruesos. En cuanto a las características químicas del primer horizonte, es un suelo básico (pH = 8,1) con un contenido en materia orgánica del 1,65%, un contenido en carbonatos totales del 13,6% y en caliza activa del 5,3%. La parcela de variedades minoritarias presenta un suelo similar, de textura franca en todos sus horizontes. La profundidad es de 43 cm en el primer horizonte, 44 cm en el segundo, 41 cm en el tercero y 37 cm en el cuarto. Las raíces se extienden hasta el tercer horizonte. La presencia de elementos gruesos es muy baja (0-2%) en todos los horizontes. En cuanto a las características químicas del primer horizonte, es un suelo básico (pH = 8,3) con un contenido en materia orgánica del 1,18%, un contenido en carbonatos totales del 15,3% y en caliza activa del 6,1%. Ambos son suelos bien drenados y moderadamente permeables.

En lo relativo a las condiciones climáticas, según la clasificación de Papadakis (1966), al igual que el clima de Olite, el clima de Logroño corresponde al grupo Mediterráneo templado (seco) (Mets), con tipo de invierno avena (Av), tipo de verano maíz (M) y un régimen hídrico Mediterráneo seco (Me) cuya fórmula climática sería AvMMe (Figura 3.5).



**Figura 3.5. Diagrama ombrotérmico tipo de Logroño. Fuente: Logroño.es**



**Figura 3.6. Gráfico de temperaturas y precipitaciones durante el periodo vegetativo de 2015 (A), 2016 (B) y 2017 (C) en Logroño.** Elaboración propia a partir de datos de la Estación Meteorológica de Logroño en: [larioja.org](http://larioja.org)

En los tres años de duración de los diferentes trabajos, según datos de la Estación Meteorológica de Logroño, la temperatura promedio durante la fase vegetativa fue de 18,7°C en 2015, 18,1°C

en 2016 y 19,0°C en 2017, mientras que la precipitación acumulada fue de 131,5 l/m<sup>2</sup> en 2015, 92,1 l/m<sup>2</sup> en 2016 y 177,5 l/m<sup>2</sup> en 2017 (Figura 3.6).

### 3.1.2 Poblaciones de autofecundación

#### 3.1.2.1 Generación de las autofecundaciones

Con el fin de analizar la segregación de marcadores moleculares tipo SNP se indujeron autofecundaciones en dos racimos seleccionados de una misma cepa de cada una de las 41 accesiones recopiladas de GB y de dos accesiones de GT de Baretón (EV15 y EV34). En el año 2015, las inflorescencias se cubrieron con bolsas de papel cerradas con el fin de evitar la fecundación de las flores con polen distinto al del propio racimo. El embolsamiento se realizó previamente a la floración, en estado fenológico H (Baggiolini, M. 1952), botones florales separados. Una vez cuajados los frutos, estadio J, se retiraron las bolsas. La extracción de las semillas se realizó tras el envero, momento en el que las semillas ya estaban maduras. Las semillas de cada racimo, una vez limpias y secas, se introdujeron en tubos Falcon, se cubrieron dentro del mismo con fungicida en polvo, oxiclورو de cobre (Cobre Key, 50% riqueza en Cu), y se conservaron a 4°C hasta el momento de la germinación.

#### 3.1.2.2 Germinación de las semillas

Se germinaron unas 200 semillas por accesión (~100 por cada racimo autofecundado) de cuatro accesiones de GB (GB11, GB71, GB77 y GB78) y de dos de GT (EV15 y EV34). Para la germinación de las semillas, se escarificaron inicialmente mediante inmersión durante 1,5 min en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%. Posteriormente se aclararon con agua y se mantuvieron en estas condiciones durante 24 horas para provocar su hidratación. Una vez hidratadas, se sembraron en bandejas alveoladas con turba fina y vermiculita y se mantuvieron dos meses en frío húmedo (3°C y humedad relativa -HR- 90%) en una cámara fría en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se trasladaron a cámaras de germinación con unas condiciones iniciales de Tª y HR de 35°C y 90% durante 48 horas en oscuridad. Posteriormente y durante 10 días se mantuvieron diariamente 8 horas a 32°C y 16 horas a 22°C con una HR del 90% en oscuridad. Seguidamente, y hasta el momento de la toma de muestras, las condiciones fueron 16 horas de luz (125 µmoles/s·m<sup>2</sup>) a 25°C y 8 horas en oscuridad a 22°C a HR constante del 80%. Una vez germinadas se recogieron muestras de hojas jóvenes de 50 plántulas por accesión y se guardaron separadamente congeladas a -80°C para la extracción de ADN.

#### 3.1.3 Enraizamiento de estaquillas

Con el fin de analizar el ADN presente en la L2 de accesiones de GR se indujo en estaquillas la producción de raíces en estaquillas. Para ello, se tomó madera de poda de GR y se desinfectó. Para realizar la desinfección, la madera se frotó con lejía al 10% y se aclaró con agua; posteriormente se pulverizó con permanganato potásico (0,2 g/l) y se mantuvo con este durante 45 min, tras los cuales se aclaró de nuevo; para finalizar, la madera se pulverizó con un fungicida sistémico (1,5ml/l; PELT 50 SC) y se dejó toda la noche, tras lo cual se volvió a aclarar con agua. Una vez desinfectada, se cortó en estaquillas con una yema y se indujo la producción de raíces siguiendo el protocolo de Díaz-Riquelme *et al.* (2016). Posteriormente, las estaquillas se pusieron en agua en una cámara de cultivo a 25°C durante 4-6 semanas para obtener la biomasa de raíces adecuada para la extracción de ADN.

### 3.2 EVALUACIÓN DE CARACTERES AGRONÓMICOS

La evaluación fenotípica relativa a los caracteres agronómicos se realizó sobre quince accesiones de GB de la Finca de Baretón, una por cada parcela origen más el clon comercial de GB 141 (Tabla 3.1 y Figura 3.2). El análisis fenotípico se repitió íntegramente durante los ciclos vegetativos de 2015 y 2017. En 2016 las plantas sufrieron una alteración fisiológica debida a causas desconocidas que hizo desistir de la toma de gran parte de los datos por la falta de representatividad de los mismos. Dicha alteración, que afectó a las variedades GT, GR y Viura además de a GB, comenzó en el estado fisiológico N (Baggiolini, M. 1952), envero, y continuó hasta el momento de la vendimia. Las bayas de los racimos comenzaron a perder turgencia y peso, dejaron de madurar y el raquis se secó y se deformó.

#### 3.2.1 Análisis de caracteres de producción y de compacidad

Se evaluaron caracteres agronómicos relacionados con la producción y la compacidad empleando como objeto unitario de las medidas la planta, el racimo y la baya, y los datos se calcularon (nivel) por planta o por racimo (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2. Caracteres de producción y compacidad evaluados en las accesiones de GB. Rep., repeticiones; las variables ToBeWe (peso total de las bayas con semillas) y ToBeVo (volumen total de las bayas con semillas) se utilizaron para calcular el peso y volumen medio de una baya con semillas.**

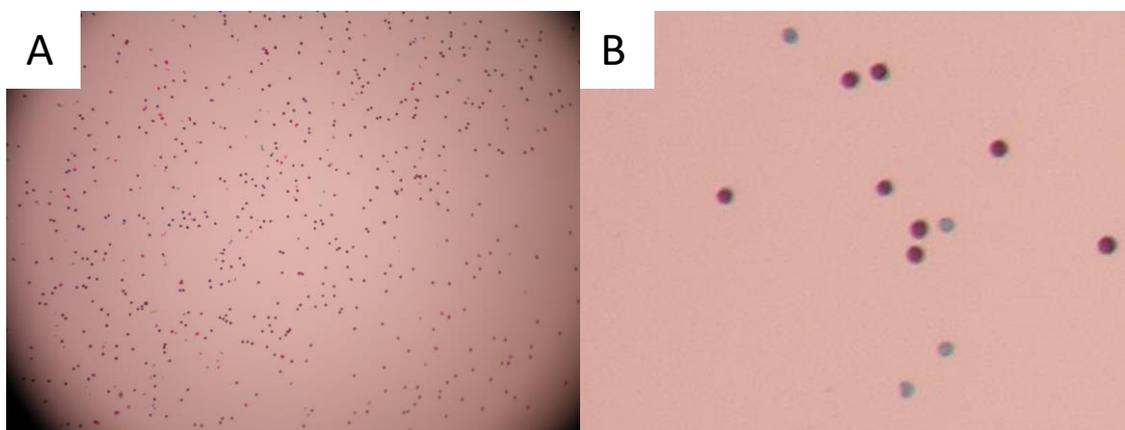
Nivel	Caracter (unidad)	Código	Descripción	Nº Rep./ Accesión
Planta	Nº racimos planta	ToBuP	Número total de racimos en la planta	4
Planta	Producción por planta (kg)	PrP	Peso total de racimos por planta	4
Accesión	Viabilidad del polen	PoVi	Porcentaje de granos viables de un total de 500 por accesión	1
Racimo	Nº flores	FIBu	Número total de flores del racimo	5
Racimo	Compacidad visual racimo	Comp	Compacidad visual del racimo	5
Racimo	Anchura del racimo (cm)	BuWi	Distancia máxima entre las bayas laterales del racimo	5
Racimo	Longitud del racimo (cm)	BuLe	Distancia desde la baya superior a la más baja del racimo	5
Racimo	Peso racimo (g)	BuWe	Peso del racimo	5
Racimo	Longitud 1ª rama (mm)	1RmLe	Longitud de la primera ramificación del raquis	5
Racimo	Longitud 2ª rama (mm)	2RmLe	Longitud de la segunda ramificación del raquis	5
Racimo	Longitud raquis (cm)	RaLe	Distancia desde la primera ramificación del racimo hasta la última ramificación	5
Racimo	Longitud pedicelo (mm)	Pdile	Valor medio de 15 medidas: distancia desde la inserción hasta la ramificación	5
Racimo	Peso raquis (g)	RaWe	Peso del raquis	5
Racimo	Nº de ramificaciones	RmBu	Número de ramificaciones del racimo	5
Racimo	Nº bayas con semillas	SedBeBu	Número total de bayas con semilla del racimo	5
Racimo	Nº bayas sin semillas	SelBeBu	Número total de bayas sin semilla del racimo	5
Racimo	Nº ovarios verdes vivos	LGO	Número total de ovarios verdes vivos del racimo	5
Racimo	Cuajado	Fr	$(\text{SedBeBu} + \text{SelBeBu}) / \text{FIBu} \times 100$	5
Racimo	Corrimiento	Col	$10 - ((\text{SedBeBu} + \text{SelBeBu} + \text{LGO}) \times 10 / \text{FIBu})$	5
Racimo	Millerandage	Mil	$10 - (\text{SelBeBu} \times 10 / (\text{SedBeBu} + \text{SelBeBu} + \text{LGO}))$	5
Racimo	Anchura baya (mm)	BeWi	Valor medio de la anchura de 15 bayas no deformadas del racimo	5
Racimo	Longitud de baya (mm)	BeLe	Valor medio de la longitud de 15 bayas no deformadas del racimo	5
Racimo	Peso baya (g)	BeWe	Valor medio de todas las bayas del racimo: $\text{ToBeWe} / \text{SedBeBu}$	5
Racimo	Volumen baya (ml)	BeVo	Valor medio de todas las bayas del racimo: $\text{ToBeVo} / \text{SedBeBu}$	5
Racimo	Nº semillas/baya	Sbe	Valor medio del nº de semillas de 15 bayas del racimo	5

Los caracteres de planta fueron evaluados en el momento de la vendimia (10/09/2015 y 13/09/2017, grado probable ~13% alcohol, acidez total ~5,5 g/l en tartárico y pH ~3,2), mientras que los caracteres de racimo y baya se evaluaron durante la semana previa a la vendimia, salvo el número de flores que se cuantificó antes del comienzo de la floración, y la viabilidad del polen, en floración.

### 3.2.1.1 Caracteres de planta

**Número de racimos por planta y producción por planta:** Se contó el número de racimos por planta y se determinó el peso total del conjunto de todos ellos mediante una báscula en campo. Se realizó sobre cuatro plantas por accesión de las cinco disponibles. Se realizó de este modo para excluir a la planta que se encontraba en el extremo de la fila con el fin de evitar el efecto borde por el que las plantas que tienen menor competencia presentan mayor producción. Al número de racimos por planta determinado en campo se sumó el número de racimos cortados previamente para el estudio de los caracteres de racimo. De la misma manera, al peso total de los racimos de cada planta se sumó el peso de los racimos cortados previamente.

**Viabilidad de polen:** El análisis se realizó mediante la tinción de Alexander (1969) según Peterson *et al.* (2010). Aparte de las quince accesiones de GB en las que se valoraron el resto de los caracteres de producción, también se consideró una accesión de GT como referencia (EV15) (Tabla 3.1). Para este análisis, se estudiaron muestras de polen de inflorescencias en antesis de las cinco plantas de cada accesión en estudio. Con unas pinzas se cogieron tres anteras de distintas flores por planta y se homogeneizaron en un tubo Eppendorf, obteniendo así una muestra por accesión. Una vez realizada y completada la tinción en placas Petri, a las 24 horas, se hicieron fotos a la lupa (Olympus SZ61) de cinco campos con unos 100 granos de polen por muestra. En estas fotos se contaron los granos de polen viables (color morado) y no viables (color azul claro). Esta distinción se basa en la tinción diferencial de la celulosa de las paredes y del protoplasma del polen. Entre los componentes de la solución de tinción, el colorante verde de malaquita tiñe específicamente la pared celular, mientras fuchina ácida penetra en las células vivas y colorea el citoplasma de rojo. El polen abortado aparece de color verde-azulado ya que sólo retiene su pared celular, mientras que los granos de polen viables presentan además una coloración rojiza-morada en su interior. Se calcularon los porcentajes de viabilidad sobre un total aproximado de 500 granos de polen por accesión (Figura 3.7A y 3.7B). El conteo se realizó mediante el programa ImageJ (1.50i). Este análisis se realizó durante los años 2015, 2016 y 2017.



**Figura 3.7. Tinción de Alexander de polen de Garnacha Blanca.** Imagen a la lupa de granos de polen teñidos (A) y detalle de la tinción en morado de los granos viables y en azul claro de los granos no viables (B).

### 3.2.1.2 Caracteres de racimo

Para la evaluación de las variables consideradas en el racimo, en el estado fenológico previo a la floración H (Baggiolini, M. 1952), botones florales separados, se seleccionaron cinco inflorescencias por accesión, una por planta, de manera sistemática según el siguiente criterio: de la cara Sur de la planta, sobre el brazo izquierdo, el primer pulgar empezando por la cruz, la segunda yema, la inflorescencia inferior; en caso de faltar la inflorescencia seleccionada, se seleccionó la misma inflorescencia del segundo pulgar. Para poder realizar el seguimiento, se marcó el pámpano correspondiente en lugar de la inflorescencia con el fin de no dañarla (Figura 3.8). Estas inflorescencias y los racimos derivados se siguieron a lo largo de todo el ciclo para evaluar los caracteres de racimo y de baya. Previamente a floración (estado H) se contó sobre la planta el número de botones florales y posteriormente, en el estado fenológico N (Baggiolini, M. 1952), maduración y antes de la vendimia (02/09/2015 y 03/09/2017), se cortaron los racimos correspondientes y se evaluaron los caracteres de racimo y de baya en laboratorio.



**Figura 3.8. Detalle del marcaje del pámpano para seguimiento de los racimos**

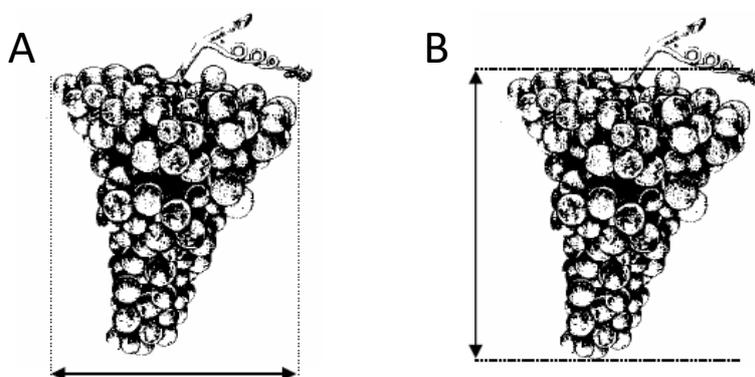
**Número de flores:** En las inflorescencias seleccionadas en el estado H se contó el número de botones florales (FIBu) de cada uno de ellos con ayuda de un contador (Figura 3.9). El conteo se realizó entre dos personas cada año, siendo una de ellas siempre la misma durante los distintos años. El conteo de cada inflorescencia se realizó una sola vez y por una sola persona, tras comprobarse que las diferencias entre los conteos realizados por distintas personas sobre la misma inflorescencia o entre varios conteos de una persona sobre una misma inflorescencia eran mínimas.



**Figura 3.9. Detalle del conteo de botones florales**

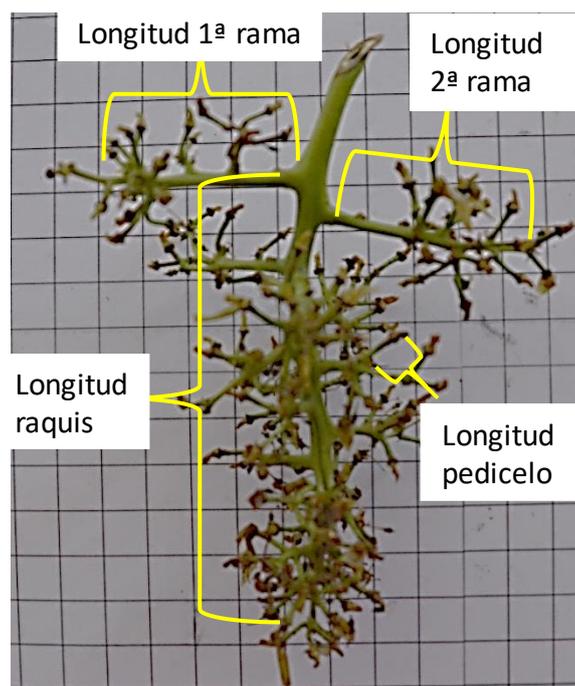
**Compacidad:** Esta variable se puntuó según el descriptor OIV N° 204 (Organización Internacional de la Viña y el Vino 2007), utilizando una escala del 1 al 9, donde 1 significa "muy suelto" (bayas muy sueltas, con muchos pedicelos visibles), 3 'suelto' (bayas separadas unas de otras, con algunos pedicelos visibles), 5 'medio' (bayas apretadas con pedicelos no visibles), 7 'compacto' (bayas difícilmente movibles) y 9 'muy compacto' (bayas deformadas por la presión). Este carácter fue valorado en cada racimo por cinco evaluadores de manera independiente y se tomó el valor de la moda como el representativo de cada racimo.

**Peso y dimensiones del racimo:** El peso del racimo completo (BuWe) se determinó mediante una balanza y la anchura (BuWi) y la longitud del racimo (BuLe) se midieron con reglas (Figura 3.10).



**Figura 3.10. Representación de los caracteres de anchura (A) y longitud del racimo (B).** Tomado de Lista de Descriptores OIV para variedades de vid y especies de Vitis (2ª edición, 2001).

**Peso y dimensiones del raquis:** El peso del raquis (RaWe) se determinó mediante una balanza y las dimensiones del raquis; longitud de la primera (1RmLe) y de la segunda rama (2RmLe), longitud del raquis (RaLe) y longitud del pedicelo (PdiLe) con un calibre digital (INSIZE) (Figura 3.11). Para la determinación de la longitud del pedicelo (PdiLe) se midieron 15 pedicelos escogidos al azar y se calculó la media de los 15 valores. El valor de la media se estableció como el dato representativo de cada racimo. Se contó además el número de ramificaciones del raquis.



**Figura 3.11.** Representación de los caracteres de dimensiones del raquis: longitud de la primera y de la segunda rama, longitud del raquis y longitud del pedicelo.

**Cuajado, millerandage y corrimiento:** Se calculó, para cada racimo, la tasa de cuajado [1] y los índices de millerandage [2] y de corrimiento [3] (Dry *et al.*, 2010). Para ello se utilizaron los valores obtenidos en el conteo del número de botones florales por inflorescencia (FIBu), del número de ovarios verdes que permanecieron en el racimo (LGO) y del número de frutos con (SedBeBu) y sin semilla (SelBeBu) que se desarrollaron y maduraron en cada racimo.

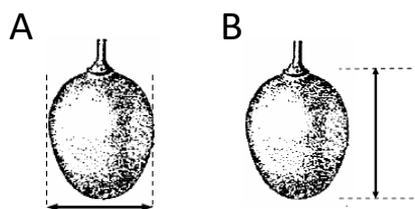
$$\text{Tasa de cuajado} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de bayas con semillas} + \text{n}^\circ \text{ de bayas sin semillas})}{\text{n}^\circ \text{ de flores por inflorescencia}} \quad [1]$$

$$\text{Índice millerandage} = 10 - \left\{ \frac{(\text{n}^\circ \text{ de bayas con semillas} \times 10)}{(\text{n}^\circ \text{ de bayas con semillas} + \text{n}^\circ \text{ de bayas sin semillas} + \text{n}^\circ \text{ de ovarios verdes vivos})} \right\} \quad [2]$$

$$\text{Índice corrimiento} = 10 - \left\{ \frac{(\text{n}^\circ \text{ de bayas con semillas} + \text{n}^\circ \text{ de bayas sin semillas} + \text{n}^\circ \text{ de ovarios verdes vivos}) \times 10}{\text{n}^\circ \text{ de flores por inflorescencia}} \right\} \quad [3]$$

### 3.2.1.3 Caracteres de baya

**Anchura, longitud y número de semillas por baya:** se tomaron 15 bayas al azar del conjunto de las bayas con semillas de cada racimo (SedBeBu). En estas 15 bayas por racimo se midieron la anchura (BeWi) y la longitud (BeLe) con un calibre digital (INSIZE) (Figura 3.12). Además, se extrajeron y se contaron las semillas de cada una de ellas de manera individual para determinar el número de semillas por baya (Sbe). Se calculó la media de los 15 valores para cada carácter y se estableció como dato representativo de cada racimo para cada uno de estos caracteres.



**Figura 3.12. Anchura (A) y longitud de la baya (B).** Tomado de Lista de Descriptores OIV para variedades de vid y especies de *Vitis* (2ª edición, 2001).

**Peso y volumen de la baya:** el peso medio de la baya (BeWe) se determinó dividiendo el peso de todas las bayas con semillas del racimo (ToBeWe) entre el número de éstas (SedBeBu) (ToBeWe/SedBeBu). Para ello, previamente se determinó el peso de todas las bayas con semilla del racimo mediante una balanza. El volumen medio de la baya (BeVo) se determinó dividiendo el volumen de todas las bayas con semillas (ToBeVo) entre el número de éstas (SedBeBu) (ToBeVo/SedBeBu). Al igual que en el caso anterior, previamente se determinó el volumen de todas las bayas con semillas del racimo (ToBeVo) mediante su inmersión en una probeta llena parcialmente con una cantidad conocida de agua y midiendo el volumen del agua desplazada. Los valores obtenidos se establecieron como dato representativo de cada racimo para cada uno de estos caracteres.

### 3.2.2 Análisis estadísticos

Para los caracteres cuantitativos se calculó la media como estadístico de tendencia central y la desviación estándar como estadístico de dispersión. A partir de ellos se calculó el coeficiente de variación (CV) (desviación estándar/media) como una medida que permitiese comparar la magnitud de la dispersión entre los diferentes caracteres. Se calcularon los estadísticos para el conjunto de los datos, sin considerar el factor accesión, con el fin de evaluar la variabilidad y la estabilidad en la variedad GB en su conjunto y las relaciones entre los distintos caracteres. Para evaluar la estabilidad entre años se realizaron dos tipos de análisis estadísticos: T-test con las medias obtenidas para cada carácter en cada año; y análisis de correlaciones bilaterales Tau-b de Kendall entre las medias de los caracteres obtenidas en 2015 y las obtenidas en 2017 para cada accesión. Para analizar la relación entre caracteres se realizó un análisis de correlaciones bilaterales Tau-b de Kendall de manera independiente para cada año con el conjunto de los datos.

Las medias obtenidas para cada carácter se compararon entre accesiones globalmente mediante análisis de varianza (ANOVA), cada año de manera independiente. Para evaluar la estabilidad de las accesiones entre años, las medias obtenidas cada año en cada accesión para cada carácter se compararon entre sí mediante T-test. Para identificar de manera gráfica las relaciones entre las accesiones respecto a los caracteres en cada año y en el conjunto de los dos años, se realizaron análisis de componentes principales tanto para cada año de manera independiente como para el conjunto de los datos de ambos años.

El conjunto de los análisis se realizó mediante IBM SPSS Statistics v. 25 y XLSTAT 2018 y, salvo que se indique otra cosa, se consideró un nivel de significación  $\alpha=0,05$ .

### 3.3 SELECCIÓN DE UVAS PARA ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y METABOLÓMICO

#### 3.3.1 Recolección de las muestras

Durante las campañas 2016 y 2017 se recogieron muestras de tres réplicas de cuatro variedades (GT, GB, TT, TB) en los estadios de pre-envero (PE), envero (E), pre-madurez (PM) y madurez (M). Estos estadios se consideraron de la siguiente manera: PE, aquel en el que todas las bayas estaban todavía verdes y duras en torno a una semana antes de E; E, momento en el que la mayoría de racimos presentaban una proporción cercana al 50% de las bayas ablandadas (y coloreadas en el caso de las variantes tintas); PM, en torno a dos semanas antes de la vendimia; M, momento de madurez tecnológica en el que las bayas tenían un contenido en sólidos solubles alrededor de 22 °Brix. Se tomaron muestras de dos o tres racimos de la cara sur, de una o dos cepas, en Tempranillo, y de la cara este, de una cepa, en Garnacha. Se tomaron muestras por triplicado, siendo cada fila una repetición en Tempranillo y cada cepa una repetición en Garnacha. En el caso del estadio de PE se recogieron uvas verdes duras de similar tamaño directamente de las plantas y se congelaron con nitrógeno líquido en el campo sin ninguna clasificación. En los estadios de E, PM y M se recolectaron los racimos enteros y se seleccionaron bayas con la misma densidad en cada estadio para todos los genotipos, como se describe en el siguiente apartado. Se hizo así con el fin de muestrear bayas en el mismo estado de maduración, al menos a nivel de contenido de azúcar (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2016) y minimizar las diferencias debidas a factores ajenos a la variación en el color de la baya. Se analizó el contenido en sólidos solubles (CSS) en cada una de las muestras mediante un refractómetro digital (ATAGO WM-7). También se analizó el pH mediante un pH-metro (pH-Meter BASIC 20+, CRISON). El muestreo de las uvas para el análisis transcriptómico se realizó en todos los casos a la misma hora del día, entre las 13:30 y las 16:00, siendo en todos los casos días soleados y calurosos.

#### 3.3.2 Selección del estado de maduración de las bayas en base a densidad

La densidad de las bayas se determinó según su flotabilidad en soluciones de NaCl (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2016). Para ello se prepararon series de soluciones de NaCl con intervalos de concentración de 10 o 20 g/l entre una solución y la siguiente en la serie. Así, durante 2016 las series de soluciones que se prepararon fueron: E (18-08-2016), 60 - 110 g/l, con intervalos de 10 g/l entre una solución y la siguiente en la serie; PM (06-09-2016), 110 - 150 g/l, con intervalos de 10 g/l; y M (13-09-2016), 120 - 160 g/l, con intervalos de 20 g/l. Durante 2017 se prepararon las siguientes series: E (03-08-2017), 90 - 110 g/l, con intervalos de 10 g/l; PM (17-08-2017), 110 - 140 g/l, con intervalos de 10 g/l; y M (31-08-2017), 120 - 160 g/l, con intervalos de 20 g/l. Las bayas se separaron de los racimos cortando el pedicelo para evitar que la solución de NaCl penetrara en la baya. El conjunto de bayas de cada muestra se transfirió en primer lugar a la solución con la concentración de NaCl más alta de la serie. De esta forma se separan las bayas que van al fondo, que poseen una densidad mayor que la de la solución de prueba, de las bayas flotantes con densidad menor. Estas bayas flotantes se pasaron a la segunda solución más concentrada. El mismo procedimiento se repitió sucesivamente hasta la solución menos concentrada de la serie. Se consideró que la densidad de cada baya se encontraba entre la de la solución de la serie en la que se hundió y la de la solución precedente de densidad mayor en la que flotó (Figura 3.13). En cada fecha de muestreo se seleccionaron para sucesivos análisis las bayas del intervalo de densidad más abundante en la mayoría de muestras. Las bayas seleccionadas se enjuagaron con agua destilada, se secaron con papel de filtro, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el momento de la

extracción. El procesamiento de las muestras desde que se recolectaron los racimos en el campo hasta que se congelaron se realizó en un intervalo de tiempo entre 20 y 60 min.



**Figura 3.13. Selección de uvas en base a densidad.** En la imagen se muestra la distribución las uvas en soluciones de tres concentraciones distintas en función de su flotabilidad. En este caso la densidad de la mayoría de las bayas se encuentra entre 100 y 110 g/l.

### 3.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA UVA

#### 3.4.1 Análisis de metabolitos primarios

##### 3.4.1.1 Preparación de las muestras

Para el análisis de metabolitos primarios, a partir de las uvas de cada estadio y de cada réplica congeladas y pesadas mediante una balanza de precisión se separó el hollejo de la pulpa a temperatura ambiente. Las pulpas se aplastaron dentro de bolsas de plástico para conseguir zumo. El zumo de cada muestra se centrifugó en un tubo Falcon de 50 ml a 5.000 rpm durante 10 min (centrífuga Eppendorf®5804, rotor A-4-44). El sobrenadante de cada muestra se utilizó para el análisis de ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos. Para los ácidos orgánicos se prepararon diluciones de 800  $\mu$ l en viales, con diferente dilución de las muestras en función del estadio (PE, 1:16; E, 1:8; PM, 1:4; M, 1:2). Dicha dilución se llevó a cabo con un MicroDilutor Hamilton 500 con agua ultrapura. Para el análisis de azúcares y aminoácidos se transfirieron 800  $\mu$ l del sobrenadante a tubos de análisis en micro placa. Todas las muestras se mantuvieron congeladas hasta el momento del análisis correspondiente. Por último, se determinó el contenido en sólidos solubles (CCS) del zumo para determinar la dilución necesaria en el análisis de azúcares mediante un refractómetro digital (ADL®). Así, para el análisis de azúcares se utilizó una dilución de 1:20 en PE, 1:100 en E y 1:140 en PM y P. Se realizó en el momento del análisis con el robot de pipeteado de precisión Precision 2000 (96/384 Well Automated Microplate Pipetting System, Bio-Tek instruments Inc).

Los hollejos obtenidos se pesaron mediante una balanza de precisión y se guardaron en congelador hasta que se liofilizaron en un liofilizador Vir Tis Bench Top K (SP Scientific, Warminster, Philadelphia, PA, USA). Los hollejos liofilizados se pulverizaron con un molino de bolas MM200 Retsch durante 20 segundos con una frecuencia de 1/s=30. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de los metabolitos primarios del hollejo de acuerdo a Bobeica *et al.* (2015) con pequeñas modificaciones. A partir de alícuotas de 80 mg de la muestra pulverizada se realizaron tres extracciones sucesivas: en primer lugar, con 2 ml de etanol al 80%; en segundo lugar, con 2 ml de etanol al 50%; y finalmente con 2 ml de agua. En cada extracción, las muestras

con el eluyente correspondiente se incubaron 15 min a 80°C (con unos segundos de agitación con vortex cada 5 min) y se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min (centrífuga Eppendorf®5804, rotor A-4-44). El *pellet* se utilizó para la siguiente extracción y todos los sobrenadantes se juntaron tras las extracciones en el tubo que contenía el *pellet* y se secaron en Speed-Vac (SAVANT). Una vez secas, las muestras se re-disolvieron en 2 ml de agua, se sonicaron mediante ultrasonidos durante 10 min, se agitaron con vortex y se centrifugaron 15 min a 5.000 rpm (Eppendorf®5804, rotor A-4-44). Finalmente, los sobrenadantes de cada muestra se pasaron por filtros de 0,45 µm y, por un lado, se tomó una alícuota de 800 µl en tubos de microplaca para el análisis de azúcares y de aminoácidos. Por otro lado, se prepararon diluciones de 800 µl en viales, con diferente dilución de las muestras en función del estadio (PE, 1:4; E, 1:2; PM y M sin diluir) para el análisis de ácidos orgánicos. Para el análisis de azúcares en hollejo se utilizó una dilución 1:5 en PE y 1:16 en el resto de estadios que se realizó en el momento del análisis.

#### 3.4.1.2 Análisis de azúcares

Los monosacáridos glucosa y fructosa se cuantificaron en muestras de hollejo y pulpa mediante análisis enzimático utilizando el kit Glucosa/Fructosa de BioSenTec (Toulouse, Francia) y un lector de microplaca automatizado (Elx800UV, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.) como se describe en Gomez *et al.*, (2007). Para ello se utilizaron diluciones diferentes dependiendo del tejido y del estadio. El protocolo consiste en un método espectrofotométrico acoplado a enzimas que mide el cambio en la absorbancia a 340 nm de la reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH (Gomez *et al.*, 2007). Se midió en un lector Epoch unido al programa GEN 5 (BioTek). La concentración de los azúcares individuales se calculó a partir de estándares de glucosa y fructosa, en gramos por litro (g/l), en el caso de la pulpa, y en microgramos por miligramo de peso seco (µg/mg PS) en el caso del hollejo.

#### 3.4.1.3 Análisis de ácidos orgánicos

La cuantificación de ácidos orgánicos en hollejo y pulpa también se realizó mediante análisis enzimático. Para el ácido tartárico se utilizó el método colorimétrico basado en las reacciones de vanadato de amonio (Pereira *et al.*, 2006). El ácido málico se determinó usando un método espectrofotométrico acoplado a enzimas que mide el cambio en la absorbancia a 340 nm de la reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH (Pereira *et al.*, 2006). En ambos casos se utilizó el autoanizador TRAACS 800 (Bran & Luebbe, Plaisir, Francia). La concentración de los ácidos orgánicos individuales se calculó a partir de estándares de ácido tartárico y ácido málico, en gramos por litro (g/l), en el caso de la pulpa, y en microgramos por miligramo (µg/mg) de peso seco (PS), en el caso del hollejo.

#### 3.4.1.4 Análisis de aminoácidos

Para el análisis de aminoácidos las muestras se derivatizaron siguiendo el método descrito por Hilbert *et al.*, (2003) con 6-aminoquinolil-N-hidroxi-succinimidil-carbamato. Tras la derivatización, los aminoácidos se cuantificaron según el método descrito por Torres *et al.* (2017). Para ello, se separaron en una columna AccQ • Tag Ultra, 2.1 × 100 mm, 1.7 µm (Waters, Milford, MA, EE.UU.) a 37°C con elución a 0,5 ml min<sup>-1</sup> (eluyente A, sodio tampón acetato, 140 mM a pH 5,7; eluyente B, acetonitrilo; eluyente C, agua) de acuerdo con el gradiente descrito por Habran *et al.* (2016) en un equipo de UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Electron SAS, Waltham, MA USA). La detección se realizó con un detector de fluorescencia FLD-3000 (Thermo Electron

SAS, Waltham, MA EE. UU.). Los cromatogramas correspondientes a la excitación a 250 nm y emisión a 395 nm se analizaron mediante el software Chromeleon, versión 7.1 (Thermo Electron SAS, Waltham, MA EE. UU.) para calcular el área de cada pico. Como estándar para calibrar la cuantificación se utilizó un kit de 20 aminoácidos (alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, GABA, glicina, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina) de Sigma (St Louis, Missouri, EE. UU.). La concentración de aminoácidos individuales se calculó en nanomoles por microlitro (nmol/ $\mu$ l), en el caso de la pulpa, y en nanomoles por miligramo de peso seco (nmol/mg PS) en el caso del hollejo.

#### 3.4.2 Análisis de antocianinas y flavonoles

Los análisis de antocianinas y flavonoles se realizaron solamente en muestras de hollejo, a partir de los hollejos pulverizados según se describe en el apartado de metabolitos primarios.

Para cada muestra se utilizó una alícuota de 20 mg de hollejo pulverizado que se extrajo con 500  $\mu$ L de metanol-clorhídrico (0,1% en volumen de HCl) (Acevedo de la Cruz *et al.* 2012). Los extractos se filtraron a través de un filtro de jeringa de polipropileno de 0,2  $\mu$ m (Pall Gelman Corp., Ann Harbor, MI, EE. UU.).

Las muestras se analizaron según el método descrito por Torres *et al.*, (2017). Los extractos se separaron en una columna Synchronis C18, 2,1  $\times$  100 mm, 1,7  $\mu$ m (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) a 25°C con elución a 0,368 ml/min según el gradiente siguiente (v / v): 0 min 92,2% A 7,8% B; 9,6 min 73% A 27% B; 14,1 min 70% A 30% B; 14,8 min 92,2% A 7,8% B (eluyente A, agua y ácido fórmico, 90/10 v / v; eluyente B, acetonitrilo) usando un sistema UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Electron SAS, Waltham, MA EE. UU.). Las antocianinas y flavonoles se detectaron mediante un detector de matriz de diodos DAD-3000 que funciona a 520 nm y a 360 nm (Thermo Electron SAS, Waltham, MA EE. UU.). La identificación y la asignación de los picos correspondientes a los compuestos fenólicos se basó en la comparación de sus tiempos de retención y datos espectrométricos UV-VIS con el de estándares puros de malvidina-3-O-glucósido para las antocianinas (a 520 nm), y quercetina-3-O-glucósido para los flavonoles (a 360 nm) (Extrasynthese, Genay, Francia). La identificación de los flavonoides se realizó mediante espectrometría de masas y espectrometría magnética de resonancia nuclear como en estudios previos (Acevedo de la Cruz *et al.*, 2012; Hilbert *et al.*, 2015). Para determinar los picos se utilizó el software Chromeleon, versión 7.1 (Thermo Electron SAS, Waltham, MA EE. UU.). La concentración de antocianinas y flavonoles individuales se calculó en microgramos por miligramo de peso seco ( $\mu$ g/mg PS) a partir de los estándares puros.

#### 3.4.3 Análisis de compuestos volátiles y sus precursores

##### 3.4.3.1 Preparación de las muestras

Para el análisis de compuestos volátiles y de precursores de compuestos volátiles se partió aproximadamente de 12 bayas congeladas de cada muestra. A partir de estas uvas se separaron hollejo y pulpa, con la ayuda de unas pinzas, para obtener 1,5 g de cada tejido, manteniéndolos congelados con nitrógeno líquido en todo momento. En un mortero enfriado con nitrógeno líquido se eliminaron las semillas rompiendo la pulpa congelada con una maza y retirando las semillas con pinzas. A continuación, los tejidos se pulverizaron por separado con un mortero. Se tomó un gramo por muestra para el análisis de los compuestos volátiles, y se guardaron en viales en congelador a -80°C hasta su envío al laboratorio de metabolómica del Instituto de Biología

Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de Valencia, donde se analizaron. El resto del tejido pulverizado de cada muestra se liofilizó para el análisis de compuestos apolares y semipolares que incluyen precursores de compuestos volátiles, obteniéndose aproximadamente 50 mg pulverizados de cada muestra. La muestra liofilizada se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su envío al Casaccia Research Centre de Roma, Italia, para su análisis.

#### 3.4.3.2 *Análisis de compuestos apolares y semipolares*

Las muestras se analizaron siguiendo los procedimientos descritos por Rambla *et al.* (2016). Los compuestos apolares carotenoides y clorofilas se separaron y cuantificaron mediante LC-DAD-APCI-HRMS como se ha descrito previamente (Liu *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015) con ligeras modificaciones, a partir de 20 mg de tejido liofilizado. Los ajustes de APCI-MS fueron los siguientes: vaina y gas auxiliar, ajustados a 30 y 12 unidades, respectivamente; la temperatura del vaporizador y la temperatura capilar se ajustaron a  $270$  y  $220^{\circ}\text{C}$  respectivamente, mientras que la corriente de descarga se ajustó a  $3,5\ \mu\text{A}$ , y la tensión capilar y la configuración de la lente del tubo fueron de 25V y 80V. La identificación de los compuestos se realizó en base a información de la literatura (Mendes-Pinto *et al.*, 2004; Crupi *et al.*, 2010; Kamffer *et al.*, 2010), y sobre la base de datos de masas  $m/z$ , de Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) o Chemspider (<http://www.chemspider.com>). Los ácidos linoleico y linolénico se analizaron usando las mismas condiciones experimentales, su detección se confirmó mediante el uso de estándares, y su cuantificación relativa se realizó con respecto al nivel de un estándar interno (acetato de  $\alpha$ -tocoferol).

Los precursores semipolares de volátiles (aminoácidos, fenilpropanoides, terpenos glucósidos) se analizaron mediante LC-ESI (+) - HRMS con ligeras modificaciones de un procedimiento descrito anteriormente (De Vos *et al.*, 2007; Iijima *et al.*, 2008). Para ello se utilizaron 20 mg de polvo de hollejo o de pulpa liofilizado que se disolvieron en 0,75 ml de metanol frío al 75% (v/v), ácido fórmico al 0,1% (v/v), enriquecido con  $10\ \mu\text{g/ml}$  de formononetina. Después de agitar durante 40 min a 20 Hz usando un Mixer Mill 300 (Qiagen), las muestras se centrifugaron 15 min a  $20.000\ \text{g}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminaron 0,6 ml de sobrenadante y se transfirieron a tubos de HPLC. Los análisis de LC-MS se llevaron a cabo utilizando un sistema de espectrometría de masas LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific) que funciona en ionización por electrospray positiva (ESI), acoplado a un sistema Accela U-HPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). La cromatografía líquida se llevó a cabo usando una columna Phenomenex C18 Luna ( $150 \times 2,0\ \text{mm}$ ,  $3\ \mu\text{m}$ ) y la fase móvil se compuso de agua con 0,1% de Ácido fórmico (A) o acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico (B). El gradiente fue: 95% A, 5% B (1min); un gradiente lineal a 25% A, 75% B durante 40 min y 2 min isocrático, antes de volver a las condiciones iniciales de LC en 18 min. Se inyectaron diez microlitros de cada muestra y se usó un flujo de 0,2 ml durante todo el ciclo de LC. La detección se llevó a cabo de forma continua de 230 a 800 nm con un detector de matriz de fotodiodos Accela Surveyor en línea (PDA, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA). Todos los solventes utilizados fueron de calidad LC-MS (CHROMASOLV R\Sigma - Aldrich). Los metabolitos se cuantificaron de forma relativa mediante la normalización con estándares internos. La ionización ESI-MS fue realizada utilizando los siguientes parámetros: el voltaje y la temperatura capilar se ajustaron a 10 V y  $285^{\circ}\text{C}$ ; el flujo de la vaina y el gas auxiliar a 40 y 10 l/h, respectivamente. El voltaje del rociador se ajustó a 6 kV y el del tubo a 60 V. La identificación de los metabolitos se realizó comparando las propiedades cromatográficas y espectrales con los estándares auténticos y los espectros de referencia, los datos de la literatura y sobre la base de

las masas precisas  $m/z$ , tal como se informa en la base de datos Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la identificación de masas monoisotópicas, o en Metabolomics Fiehn Lab Calculadora de Aducto de Espectrometría de Masas (<http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator/>) en caso de detección de iones aductos.

#### 3.4.3.3 *Análisis de compuestos volátiles*

Las muestras se analizaron según se describe en Rambla *et al.*, (2016). Cada muestra de un gramo de tejido pulverizado congelado se incubó a 30°C 10 min en un vial cerrado de vidrio de 7 ml. Posteriormente, se añadieron 2,2 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 1 ml de EDTA 100 mM, se agitaron suavemente y se sonicaron 5 min. Se transfirieron 1,5 ml de la mezcla homogeneizada a un vial de espacio de cabeza con tapón de rosca de 10 ml. Los compuestos volátiles se extrajeron mediante microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) mediante una fibra PDMS/DVB de 65  $\mu\text{m}$  (Supelco). Inicialmente, los frascos del espacio de cabeza se templaron a 50°C durante 10 min. Luego, los volátiles se extrajeron al exponer la fibra al espacio superior del vial durante 30 min bajo agitación continua y calentamiento a 50°C. Los volátiles extraídos se desorbieron en el puerto de inyección de GC durante 1 min a 250°C en modo splitless. La incubación de los viales, la extracción y la desorción se realizaron automáticamente mediante un automuestreador CombiPAL (CTC Analytics). La separación se realizó en un cromatógrafo de gases 6890N (Agilent Technologies) con una columna DB-5ms (60m x 0.25 mm x 1  $\mu\text{m}$ ) (J & W Scientific) con helio como gas portador a un flujo constante de 1,2 ml/min. Las condiciones de temperatura del horno fueron: 40°C durante 2 min, 5°C / min hasta 250°C y luego se mantuvieron a 250°C durante 5 min. Los espectros de masas se registraron en modo Scan (barrido de todo el rango de masas indicado) en el rango de 35-250  $m/z$  mediante un espectrómetro de masas 5975B (Agilent Technologies) y una velocidad de 6,2 escaneos/s. La ionización se realizó por impacto electrónico con una energía de ionización de 70 eV. Las temperaturas de la fuente de ionización y el cuadrupolo fueron 230°C y 150°C, respectivamente. Los cromatogramas y los espectros de masas se registraron y procesaron utilizando el software Enhanced ChemStation (Agilent Technologies). Los compuestos se identificaron por comparación del espectro de masas y el tiempo de retención con los de estándares puros (SIGMA-Aldrich). Algunos de ellos (Apocarotenoid 33.52 (tipo ionona) y desconocido 34.15 (tipo ionona) se identificaron tentativamente por comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos NIST05. Las áreas de los picos de iones específicos seleccionados se integraron para cada compuesto para la cuantificación, y se normalizaron en comparación con el área de pico del mismo compuesto en una muestra de referencia inyectada regularmente para corregir las variaciones en la sensibilidad del detector y el envejecimiento de la fibra. La muestra de referencia consistió en una mezcla homogénea de todas las muestras analizadas. Los datos para una muestra en particular se expresaron como el contenido relativo de cada metabolito en comparación con los de la referencia.

#### 3.4.4 *Análisis estadísticos*

##### 3.4.4.1 *Comparación de la concentración media de los metabolitos entre variantes blancas y tintas*

Para la cuantificación de cada compuesto se calculó la media como estadístico de tendencia central y la desviación estándar como estadístico de dispersión. Las medias obtenidas para cada

compuesto se compararon dos a dos entre variantes blancas y tintas de cada variedad para cada tejido y estadio de desarrollo mediante el análisis estadístico T-test.

En el caso concreto de azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos totales y flavonoles las medias obtenidas se compararon entre las cuatro variedades (TT, TB, GT y GB) para cada tejido y estadio de desarrollo mediante ANOVA. En caso de detectarse diferencias significativas en ANOVA, estas fueron analizadas entre las muestras mediante el test de comparaciones múltiples HSD (*Honestly significant difference*) de Tukey.

En todos los casos los efectos que se discuten son significativos para un nivel de significación  $\alpha=0,05$ . Para todo ello se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics, versión 25 (IBM).

#### 3.4.4.2 Análisis multivariante de la composición de las uvas

En los grupos de metabolitos estudiados para los que el número de compuestos a comparar entre variantes tintas y blancas fue muy amplio, se utilizó un análisis de componentes principales (ACP) como primera aproximación al estudio de la composición. Este análisis se realizó para el conjunto de todas las muestras en cada grupo de metabolitos. Para analizar específicamente el efecto del color de manera global en la composición de cada grupo de metabolitos, se realizaron también análisis multivariantes de regresión por mínimos cuadrados PLS-DA para el factor color. Mientras que el ACP establece relaciones entre las muestras considerando su composición de manera global, el análisis PLS-DA establece relaciones entre las muestras considerando su composición en función de un determinado factor, en este caso el color de uva de la variante somática. Además del análisis con el conjunto de todas las muestras, se realizaron análisis PLS-DA para el efecto del color específico en las muestras de hollejo y pulpa de cada variedad (Garnacha o Tempranillo). La información estadística obtenida del modelo PLS-DA se puede utilizar para identificar qué variables son importantes para determinar la pertenencia al grupo "tinto" o "blanco". Así, con el objetivo de identificar qué compuestos contribuyeron a la separación de las variantes de color en cada tejido se usó el umbral estadístico  $VIP > 1$  (Chong y Jun, 2005). El VIP (del inglés *Variable Importance in Projection*) es una medida de la importancia de una variable en el modelo PLS-DA. Los valores de VIP para cada compuesto corresponden a la variación porcentual explicada por dicho compuesto en el modelo. Estos análisis se realizaron con el programa estadístico XLSTAT 2018 (Addinsoft).

### 3.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS Y ANÁLISIS DE SNP

#### 3.5.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizaron hojas jóvenes de una anchura menor de 3 cm o raíces secundarias procedentes del enraizamiento de estaquillas. Este material vegetal se conservó en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. La extracción se realizó utilizando el kit DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante más la adición de 1% de PVP40 (Sigma-Aldrich) al tampón de extracción para reducir adicionalmente la presencia de contaminantes. El ADN extraído se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC). Este ADN se utilizó indistintamente para el genotipado de los marcadores SNP y para la re-secuenciación del genoma.

#### 3.5.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el procedimiento de Reid *et al.*, (2006). Para cada réplica, variedad y estadio se utilizaron aproximadamente 10 bayas. En primer lugar, se separó el hollejo

con la ayuda de unas pinzas y se conservó congelado en nitrógeno líquido. En un mortero enfriado con nitrógeno líquido se eliminaron las semillas rompiendo la pulpa congelada con una maza y retirando las semillas con pinzas. A continuación, los tejidos se pulverizaron separadamente en mortero. En todo momento se mantuvieron congelados con nitrógeno líquido. A cada muestra pulverizada, se añadieron 15 ml de tampón de extracción (2% CTAB, 2% PVP, 300 mM Tris-HCl (pH 8), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 0,05% espermidina trihidroclorida) y un 2% de  $\beta$ -Mercaptoetanol en un tubo Falcon de 50 ml y se incubaron a 65°C durante 10 min, mezclando por agitación con vórtex cada 2 min. Posteriormente se añadieron 15 ml de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 a 4°C y se centrifugaron a 4.000 rpm (centrífuga Thermo SCIENTIFIC SORVALL LYNX 4000 Centrifuge, rotor Fiberlite F12 - 6x500 LEX) a 4°C durante 20 min. La fase acuosa del nivel superior se trasladó a un nuevo tubo Falcon, se añadieron de nuevo 15 ml de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se repitió la separación de fases como en el paso anterior. Se recogió de nuevo la fase acuosa en un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó para sedimentar posibles restos de fase orgánica centrifugando a 4.000 rpm (Thermo SCIENTIFIC SORVALL LYNX 4000 Centrifuge, rotor Fiberlite F12 - 6x500 LEX) a 4°C durante 40 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo Falcon de 50 ml. Para precipitar los ácidos nucleicos, se añadieron 1,5 ml de acetato de sodio 3M más 9 ml de isopropanol y se incubó a -80°C durante 25 min. Se centrifugó de nuevo a 4.000 rpm (Thermo SCIENTIFIC SORVALL LYNX 4000 Centrifuge, rotor Fiberlite F12 - 6x500 LEX) a 4°C durante 30 min y se desechó el sobrenadante. El *pellet* se disolvió en 1,5 ml de TE (Tris-HCl 10 mM - EDTA 1 mM) pH 8 y, tras agitar, las muestras se transfirieron a tubos eppendorf de base redonda de 2 ml. Para la precipitación específica de ARN se añadieron 250  $\mu$ l de cloruro de litio 10 M, se mezclaron y se incubaron durante la noche a 4°C. A la mañana siguiente, las muestras se centrifugaron a 12.600 rpm (centrífuga Hettich zentrifugen MIKRO 200R, rotor 2424 - A) a 4 °C durante 30 min para sedimentar el ARN. Se desechó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol 70% a 4°C para lavar el ARN. Tras resuspender los *pellets* en el etanol, las muestras se centrifugaron a 12.600 rpm (Hettich zentrifugen MIKRO 200R, rotor 2424 - A) a 4°C durante 5 min. De nuevo se desechó el sobrenadante y se eliminaron los restos de etanol. Una vez secas las muestras, se añadieron 100  $\mu$ l de agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) para disolver los pellets. El DEPC inactiva las enzimas RNasa ayudando a conservar la integridad del ARN. Las muestras permanecieron en hielo en todo momento.

El ARN extraído según el método anterior se transfirió a columnas del kit Spektrum™ Plant Total RNA (Sigma-Aldrich) en las que se hizo una digestión con DNasa libre de RNasa (QIAGEN Cat. No. 79254) y el ARN se purificó en la columna de acuerdo con los protocolos estándar de la DNasa y el kit descrito por los fabricantes. El ARN se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC) y en caso de obtener una tasa de absorbancia 260 nm/230 nm <1,7 se purificó de nuevo con cloruro de litio según lo descrito en el párrafo anterior.

### 3.5.3 Análisis de SNP

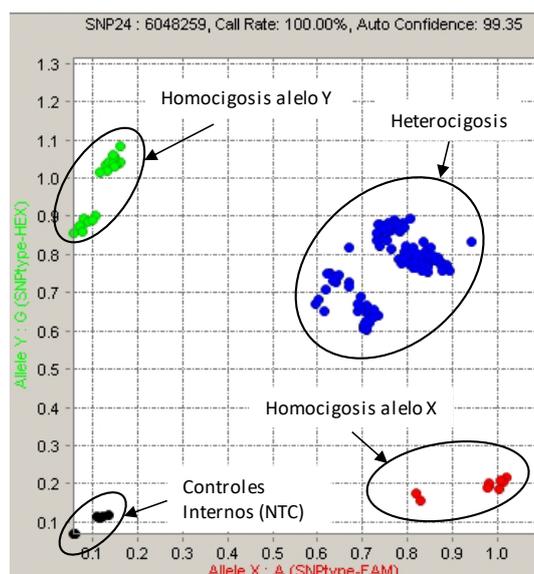
Como herramienta de caracterización preliminar de la presencia de deleciones en el cromosoma 2 y de su segregación, se diseñó un chip para el genotipado de 45 SNP distribuidos a lo largo de este cromosoma (Véase en Resultados punto 4.2.1). Para el genotipado de muestras de ADN de las diferentes accesiones y de plántulas derivadas de autofecundaciones con este chip, las muestras se organizaron en placas de 96 pocillos incluyendo cuatro muestras control (en cada media placa formada por 48 pocillos se incluyó una muestra de PN40024 y otra de Graciano

como controles homocigóticos para los alelos blanco y tinto respectivamente en el locus del color (Jaillon *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2013) y se enviaron al Servicio General de Genómica, Unidad de Secuenciación y Genotipado, SGIker (UPV/EHU) de la Universidad del País Vasco, dónde se analizaron con el sistema Fluidigm. Los SNP son marcadores basados en polimorfismos para un único nucleótido y generalmente dialélicos (X, Y). Por ello, los SNP polimórficos se presentan en tres alternativas genotípicas: XX, XY, YY. El genotipado de SNP mediante este sistema se basa en reacciones de PCR alelo específica a partir de información de las secuencias. Se utilizan marcadores fluorescentes distintos para cada alelo, de tal manera que para cada marcador SNP y muestra analizada se obtienen dos valores de fluorescencia (uno para cada tipo de alelo). La asignación de genotipo se hace a partir de la tasa de fluorescencia de los dos alelos en el conjunto de las muestras. Si la fluorescencia es similar entre los dos fluoróforos para una muestra dada, se asigna genotipo heterocigoto (XY), mientras que, si es suficientemente mayor para algunos de los dos fluoróforos, se le asigna genotipo homocigoto para el alelo correspondiente (XX o YY) como se muestra en la Tabla 3.3. Las muestras que no amplifican o en las que se detectan niveles de fluorescencia que generan incertidumbre para la asignación de genotipo se codifican como “No Call”.

**Tabla 3.3. Asignación de genotipo en función de la fluorescencia para cada alelo para dos de los SNP analizados. Se incluyen ejemplos de accesiones codificadas según se describe en la Tabla 3.1.**

SNP	Muestra	Genotipo	Alelos	Fluorescencia en el alelo X	Fluorescencia en el alelo Y
6048259	EV34-1-15	XX	A:A	0,663	0,150
6048259	GB78-1-22	XX	A:A	0,672	0,145
6048259	GB78-1-23	XY	A:G	0,530	0,574
6048259	GB71-1-24	XY	A:G	0,572	0,531
6048259	GB11-1-3	YY	G:G	0,106	0,651
6048259	EV15-1-17	YY	G:G	0,108	0,665
16788656	GB78-1-22	XX	T:T	0,674	0,202
16788656	EV34-1-16	XX	T:T	0,694	0,202
16788656	GB71-2-5	XY	T:C	0,548	0,673
16788656	GB77-1-1	XY	T:C	0,493	0,526
16788656	GB11-2-4	YY	C:C	0,202	0,665
16788656	EV15-1-6	YY	C:C	0,184	0,650

Estos resultados se pueden representar en gráficas como la de la Figura 3.14, donde cada punto representa una muestra, y los ejes de coordenadas indican el nivel de fluorescencia de cada uno de los dos alelos posibles.



**Figura 3.14. Representación gráfica de resultados de fluorescencia del chip de genotipado del cromosoma 2 para un SNP dado.**

Esta herramienta se utilizó, por un lado, para el estudio de la pérdida de heterocigosidad a lo largo del cromosoma 2 asociada a la pérdida de color de baya en accesiones de GB respecto a GT. La pérdida de heterocigosidad se asigna a aquellos SNP para los que se obtiene genotipo heterocigótico en GT y homocigótico en GB. Esto es debido a que en situaciones de hemicingosis, tras la pérdida de un alelo por delección, aparecen dos nuevos genotipos posibles: X- y Y-, a los que se asigna normalmente un genotipo homocigótico porque sólo se observa fluorescencia de uno de los alelos, y es difícil distinguir entre homocigoto y hemicingoto sólo por la diferencia de intensidad.

Por otro lado, el chip de SNP se utilizó para estudiar la segregación de las copias del cromosoma 2 en las progenies de autofecundación de GB respecto a la de progenies de GT. En este caso, si el locus está en heterocigosis (XY) en el progenitor, la segregación alélica esperada es 1:1 (X, Y), y la segregación genotípica mendeliana esperada es 1:2:1 (XX, XY, YY), que coincide con la fenotípica a nivel de fluorescencia del chip por comportarse como un locus codominante y poder distinguirse los tres genotipos posibles (Tabla 3.4). Si el locus está en hemicingosis (X-) la segregación alélica esperada es 1:1 (X, -), y la genotípica esperada es también 1:2:1 para XX, X-, --, pero a nivel de la fluorescencia detectada se comporta como un locus dominante, al no poder distinguirse los genotipos XX y X- con la tecnología de genotipado utilizada (Tabla 3.5), por lo que son asignados al genotipo XX. Por ello la frecuencia fenotípica esperada según la señal fluorescente sería 3:1 (XX, --). Los valores de fluorescencia de los controles sin DNA se usan como referencia para clasificar los "No Call" en ese rango como homocigotos para el alelo nulo (--).

**Tabla 3.4. Ejemplo de segregación en individuos de la población de autofecundación de la accesión GB71 de un SNP que se halla en heterocigosis en el parental.**

SNP	Muestra	Tipo de muestra	Fenotipo	Alelos	Fluorescencia en el alelo X	Fluorescencia en el alelo Y
<b>6048259</b>	<b>GB71</b>	Parental	<b>XY</b>	<b>A:G</b>	<b>0,539</b>	<b>0,583</b>
6048259	GB71-1-1	Progenie	XX	A:A	0,532	0,136
6048259	GB71-1-5	Progenie	YY	G:G	0,092	0,583
6048259	GB71-2-10	Progenie	XY	A:G	0,574	0,526
6048259	GB71-2-15	Progenie	XY	A:G	0,557	0,576

**Tabla 3.5. Ejemplo de segregación en individuos de la población de autofecundación de la accesión GB71 de un SNP que se halla en hemicigosis en el parental (y heterocigosis en GT).**

SNP	Muestra	Tipo de muestra	Fenotipo	Alelos	Fluorescencia en el alelo X	Fluorescencia en el alelo Y
<b>14942522</b>	<b>GTEV15</b>	Parental	<b>XY</b>	<b>T:C</b>	<b>0,447</b>	<b>0,570</b>
<b>14942522</b>	<b>GB71</b>	Parental	<b>YY</b>	<b>-:C</b>	<b>0,158</b>	<b>0,735</b>
14942522	GB71-1-1	Progenie	YY	-:C/C:C	0,105	0,543
14942522	GB71-1-5	Progenie	YY	-:C/C:C	0,138	0,569
14942522	GB71-2-10	Progenie	YY	-:C/C:C	0,159	0,741
14942522	GB71-2-15	Progenie	YY	-:C/C:C	0,161	0,743
14942522	GB71-1-14	Progenie	No Call	-:-	0,082	0,080
14942522	GB71-1-8	Progenie	No Call	-:-	0,084	0,083
14942522	GB71-2-6	Progenie	No Call	-:-	0,111	0,113

## 3.6 ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

### 3.6.1 Re-secuenciación de genomas de accesiones de Garnacha

La re-secuenciación se llevó a cabo en el Centro de Regulación Genómica de Barcelona a partir de muestras de ADN genómico (ADNg) extraído de hojas jóvenes de los individuos: GB77, GT77, GB1662 y GT1608. Para ello se construyó una librería a partir del ADNg de cada accesión que fue fragmentado a un promedio de ca. 470 bp y a esos fragmentos se ligaron adaptadores usando el protocolo TruSeq de Illumina. Las librerías así generadas se secuenciaron en un secuenciador Illumina HiSeq 2000. La secuenciación se realizó mediante lecturas de una longitud de 125 nucleótidos (nt) y de manera emparejada. Es decir, para cada fragmento de ADN se secuencian 125 nt desde cada extremo, de modo que se conoce la pareja de lecturas que procede del mismo fragmento, así como su orientación en el mismo.

#### 3.6.1.1 Alineamiento

Las lecturas correspondientes a cada muestra se alinearon con el genoma de referencia PN40024 12X.0 (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>) utilizando el programa BWA versión 0.7.12 con los parámetros establecidos por defecto (Li y Durbin, 2009). Aproximadamente, un 80% de las lecturas alinearon con el genoma de referencia con mayor o menor grado de calidad. Para los subsiguientes análisis solo se consideraron las lecturas en las que los dos miembros de la pareja habían alineado con el

genoma de referencia (ca. 73% de las lecturas). Se eliminaron las lecturas redundantes incluidas en el mismo intervalo usando la opción `rmdup` de SAMtools versión 1.5 (Li *et al.*, 2013), ya que suelen corresponder con copias técnicas de la secuenciación del mismo fragmento.

#### 3.6.1.2 *Análisis de la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 2*

Los archivos que almacenan en formato BAM los datos de las lecturas de las muestras alineadas con el genoma de referencia se usaron para identificar SNP heterocigóticos en las accesiones de GT (GT77 y GT1608). Para cada uno de ellos se comprobó si las mismas posiciones eran homocigóticas en la variante blanca correspondiente (GB77 o GB1662). El genotipado sobre las lecturas alineadas se llevó a cabo utilizando la aplicación SAMtools (Li *et al.*, 2013).

Los alineamientos con calidad de mapeo  $\geq 40$  (en escala *phred*= probabilidad de alineamiento erróneo  $< 0,0001$ ) se utilizaron para la búsqueda de polimorfismos de nucleótido con respecto al genoma de referencia. Para todo ello, se usaron las herramientas del paquete `samtools-bcftools` 1.5 (Li *et al.*, 2013). Los SNP identificados por esta aplicación fueron además filtrados por calidad a nivel de base (min  $>13$  BAQ), desviación de hebra, profundidad total (solo se consideraron posiciones con  $>15$  lecturas) y frecuencia alélica. En el análisis de LOH se designaron como SNP en heterocigosis a aquellos con una frecuencia del alelo alternativo de 35-65 % frente al alelo de la referencia. Sobre las posiciones de SNP en heterocigosis en la variante tinta se determinó que había LOH en la variante blanca correspondiente si uno de los alelos estaba en homocigosis (frecuencia  $\geq 90\%$  en la variante blanca). Se cuantificaron las posiciones heterocigóticas en ventanas de 10 kb a lo largo de cada cromosoma.

#### 3.6.1.3 *Análisis de número de copias en el cromosoma 2 a partir de los datos de secuenciación del genoma*

Las lecturas alineadas con el genoma de referencia con un mínimo de calidad de mapeo de 10 se utilizaron para el estudio de la variación en el número de copias. En este análisis se comparó la profundidad de lecturas de secuenciación de ADN<sub>g</sub> alineadas con el genoma de referencia en las variantes somáticas blancas, GB77 y GB1662, frente a sus respectivas muestras control tintas, GT77 y GT1608. Para este fin se usó el programa CNV-seq (Xie y Tammi, 2009) y se establecieron como criterios de significación un tamaño mínimo de cuatro ventanas consecutivas con una probabilidad de error  $P \leq 0,05$  y que además superasen umbrales de cambio de  $\log_2 \leq -0,5$  o  $\geq 0,37$  para designar deleciones y duplicaciones, respectivamente. Las figuras de los resultados fueron elaboradas con un script de R que incluye el propio paquete.

#### 3.6.2 *Secuenciación de ARN*

La secuenciación de ARN (RNA-seq) se realizó en el Centro de Regulación Genómica de Barcelona. En primer lugar, se comprobó la integridad del ADN mediante Bioanalyzer (RIN  $>8$ ). Se construyeron 72 librerías para las tres repeticiones de hollejo y pulpa de TT, TB, GT (accesión 1608) y GB (accesión 1662) de bayas recolectadas en tres estadíos (PE, E y PM) usando Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Prep kit a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total de cada muestra, tal como se ha descrito previamente (Royo *et al.*, 2018). Las librerías con los adaptadores ligados a los fragmentos de ADN<sub>c</sub> retrotranscritos se amplificaron con 15 ciclos de PCR. Finalmente, la calidad de las librerías se analizó en un Bioanalyser DNA1000 y se cuantificaron usando un kit de PCR en tiempo real (Kapa Biosciences). La secuenciación se realizó en Illumina HiSeq 2000 usando química v.4.

La secuenciación produjo lecturas emparejadas de 125 nucleótidos siguiendo el mismo procedimiento descrito para la secuenciación genómica. Se produjeron aproximadamente ~15 millones de parejas de lecturas por muestra.

#### 3.6.2.1 Alineamiento de las secuencias de ARN

Las lecturas obtenidas para cada muestra se alinearon con el genoma de referencia PN40024 12X.0 utilizando el alineador HiSat2 (Kim D, Langmead y Salzberg, 2015) bajo parámetros permisivos para la diversidad esperada entre el transcriptoma en estudio y el genoma de referencia (edit distance $\leq$ 4). Se eliminaron las lecturas duplicadas, y solo los alineamientos concordantemente emparejados y, con una calidad de mapeo de 60 (alineamientos únicos) fueron tenidos en cuenta para analizar los niveles de expresión génica. Así, el ~60% de las lecturas originales de cada muestra son las que se utilizaron para el posterior contaje.

#### 3.6.2.2 Análisis de expresión diferencial del transcriptoma

El recuento de alineamiento de lecturas con el genoma de referencia PN40024 12X.0 se computó con HTseq (versión 0.5.4p5) (Anders *et al.*, 2015), dirigido a regiones exónicas según la anotación de genes 12X v1 disponible para ese genoma de referencia (Grimplet *et al.*, 2012). Para la normalización del número total de lecturas entre las muestras, previa al análisis de expresión diferencial, se usó el paquete de programas edgeR (Robinson *et al.*, 2010) ajustando el contaje al tamaño de librería y al tamaño del transcrito mediante el cálculo de FPKM (Fragments Per Kilobase per Million). Como primera aproximación a la variación de la expresión global entre las muestras se realizó un escalado multidimensional (MDS) de dos dimensiones de los 500 genes con mayor variación como control previo al análisis diferencial. Para identificar genes expresados diferencialmente se analizaron las cuatro series (hollejo y pulpa de Garnacha y Tempranillo) de desarrollo y maduración (PE, E y PM) que implican la comparación entre la variante blanca y la tinta para Tempranillo y Garnacha para hollejo y pulpa mediante el algoritmo de series temporales de dos clases de la herramienta maSigPro (Nueda, *et al.*, 2018). Los genes diferenciales se seleccionaron de acuerdo a un umbral de significación de  $P < 0,05$  (tras el ajuste del valor de  $P$  para test múltiples según la tasa de falsos positivos, FDR, mediante el método Benjamini-Hochberg) y que se ajustasen al modelo de la serie temporal con  $R^2 > 0,6$  según la estimación del algoritmo maSigPro. Además, solo se consideraron como significativos aquellos genes para los que, en al menos uno de los tres estadios de la serie, la diferencia en los niveles de expresión entre la variante blanca y la tinta fuese  $> 1,75$  veces ( $\log_{FC} > 0,8073$ ) y para filtrar genes con expresión demasiado baja que, en el mismo estadio, al menos una de las dos variantes tuviese un valor promedio de expresión FPKM  $> 1$ . Para cada una de las cuatro series de la combinación de cada tejido y variedad, los genes expresados diferencialmente (DEG) se clasificaron en nueve grupos en función de su perfil de expresión diferencial entre variantes blancas y tintas a lo largo de la maduración utilizando también la aplicación de maSigPro.

#### 3.6.2.3 Análisis de enriquecimiento funcional

Se analizó el enriquecimiento funcional en los DEG de cada uno de los nueve perfiles identificados para cada una de las cuatro series temporales por maSigPro. Para ello se utilizó una clasificación funcional específica de vid disponible para los transcritos predichos para la anotación 12X v1 del genoma de referencia de la vid (Grimplet *et al.*, 2012). Mediante la aplicación FatiGO de Babelomics 5 (<http://www.babelomics.org/>), se comparó la representación de categorías funcionales de los DEG de cada perfil frente a la que se da para el global de

transcritos anotados en el genoma de referencia. Se consideró que el enriquecimiento era significativo cuando  $P < 0,05$  (tras corregir  $P$  para test múltiples según Benjamini-Hochberg) en el test de Fisher calculado por FatiGO.



# 4.Resultados



## 4 RESULTADOS

### 4.1 VARIACIÓN PARA CARACTERES RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN Y LA COMPACIDAD DEL RACIMO EN UNA COLECCIÓN DE ACCESIONES DE GARNACHA BLANCA

Los procesos de selección clonal precisan de la existencia de variabilidad genética intravarietal que dé lugar a variación fenotípica para poder seleccionar aquellos individuos que se diferencien del resto por unas determinadas características de interés. Por otro lado, dichas características deben mantenerse estables a lo largo del tiempo. A la hora de seleccionar variantes que se conviertan en clones hay distintos caracteres agronómicos y enológicos a tener en cuenta, entre los que cabe destacar la producción y la compacidad del racimo, por su influencia directa en la calidad y en los resultados económicos de la explotación, y por estar influidos por muchos factores diferentes, dificultando la consecución del objetivo de estabilidad. Con el fin de tratar de entender las diferencias detectadas en trabajos previos (Andreu *et al.*, 2016) para estos dos caracteres en una colección de GB susceptible de selección clonal, se estudiaron durante los años 2015 y 2017 distintos caracteres con posible influencia a nivel de planta, racimo y baya en 15 accesiones de GB.

#### 4.1.1 Selección de accesiones y caracteres

En este estudio se caracterizó parte del germoplasma de GB recopilado por la Sección de Viticultura y Enología del Gobierno de Navarra (EVENA) y conservado en la finca experimental del Gobierno de Navarra, Baretón. Dado que resultaba inviable acometer simultáneamente el estudio completo de las 41 accesiones de GB recopiladas, se decidió seleccionar una accesión de cada una de las 14 parcelas origen, bajo la hipótesis de que puede existir mayor variabilidad genética entre plantas de distintas parcelas que entre plantas de una misma parcela. EVENA había trabajado en la caracterización agronómica y enológica de las 41 accesiones desde el año 2013, en el marco de un programa de selección clonal de GB. Se eligió de cada parcela de origen la accesión mejor valorada según los criterios de selección clonal que había establecido el programa de mejora con anterioridad al inicio del presente trabajo, en base a los datos previos de todas las accesiones. En este punto es importante señalar que los trabajos de caracterización relativos al proceso de selección clonal continuaron sobre el conjunto de las accesiones recopiladas de manera paralela al estudio aquí presentado. Este estudio por lo tanto iba a permitir una caracterización más completa de las 14 accesiones sobre las que se iba a realizar. La elección de dichas accesiones considerando los criterios del programa de mejora permitía caracterizar en mayor profundidad las accesiones con mayor probabilidad de convertirse en clones. También es importante mencionar que en el momento de elegir las accesiones a estudiar se desconocía la presencia de virosis en la mayor parte de ellas (Tabla suplementaria S1). Según los criterios de la selección clonal, se valoró positivamente a las accesiones con valores por debajo de la media de todas las accesiones para los caracteres de corrimiento, compacidad, peso de 100 bayas y grado probable del mosto y valores por encima de la media para acidez total del mosto. El estudio por lo tanto se ha desarrollado sobre las 14 accesiones pre-seleccionadas más una accesión del clon comercial de GB 141 plantado en la misma parcela (véase Tabla 3.1 en Materiales y Métodos).

Como primera aproximación, se evaluó el promedio y la dispersión de los datos para cada uno de los caracteres en cada accesión, cada uno de los dos años de estudio. Los resultados

apuntaron diferencias interesantes entre accesiones, pero también una dispersión muy alta (rango amplio de variación entre réplicas -plantas o racimos- de la misma accesión), en algunos de los caracteres (véase coeficientes de variación en la Tabla suplementaria S1), y más acusada en 2017 que en 2015. Esa dispersión tan elevada en algunos caracteres indicaba que su variabilidad intrínseca posiblemente requería el estudio de un número mayor de racimos en cada accesión para su correcta caracterización, por lo que se decidió eliminarlos del presente estudio. Así, se decidió excluir de los siguientes análisis aquellos caracteres en los que el coeficiente de variación (CV) fue superior al 40% en más del 80% de las accesiones los dos años (Tabla suplementaria S1). De esta forma, se excluyeron tres caracteres: el número de ovarios verdes vivos (LGO), el nº de bayas sin semilla (SelBeBu) y el millerandage (Mil). Asimismo, se decidió excluir a la accesión GB04 de los siguientes análisis, la única en la que más del 24% de los caracteres mostró un CV superior al 35% los dos años. Por tanto, para análisis más detallados de los datos se utilizaron los datos de 14 accesiones (13 pre-seleccionadas más GB 141).

#### 4.1.2 Variabilidad, estabilidad y relaciones entre los caracteres

En primer lugar, se estudió el comportamiento de los caracteres en cuanto a su variabilidad, estabilidad y relaciones entre ellos, considerando el conjunto de todos los datos, es decir, todas las medidas de plantas y racimos de GB conjuntamente, sin considerar el factor accesión. El objetivo era evaluar la existencia de variabilidad en GB, y para ello se determinó el rango (valores máximo y mínimo) y el coeficiente de variación (CV, a partir de la media y la desviación estándar) del conjunto de los datos para cada carácter en cada año (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1. Estadística descriptiva para los caracteres estudiados en 2015 y 2017.** *n*, número de muestras analizadas en cada año; *Mín*, mínimo; *Máx*, máximo; *DesvStd*, desviación estándar; *CV*, coeficiente de variación. Para el CV, fondos en tonos verdes muestran valores bajos, y en tonos rojos valores altos; tonos más oscuros, más bajo o más alto. Para el T-test entre años se muestra la media de los dos años y la significación. \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ .

Caracteres	n	2015					2017					T-test 2015-2017
		Media	Mín	Máx	DesvStd	CV	Media	Mín	Máx	DesvStd	CV	
Nº racimos cepa	56	15,7	7,0	24,0	3,9	0,24	15,5	7,0	25,0	4,3	0,27	15,6
Producción cepa (kg)	56	3,8	0,9	11,7	1,8	0,48	2,3	0,1	7,0	1,3	0,56	3,0 ***
Anchura del racimo (cm)	70	11,3	7,1	18,5	2,4	0,21	11,0	5,5	19,0	2,8	0,25	11,2
Longitud del racimo (cm)	70	12,6	9,0	17,5	1,9	0,15	13,3	5,0	21,0	3,0	0,22	12,9
Peso racimo (g)	70	286,0	112,1	891,9	140,4	0,49	217,8	18,6	570,7	124,0	0,57	251,9 ***
Longitud 1ª rama (mm)	70	37,8	16,4	65,6	11,2	0,29	36,8	13,5	63,2	11,5	0,31	37,3
Longitud 2ª rama (mm)	70	35,0	6,3	61,0	10,2	0,29	31,4	14,4	57,1	10,0	0,32	33,2 *
Longitud raquis (cm)	70	7,8	5,0	12,3	1,4	0,18	8,6	3,7	14,3	2,4	0,28	8,2 *
Longitud pedicelo (mm)	70	5,8	4,8	7,4	0,5	0,09	5,4	4,7	6,5	0,5	0,09	5,6 ***
Peso raquis (g)	70	9,2	3,7	24,4	4,0	0,43	8,2	1,1	24,0	4,6	0,56	8,7
Nº de ramificaciones	70	13,0	6,0	24,0	3,7	0,29	14,7	2,0	31,0	5,3	0,36	13,8 *
Nº flores	70	576,6	219,0	1147,0	207,6	0,36	667,5	146,0	1267,0	309,3	0,46	622,1 *
Nº bayas normales	70	171,8	50,0	493,0	81,0	0,47	127,8	13,0	320,0	68,4	0,54	149,8 ***
Cuajado	70	34,4	9,5	75,0	15,6	0,45	24,1	1,6	51,0	12,3	0,51	29,3 ***
Corrimiento	70	6,5	2,5	9,0	1,6	0,24	7,6	4,9	9,8	1,2	0,16	7,1 ***
Compacidad visual racimo	70	5,8	3,0	9,0	1,9	0,32	4,2	1,0	9,0	2,3	0,55	5,0 ***
Anchura baya (mm)	70	12,8	10,2	14,7	1,0	0,08	12,8	9,1	14,2	0,8	0,06	12,8
Longitud de baya (mm)	70	13,3	10,8	15,7	1,2	0,09	13,0	9,1	14,6	0,9	0,07	13,1
Peso baya (g)	70	1,5	0,7	2,5	0,4	0,25	1,6	0,7	2,2	0,2	0,16	1,6
Volumen baya (ml)	70	1,5	0,6	4,1	0,5	0,34	1,4	0,7	2,0	0,2	0,16	1,5
Nº semillas/baya	70	1,8	1,1	2,9	0,4	0,20	1,3	1,0	1,9	0,2	0,14	1,6 ***

De manera general GB mostró variabilidad en todos los caracteres estudiados. Sin embargo, el análisis reveló que determinados caracteres presentaron alto CV y otros bajo CV de manera consistente en los dos años de estudio (Tabla 4.1). Así, los caracteres en los que se observó mayor coeficiente de variación ambos años fueron la producción por planta (CV=0,48 en 2015 y CV=0,56 en 2017) y el peso del racimo (CV=0,49 y CV=0,57), seguidos por el peso del raquis, el número de bayas y el cuajado (Tabla 4.1). Por el contrario, la anchura y la longitud de la baya fueron los que presentaron menor coeficiente de variación tanto en 2015 como en 2017 (entre 0,06 y 0,09), seguidos de la longitud del pedicelo.

Con el fin de conocer el comportamiento de los caracteres en lo que respecta a su estabilidad a lo largo del tiempo se compararon las medias del conjunto de los datos para cada carácter entre 2015 y 2017 mediante un análisis T-test. La comparación de las medias mostró diferencias significativas en un total de doce caracteres (57% de los caracteres analizados): producción por planta, peso de racimo, longitud de la 2ª ramificación, longitud del raquis, longitud del pedicelo, número de ramificaciones, de flores y de bayas con semillas por racimo, cuajado, corrimiento, compacidad visual y semillas por baya (Tabla 4.1). Con el fin de comprobar si estas diferencias observadas en muchos de los caracteres entre los dos años estudiados eran independientes o no de las accesiones se realizó un análisis de correlaciones Tau-b de Kendall entre años para cada carácter usando las medias de las accesiones. Solamente se encontró correlación significativa entre ambos años en el número de bayas con semilla (SedBeBu, coeficiente de correlación de Tau-b de Kendall ( $\tau_b$ ) igual a 0,407), en el cuajado (Fr,  $\tau_b = 0,538$ ), en el corrimiento (Col,  $\tau_b = 0,516$ ) y en el peso de la baya (BeWe,  $\tau_b = 0,407$ ), indicando que la variación interanual observada en el test de medias ocurrió en sentidos diferentes para las accesiones estudiadas en la mayor parte de los caracteres. Por ejemplo, para la Producción por cepa, la media global descendió de 3,8 kg en 2015 a 2,3 kg en 2017; sin embargo, el comportamiento de las distintas accesiones fue muy desigual, y hubo algunas que disminuyeron notablemente su producción, como GB08 (de 5,9 a 1,8), otras que se mantuvieron, como GB45 (de 3,2 a 2,7) y otras que incluso aumentaron, como GB36 (de 3,0 a 3,9). Este comportamiento indica la posible existencia de interacciones Genotipo x Ambiente en las accesiones de GB.

En lo que respecta a las relaciones entre caracteres, se espera que existan entre algunos de ellos, como es el caso de los relacionados con la producción por ser interdependientes (Producción por planta, racimos por planta, peso de racimo) o de algunos caracteres de un mismo grupo (planta, racimo o baya). Con el fin de determinar la existencia y la magnitud de estas relaciones, se realizó un análisis de correlaciones bilaterales Tau-b de Kendall de manera independiente para cada año con el conjunto de todos los datos (Tabla 4.2). Durante 2015, los caracteres que mayor correlación mostraron entre ellos fueron corrimiento y cuajado, en este caso correlacionados negativamente ( $\tau_b = -0,981$ ). También se obtuvieron coeficientes de correlación por encima de 0,7 para las parejas volumen - peso de la baya, longitud - anchura de baya, y peso de raquis - peso de racimo. En lo que respecta a caracteres relacionados con la producción, el peso del racimo correlacionó con el número de bayas por racimo ( $\tau_b = 0,634$ ) y éste con el cuajado ( $\tau_b = 0,536$ ) y con el corrimiento ( $\tau_b = -0,541$ ). El cuajado fue menor cuanto mayor fue el número de flores ( $\tau_b = -0,402$ ), lo opuesto al corrimiento ( $\tau_b = 0,399$ ). En lo que respecta a la compacidad, mostró la mayor correlación con el peso del racimo ( $\tau_b = 0,406$ ) y con el cuajado ( $\tau_b = 0,350$ ) y corrimiento ( $\tau_b = -0,358$ ), siendo menores las correlaciones con caracteres de dimensiones de la baya, del racimo y del raquis, y con el número de bayas por racimo (Tabla 4.2).

Durante 2017 las variables con mayor correlación entre ellas coincidieron con las de 2015. En 2017, la correlación entre el peso de racimo y el número de bayas normales fue mayor ( $\tau_b = 0,856$ ) y la producción por cepa se relacionó tanto con el número de racimos por cepa ( $\tau_b = 0,666$ ) como con el peso del racimo ( $\tau_b = 0,394$ ). En la misma línea que en 2015, el peso de racimo también se relacionó con el peso de la baya, pero en menor medida que con el número de bayas. Se observó de nuevo relación de este último con el cuajado y el corrimiento, aunque menor que en 2015. De nuevo el cuajado fue menor cuanto mayor fue el número de flores ( $\tau_b = -0,368$ ), lo opuesto al corrimiento ( $\tau_b = 0,368$ ). En este caso, la compacidad mostró las mayores correlaciones con el peso del racimo ( $\tau_b = 0,595$ ), número de bayas por racimo ( $\tau_b = 0,577$ ), cuajado y corrimiento ( $|\tau_b| = 0,446$ ) y bajas de nuevo con las dimensiones de la baya y la arquitectura del racimo.

**Tabla 4.2. Correlación Tau-b de Kendall entre caracteres.** Correlaciones significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre caracteres obtenidas en 2015 (encima de la diagonal) y en 2017 (debajo de la diagonal). Fondos de tonos verdes muestran correlaciones positivas, y en tonos rojos correlaciones negativas; los tonos más oscuros indican mayor correlación; en color azul en la diagonal se indican las correlaciones significativas entre ambos años; ToBuP, nº racimos planta; PrP, producción por planta; Comp, compacidad visual racimo; BuWi, anchura racimo; BuLe, longitud racimo; BuWe, peso racimo; 1RmLe, longitud 1ª rama; 2RmLe, longitud 2ª rama; RaLe, longitud raquis; PdiLe, longitud pedicelo; RaWe, peso raquis; RmBu, nº de ramificaciones racimo; FIBu, nº flores racimo; SedBeBu, nº bayas con semillas racimo; Fr, cuajado; Col, corrimiento; BeWi, anchura baya; BeLe, longitud de baya; BeWe, peso baya; BeVo, volumen baya; Sbe, nº semillas/baya.

2015 2017 T <sub>b</sub> Kendall	ToBuP	PrP	BuWi	BuLe	BuWe	RmLe1	RmLe2	RaLe	PdiLe	RaWe	RmBu	FIBu	SedBeBu	Fr	Col	Comp	BeWi	BeLe	BeWe	BeVo	Sbe	
ToBuP		,227								-,205	-,248											
PrP	,666		,217			,191	,289	,294		,223												
BuWi				,437	,483	,477	,375	,353		,548	,307	,167	,428	,199	-,191			,184				
BuLe	,277	,290	,516		,610	,360	,352	,351		,535	,257		,478	,280	-,277	,238	,268	,257				
BuWe	,287	,394	,593	,565		,414	,380	,360		,758	,354		,634	,425	-,422	,406	,353	,318	,233	,182		
RmLe1		,238	,452	,559	,420		,492	,479		,525	,374	,215	,457	,196	-,203							
RmLe2			,404	,497	,314	,631		,342		,428	,231	,176	,487	,251	-,254							
RaLe			,335	,544	,352	,508	,435			,434	,356	,237	,338									
PdiLe				,251	,202	,173	,201	,334						-,172	-,178	,185						
RaWe	,320	,336	,658	,622	,775	,480	,402	,421	,240		,399	,164	,646	,342	-,340	,297	,230	,186				
RmBu			,252	,415	,295	,353	,269	,375		,355				,362	,216	-,217					,176	
FIBu			,352	,524	,262	,546	,401	,465		,359	,320				-,402	,399						
SedBeBu	,264	,345	,589	,583	,856	,431	,300	,386	,191	,767	,293	,308	,407	,536	-,541	,242						
Fr		,245	,171		,347					,232				-,368	,309	,538	-,981	,350				
Col		-,245	-,171		-,347					-,232				,368	-,309	-,1,00	,516	-,358				
Comp		,295	,271	,295	,595				,205	,482	,201		,577	,446	-,446		,271	,295	,260	,243		
BeWi	,199	,360	,290		,375	,212	,253			,297				,255	,178	-,178	,303	,786	,510	,502		
BeLe		,350	,228		,365	,189	,238		,181	,284				,245	,166	-,166	,358	,799		,481	,474	
BeWe					,292					,195							,255	,670	,699	,407	,789	
BeVo		,236			,245					,177					,180	-,180	,228	,555	,577	,759		
Sbe		,292	,220	,227	,376			,191		,324	,217			,381	,214	-,214	,427	,266	,253			

En resumen, los resultados muestran distinto comportamiento de los caracteres en varios aspectos; en primer lugar, por un diferente grado de variabilidad entre las plantas y racimos estudiados, mayor para la producción por planta y el peso del racimo y menor para la anchura y la longitud de la baya. Muestran también diferente estabilidad, cambiando significativamente

doce de ellos su valor medio en función del año. Este cambio, además, sólo muestra una tendencia definida para el número de bayas con semilla del racimo, el cuajado, el corrimiento y el peso de la baya, considerando las accesiones. De manera general, los caracteres de cada grupo (planta, racimo y baya), correlacionaron más entre sí que con los de los otros grupos. El peso del racimo mostró mayor correlación con el número de bayas por racimo que con el peso de la baya ambos años. El número de bayas a su vez correlacionó con el cuajado y de manera opuesta con el corrimiento. Por su parte, la compacidad mostró las mayores correlaciones con el peso del racimo, el número de bayas por racimo y el cuajado, todas ellas relacionadas entre sí en sentido positivo.

#### 4.1.3 Variabilidad y estabilidad de las accesiones

Una vez determinada la existencia de altos niveles de variación en GB para la mayoría de los caracteres estudiados, se analizó si parte de esa variación se debía al factor accesión. Los análisis de varianza mostraron la existencia de diferencias significativas entre accesiones para muchos de los caracteres (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3. Variación entre accesiones por carácter y año.** Se muestra el dato medio de las accesiones y la significación. n, número de muestras analizadas; \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ .

Caracteres	n	ANOVA			
		2015		2017	
Nº racimos cepa	14	15,7		15,9	
Producción cepa (kg)	14	3,8	***	2,5	***
Anchura del racimo (cm)	14	11,5	**	11,1	
Longitud del racimo (cm)	14	12,7	**	13,1	***
Peso racimo (g)	14	301,1	***	219,5	*
Longitud 1ª rama (mm)	14	38,7	***	35,8	
Longitud 2ª rama (mm)	14	35,5	**	30,4	*
Longitud raquis (cm)	14	7,9	***	8,5	
Longitud pedicelo (mm)	14	5,8	***	5,4	
Peso raquis (g)	14	9,9	***	8,1	
Nº de ramificaciones	14	13,2	***	14,2	*
Nº flores	14	578,6		658,4	
Nº bayas normales	14	179,20	***	127,80	*
Cuajado	14	35,30	**	24,60	*
Corrimiento	14	6,50	**	7,50	*
Compacidad visual racimo	14	5,80	**	4,20	**
Anchura baya (mm)	14	12,80		12,80	**
Longitud de baya (mm)	14	13,30		13,00	**
Peso baya (g)	14	1,50		1,60	***
Volumen baya (ml)	14	1,50		1,50	*
Nº semillas/baya	14	1,80	***	1,30	*

Durante el año 2015 se detectaron diferencias entre accesiones para 15 caracteres: producción por cepa, número de semillas por baya y todos los caracteres de racimo excepto el número de flores por racimo. Durante el año 2017, 14 caracteres mostraron diferencias significativas entre accesiones, aunque no todos correspondieron con los del primer año de estudio, lo que pone de manifiesto la influencia del ambiente sobre las accesiones. Todos los caracteres de baya

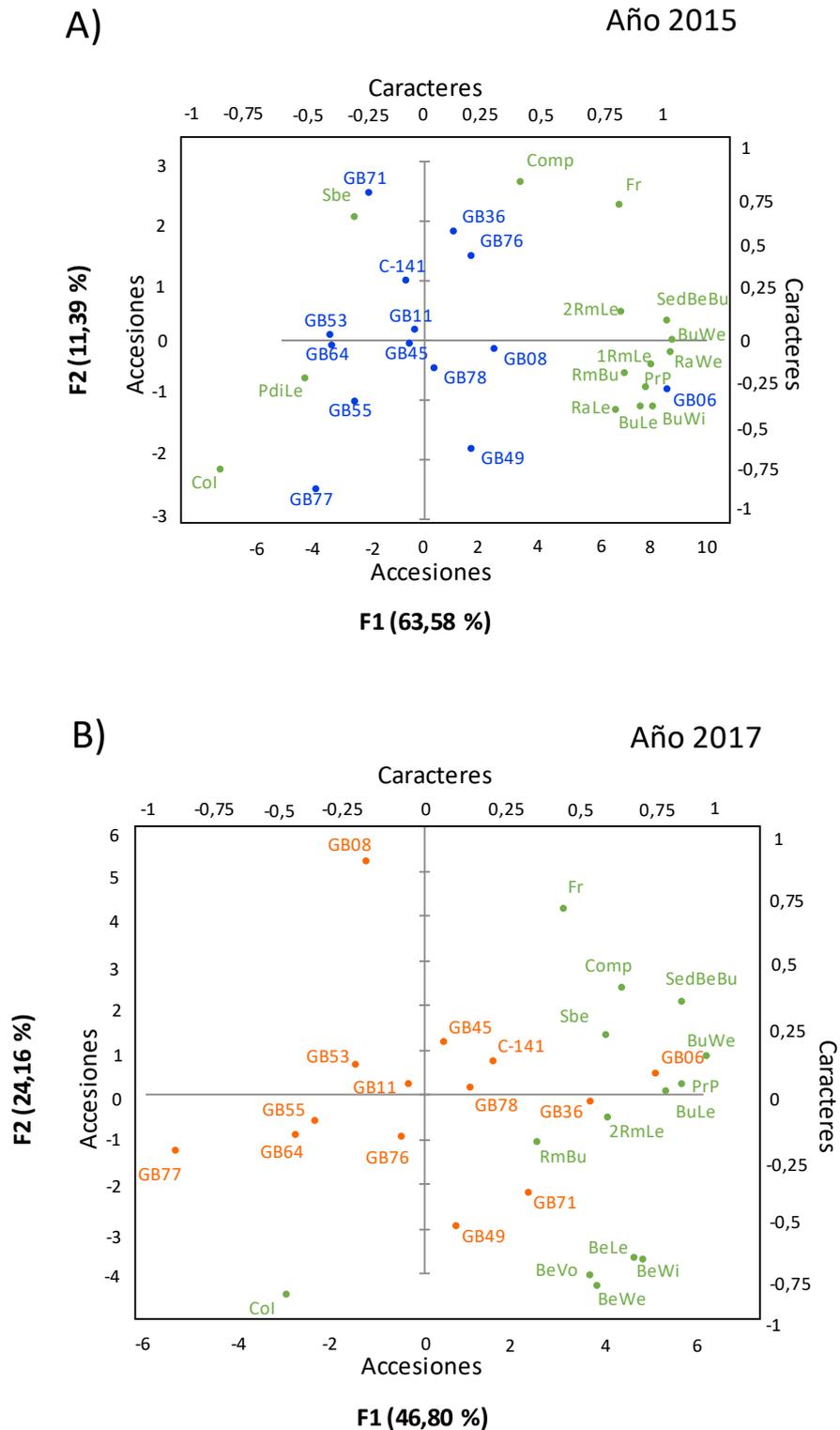
mostraron diferencias significativas durante el año 2017, y no en 2015. En total, diez caracteres mostraron diferencias significativas los dos años (producción por cepa, longitud del racimo, peso del racimo, longitud de la segunda ramificación, número de ramificaciones y de bayas con semillas por racimo, cuajado, corrimiento, compacidad y número de semillas por baya) y dos (número de racimos por planta y número de flores por racimo) no mostraron diferencias ninguno de los dos años. Resulta destacable que la producción por cepa, el peso del racimo y la compacidad, tres de los caracteres más importantes en términos de calidad y rendimiento, mostraron diferencias significativas entre las accesiones. Por otro lado, en todos los caracteres que mostraron capacidad discriminante entre accesiones los dos años (Tabla 4.3) se identificaron diferencias interanuales significativas (Tabla 4.1), a excepción de la longitud del racimo, el único carácter discriminante y estable a nivel global.

Para visualizar la variación global entre accesiones, así como para identificar los caracteres que marcan la diferenciación entre las mismas, se realizó un análisis de componentes principales para el conjunto de las accesiones en cada año considerando únicamente aquellos caracteres que mostraron diferencias significativas entre accesiones en el año analizado (Figura 4.1).

Durante el año 2015 (Figura 4.1A) no se observó agregación de las accesiones en grupos con características similares, apareciendo todas ellas dispersas. Se observaron sin embargo algunas de ellas muy cercanas al origen de coordenadas (GB11, GB45), con un comportamiento intermedio respecto a las demás, mientras que otras se encontraron muy alejadas del mismo: GB71 con mayor número de semillas por baya, GB06 con mayor producción y tamaño de racimo y menor corrimiento y GB77 con mayor corrimiento a la vez que menor producción, compacidad y tamaño de racimo (Figura 4.1A). Por otro lado, GB36 y GB76 fueron las que mayor compacidad y cuajado mostraron en 2015. Durante el año 2017 (Figura 4.1B) tampoco se observó agregación de las accesiones en grupos, aunque destacó la GB08, alejada del resto de las accesiones, con menores dimensiones de baya. De nuevo, la GB11 se situó cercana al origen de coordenadas, con comportamiento intermedio respecto al resto de accesiones. La GB06 y la GB77, de comportamientos opuestos, mantuvieron sus posiciones relativas, con mayor producción y tamaño de racimo, y mayor corrimiento y menor compacidad, respectivamente. Ambos años, las accesiones GB53, GB55 y GB64 mostraron posiciones cercanas entre sí y, aunque en menor medida que GB77, opuestas a GB06.

Además de estudiar las diferencias entre las accesiones cada año, también se estudió su estabilidad durante los dos años mediante análisis T-test de las medias de cada accesión para cada carácter. La accesión que mostró diferencias interanuales significativas en un mayor número de caracteres fue la GB76, con nueve; mientras que GB11 fue la de menor número, con solo dos (Tabla 4.4). GB06, GB49, GB71 y GB77 mostraron también diferencias interanuales significativas en pocos caracteres, con solo tres (Tabla 4.4).

Entre todos los caracteres, el número de semillas por baya y la producción por cepa fueron los que variaron en un número mayor de accesiones entre los dos años estudiados (en diez y en seis respectivamente) (Tabla 4.4). Por el contrario, el volumen de la baya fue el único carácter en el que ninguna accesión mostró variación interanual significativa, mientras que esta variación solo fue significativa en una accesión para el peso de la baya, el número de racimos por cepa y el peso del raquis (Tabla 4.4).

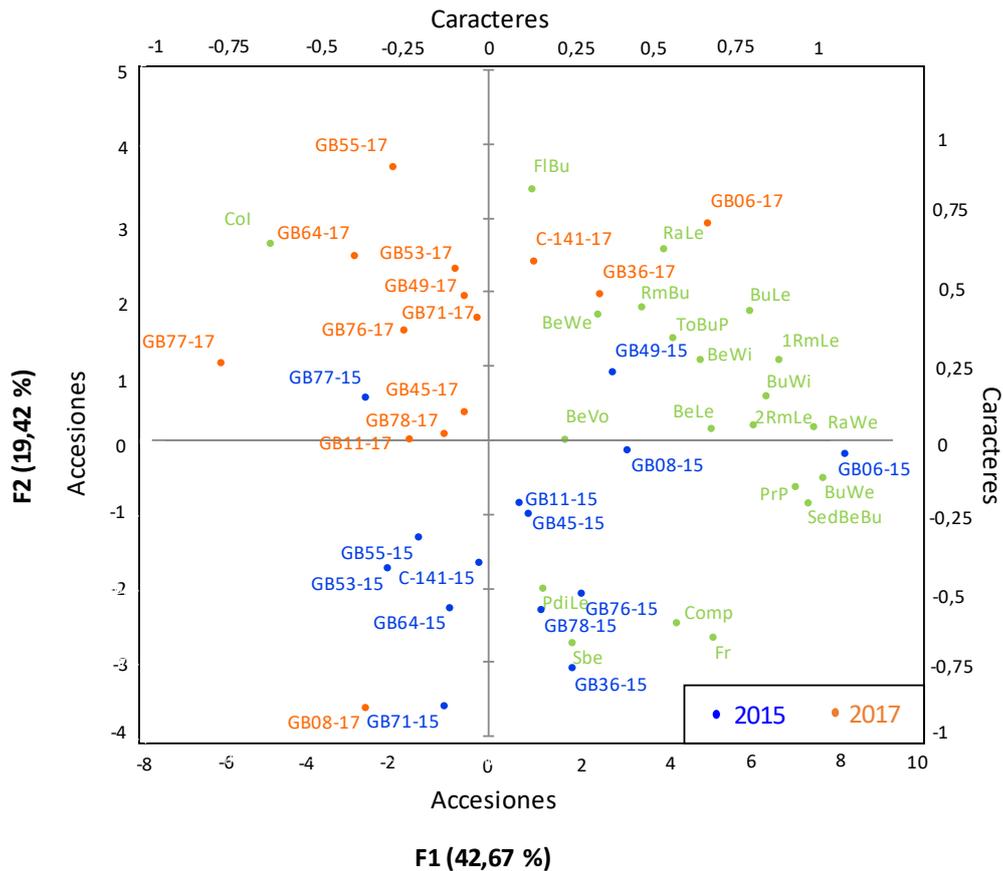


**Figura 4.1. Diferenciación de las accesiones de GB en 2015 (A) y en 2017 (B) mediante análisis de componentes principales en función de los caracteres diferenciales en cada año.** ToBuP, nº racimos planta; PrP, producción por planta; Comp, compacidad visual racimo; BuWi, anchura racimo; BuLe, longitud racimo; BuWe, peso racimo; 1RmLe, longitud 1ª rama; 2RmLe, longitud 2ª rama; RaLe, longitud raquis; PdiLe, longitud pedicelo; RaWe, peso raquis; RmBu, nº de ramificaciones racimo; FlBu, nº flores racimo; SedBeBu, nº bayas con semillas racimo; Fr, cuajado; Col, corrimiento; BeWi, anchura baya; BeLe, longitud de baya; BeWe, peso baya; BeVo, volumen baya; Sbe, nº semillas/baya.

Con el fin de analizar la contribución de cada carácter a la variación interanual en cada accesión, se realizó un análisis de componentes principales global, pero considerando por separado los datos de cada accesión en cada año (Figura 4.2). El resultado muestra una clara influencia del año de estudio sobre las características de las accesiones. De manera general, en 2017 las accesiones presentaron menor cuajado, menor compacidad, menor número de semillas por baya, menores tamaños de racimo y menor producción que en 2015. Algunas accesiones mostraron posiciones cercanas en los dos años, siendo GB11, GB45, GB49 y GB77 las que más estabilidad mostraron. Pese a no mostrar posiciones cercanas en ambos años, la GB06 mostró la misma posición relativa con el mismo comportamiento respecto a las demás accesiones ambos años, con la mayor producción y tamaño de racimo. En el polo opuesto, GB53, GB55 y GB64 mostraron fenotipo de producción y peso de racimo relativamente bajos de manera estable en los dos años. Esto puede indicar que el fenotipo en estas accesiones se determina principalmente por el factor accesión, bien por estar infectados con los virus del entrenudo y el enrollado respectivamente en el caso de GB49 y GB77 (Tabla suplementaria S1), o porque pueda haber realmente variación genética intravarietal subyacente en el caso de GB06, GB11, GB45, GB53, GB55 y GB64. Así, uno de los principales síntomas de las infecciones por el virus del entrenudo corto de la vid (GFLV, Grapevine fanleaf virus) o por el virus del enrollado de la vid (GLRaV) es la reducción en la producción (Mannini y Digiario 2017). En cuanto a la virología, también cabe mencionar que otras seis accesiones (GB06, GB08, GB11, GB55, GB64 y GB76) están infectadas por el virus del jaspeado de la vid (GFkV, Grapevine fleckvirus) (Tabla suplementaria S1) pero, al contrario que los anteriores, la infección por este virus es asintomática, por lo que no afecta a las características fenotípicas de la planta (Mannini y Digiario 2017).

**Tabla 4.4. Variabilidad interanual entre el año 2015 y el año 2017 por carácter y accesión.** Color rojo indica  $P \leq 0,001$ ; amarillo  $P \leq 0,01$  y verde  $P \leq 0,05$ ; dif. sig., diferencias significativas.

P	GB06	GB08	GB11	GB36	GB45	GB49	GB53	GB55	GB64	GB71	GB76	GB77	GB78	C-141	Nº accesiones con dif. sig.
	Nº racimos cepa														
Producción cepa (kg)		■			■			■			■		■		6
Anchura del racimo (cm)		■							■						2
Longitud del racimo (cm)				■			■	■						■	4
Peso racimo (g)											■	■			2
Longitud 1ª ramif. (mm)		■					■								2
Longitud 2ª ramif. (mm)		■													1
Longitud raquis (cm)									■					■	2
Longitud pedicelo (mm)							■	■	■				■		4
Peso raquis (g)											■				1
Nº de ramificaciones	■							■			■		■		5
Nº flores		■		■											2
Nº bayas normales						■					■	■			3
Cuajado	■			■							■	■			3
Corrimiento	■			■							■			■	4
Compacidad visual racimo			■						■		■	■			4
Anchura baya (mm)					■				■		■				2
Longitud de baya (mm)					■				■						2
Peso baya (g)											■				1
Volumen baya (ml)											■				0
Nº semillas/baya			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	10
<b>Nº caracteres con dif. sig.</b>	3	5	2	5	4	3	4	4	6	3	9	3	5	5	



**Figura 4.2. Diferenciación de las accesiones en función de sus valores fenotípicos en los dos años de estudio mediante análisis de componentes principales.** ToBuP, nº racimos planta; PrP, producción por planta; Comp, compacidad visual racimo; BuWi, anchura racimo; BuLe, longitud racimo; BuWe, peso racimo; 1RmLe, longitud 1ª rama; 2RmLe, longitud 2ª rama; RaLe, longitud raquis; PdiLe, longitud pedicelo; RaWe, peso raquis; RmBu, nº de ramificaciones racimo; FIBu, nº flores racimo; SedBeBu, nº bayas con semillas racimo; Fr, cuajado; Col, corrimiento; BeWi, anchura baya; BeLe, longitud de baya; BeWe, peso baya; BeVo, volumen baya; Sbe, nº semillas/baya.

La mayor influencia de las características del año respecto a las intrínsecas de las accesiones se confirmó mediante el análisis de los factores año y accesión en un ANOVA (Tabla 4.5). Este análisis mostró para el factor año un mayor número de caracteres con diferencias significativas que para el factor accesión (ocho frente a cinco). Las diferencias significativas detectadas en la interacción entre año y accesión en la producción por cepa, la longitud del racimo y del pedicelo, el número de ramificaciones y el número de semillas por baya indican la posible existencia de interacciones Genotipo x Ambiente, es decir, que el mismo ambiente afecta de manera diferente a distintas accesiones en estos caracteres, como ya se apuntaba al analizar las correlaciones entre años.

**Tabla 4.5. Análisis de los factores año y accesión en la variación de GB.** \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ ; n.s., no significativo.

Caracteres	ANOVA		
	Accesión	Año	Año*Accesión
Nº racimos cepa	n.s	n.s	n.s
Producción cepa (kg)	*	**	**
Anchura del racimo (cm)	*	n.s	n.s
Longitud del racimo (cm)	n.s	n.s	**
Peso racimo (g)	**	**	n.s
Longitud 1ª rama (mm)	n.s	n.s	n.s
Longitud 2ª rama (mm)	n.s	*	n.s
Longitud raquis (cm)	n.s	n.s	n.s
Longitud pedicelo (mm)	n.s	*	***
Peso raquis (g)	**	n.s	n.s
Nº de ramificaciones	n.s	n.s	**
Nº flores	n.s	n.s	n.s
Nº bayas con semilla	*	**	n.s
Cuajado	n.s	**	n.s
Corrimiento	n.s	**	n.s
Compacidad visual racimo	n.s	**	n.s
Anchura baya (mm)	n.s	n.s	n.s
Longitud de baya (mm)	n.s	n.s	n.s
Peso baya (g)	n.s	n.s	n.s
Volumen baya (ml)	n.s	n.s	n.s
Nº semillas/baya	n.s	***	**

#### 4.1.3.1 Análisis de viabilidad del polen

Dadas las diferencias observadas en el cuajado entre accesiones, se realizó un análisis de la viabilidad del polen con el fin de comprobar si la causa de estas diferencias podía ser una baja viabilidad en las accesiones con menor cuajado. Ésta fue analizada en las 15 accesiones de GB y en una de GT como referencia (ver Tabla 3.1 en Material y Métodos) durante los años 2015, 2016 y 2017. La viabilidad del polen fue superior al 82% en todas las accesiones y en los tres años (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6. Viabilidad del polen en distintas accesiones de GB.** La viabilidad se expresa como el porcentaje de granos de polen con tinción positiva de Alexander. \*, Garnacha Tinta analizada como referencia.

	Año 2015	Año 2016	Año 2017
<b>GB04</b>	94,8	92,8	95,1
<b>GB06</b>	96,3	86,7	92,7
<b>GB08</b>	93,9	84,9	97,7
<b>GB11</b>	91,8	88,6	95,7
<b>GB36</b>	93,4	82,7	92,7
<b>GB45</b>	92,6	90,9	92,1
<b>GB49</b>	93,4	91,2	93,0
<b>GB53</b>	94,4	95,4	90,1
<b>GB55</b>	90,8	91,8	96,0
<b>GB64</b>	94,3	94,6	88,3
<b>GB71</b>	93,7	92,6	92,1
<b>GB76</b>	94,7	94,0	88,4
<b>GB77</b>	94,8	92,8	91,3
<b>GB78</b>	97,0	93,6	88,4
<b>Clon-141</b>	93,6	90,8	94,3
<b>EVENA 15*</b>	87,4	82,1	83,0

Considerando el conjunto de los resultados de este estudio de variación intravarietal en GB, los caracteres relacionados con las dimensiones de la baya destacaron por su menor diversidad y su mayor estabilidad genética y ambiental. La variabilidad encontrada en la producción por cepa, en caracteres relacionados con la morfología del racimo (longitud del racimo, peso del racimo, longitud 2ª rama, número de ramas del racimo y número de bayas con semilla del racimo), en el cuajado y corrimiento, en la compacidad y en el número de semillas por baya, permitió diferenciar entre accesiones ambos años. Ello pese a que las medias globales de estos caracteres fueron diferentes entre 2015 y 2017, excepto en longitud de racimo, el único carácter discriminante entre accesiones y estable. De manera general, en 2017 los valores de cuajado, compacidad, número de semillas por baya, tamaño de racimo y producción fueron menores que en 2015. Sin embargo, hubo algunas accesiones cuyos caracteres se mantuvieron más estables entre años (GB45) y en algún caso (GB11), además, manteniendo posiciones intermedias respecto al resto de las accesiones, tanto en el análisis conjunto de los dos años como en cada año independientemente. GB06 por un lado y GB53, GB55 y GB64 por otro, mostraron fenotipos de producción relativamente extremos de manera estable, indicando también la posible existencia de variación genética intravarietal relevante. A pesar de ello, el factor año fue más importante que el factor accesión en la variación encontrada en las accesiones.

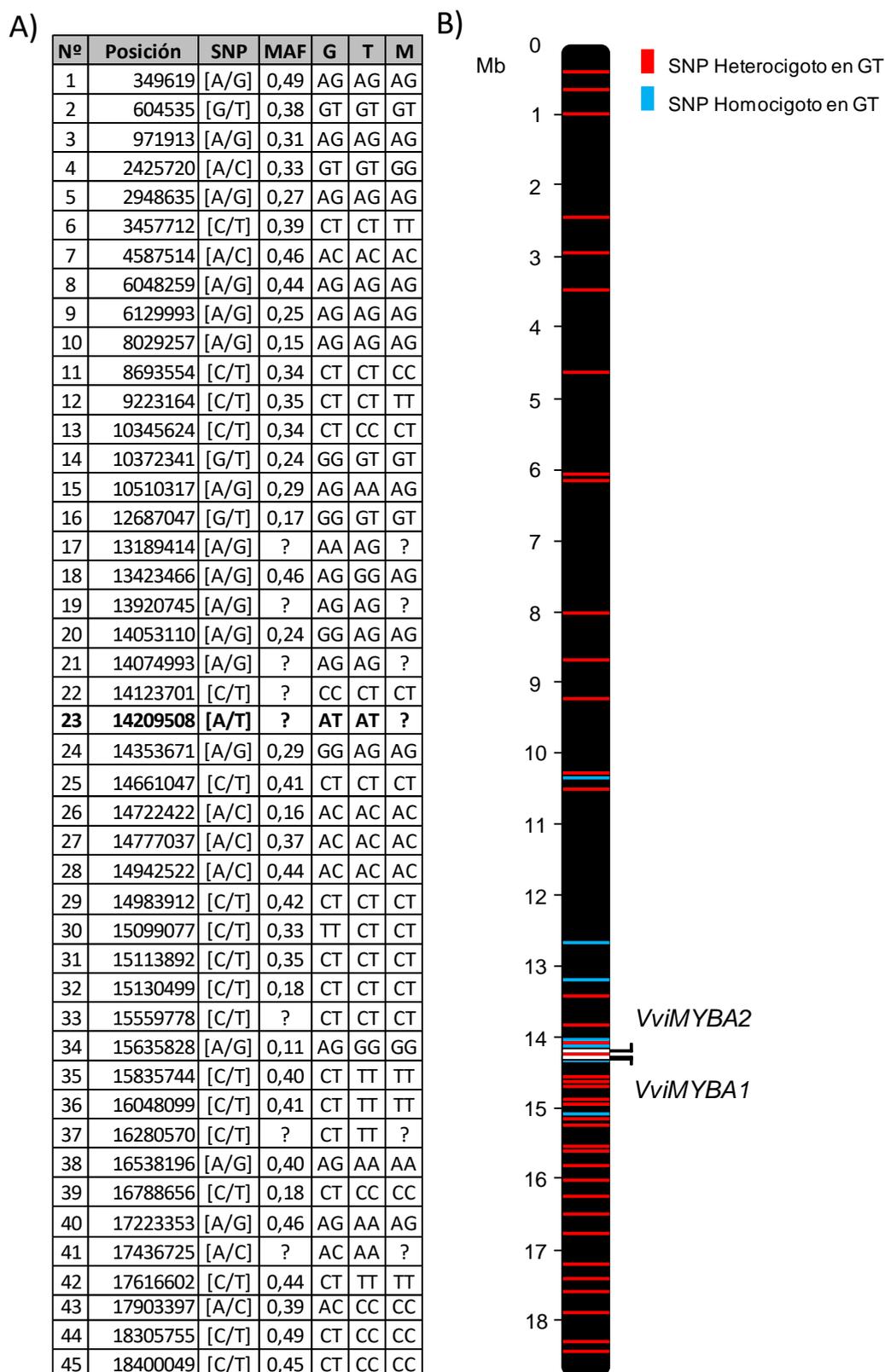
La variación detectada en las accesiones de GB planteó la hipótesis de si, en parte, podría ser consecuencia de que se hubiesen originado a partir de eventos de pérdida de color independientes causados por distintos tipos de mutación en el cromosoma 2 de GT, lo que llevó a abordar el análisis de esta región del genoma en muestras de GB.

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DEL ORIGEN DE LA PÉRDIDA DE COLOR DE LA BAYA EN LA VARIEDAD GARNACHA

Con el objetivo de determinar el origen de la pérdida de color en accesiones de GB, establecer su relación con la posible delección del alelo funcional del locus de color presente en el cromosoma 2 de GT, así como de caracterizar la posible existencia de sucesos de delección independientes y variables en tamaño en las distintas accesiones de GB, se llevó a cabo el estudio de esta región del genoma mediante dos estrategias: 1) análisis de la pérdida de heterocigosidad para marcadores SNP a lo largo del cromosoma 2 en una colección amplia de accesiones de Garnacha y 2) re-secuenciación completa del genoma en cuatro accesiones representativas.

### 4.2.1 Selección de un conjunto de marcadores SNP para el seguimiento de la heterocigosidad a lo largo del cromosoma 2 de la vid

Con el objetivo de facilitar el análisis de la pérdida de heterocigosidad a lo largo del cromosoma 2 en variantes somáticas de color se diseñó un chip de genotipado de SNP basado en 45 marcadores localizados a lo largo de este cromosoma (Figura 4.3). Para la selección de SNP, además de la información disponible para GT, también se consideró la información referente a TT y a Mazuelo, variedades tintas cultivadas en la zona y con variantes somáticas para el color que se podrían analizar usando la misma herramienta. La selección de los marcadores SNP se realizó a partir de la información disponible en diversas fuentes: 1) el chip de genotipado Vitis GrapeReseq 18K que cuenta con 764 SNP localizados en el cromosoma 2 y que se ha utilizado para obtener el genotipo de 783 variedades de vid (Laucou *et al.*, 2018); 2) los resultados de experimentos previos realizados con estas variedades en el laboratorio y 3) los resultados de la re-secuenciación del genoma completo de TT y TB (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017). En las zonas en las que la abundancia de marcadores permitió elegir entre varios SNP, se seleccionaron aquellos con MAF (*Minor allele frequency* o frecuencia alelo menor) próxima a 0,5 (información disponible solamente para el caso de los SNP procedentes del Vitis GrapeReseq 18K). Cuanto más elevada es esta frecuencia MAF, es decir, cuanto más se acerca a 0,5, más probable es que este alelo se encuentre también en heterocigosis en otras variedades tintas, lo que puede hacer más útil esta herramienta para el estudio de variedades adicionales. De los SNP seleccionados, 40 se encuentran en heterocigosis en GT (Figura 4.3), si bien, con el fin de hacer útil el chip para Tempranillo y Mazuelo además de para Garnacha, se incluyeron también cinco marcadores heterocigotos en Tempranillo y/o Mazuelo, aunque homocigotos en GT (Figura 4.3). Como se observa en la Figura 4.3, los SNP se distribuyen con menor densidad entre las posiciones 11 y 13 millones de nucleótidos del cromosoma (según la versión 12X.0 del ensamblaje del genoma de referencia de PN40024, <https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>) que podría corresponder a su región centromérica, dado que en estas regiones es más difícil identificar SNP de calidad. Por otra parte, entre las posiciones 13 y 16 millones, donde se encuentran localizados los genes *VviMYBA* (*VviMYBA1* y *VviMYBA2* en lo que respecta a esta memoria de tesis) responsables del locus del color (Kobayashi *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2007), se seleccionó un mayor número de marcadores SNP para poder delimitar con mayor precisión las zonas con pérdida de heterocigosidad.



**Figura 4.3. Marcadores SNP seleccionados para el chip de análisis de pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 2.** A) Listado de los 45 SNP seleccionados. Los SNP se encuentran ordenados por su posición en el cromosoma 2. La Tabla incluye los alelos de cada locus, la frecuencia del alelo menor (MAF) en un conjunto de 783 genotipos varietales (Laucou et al., 2018) y el genotipo de cada marcador en las variantes tintas de Garnacha (G), Tempranillo

(T) y Mazuelo (M) (Laucou et al., 2018; Carbonell-Bejerano et al., 2017 y análisis previos del laboratorio). En los casos en los que se desconoce la MAF o el genotipo se indica con “?”. En negrita se marca el SNP situado entre los genes *VviMYBA2* y *VviMYBA1*. B) Representación de la posición de los marcadores SNP por barras horizontales a lo largo del cromosoma. Su color indica su estado de heterocigosis (rojo) u homocigosis (azul) en GT. El esquema indica también la posición de los dos genes *VviMYBA1* y *VviMYBA2*. Los números definen las posiciones a lo largo del cromosoma en bases en A) y en mega bases en B) según la versión 12X.0 del ensamblaje del genoma de referencia de la vid (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>).

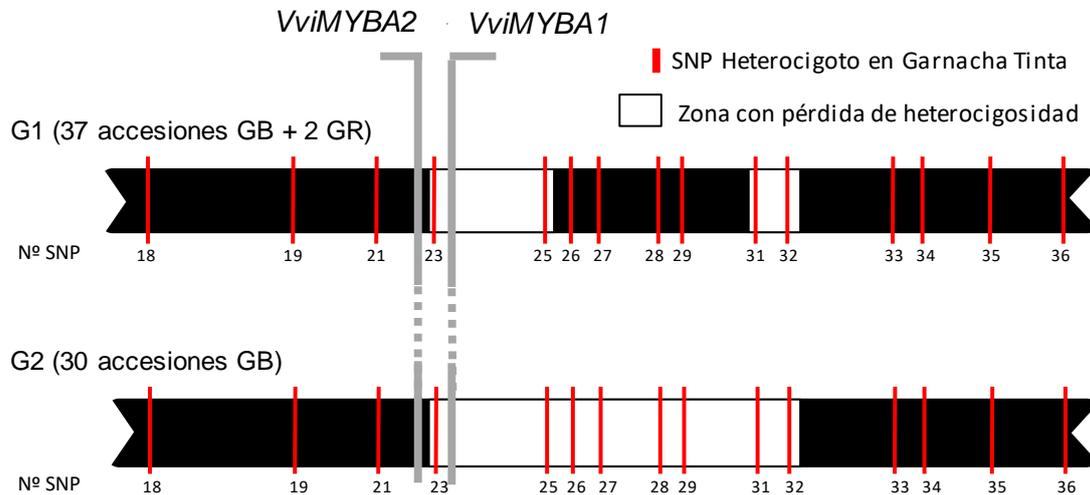
#### 4.2.2 Caracterización de patrones de pérdida de heterocigosidad del cromosoma 2 en distintas accesiones de Garnacha Blanca

El uso del chip de SNP permitió caracterizar la presencia de pérdida de heterocigosidad en un número de accesiones mucho más amplio que el contemplado en el análisis de la variación para caracteres agronómicos. En total se analizaron 74 muestras, correspondientes a 67 accesiones de GB (41 recolectadas en Navarra, 21 en La Rioja, tres en Cataluña, una en Álava y un clon comercial procedente de Francia), dos de GR recolectadas en Navarra y cinco de GT, que se utilizaron como referencia del genotipo presumiblemente normal (disómico) para el cromosoma 2 (Véase Tabla 3.1 en Material y Métodos). Una de estas GT (GT77) corresponde a la planta original de la que emergió el fenotipo de uva blanca a partir del que se multiplicó la variante blanca GB77.

Para todas las muestras de GT analizadas los resultados del chip confirmaron el genotipo heterocigótico esperado para todos los marcadores SNP en heterocigosis en esta variedad según estudios previos (Tabla suplementaria S2). Por otro lado, en todas las muestras de GB analizadas se detectaron sucesos de pérdida de heterocigosidad en la región del cromosoma 2 que alberga los genes *VviMYBA* (Figura 4.4. y Tabla suplementaria S2). En todas las accesiones de GB, coincidieron los marcadores SNP que delimitan los extremos aguas arriba y aguas abajo de la región del cromosoma 2 en la que en que se detectó pérdida de heterocigosidad: el primero, el SNP23, situado en la posición 14.209.508; y el último, el SNP32, situado en la posición 15.130.499 (Figura 4.4 y Tabla suplementaria S2).

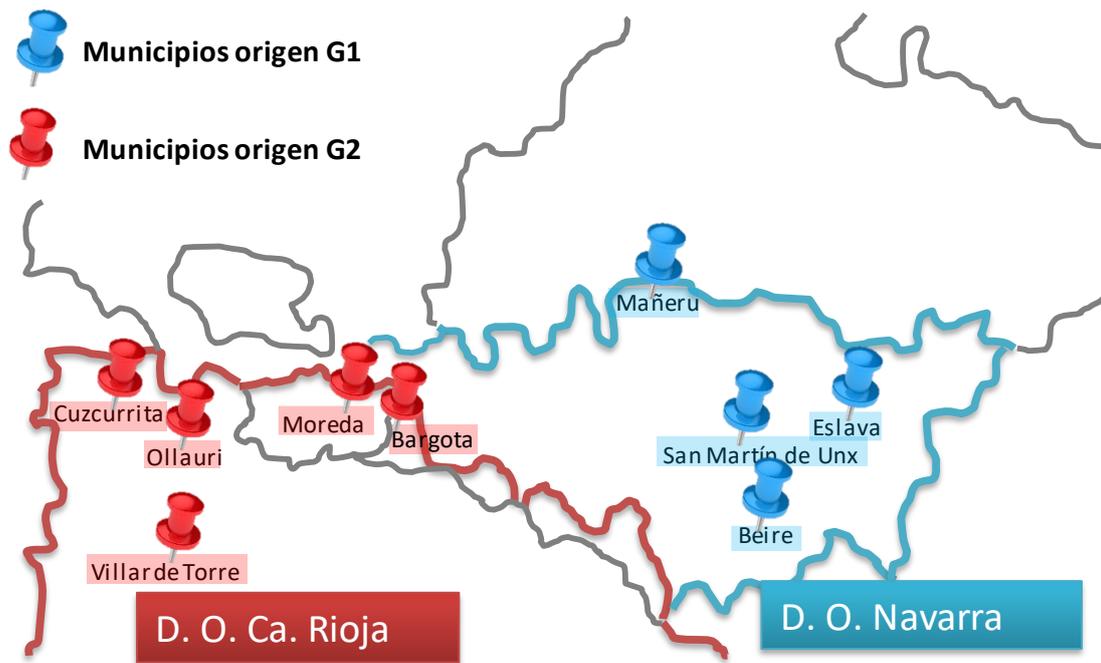
Curiosamente, y a pesar del elevado número de muestras de GB analizadas, solo se identificaron dos grupos o patrones de pérdida de heterocigosidad (aquí llamados G1 y G2) (Figura 4.4). Estos dos patrones se diferencian porque en las accesiones G1 el intervalo de pérdida de heterocigosidad es discontinuo según las posiciones del genoma de referencia, ya que se localizan marcadores SNP que se mantienen en heterocigosis entre las posiciones 14.722.422 (SNP26) y 14.983.912 (SNP29). En las accesiones G2, sin embargo, la pérdida de heterocigosidad es continua en todos los marcadores del intervalo. Por tanto, las zonas con pérdida de heterocigosidad en las accesiones de tipo G1 se limitan a aproximadamente 0,68 Mb, mientras que en el tipo G2 la pérdida de heterocigosidad se extiende a lo largo de 1 Mb aproximadamente. En ambos casos, el grado de resolución de los SNP deja en incertidumbre la zona del cromosoma situada entre las posiciones 14.074.993 (SNP21) y 14.209.508 (SNP23), zona en la que se encuentra el gen *VviMYBA2* (Chr 2: 14.179.728-14.180.733). Estos resultados indican que el origen de accesiones G1 debe implicar reorganizaciones genómicas más complejas que una única delección, y se requiere de otras técnicas de análisis genómico para

caracterizarla. En lo que respecta a las GR, para cuyo análisis se utilizó ADN extraído de raíces adventicias (que proceden de la línea meristemática L2 que se asume que es la capa mutante en variantes rojas quiméricas, Walker *et al.*, 2006), ambas mostraron el mismo patrón de pérdida de heterocigosidad que el grupo G1 de GB. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la pérdida de color en Garnacha puede ser consecuencia de sucesos independientes de delección en esta región.



**Figura 4.4. Patrones de pérdida de heterocigosidad identificados para el cromosoma 2 en accesiones de GB y GR.** Detalle de la zona con pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 2 según las posiciones en la versión 12X.0 del ensamblaje del genoma de referencia de la vid (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>). Las regiones en las que se detecta pérdida de heterocigosidad se representan en blanco y los que mantienen la heterocigosidad en negro dentro del esquema de la región del cromosoma. Los SNP en heterocigosis en GT están representados por barras verticales rojas a lo largo del cromosoma. No se representan los SNP del chip que no están en heterocigosis en GT. El esquema indica también la posición de los dos genes VviMYBA2 y VviMYBA1. Los números hacen referencia a los SNP a lo largo del cromosoma 2 (Véase Figura 4.3A).

Curiosamente, los dos patrones de pérdida de heterocigosidad identificados correlacionan con una clara distribución geográfica de las zonas de prospección (Figura 4.5). Así, mientras que todas las accesiones de GB recolectadas en municipios de la zona geográfica correspondiente a la D. O. Ca. Rioja (La Rioja, sur de Álava y oeste de Navarra) mostraron el patrón G2 (pérdida de heterocigosidad continua entre al menos 14.209.508 y 15.130.499), todas las recolectadas en localidades de la D. O. Navarra (Centro, sur y este de Navarra) presentaron el patrón discontinuo G1 (Figura 4.5).



**Figura 4.5. Mapa de distribución de los dos tipos de patrones de pérdida de heterocigosidad según los municipios de origen de las accesiones de GB recolectadas en La Rioja y Navarra. Con marca azul se muestra la localización de los municipios de origen de las accesiones de GB con patrón tipo G1 y con marca roja la de los municipios de origen de las GB con patrón G2.**

#### 4.2.3 Análisis de la secuencia genómica de variantes de Garnacha Blanca representativas de cada patrón de pérdida de heterocigosidad

Con el objetivo de verificar la presencia de deleciones en el cromosoma 2 y definir su longitud exacta se re-secuenciaron los genomas de una accesión representativa de GB para cada patrón de pérdida de heterocigosidad detectado (GB77 del G1 y GB1662 del G2). Se seleccionaron estas accesiones porque para ellas se disponía de una referencia de GT relacionada con las que comparar: GT77 correspondiente a la planta en la que apareció la variante blanca GB77 y GT1608 como accesión recolectada en D. O. Ca. Rioja, en la misma localidad que GB1662. La re-secuenciación masiva se llevó a cabo siguiendo la modalidad TruSeq de Illumina que genera pares de lecturas con una longitud de 125 nt (nucleótidos), como se describe en la sección 3.6.1 de Materiales y Métodos. Las lecturas obtenidas para cada genotipo se alinearon con el genoma de referencia PN40024 12X.0 (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>) (Véase Material y Métodos punto 3.6.1). En todas las muestras, más de un 70% de las lecturas alinearon con el genoma de referencia, obteniéndose una cobertura del genoma mayor del 80% en todos los casos, con una profundidad efectiva media en torno a 30X (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7. Resumen de la cantidad de lecturas de secuenciación obtenidas para las muestras de de DNA genómico de Garnacha y de su alineamiento con el genoma de referencia. DesStd, desviación estándar.**

Muestra	Nº de lecturas	Grado de alineamiento de lecturas emparejadas (%)	Cobertura del genoma de referencia (%)	Profundidad de cobertura (X)	
				Media	DesStd
GT1608	129.805.078	72,8	81,5	26,8	123,5
GT77	150.514.814	71,8	80,4	33,3	176,9
GB1662	133.484.968	74,0	82,3	27,9	125,3
GB77	154.871.944	72,3	80,7	31,7	184,0

#### 4.2.3.1 Pérdida de heterocigosidad

Siguiendo la misma lógica empleada en el uso del chip de marcadores SNP, en primer lugar, se realizó un análisis de pérdida de heterocigosidad a partir de los datos de re-secuenciación del genoma completo, para delimitar así con mayor precisión la región en la que se da la pérdida de un alelo. Para ello, se realizó una búsqueda de SNP en heterocigosis a partir de los datos de re-secuenciación de cada accesión y en cada una se calculó el número total de SNP heterocigotos en ventanas de 10 kb a lo largo de todos los cromosomas. En ambas accesiones de GB se detectaron regiones con pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 2 en comparación con sus respectivas GT de referencia. Estos resultados confirmaron los obtenidos mediante el genotipado del chip de SNP. En la comparación entre la accesión GB77, con pérdida de heterocigosidad tipo G1 según el chip de SNP (Figura 4.4 y Tabla suplementaria S2), y la GT77 se detectaron dos regiones en las que el número de SNP heterocigotos fue menor en GB77 de manera continua a lo largo casi todas las ventanas de 10 kb que las componen. Estas dos regiones de pérdida de heterocigosidad en GB77 se comprenden entre las ventanas de 10 kb con inicio y fin en las posiciones 14.170.000 y 14.690.000 en el caso de la región más aguas arriba y 15.040.000 y 15.500.000 en la región más aguas abajo en el cromosoma 2 del genoma de referencia (Figura 4.6A y Tabla suplementaria S3). En el caso de la comparación entre la accesión GB1662, con pérdida de heterocigosidad tipo G2 según el genotipado del chip (Figura 4.4 y Tabla suplementaria S2), y la GT1608 se detectó una región en la que el número de SNP heterocigotos fue menor en GB1662 de manera continua a lo largo de casi todas las ventanas de 10 kb contenidas en la misma. Fue la región comprendida entre una ventana con inicio en la posición 14.090.000 y otra ventana con fin en la posición 15.460.000 (Figura 4.7A y Tabla suplementaria S3).

#### 4.2.3.2 Variación en el número de copias

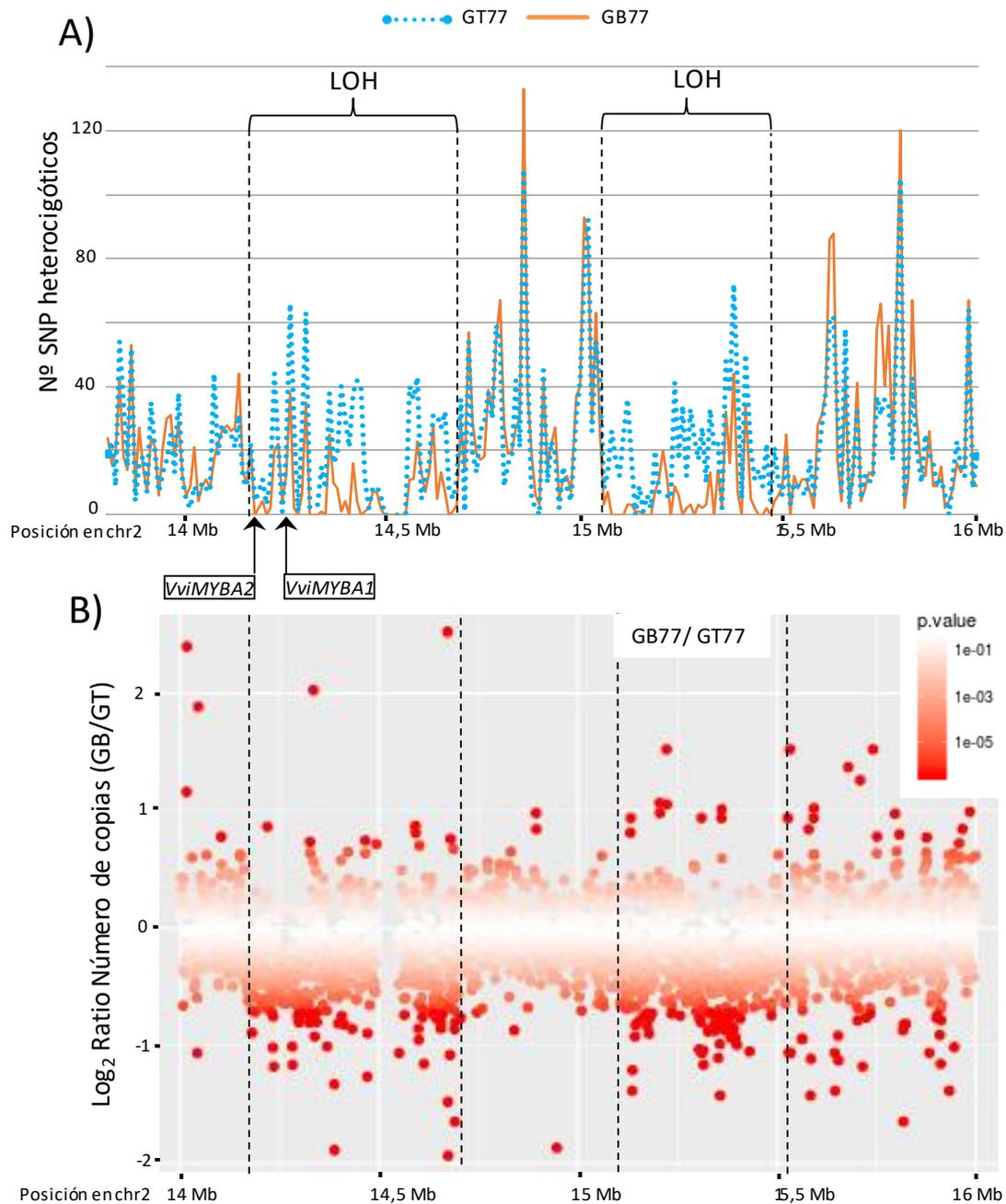
Con el fin de identificar si la pérdida de heterocigosidad se debe a la presencia de regiones hemicigólicas causadas por deleciones, se realizó un análisis de variación para el número de copias de las lecturas obtenidas. Para ello se comparó el número de lecturas alineadas con el genoma de referencia (versión 12X.0, <https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>) en GB1662 y GB77 en relación a sus respectivas accesiones GT de referencia, GT1608 y GT77 a lo largo de cada cromosoma. Utilizando CNV-seq, se establecieron como criterios de significación un tamaño mínimo de cuatro sub-ventanas consecutivas con  $P \leq 0,05$  y que además superasen umbrales de cambio de  $\log_2 \leq -0,5$  o  $\geq 0,37$

para designar deleciones y duplicaciones, respectivamente. De esta manera se obtuvieron ventanas, formadas por un mínimo de cuatro sub-ventanas, con variación significativa en el número de copias a lo largo del cromosoma 2. En la comparación entre GB77 y GT77 se detectó una reducción significativa en el número de copias en GB77 a lo largo de varias ventanas consecutivas que cubren gran parte de dos regiones del cromosoma 2. La región más aguas arriba comprendió las ventanas en el intervalo entre las posiciones 14.168.491 y 14.690.610. La otra región fue la comprendió las ventanas en el intervalo entre 15.053.701 y 15.522.810 (Figura 4.6B y Tabla suplementaria S4A). En la comparación entre las accesiones GB1662 y GT1608 se detectó una reducción significativa en el número de copias en GB1662 a lo largo también de varias ventanas consecutivas que cubren la práctica totalidad de una región del cromosoma 2. Fue la región comprendida entre una ventana con inicio en la posición 14.093.703 y otra ventana con fin en la posición 15.456.419 (Figura 4.7B y Tabla suplementaria S4B).

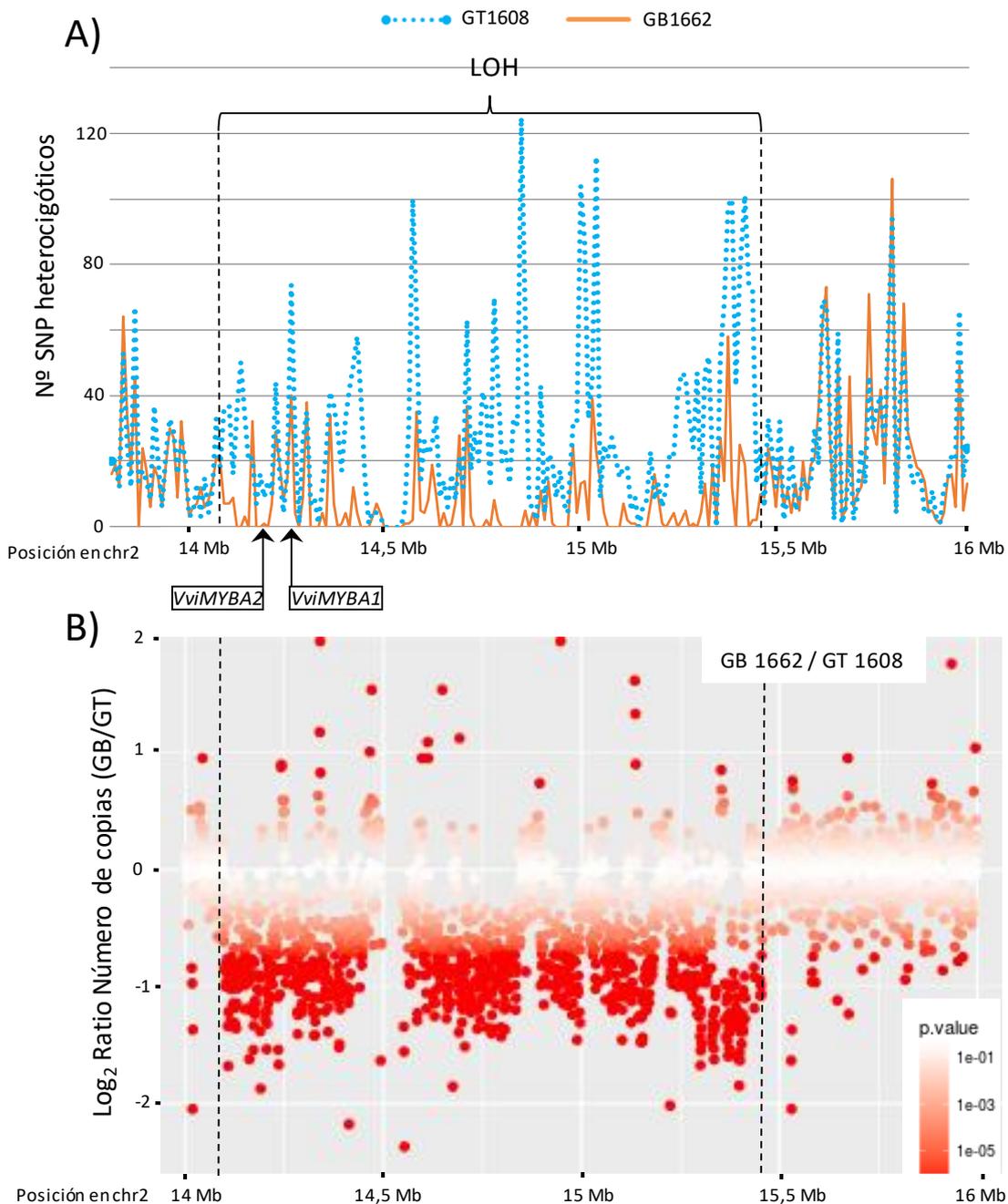
En ambas accesiones de GB, las regiones de reducción de número de copias detectadas fueron solapantes con las zonas con pérdida de heterocigosidad identificadas en las mismas (Figuras 4.6 y 4.7). Los límites de las ventanas de pérdida de heterocigosidad y bajada en el número de copias difirieron levemente en el caso de la región más aguas abajo de GB77 (Figuras 4.6 y 4.8). Tanto en GB77 como en GB1662, en las regiones en las que coincide la pérdida de heterocigosidad (Figura 4.8 y Tabla suplementaria S3) con la reducción en el número de copias (Figura 4.8 y Tabla Suplementaria S4) se localiza el gen *VviMYBA2* (Chr 2: 14.179.728-14.180.733) además del gen *VviMYBA1* situado aguas abajo (Chr 2: 14.239.792-14.240.808).

Cabe destacar que las diferencias tanto en LOH como en número de copias fueron menos claras en la comparación entre GB77 y GT77 que entre el otro par de accesiones. De hecho, entre las variantes tintas, la densidad de SNP heterocigóticos detectada fue menor en GT77 que en GT1608 pese a que la cobertura de secuenciación fue mayor en GT77 (Figuras 4.6 y 4.7 y Tabla 4.6). Estas diferencias sugieren la existencia de cierto grado de variación estructural quimérica en la región del cromosoma 2 entre las accesiones de GT relacionadas con orígenes independientes de GB.

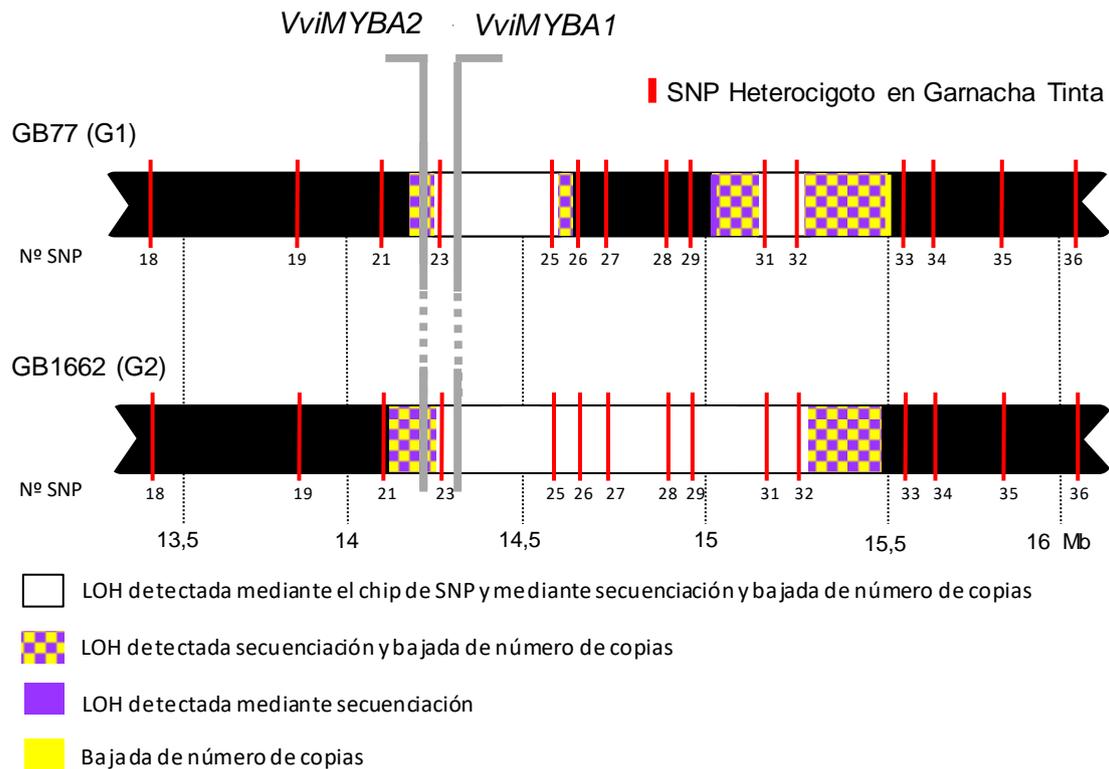
En conjunto, los resultados confirman que la pérdida de heterocigosidad observada en las regiones indicadas del cromosoma 2 se debe a que esas regiones que se encuentran en estado de hemicigosis en las dos accesiones de GB como consecuencia de la deleción de uno de los dos haplotipos cromosómicos. La discontinuidad de la hemicigosis observada en GB77 en estas regiones sugiere la existencia de un reordenamiento cromosómico adicional y posiblemente previo a la propia deleción.



**Figura 4.6. Pérdida de heterocigosidad (LOH) y variación en el número de copias a lo largo del cromosoma 2 en GB77.** A) Niveles de heterocigosidad representadas como el número de SNP heterocigóticos por cada 10 kb en GT77 (líneas discontinuas de punto azul) y GB77 (líneas continuas naranjas). B) Variación en el número de copias representada como el Log<sub>2</sub> del cociente entre GB77 y GT77 del número de lecturas alineadas con el genoma de referencia de PN40024 versión 12X.0 (<https://urqi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>) de acuerdo con las lecturas de re-secuenciación del cromosoma 2 (chr2). Solo se muestra el detalle de la región del cromosoma 2 que mostró diferencias significativas.



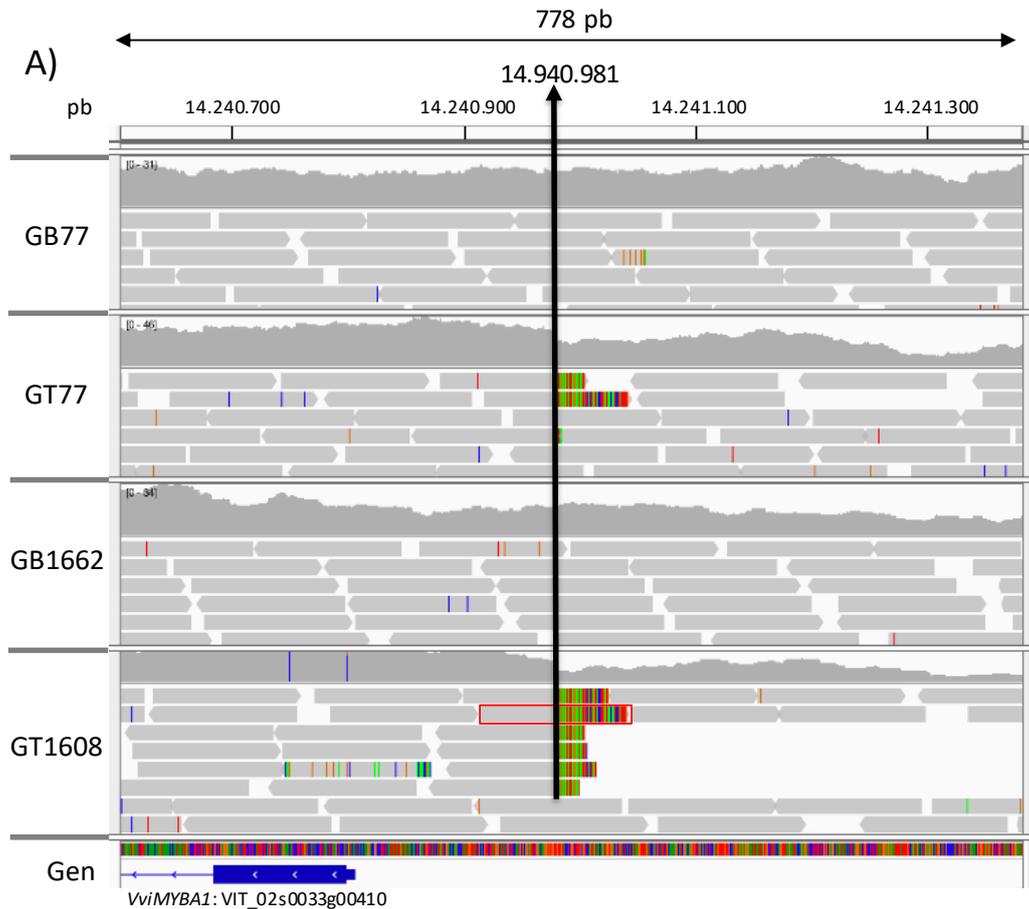
**Figura 4.7. Pérdida de heterocigosidad (LOH) y variación en el número de copias a lo largo del cromosoma 2 en GB1662.** A) Niveles de heterocigosidad representadas como el número de SNP heterocigóticos por cada 10 kb en GT1608 (líneas discontinuas de punto azul) y GB1662 (líneas continuas naranjas). B) Variación en el número de copias representada como el Log<sub>2</sub> del cociente entre GB1662 y GT1608 del número de lecturas alineadas con el genoma de referencia de PN40024 versión 12X.0 (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>) de acuerdo con las lecturas de re-secuenciación del cromosoma 2 (chr2). Solo se muestra el detalle de la región del cromosoma 2 que mostró diferencias significativas.



**Figura 4.8. Esquema de los patrones de delección identificados en el cromosoma 2 en las accesiones de Garnacha Blanca GB77 y GB1662.** Se presenta una ampliación de la zona delecionada dentro del cromosoma 2. Los SNP en heterocigosis están representados por barras verticales a lo largo del cromosoma. El esquema indica también la posición de los dos genes *VviMYBA2* y *VviMYBA1*. Se indica el orden de los SNP a lo largo del cromosoma 2 (Nº SNP). Se indican las posiciones a lo largo del cromosoma en mega bases según la versión 12X.0 del ensamblaje del genoma de referencia de la vid (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>). LOH, pérdida de heterocigosidad.

El retrotansposón *Gret1*, de un tamaño de 10.422 pares de bases (pb), que impide la transcripción de *VviMYBA1* en las variedades blancas se inserta aguas abajo de este gen en su región promotora (Kobayashi *et al.*, 2004). En esta región en la que el genoma de referencia corresponde al alelo canónico blanco nulo y contiene la secuencia de *Gret1* (Jaillón *et al.*, 2007), el alineamiento de lecturas con el genoma de referencia fue distinto entre accesiones GB y GT. Mientras que las GB alinearon con respecto al genoma de referencia en una tasa similar respecto a regiones circundantes y sin mayores diferencias de secuencia respecto a la de la referencia, en ambas accesiones de GT se detectaron lecturas alineadas parcialmente con un extremo de secuencia distinta a la del genoma de referencia a partir de la posición 14.940.981 (Figura 4.9A), coincidiendo con una bajada en el número de copias respecto a las regiones circundantes en las mismas accesiones. Mediante un análisis Blast se observó que el extremo de las lecturas que no alineaban con la referencia corresponde con una zona del cromosoma 2 situada a una distancia de 10.423 pb aguas abajo, coincidiendo con las posiciones que delimitan la inserción de *Gret1* en el alelo nulo (Figura 4.9B). Específicamente en las variantes tintas, se detectaron además lecturas cuyas parejas se alinean en posiciones con el genoma de referencia más alejadas de lo esperado según el tamaño de inserto, con una separación de ~10.600 pb (entre las posiciones ~14.240.900 – ~14.251.600) equivalente al tamaño de inserto más el de *Gret1* (Figura 4.10).

Estos alineamientos anómalos equivalen a aproximadamente el 50% del total en la región en GT1608 y un porcentaje algo menor en GT77. Esto indica que, mientras que en GT se secuencian los dos alelos (no funcional con *Gret1* y funcional sin *Gret1*) en GB solo existen lecturas del alelo no funcional, lo que está de acuerdo con que se haya delecionado el alelo funcional y que esto sea la causa de la pérdida de color. Las delecciones por tanto implican la pérdida del haplotipo que presenta la copia funcional del gen *VviMYBA1* y, en consecuencia, del alelo funcional ligado de *VviMYBA2*, necesarios para la síntesis de antocianinas en ambas variantes de uva blanca.



B)

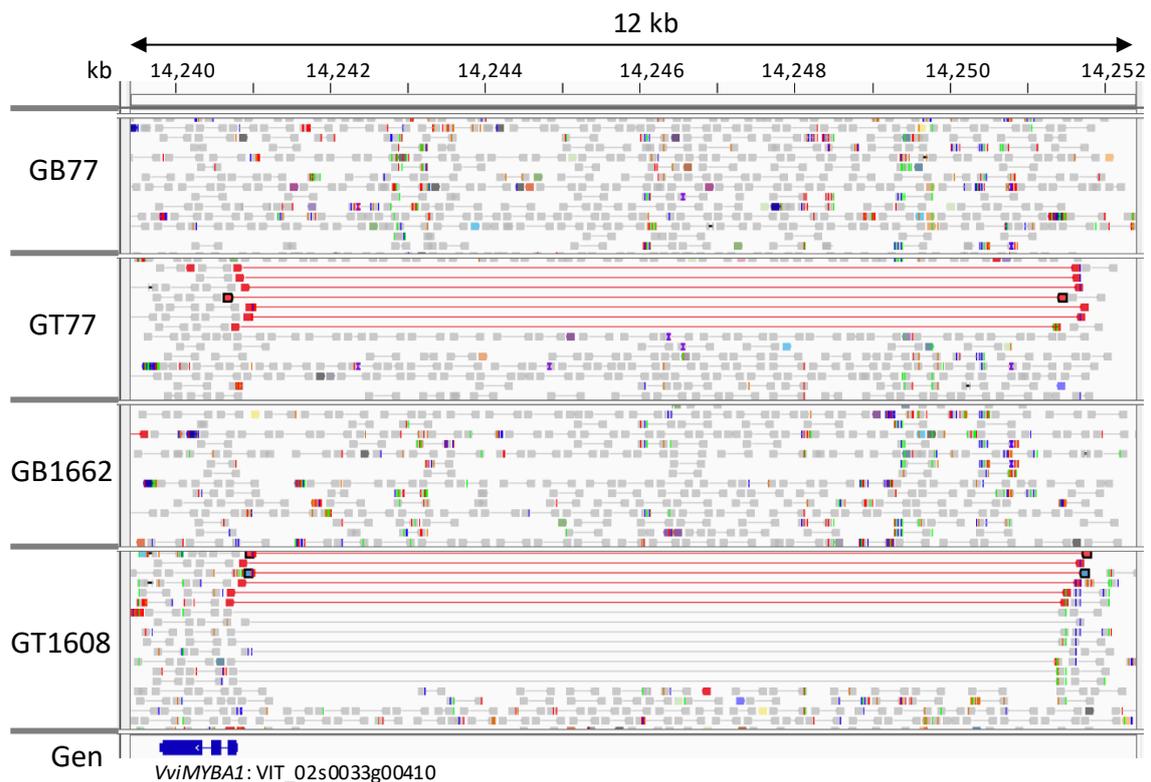
Alineamiento BLAST coincidente con el del extremo de la lectura alineado con el genoma de referencia en el análisis genómico

	E valor	Coincidencias	Hebra
	$3.49 \times 10^{-25}$	64/64 (100.00)	+/+
Posición en la lectura	1	ACGTTTCCTTATGGTGCATTACTGGCTTCCAAATGCGCTGGAGTTCATGGACAAAGGGTGT	60
Posición respecto PN40024	14240918	ACGTTTCCTTATGGTGCATTACTGGCTTCCAAATGCGCTGGAGTTCATGGACAAAGGGTGT	14240977
	61	GTGT	64
	14240978	GTGT	14240981

Alineamiento BLAST del extremo de la lectura no alineado con el genoma de referencia en el análisis genómico a una distancia de 10.423 pb aguas abajo del extremo alineado.

	E valor	Coincidencias	Hebra
	$2.87 \times 10^{-26}$	66/66 (100.00)	+/+
Posición en la lectura	60	TGTGTCATAAGAGATATTTAGGAATTAATTGCTGACTAGTATCCTTGATGAACAATCTCT	119
Posición respecto PN40024	14251404	TGTGTCATAAGAGATATTTAGGAATTAATTGCTGACTAGTATCCTTGATGAACAATCTCT	14251463
	120	ATTTTG	125
	14251464	ATTTTG	14251469

**Figura 4.9. Presencia de lecturas con alineamiento parcial en la región de inserción de Gret1 del cromosoma 2 en las accesiones de GT.** A) Alineamiento de lecturas en accesiones de GB y GT. La región gris de las lecturas indica coincidencia de su secuencia con la del genoma de referencia y las regiones coloreadas indican cambios de nucleótido respecto a la referencia. Imagen de los alineamientos obtenida con el visualizador IGV. Se indican las posiciones del genoma de referencia en pares de bases (pb) y se representa la posición del gen *VviMYBA1*. B) Análisis Blast sobre la secuencia de una lectura de GT alineada parcialmente con el genoma de referencia. La lectura analizada corresponde a la destacada en rojo en el panel A. Se indican las posiciones de la lectura en nucleótidos y la de las regiones del genoma de referencia.



**Figura 4.10. Alineamiento de lecturas con distancia anómala con respecto del genoma de referencia de la vid en la región de Gret1 en accesiones de GT.** Se indica la posición del gen *VviMYBA1*. Pb, pares de bases; kb, kilobases. Se representan las lecturas aliadas (líneas gruesas) de manera emparejada de modo que se observa la distancia entre miembros de la pareja (línea fina entre dos líneas gruesas). En rojo se indican lecturas cuyas parejas alinean separadas por más de 10 kb con el genoma de referencia (<https://urqi.versailles.inra.fr/Species/Vitis/Data-Sequences/Genome-sequences>).

La confirmación del origen de GB a partir de deleciones ocurridas en GT que han dejado regiones en hemicigosis en el cromosoma 2 plantea nuevas preguntas sobre el efecto de estas deleciones en otros caracteres de GB. Concretamente, la presencia de la deleción podría afectar a la segregación del cromosoma 2 y ello a su vez tener un efecto en la viabilidad de los gametos y en consecuencia en el cuajado del fruto, una característica muy relevante en la producción. Este efecto se ha observado en TB, la variante somática de uva blanca de TT que también se origina como consecuencia de deleciones que provocan la aparición de zonas de hemicigosis en el genoma (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017).

#### 4.2.4 Análisis de la segregación de los marcadores SNP a lo largo del cromosoma 2

Con el fin de analizar el posible efecto de las deleciones en la transmisión del cromosoma 2, se valoró la segregación de los marcadores SNP heterocigóticos en GT en plántulas S1 obtenidas tras la autofecundación de accesiones de GB. Para ello se utilizó de nuevo el chip de 45 SNP localizados en el cromosoma 2, en este caso para obtener el genotipo de los individuos S1. De este modo se analizaron poblaciones de autofecundación de dos accesiones de GB de cada tipo de deleción (G1: GB11 y GB77; G2: GB71 y GB78) y dos accesiones de GT como referencia (EV15 y EV34). En una segregación mendeliana, la frecuencia de segregación esperada para cada alelo de los SNP heterocigóticos es de 1:1 (X, Y). En el caso de los SNP que se encuentran en la zona delecionada en GB la frecuencia esperada es 1:1 (X:-) o (-:Y), dependiendo del alelo delecionado (véase Material y Métodos sección 3.5.3).

Los resultados de fluorescencia obtenidos con el chip para cada marcador SNP en esta zona no permiten distinguir si un genotipo anotado como homocigoto es realmente homocigoto (XX o YY) o su hemicigoto correspondiente (X- o Y-, respectivamente) y la única valoración posible de la segregación es la segregación de fenotipos con señal de fluorescencia frente a no señal (fenotipo nulo, --) (véase Material y Métodos sección 3.5.3). La frecuencia esperada en este caso es de 3:1 (XX:--) (equivaliendo  $XX = XX + X-$ , véase Material y Métodos sección 3.5.3). La diferencia entre las frecuencias esperadas y observadas para cada SNP se valoró mediante la prueba chi-cuadrado para un nivel de significación 0,05.

El análisis de segregación mostró distinto comportamiento para las GB de cada grupo, de acuerdo con la información molecular sobre las deleciones de la que se dispone (Tablas suplementarias S2 y S5). En cada grupo, la segregación se ajustó a la esperada de 1:1 en todos los SNP heterocigotos situados fuera de la deleción en los progenitores (Tabla 4.8). En el caso de los SNP en hemicigosis en las variantes blancas progenitoras, la segregación de las progenies de autofecundación de las mismas no se ajustó en todos los casos a la segregación fenotípica esperada 3:1. De manera general, se observó, para varios marcadores SNP, mayor proporción de la esperada de fenotipos con fluorescencia que nulos (--) (Tabla 4.9). Al evaluar los datos de cada individuo en su conjunto observamos que algunos presentaban fenotipos nulos para algunos SNP y no nulos para otros SNP de la zona delecionada, lo que no era posible. Al reanalizar las segregaciones considerando como fenotipo nulo para todos los SNP de la región de la deleción a todos los individuos segregantes que presentan algún marcador SNP de esa región con fenotipos nulos (--), se obtuvo la proporción esperada de 3:1 (XX,--) (Tabla suplementaria S5). Esto indica que para algunos SNP existen problemas de detección de fenotipos nulos (homocigotos para la deleción) posiblemente porque en ausencia de la región delecionada en el cromosoma 2, pueden amplificarse otras secuencias del genoma que presenten cierta similitud, generando una fluorescencia que difiere ligeramente del grupo principal para el alelo en cuestión (Figura 4.11).

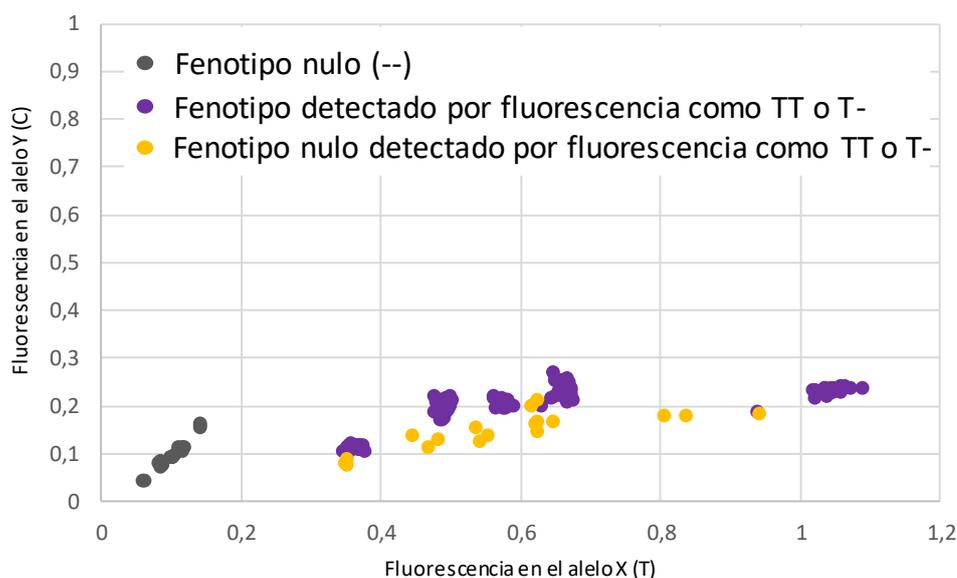
Globalmente, estos resultados confirman las conclusiones del análisis molecular de la existencia de una deleción en esta región del cromosoma 2 e indican que las deleciones detectadas no tienen un efecto sobre la segregación cromosómica, ni afectan a la viabilidad gamética o a la supervivencia del embrión, dado que las segregaciones corresponden a las esperadas para la normal transmisión de las deleciones en el conjunto de las accesiones estudiadas.

**Tabla 4.8. Segregación alélica de los SNP analizados mediante el chip de SNP del cromosoma 2 en las autofecundaciones de GB y de GT. Se muestran los SNP en heterocigosis en GT y se indica el nucleótido de cada alelo en GT (Alelos) y su frecuencia percentual de segregación en cada una de las seis poblaciones de autofecundación (Frec). En color gris se enmascaran los SNP con pérdida de heterocigosidad en el análisis de los progenitores GB. En el caso de estos SNP, los resultados se muestran en la Tabla 4.9. ns, no significativo para segregación distinta a 1:1 en el test chi-cuadrado.**

Nº SNP	Posición en el cromosoma	Alelos	GT EV15		GT EV34		GB11 (G1)		GB77 (G1)		GB71 (G2)		GB78 (G2)	
			Frec	Chi <sup>2</sup>	Frec	Chi <sup>2</sup>	Frec	Chi <sup>2</sup>	Frec	Chi <sup>2</sup>	Frec	Chi <sup>2</sup>	Frec	Chi <sup>2</sup>
1	349619	A:G	43:55	ns	46:54	ns	53:47	ns	53:47	ns	50:46	ns	48:52	ns
2	604535	T:G	56:44	ns	52:48	ns	48:52	ns	45:55	ns	50:48	ns	52:48	ns
3	971913	A:G	50:41	ns	51:49	ns	48:52	ns	45:55	ns	48:46	ns	52:48	ns
4	2425720	T:G	41:59	ns	53:47	ns	49:51	ns	54:46	ns	48:48	ns	46:54	ns
5	2948635	A:G	43:55	ns	56:44	ns	48:52	ns	52:48	ns	45:49	ns	48:52	ns
6	3457712	T:C	59:41	ns	44:56	ns	51:49	ns	48:52	ns	52:46	ns	48:52	ns
7	4587514	A:C	59:41	ns	46:54	ns	53:47	ns	49:52	ns	50:44	ns	49:51	ns
8	6048259	A:G	53:43	ns	46:55	ns	49:51	ns	55:45	ns	51:43	ns	50:50	ns
9	6129993	A:G	54:44	ns	47:53	ns	49:51	ns	55:45	ns	53:43	ns	50:50	ns
10	8029257	A:G	46:54	ns	54:46	ns	50:50	ns	42:58	ns	45:51	ns	48:52	ns
11	8693554	T:C	49:51	ns	53:47	ns	52:48	ns	52:48	ns	48:48	ns	59:41	ns
12	9223164	T:C	44:54	ns	58:42	ns	51:49	ns	43:57	ns	48:48	ns	50:50	ns
13	10345624	T:C	45:55	ns	58:43	ns	51:49	ns	43:57	ns	48:48	ns	50:50	ns
15	10510317	A:G	55:45	ns	41:59	ns	49:51	ns	58:42	ns	48:48	ns	50:50	ns
18	13423466	A:G	45:53	ns	56:44	ns	50:50	ns	42:58	ns	46:50	ns	51:49	ns
19	13920745	A:G	45:53	ns	55:45	ns	50:50	ns	42:58	ns	44:50	ns	51:49	ns
21	14074993	A:G	46:54	ns	56:44	ns	50:50	ns	43:57	ns	46:50	ns	51:49	ns
23	14209508	T:A	47:53	ns	56:43	ns								
25	14661047	T:C	45:51	ns	56:44	ns								
26	14722422	A:C	47:53	ns	57:43	ns	50:50	ns	43:57	ns				
27	14777037	C:A	46:52	ns	57:43	ns	50:50	ns	43:58	ns				
28	14942522	C:A	46:52	ns	56:44	ns	50:50	ns	43:59	ns				
29	14983912	T:C	44:52	ns	56:44	ns	50:50	ns	43:57	ns				
31	15113892	T:C	47:53	ns	55:45	ns								
32	15130499	T:C	47:53	ns	58:44	ns								
33	15559778	C:T	46:52	ns	57:43	ns	50:50	ns	53:57	ns	44:50	ns	51:49	ns
34	15635828	A:G	53:47	ns	43:57	ns	50:50	ns	57:43	ns	50:44	ns	49:51	ns
35	15835744	T:C	46:52	ns	56:44	ns	50:50	ns	43:57	ns	46:50	ns	51:49	ns
36	16048099	T:C	47:53	ns	56:44	ns	50:50	ns	43:57	ns	44:50	ns	51:49	ns
37	16280570	T:C	53:47	ns	45:55	ns	50:50	ns	57:43	ns	50:46	ns	49:51	ns
38	16538196	A:G	46:52	ns	57:43	ns	50:50	ns	43:57	ns	46:50	ns	51:49	ns
39	16788656	T:C	52:48	ns	44:56	ns	50:50	ns	56:44	ns	50:46	ns	49:51	ns
40	17223353	A:G	44:52	ns	55:45	ns	50:50	ns	45:55	ns	44:50	ns	52:48	ns
41	17436725	A:C	47:53	ns	55:45	ns	49:51	ns	46:54	ns	45:49	ns	52:48	ns
42	17616602	T:C	48:50	ns	55:45	ns	49:51	ns	46:54	ns	46:48	ns	52:48	ns
43	17903397	A:C	52:48	ns	43:57	ns	52:48	ns	53:47	ns	48:46	ns	48:52	ns
44	18305755	T:C	53:47	ns	40:60	ns	52:48	ns	55:45	ns	50:46	ns	49:51	ns
45	18400049	T:C	52:46	ns	40:60	ns	53:47	ns	56:44	ns	48:48	ns	49:51	ns

**Tabla 4.9. Segregación del fenotipo de fluorescencia en el chip de SNP del cromosoma 2 en las autofecundaciones de GB para los SNP que muestran pérdida de heterocigosidad en los respectivos progenitores GB. Se muestra el fenotipo para el nucleótido no delecionado en el parental; su frecuencia percentual de segregación en cada una de las seis poblaciones de autofecundación y la frecuencia de segregación del fenotipo nulo (Frec). Para cada marcador y población se indica el valor de significación para segregación distinta a 3:1 en el test chi-cuadrado \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*,  $P \leq 0,05$ ; ns, no significativo; nv, resultado no válido; NC, fenotipo nulo (--).**

Nº SNP	Posición en el cromosoma	Fenotipo	GB11 (G1)		GB77 (G1)		GB71 (G2)		GB78 (G2)	
			Frec	Chi <sup>2</sup>						
23	14209508	T:NC	nv		nv		nv		nv	
25	14661047	T:NC	84:16	*	88:12	**	81:18	ns	80:20	ns
26	14722422	A:NC					79:18	ns	90:8	***
27	14777037	C:NC					75:22	ns	86:12	**
28	14942522	C:NC					76:24	ns	84:14	*
29	14983912	T:NC					75:24	ns	86:14	*
31	15113892	T:NC	84:14	*	85:12	**	80:20	ns	86:14	*
32	15130499	T:NC	82:12	**	87:12	**	80:20	ns	92:8	***



**Figura 4.11. Ejemplo de los fenotipos de fluorescencia para un SNP en hemicigosis en los parentales GB y segregación no esperada en sus progenies de autofecundación. Se muestra la fluorescencia detectada con el chip de 45 SNP en las progenies de las cuatro accesiones GB para el SNP31 (15.113.892). En amarillo se representa la fluorescencia obtenida en individuos S1 para los que se esperaría detectar el fenotipo nulo, ya que serían homocigotos para el haplotipo nulo según la segregación de marcadores adyacentes. El hecho de que la señal de fluorescencia tienda a ser menor que en individuos para los que sí se espera detectar el alelo no delecionado indica que la fluorescencia puede proceder de la amplificación de otras regiones del genoma que muestren cierta similitud.**

### 4.3 CONSECUENCIAS DE LA VARIACIÓN DEL COLOR DE LA UVA EN SU DESARROLLO Y COMPOSICIÓN

Con el fin de evaluar los posibles efectos secundarios de la variación de color en el desarrollo y composición de la uva en fondos genéticos cuasi isogénicos, se compararon las variantes somáticas para el color de Garnacha y Tempranillo tanto a nivel de composición en distintos estadios de maduración de la uva como a nivel de expresión génica a lo largo del desarrollo. Debido a que en los racimos coexisten uvas con diferentes estados de madurez y que a su vez puede haber variación fenológica en la maduración entre genotipos, plantas y racimos, para el análisis composicional y transcriptómico, se trató de seleccionar bayas con estados de madurez equivalentes en todas las muestras del mismo estadio s (Tabla 4.10), atendiendo a su densidad según se describe en el punto 3.3.1. de Material y Método.

#### 4.3.1 Efecto de la variación del color en la composición de la uva

Para determinar si la variación de color entre uvas blancas y tintas lleva asociados cambios en la composición de la baya adicionales a la presencia de antocianinas, se analizó una amplia diversidad de metabolitos primarios y secundarios de la baya. Concretamente, se cuantificó la concentración de metabolitos primarios solubles como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos; de metabolitos secundarios, como antocianinas y flavonoles; y de compuestos volátiles implicados en el aroma y de sus precursores apolares y semipolares, en las variantes somáticas de uva blanca TB y GB y en sus respectivas variedades ancestrales de uva tinta TT y GT. Las accesiones empleadas se identifican en la Tabla 3.1 (véase Material y Métodos punto 3.1). Los análisis se realizaron por separado en hollejo y pulpa para poder estudiar el efecto del cambio de color en ambos tejidos de manera independiente, y se consideraron también uvas en PE. De este modo se pueden inferir efectos directos e indirectos del locus del color y de la presencia de antocianinas.

##### 4.3.1.1 Metabolitos primarios

###### 4.3.1.1.1 Azúcares y ácidos orgánicos

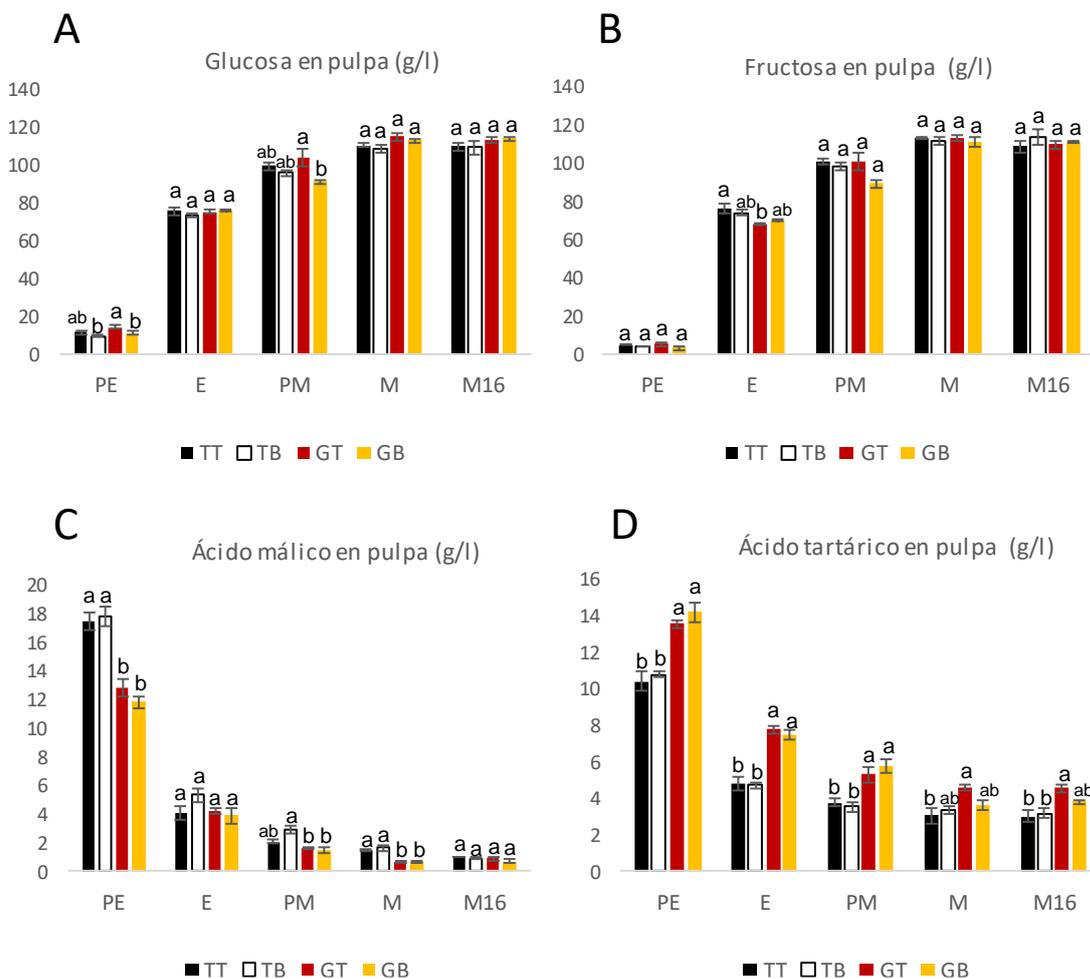
Los azúcares y ácidos orgánicos solubles se cuantificaron en muestras de hollejo y pulpa en cuatro estadios a lo largo del desarrollo y maduración de la uva en 2017 (PE, E, PM y M) y en muestras de uvas maduras de 2016 (M16). Las muestras de E tenían una densidad entre 100-110 g/l, con un CSS medio de 16,3 °Brix y un pH medio de 2,9; las de PM una densidad entre 120-130 g/l, con un CSS medio de 20,3 °Brix y un pH medio de 3,3; las de M una densidad entre 140-160 g/l, con un CSS medio de 23,4 °Brix y un pH medio de 3,5; y las de M16 una densidad entre 140-160 g/l, con un CSS medio de 23,0 °Brix y un pH medio de 3,4 (Tabla 4.10). En cuanto a los azúcares, se midió el contenido de glucosa y fructosa mediante análisis enzimático ligado a espectrofotometría en lector de microplaca (Figura 4.10A, 4.10B, 4.11A y 4.11B). Los ácidos orgánicos málico y tartárico, se cuantificaron mediante métodos enzimáticos y colorimétricos respectivamente y posterior análisis espectrofotométrico (Figura 4.12C, 4.12D, 4.13C y 4.13D).

Los posibles efectos del color y/o del genotipo varietal, se analizaron mediante la comparación de medias en cada estadio utilizando el análisis estadístico ANOVA ( $P \leq 0,05$ ). En cada estadio, se recolectaron uvas de la misma densidad y en el mismo día, con el fin de minimizar diferencias debidas a posibles desplazamientos fenológicos o efectos ambientales (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2016).

**Tabla 4.10. Características de las uvas muestreadas.** Para cada muestra se indica el análisis en el que se han utilizado. CSS, contenido en sólidos solubles; DesvStd, desviación estándar.

Año	Estadio	Variedad	Fecha muestreo	Densidad (g/l)	CSS (° Bx)		pH		Análisis	
					Media	DesvStd	Media	DesvStd	Hollejo	Pulpa
2016	PE	GT	12/08/16	Bayas verdes	-----	-----	-----	-----	ARN	
		TT	04/08/16		-----	-----	-----	-----		
		GB	12/08/16		-----	-----	-----	-----		
		TB	04/08/16		-----	-----	-----	-----		
	E	GT	18/08/16	90-100	15,3	0,083	3,0	0,002	ARN	
		TT			14,3	0,079	3,1	0,008		
		GB			13,9	0,006	3,0	0,001		
		TB			14,4	0,021	3,2	0,005		
	PM	GT	06/09/16	120-130	20,9	0,036	3,1	0,003	ARN	
		TT			20,2	0,081	3,3	0,010		
		GB			20,7	0,032	3,1	0,005		
		TB			20,7	0,089	3,3	0,006		
	M	GT	13/09/16	140-160	23,4	0,060	3,2	0,005	Aromas + precursores aromáticos	
		TT			22,7	0,029	3,5	0,004		
		GB			22,9	0,028	3,2	0,003		
		TB			23,1	0,104	3,7	0,020		
2017	PE	GT	27-07-17	Bayas verdes	-----	-----	-----	-----	Azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, flavonoles	Azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos
		TT	21-07-17		-----	-----	-----	-----		
		GB	27-07-17		-----	-----	-----	-----		
		TB	21-07-17		-----	-----	-----	-----		
	E	GT	03/08/17	100-110	16,0	0,051	2,9	0,002	Azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, flavonoles, antocianinas	Azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos
		TT			16,9	0,064	3,0	0,007		
		GB			16,0	0,012	2,9	0,001		
		TB			16,4	0,072	3,0	0,001		
	PM	GT	17/08/17	120-130	20,7	0,121	3,2	0,005	Azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, flavonoles, antocianinas	Azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos
		TT			21,1	0,047	3,3	0,009		
		GB			19,1	0,025	3,2	0,001		
		TB			20,4	0,120	3,3	0,006		
	M	GT	31/08/17	140-160	23,4	0,069	3,4	0,004	Azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, flavonoles, antocianinas	Azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos
		TT			23,6	0,035	3,6	0,012		
		GB			23,3	0,080	3,4	0,005		
		TB			23,2	0,055	3,5	0,011		

Como cabía esperar en base a la fisiología de la maduración (Conde *et al.*, 2007), los resultados sobre pulpa licuada muestran una clara diferencia entre las muestras de PE y las de E y M en cuanto a su composición de azúcares solubles y ácidos orgánicos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas consistentes a lo largo de la maduración en la concentración de glucosa y fructosa, ni entre variantes de color ni entre variedades (Figura 4.12A y 4.12B), de acuerdo a lo esperado para bayas de la misma densidad según la selección que se realizó en estadios posteriores a PE. En lo relativo a los ácidos orgánicos, tampoco se observaron diferencias destacables en los niveles de ácido málico y ácido tartárico entre las variantes de color (Figura 4.12C). En los niveles de tartárico se detectó un efecto varietal, con mayor concentración en Garnacha que en Tempranillo en todas las muestras analizadas (Figura 4.12D). Por tanto, en la pulpa, el cambio de color no altera las relaciones entre los compuestos que determinan en mayor medida la calidad tecnológica de la baya.

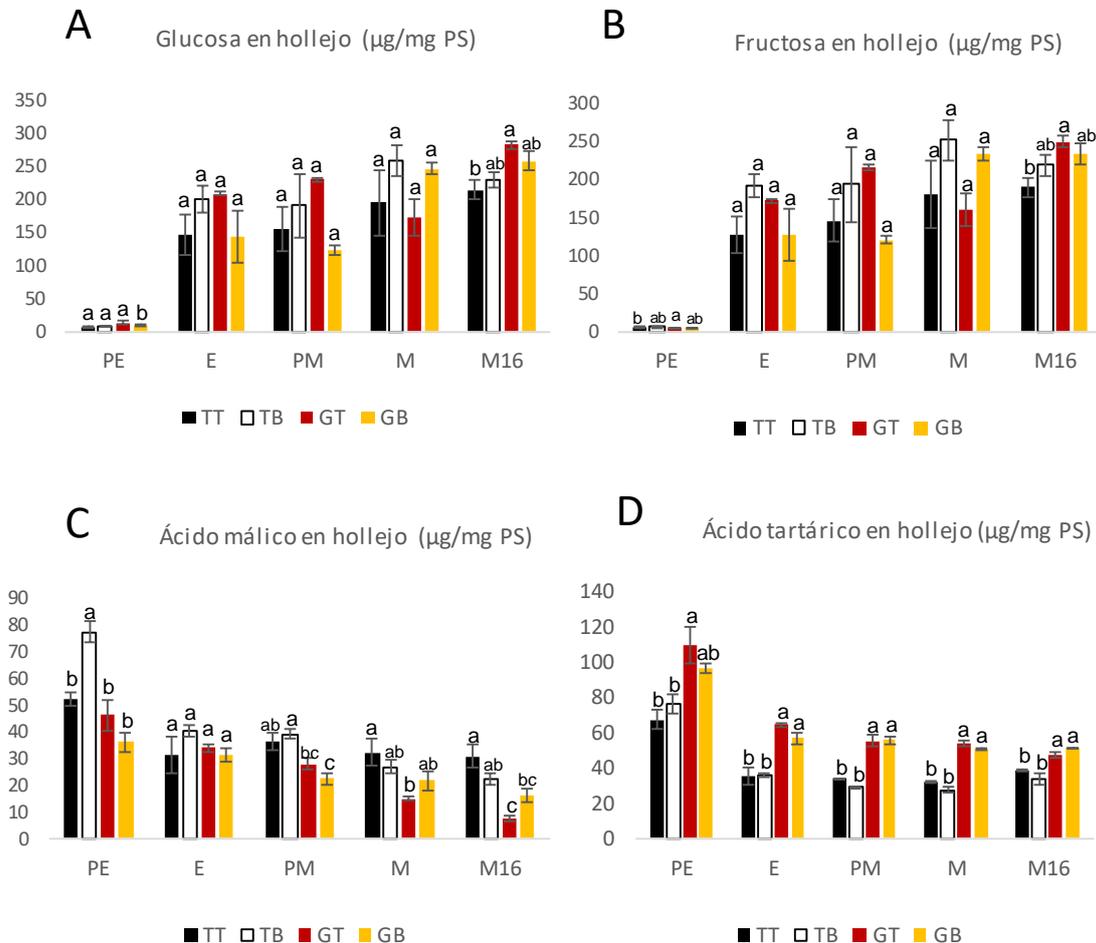


**Figura 4.12. Contenido de azúcares y ácidos orgánicos en la pulpa.** Se representan los valores en Tempranillo Tinto (TT), Tempranillo Blanco (TB), Garnacha Tinta (GT) y Garnacha Blanca (GB) en los estadios de pre-envero (PE), envero (E), pre-madurez (PM) y madurez (M) de 2017 y en madurez en 2016 (M16). Distintas letras indican diferencias significativas entre los genotipos en el estadio en cuestión considerando un  $P \leq 0,05$  según el análisis estadístico ANOVA.

En lo que respecta al hollejo, los resultados, en este caso sobre peso seco, fueron similares. Tampoco se detectaron diferencias significativas entre variantes de color, excepto en el caso del ácido málico en Tempranillo en PE, para el cual la concentración fue mayor en TB (Figura 4.13C).

La tendencia general a lo largo de la maduración fue igual que en la pulpa, incrementándose la concentración en azúcares y disminuyendo la de ácidos orgánicos, especialmente en el caso del málico. Al igual que ocurría en pulpa, se observó mayor concentración de ácido tartárico en Garnacha respecto a Tempranillo.

Por tanto, la variación en el color de la baya no afecta de manera relevante a su composición de azúcares y ácidos orgánicos.

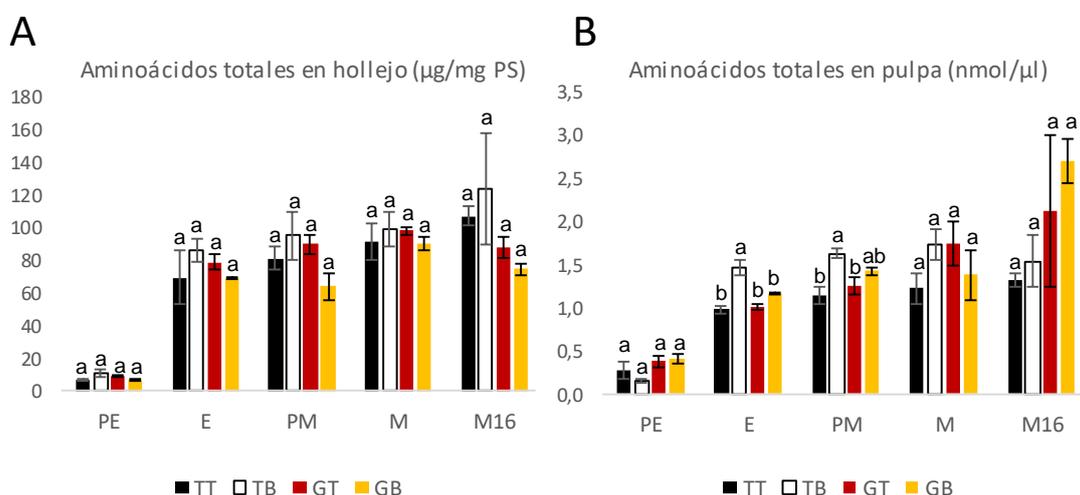


**Figura 4.13. Contenido en azúcares y ácidos orgánicos en el hollejo.** Se representan los valores en Tempranillo Tinto (TT), Tempranillo Blanco (TB), Garnacha Tinta (GT) y Garnacha Blanca (GB) en los estadios de pre-envero (PE), envero (E), pre-madurez (PM) y madurez (M) de 2017 y en madurez en 2016 (M16). Distintas letras indican diferencias significativas entre los genotipos en el estadio en cuestión considerando un  $P \leq 0,05$  según el análisis estadístico ANOVA.

#### 4.3.1.1.2 Aminoácidos

Se cuantificaron un total de 19 aminoácidos, incluyendo todos los proteínogénicos, a excepción de metionina y triptófano, y el aminoácido no proteínogénico GABA, en las mismas muestras en las que se cuantificaron azúcares y aminoácidos (hollejo y pulpa en los estadios de PE, E, PM y M recolectados en 2017 y en muestras de madurez de 2016, M16) mediante derivatización y cromatografía líquida UHPLC (Tablas suplementarias S6-S9). Como primera aproximación al estudio de la variación de los niveles de los 19 aminoácidos cuantificados, sobre la suma del contenido en todos ellos se llevó a cabo la comparación de medias entre variantes blancas y

tintas tanto en hollejo como en pulpa mediante el análisis estadístico ANOVA ( $P \leq 0,05$ ). En hollejo, aunque no se identificaron diferencias significativas, se observó una tendencia a mayor acumulación de aminoácidos totales en TB respecto a TT, mientras en Garnacha, al contrario, se observó tendencia a menor acumulación de aminoácidos totales en la variante blanca (Figura 4.14A). La tendencia en pulpa fue similar en el caso de Tempranillo, con mayor acumulación significativa de aminoácidos en TB respecto a TT en E y PM (Figura 4.14B).

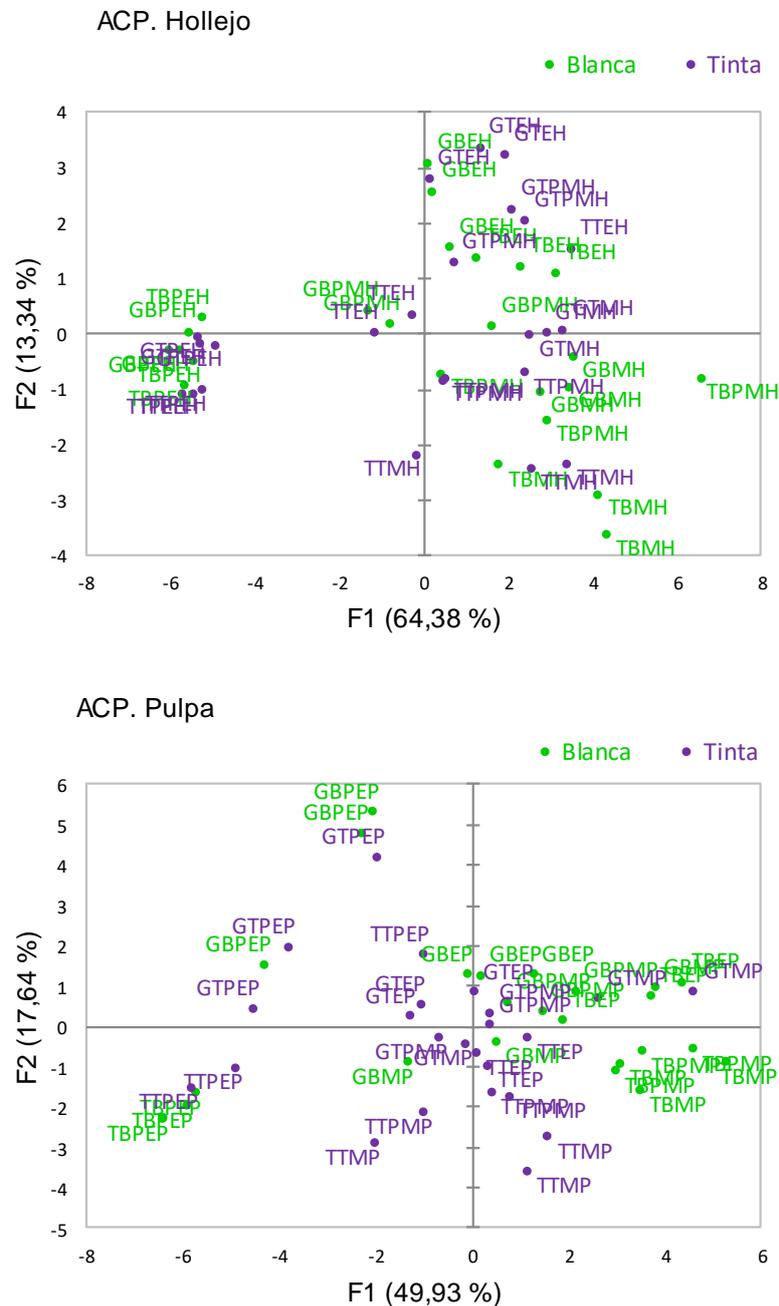


**Figura 4.14. Contenido en aminoácidos totales en hollejo (A) y en pulpa (B).** Se representan los valores en Tempranillo Tinto (TT), Tempranillo Blanco (TB), Garnacha Tinta (GT) y Garnacha Blanca (GB) en pre-envero (PE), envero (E), pre-madurez (PM), madurez (M) de 2017 y madurez en 2016 (M16). PS: peso seco. Distintas letras indican diferencias significativas entre los genotipos en el estadio en cuestión considerando un  $P \leq 0,05$  según análisis estadístico ANOVA.

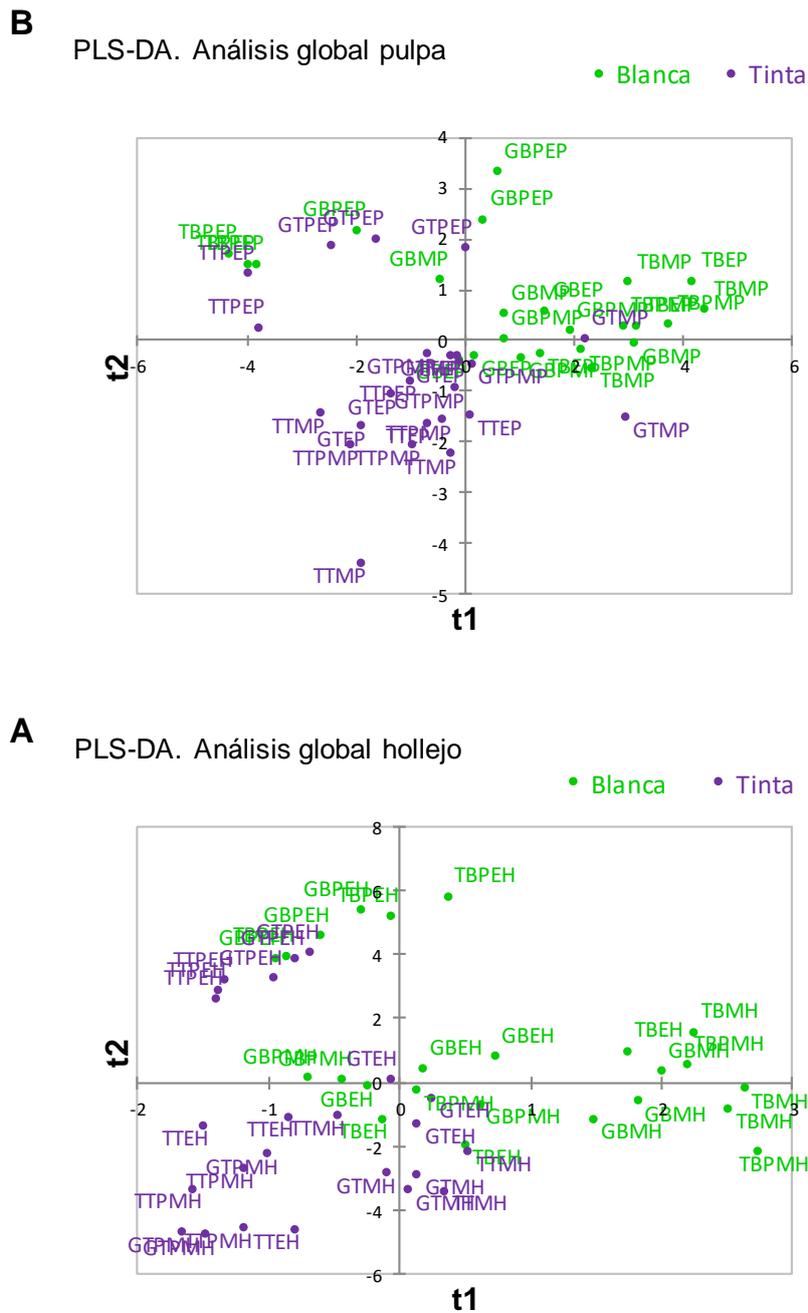
Con el fin de identificar los factores responsables de las diferencias en composición aminoacídica entre las muestras, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) analizando separadamente las muestras de hollejo (Figura 4.15A) y pulpa (Figura 4.15B). En cada caso se consideraron conjuntamente todas las réplicas de todas las variantes somáticas (TB, TT, GB y GT) y todos los estadios analizados durante 2017 (PE, E, PM y M). Tanto en hollejo como en pulpa, el componente 1 resultante del análisis separó las muestras en base a la serie de los estadios de maduración, mostrando mayores diferencias entre las muestras de PE y las del resto de estadios. El componente 2 mostró una tendencia a separar las muestras de Garnacha de las de Tempranillo en ambos tejidos. En el caso del hollejo se observó cierto efecto del color en las muestras de Tempranillo en el estadio de madurez (Figura 4.15A). En la pulpa, el componente 1 también mostró un efecto de la variación del color en la composición de aminoácidos de la pulpa específico de la variedad Tempranillo en los estadios de PM y M (Figura 4.15B). En cambio, el ACP no mostró efectos claros de la variación del color en el fondo genético de la variedad Garnacha.

Con el fin de analizar específicamente el efecto del color en la composición de aminoácidos de manera global, se realizaron análisis multivariantes PLS-DA en hollejo (Figura 4.16A) y pulpa (Figura 4.16B). El análisis PLS-DA permite evaluar el efecto de un factor concreto, en este caso el color o capacidad de sintetizar antocianinas, pese a que como mostró el ACP, otros factores como el tejido o el fondo varietal tengan más peso sobre el conjunto de datos. Al igual que

ocurría en el ACP y pese a ser un análisis dirigido, la separación de las muestras en el análisis PLS-DA en función del factor color mostró de nuevo que los efectos se dan sobre todo en muestras de PM y M y que son más intensos en Tempranillo que en Garnacha. En este caso fueron más claros en hollejo que en pulpa.

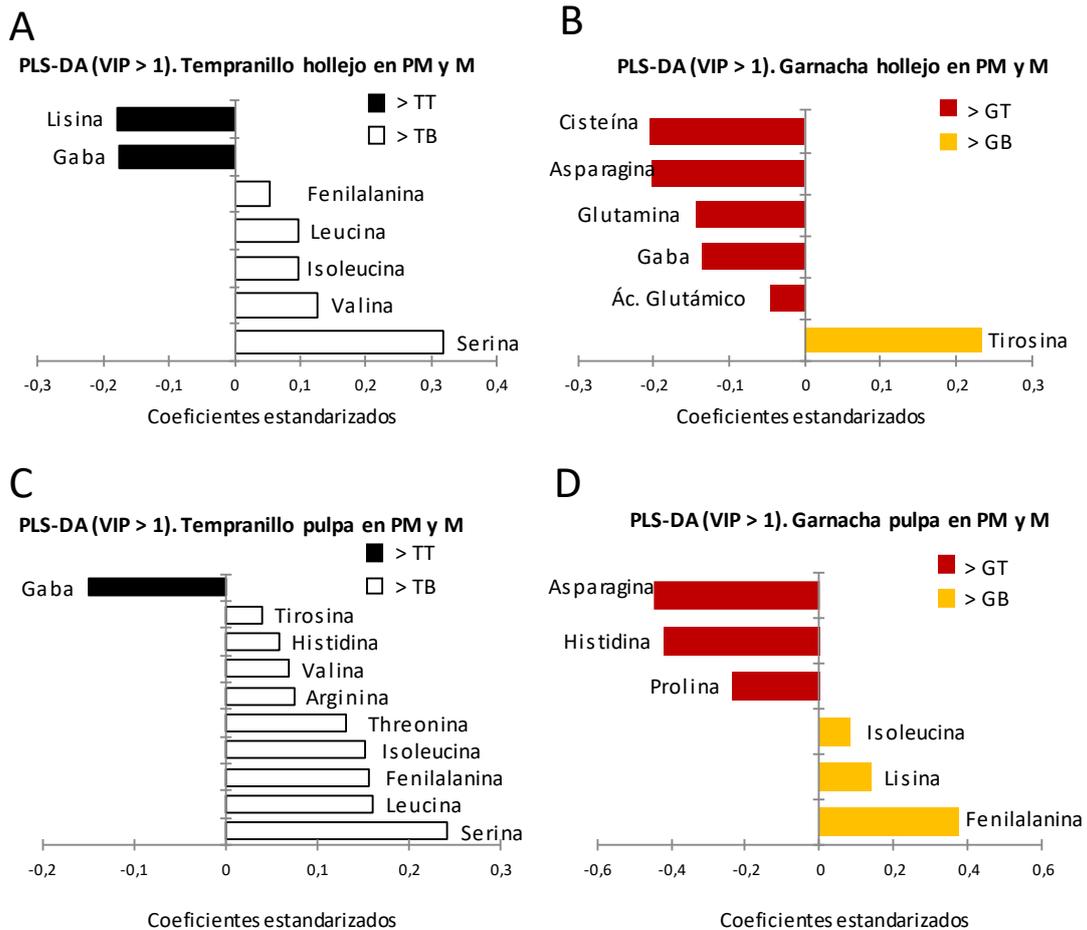


**Figura 4.15. Análisis de componentes principales para la variación en el contenido en aminoácidos.** Se representan todas las muestras recolectadas en 2017 para las cuatro variedades en los cuatro estadios estudiados en hollejo (A) y en pulpa (B). TT, Tempranillo Tinto; TB, Tempranillo Blanco; GT, Garnacha Tinta; GB, Garnacha Blanca; PE, pre-envero; E, envero; PM, pre-madurez; M, madurez; H, hollejo y P, pulpa; F1 y F2 variables generadas por el análisis.



**Figura 4.16. Análisis PLS-DA para la variación en el contenido en aminoácidos según el factor color de baya.** Se representan todas las muestras recolectadas en 2017 para las cuatro variedades en los cuatro estadios estudiados en hollejo (A) y en pulpa (B) por separado. TT, Tempranillo Tinto; TB, Tempranillo Blanco; GT, Garnacha Tinta; GB, Garnacha Blanca; PE, pre-envero; E, envero; PM, pre-madurez; M, madurez; H, hollejo y P, pulpa; t1 y t2 variables generadas por el análisis.

En vista de que tanto los análisis ACP como el PLS-DA indicaron un mayor efecto del color sobre la composición de aminoácidos en las muestras de los estadios de PM y M, se realizaron análisis PLS-DA para el efecto del color específicamente en las muestras de estos estadios en cada variedad y se identificaron los metabolitos que más contribuyen al efecto del color en esas muestras según un umbral del *valor de la importancia de la variable en proyección* (VIP) >1 en el PLS-DA (Véase Material y Métodos sección 3.4.4.2).



**Figura 4.17. Aminoácidos que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas.** Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un VIP >1 en los análisis PLS-DA para el factor color realizados sobre las muestras de pre-madurez y madurez de 2017 de hollejo de Tempranillo (A), hollejo de Garnacha (B), pulpa de Tempranillo (C) y pulpa de Garnacha (D).

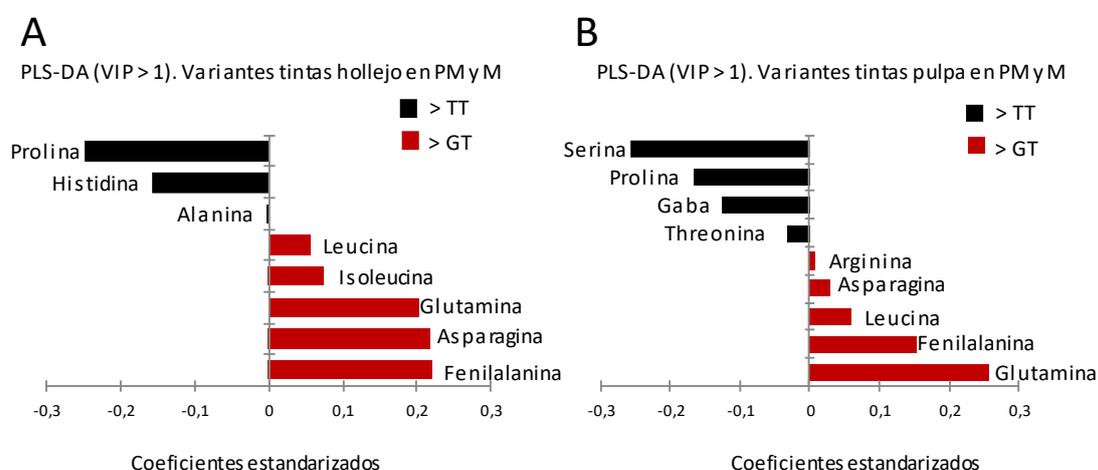
Los resultados de los aminoácidos que más contribuyen al efecto del color en PM y M indican que, en el hollejo, las variantes blancas de ambas variedades presentaron mayores niveles de precursores de fenilpropanoides, como la fenilalanina, y los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina en el caso del Tempranillo (Figura 4.17A), y la tirosina en el caso de Garnacha (Figura 4.17B). TB también acumuló mayores niveles de serina que TT. Por otro lado, el hollejo de las variantes blancas tanto de Tempranillo como de Garnacha, acumularon menos GABA, aminoácido relacionado con la protección frente a estrés abiótico. TB también acumuló de manera específica menos lisina que TT, mientras que, en GB, cisteína, asparagina, glutamina y ácido glutámico se acumularon menos que en GT.

En el caso de la pulpa, también se observaron coincidencias entre las dos variedades. Así, en ambas variantes blancas se acumularon, al igual que en el hollejo, mayores niveles de precursores de la síntesis de fenilpropanoides, tirosina, valina, isoleucina, fenilalanina y leucina en TB (Figura 4.17C), e isoleucina y fenilalanina en GB (Figura 4.17D). TB además acumuló mayores niveles de histidina, arginina, treonina y, al igual que en hollejo, serina. En el caso de GB, el PLS-DA indicó también mayores niveles de lisina que en GT. Por otro lado, al igual que en

el hollejo, también se observó una menor acumulación de aminoácidos relacionados con la protección frente a estrés abiótico (Hayat *et al.*, 2012; Ramesh *et al.*, 2016), GABA en el caso de TB (Figura 4.17C) y prolina en el caso de GB (Figura 4.17D) en comparación con TT y GT, respectivamente. En GB también se acumuló de manera específica menos histidina y, al igual que en hollejo, menos asparagina que en GT.

Estos resultados apuntan en el mismo sentido que las tendencias observadas en el análisis de comparación de medias, en el que se vio mayor acumulación de un mayor número de aminoácidos en TB que en TT tanto en el hollejo como en la pulpa, mientras que en el hollejo de Garnacha se detectó un mayor número de aminoácidos con menor acumulación en GB que en GT. Cabe destacar que la menor acumulación de GABA en el hollejo de las variantes blancas en PM y M fue significativa en ambas variedades según el análisis de comparación de medias T-test para un  $P \leq 0,05$  (Tablas suplementarias S6 y S7). Los aminoácidos precursores de fenilpropanoides mostraron diferencias significativas solo en Tempranillo, con mayor contenido en fenilalanina, leucina, isoleucina, tirosina y valina en hollejo y pulpa de PM y M en TB respecto a TT (Tablas suplementarias S6 y S8).

Por otro lado, dado que se observaron efectos del color específicos de cada variedad, se compararon las variedades tintas en análisis PLS-DA para determinar si podían estar en el origen de estas diferencias. Cabe destacar que Garnacha se asemejó más a las variantes blancas, con un mayor contenido en aminoácidos precursores de fenilpropanoides y menor contenido en aminoácidos relacionados con respuesta a estrés abiótico (Figura 4.18).



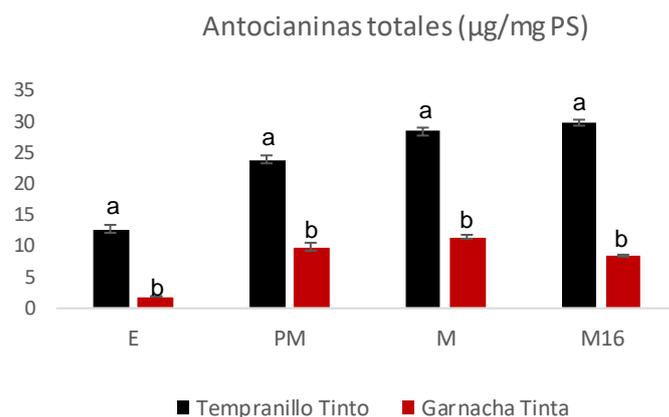
**Figura 4.18. Aminoácidos que contribuyen a la variación entre Tempranillo Tinto y Garnacha Tinta.** Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un VIP >1 en los análisis PLS-DA para el factor variedad realizados sobre las muestras de pre-madurez y madurez de 2017 de hollejo (A) y de pulpa (B).

En resumen, en el conjunto de los resultados se observó menor contenido de los aminoácidos relacionados con respuestas a estrés abiótico GABA y prolina en las variantes blancas frente a las tintas, mientras que el contenido fue mayor en aminoácidos implicados en la síntesis de fenilpropanoides, fenilalanina y tirosina y los aminoácidos ramificados leucina, isoleucina y valina.

### 4.3.1.2 Fenilpropanoides

#### 4.3.1.2.1 Antocianinas

Como variable que determina el color y que por tanto puede influir en distintos efectos asociados al mismo, y en las diferencias observadas entre variantes tintas y blancas, se analizó el contenido en antocianinas en el hollejo de las variantes tintas mediante cromatografía líquida UHPLC. Se analizaron muestras de uvas del estadio de madurez de 2016 y de E, PM y M en 2017. El contenido en antocianinas totales fue significativamente mayor ( $P \leq 0,05$  en T-test) en TT respecto a GT en todas las muestras analizadas (Figura 4.19). En todos los estadios, la concentración de antocianinas en GT fue más de dos veces menor que la de TT.

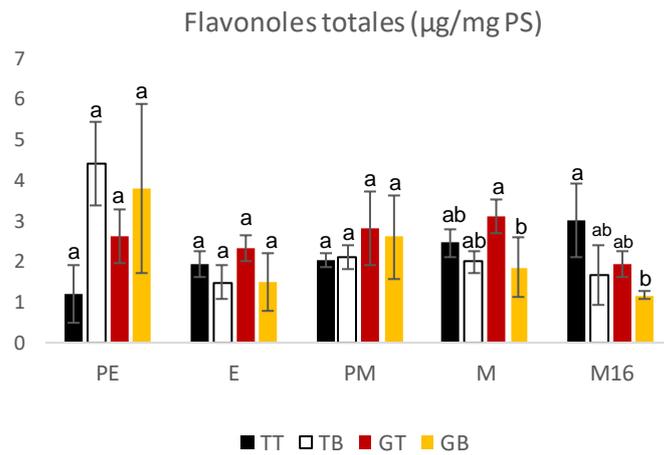


**Figura 4.19. Contenido en antocianinas totales en Tempranillo y Garnacha.** Se representan los valores obtenidos en Tempranillo Tinto y Garnacha Tinta en invierno (E), pre-madurez (PM), madurez (M) en 2017 y madurez en 2016 (M16). PS: peso seco. Distintas letras en cada estadio indican la existencia de diferencias significativas para un  $P \leq 0,05$  según el análisis estadístico T-test.

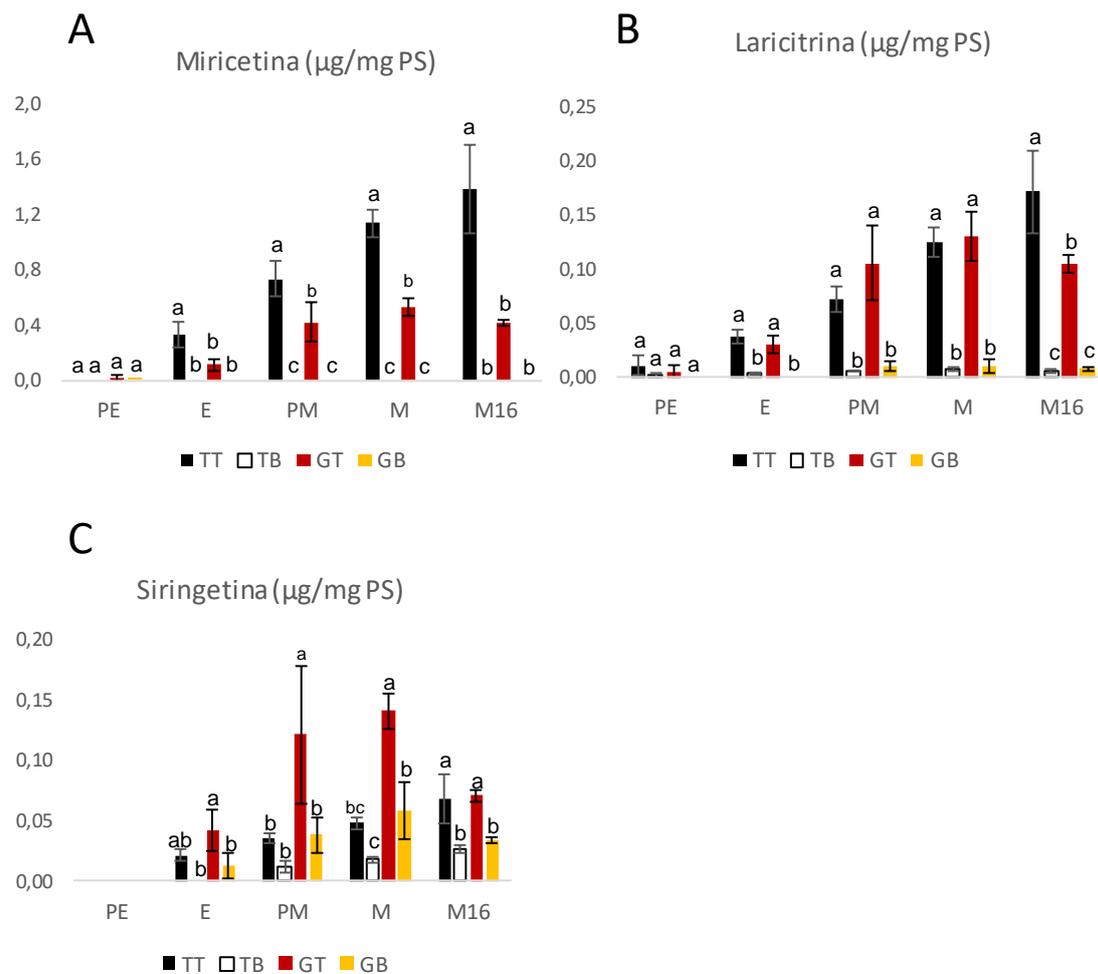
#### 4.3.1.2.2 Flavonoles

Para determinar el contenido en flavonoles, se cuantificaron tanto el contenido total como los niveles de los compuestos individuales mediante cromatografía líquida UHPLC en hollejo de uvas maduras de 2016 y a lo largo de la maduración de 2017, paralelamente al análisis de antocianinas. En cuanto al contenido total de flavonoles, no se observaron diferencias significativas entre las variantes blancas y tintas de ambas variedades para ninguno de los estadios analizados con la excepción del estadio M en Garnacha ( $P \leq 0,05$  en ANOVA), que presentó un menor contenido total en GB que en GT (Figura 4.20).

En cuanto a los flavonoles individuales, un efecto común observado tanto en Tempranillo como en Garnacha fue que los flavonoles tri-hidroxilados se acumularon en las variantes tintas a partir de invierno y casi no lo hicieron en las variantes blancas (Figura 4.21). Este efecto fue mayor para miricetina (Figura 4.21A) y laricitrina (Figura 4.21B), que prácticamente no se detectaron en las variantes blancas. La miricetina fue el flavonol trihidroxilado mayoritario en las variantes tintas. Sin embargo, sus niveles en GT fueron intermedios entre los detectados en TT y en las variantes blancas. En el caso de la siringetina también se observaron menores niveles en las variantes blancas a partir de invierno, aunque en Tempranillo la diferencia solo fue significativa en M16 (Figura 4.21C). Los niveles de siringetina fueron significativamente superiores en Garnacha Tinta que en Tempranillo Tinto durante el proceso de maduración (estadios PM y M) a lo largo de 2017 pero no en las uvas maduras de 2016.



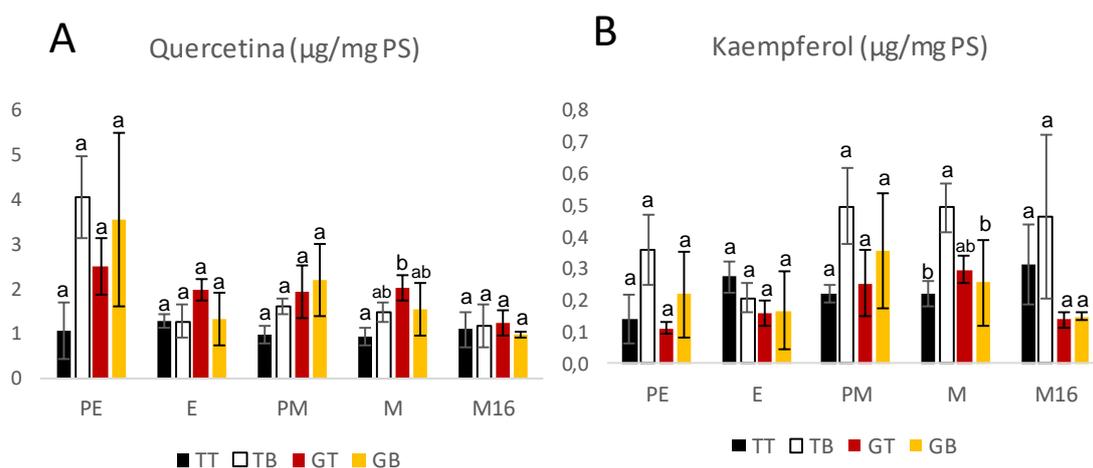
**Figura 4.20. Contenido en flavonoles totales.** Se representan los valores en Tempranillo Tinto (TT), Tempranillo Blanco (TB), Garnacha Tinta (GT) y Garnacha Blanca (GB) en pre-enero (PE), enero (E), pre-madurez (PM), madurez (M) de 2017 y madurez en 2016 (M16). PS: peso seco. Distintas letras en cada estadio significan diferencias significativas en dicho estadio para un  $P \leq 0,05$  según el análisis estadístico ANOVA.



**Figura 4.21. Contenido en flavonoles tri-hidroxilados.** Se representan los valores en Tempranillo Tinto (TT), Tempranillo Blanco (TB), Garnacha Tinta (GT) y Garnacha Blanca (GB) en pre-enero

(PE), envero (E), pre-madurez (PM), madurez (M) de 2017 y madurez en 2016 (M16). Distintas letras en cada estadio significan diferencias significativas en dicho estadio para un  $P \leq 0,05$  según el análisis estadístico ANOVA.

El flavonol dihidroxilado quercetina y el monohidroxilado kaempferol mostraron una tendencia distinta a los tri-hidroxilados, con una mayor concentración en TB frente a TT, aunque las diferencias solo fueron significativas en M para kaempferol (Figura 4.22A y 4.22B). En Garnacha no se observó efecto del color de la baya sobre la concentración de estos flavonoles.



**Figura 4.22. Contenido en no tri-hidroxilados quercetina y kaempferol.** Se representan los valores en Tempranillo Tinto (TT), Tempranillo Blanco (TB), Garnacha Tinta (GT) y Garnacha Blanca (GB) en pre-envero (PE), envero (E), pre-madurez (PM), madurez (M) de 2017 y madurez en 2016 (M16). Distintas letras en cada estadio significan diferencias significativas en dicho estadio para un  $P \leq 0,05$  según el análisis estadístico ANOVA.

En resumen, el contenido en antocianinas fue claramente superior en TT que en GT a lo largo de toda la maduración. En lo que respecta a los flavonoles, el contenido en flavonoles tri-hidroxilados fue menor en las variantes blancas frente a las tintas, mientras que se observó una tendencia al aumento de la concentración de quercetina y kaempferol en las variantes blancas frente a las tintas.

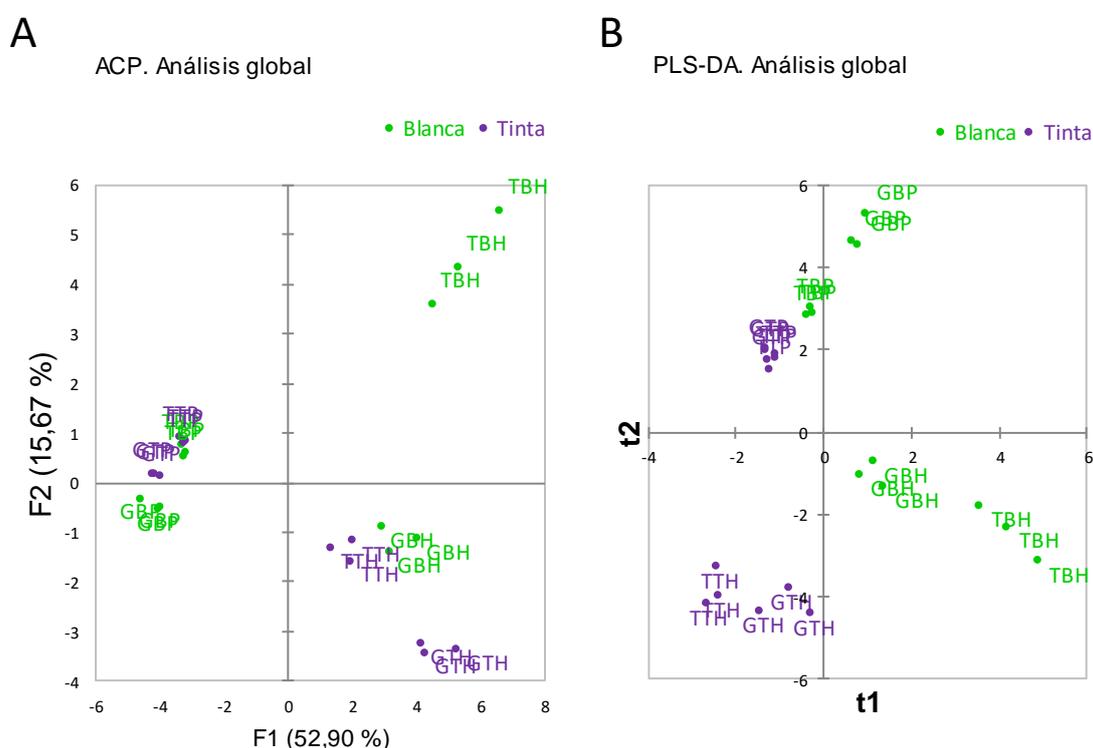
#### 4.3.1.3 Precursores de compuestos volátiles y compuestos volátiles

##### 4.3.1.3.1 Precursores apolares

Como precursores apolares de los compuestos volátiles C-13 norisoprenoides y alcoholes C6 y sus derivados respectivamente se analizó el contenido en carotenoides y ácidos grasos. Por su carácter de compuesto apolar, se analizaron también al mismo tiempo las clorofilas y sus derivados. Se cuantificaron un total de 29 compuestos apolares en hollejo y pulpa en muestras recolectadas en el estadio de madurez de 2016 (Tabla 4.9) mediante cromatografía líquida LC-DAD-APCI-HRMS (Tablas suplementarias S6-S9). Como primera aproximación al estudio de la variación en la composición de los 29 compuestos apolares cuantificados se llevó a cabo una serie de Análisis de Componentes Principales (ACP). Para ello se consideraron todas las muestras de hollejo y pulpa de todos los genotipos varietales y variantes somáticas (TB, TT, GB y GT). Como se observa en la Figura 4.23A, el componente 1 separó las muestras de hollejo y pulpa y mostró una tendencia a diferenciar también las muestras de Garnacha de las de Tempranillo. El

componente 2 separó las muestras de cada variedad en función del color de la baya en ambos tejidos, más discretamente en pulpa y claramente en hollejo. En el caso del hollejo, la separación fue mayor entre las variantes de color de Tempranillo que entre las de Garnacha (Figura 4.23A).

Para analizar específicamente el efecto del color de manera global se realizaron análisis multivariantes PLS-DA (Figura 4.23B). Al igual que en el ACP, la separación de las muestras en el análisis PLS-DA por el factor color mostró que los efectos son más intensos en hollejo que en pulpa y en Tempranillo que en Garnacha (Figura 4.23B), situándose GT entre las muestras de TT y las de uva blanca de ambas variedades. Las variantes blancas de cada variedad también se separaron entre ellas y además en sentido inverso en cada tejido. En el hollejo las diferencias fueron mayores y las muestras de TB se distanciaron más de las tintas que las de GB, mientras que en pulpa fueron las de GB las más distanciadas.

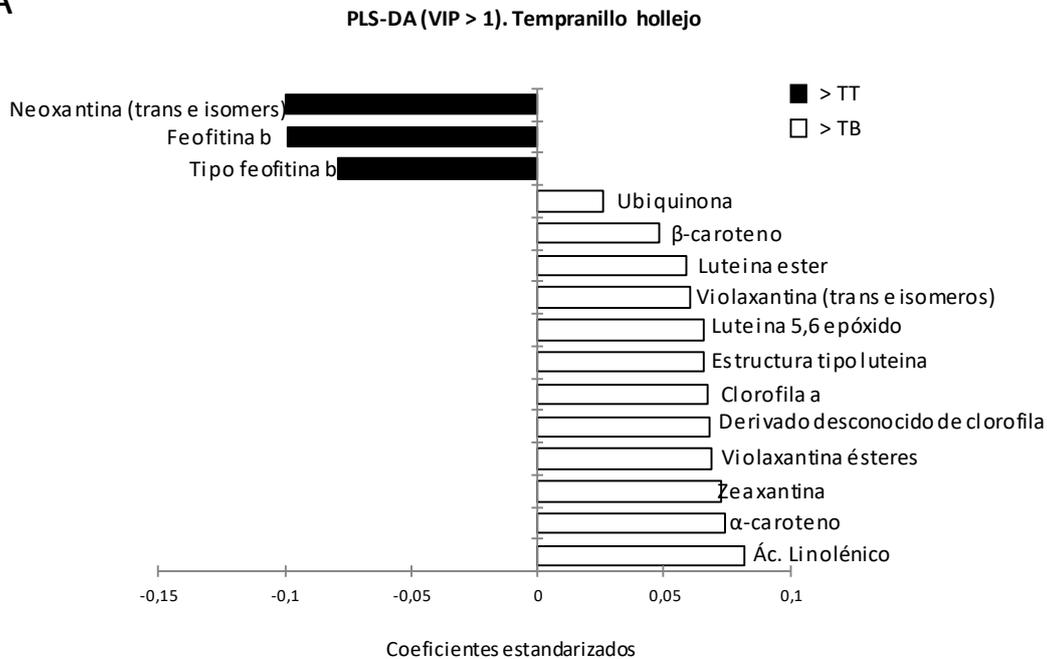


**Figura 4.23. Análisis de Componentes Principales y análisis multivariante PLS-DA en el estudio del efecto del color sobre la composición de precursores apolares.** Se representan el ACP (A) y el PLS-DA para el factor color (B) del conjunto de las muestras correspondientes al estadio de madurez de 2016 de ambas variedades y variantes de color, tanto en pulpa como en hollejo. La representación corresponde a la variación en los 29 compuestos apolares cuantificados. TT, Tempranillo Tinto; TB, Tempranillo Blanco; GT, Garnacha Tinta; GB, Garnacha Blanca; H, hollejo y P, pulpa; F1, F2, t1 y t2, variables generadas por los análisis.

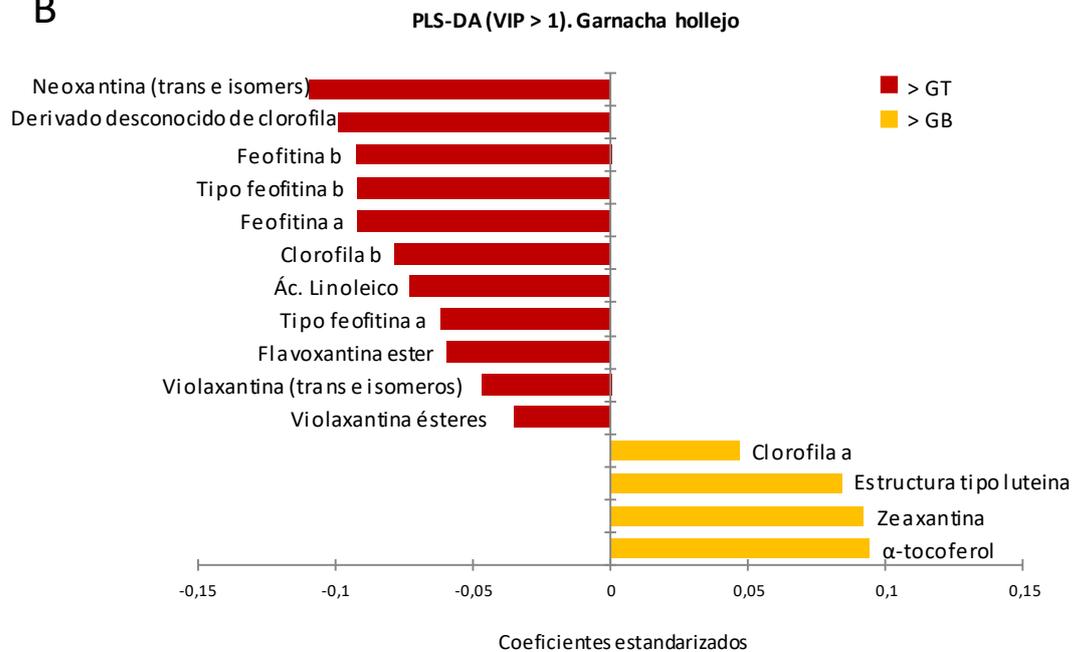
Con el objetivo de identificar los compuestos apolares con mayor contribución a la separación de las variantes de color (VIP >1) en cada tejido, se realizaron análisis PLS-DA adicionales independientemente para cada genotipo varietal. Los resultados indicaron que, en hollejo, las variantes blancas de ambas variedades acumularon mayor contenido de clorofila a y de carotenoides como la zeaxantina y compuestos relacionados con la luteína (luteína 5,6-époxico y éster de luteína en TB y un compuesto similar a la luteína en TB y GB) (Figura 4.24). Por otro lado, las variantes blancas mostraron menor acumulación del carotenoide neoxantina y de

derivados de clorofila no fotoactivos (feofitina b y un compuesto similar en TB y feofitina a y b y compuestos similares y un derivado desconocido de clorofila en GB). Además de estos efectos comunes del color se observaron también efectos específicos en cada variedad. Concretamente, el PLS-DA indica que en TB se produjo mayor acumulación de carotenoides como violaxantina y ácidos grasos que en TT, mientras que estos mismos compuestos mostraron menor acumulación en GB que en GT.

A

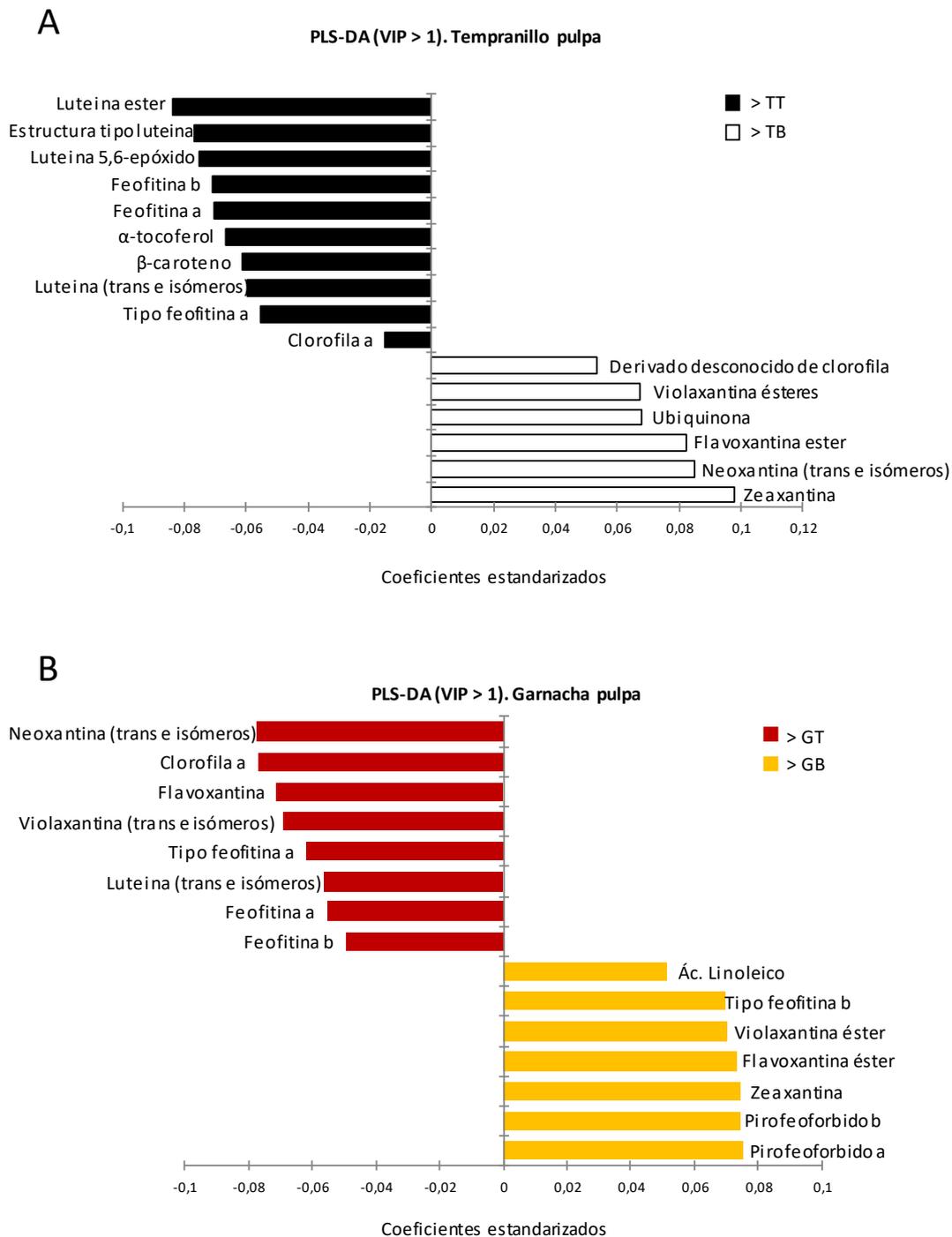


B



**Figura 4.24. Precursores apolares que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en el hollejo.** Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un VIP >1 en los análisis PLS-DA para el factor color realizados sobre las muestras de uvas maduras de 2016 de Tempranillo (A) y de Garnacha (B).

En lo que respecta a la pulpa, se observaron efectos del color similares a los del hollejo, como la mayor acumulación de zeaxantina y menor acumulación de feofitinas en las variantes blancas (Figura 4.25). Además, en la pulpa, las variantes blancas también acumularon mayor contenido de otros carotenoides como ésteres de violaxantina y de flavoxantina y de compuestos derivados de clorofila (derivado desconocido en TB y un compuesto similar a feofitina b y los pirofeofórbidos a y b en GB). Al contrario de lo que se observó en hollejo, las variantes blancas de ambas variedades acumularon menores niveles de clorofila a y de carotenoides tipo luteína.



**Figura 4.25. Precursores apolares que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en la pulpa. Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un**

*VIP >1 en los análisis PLS-DA para el factor color realizados sobre las muestras de uvas maduras de 2016 de Tempranillo (A) y de Garnacha (B).*

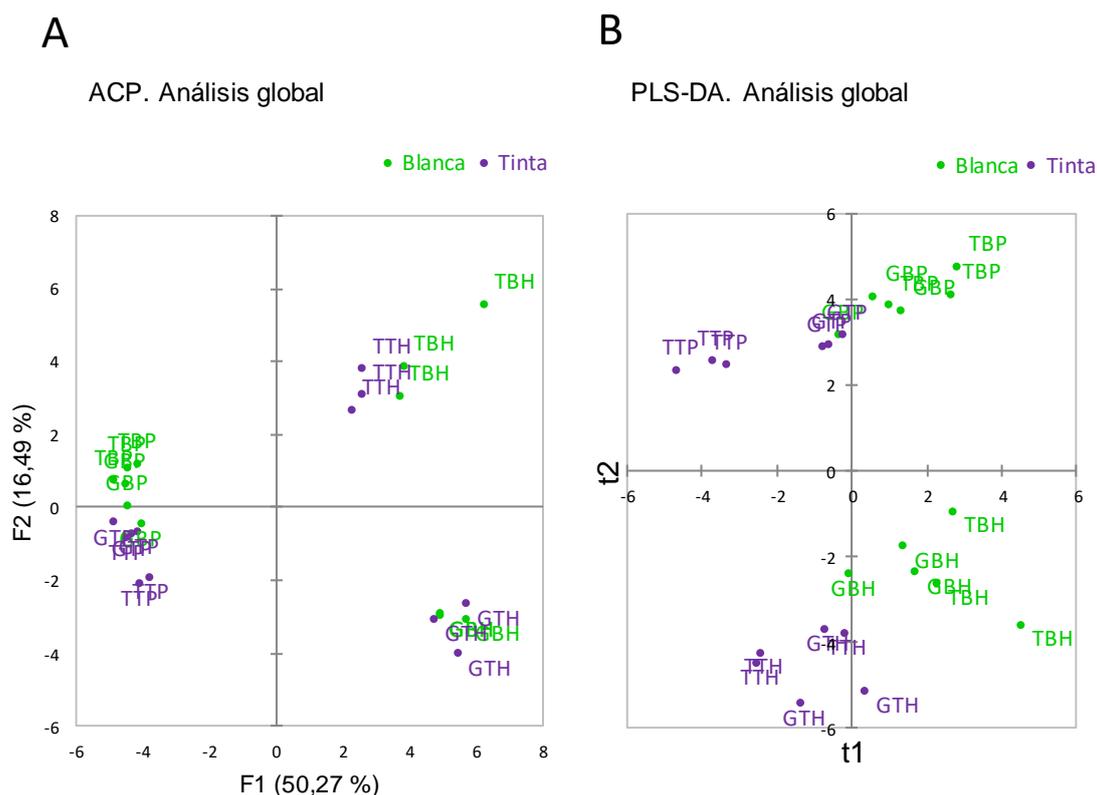
La mayor acumulación de zeaxantina en ambos tejidos de las variantes blancas respecto a las tintas fue significativa en ambas variedades según el análisis de comparación de medias T-test para un  $P \leq 0,05$  (Tablas suplementarias S6-S9). Sin embargo, la mayor acumulación de clorofila a en el hollejo de TB y GB solo fue significativa en el caso de TB, mientras que la menor acumulación en la pulpa de TB y GB solo fue significativa en GB. En el caso de las feofitinas, las diferencias fueron significativas en la pulpa de Tempranillo y en el hollejo de Garnacha para ambos tipos con menor acumulación en TB y GB respecto a TT y GT. La feofitina b presentó un contenido significativamente menor no sólo en la pulpa sino también en el hollejo de TB respecto a TT.

En conjunto, los resultados mostraron un mayor contenido en carotenoides en las variantes blancas frente a las tintas, especialmente de zeaxantina, y un menor contenido en feofitinas.

#### 4.3.1.3.2 Precursores semipolares

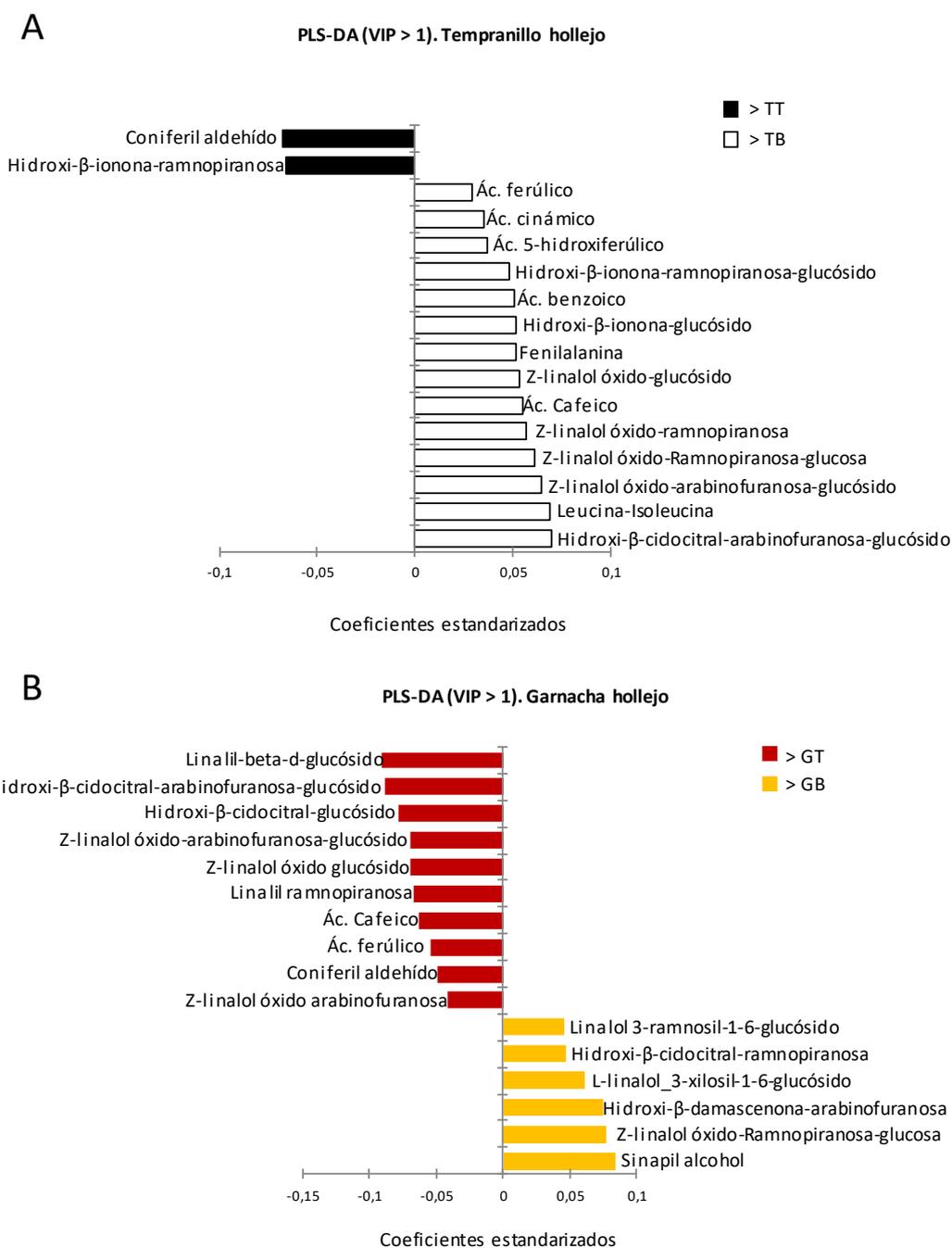
Como precursores semipolares de compuestos volátiles de la uva se analizaron los aminoácidos leucina, isoleucina y valina, ácidos fenólicos y sus derivados, terpenos glicosilados y norisoprenoides glicosilados. Se cuantificaron un total de 39 compuestos semipolares en hollejo y pulpa de muestras de uvas recolectadas en el estadio de madurez de 2016 mediante cromatografía líquida LC-ESI (+) – HRMS (Tablas suplementarias S6- S9). Al igual que en el caso de los precursores apolares, los resultados se analizaron inicialmente mediante ACP considerando conjuntamente todas las muestras de todos los tejidos de las variantes somáticas (TB, TT, GB y GT). Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 4.26A. El componente 1 identificado en este análisis separó las muestras de hollejo y las de pulpa. En el caso del hollejo de Tempranillo, el componente 1 separó además las muestras según el color de baya de las variantes indicando un efecto notable de este factor, mientras que, en el hollejo de Garnacha, el ACP no mostró efectos claros de la variación del color. El componente 2 separó las muestras de Tempranillo de las de Garnacha en el hollejo y las muestras de las variantes blancas y tintas en la pulpa (Figura 4.26A).

La separación de las muestras en el análisis PLS-DA por el factor color mostró que los efectos del color diferencian tanto las muestras de hollejo como las de pulpa en Tempranillo y en Garnacha, aunque en esta última la separación fue mayor en hollejo (Figura 4.26B). Al igual que en el caso de los precursores apolares, los efectos de la diferenciación por color fueron más intensos en Tempranillo que en Garnacha, situándose GT entre las muestras de TT y las blancas de ambas variedades.



**Figura 4.26. Análisis de Componentes Principales y análisis PLS-DA para el efecto color sobre los precursores semipolares.** Se representan el ACP (A) y el PLS-DA para el factor color (B) del conjunto de las muestras de pulpa y hollejo recolectadas en el estadio de madurez de 2016 de ambas variedades y variantes de color. La representación corresponde a la variación en los 39 compuestos semipolares cuantificados. TT, Tempranillo Tinto; TB, Tempranillo Blanco; GT, Garnacha Tinta; GB, Garnacha Blanca; H, hollejo y P, pulpa; F1, F2, t1 y t2, variables generadas por los análisis.

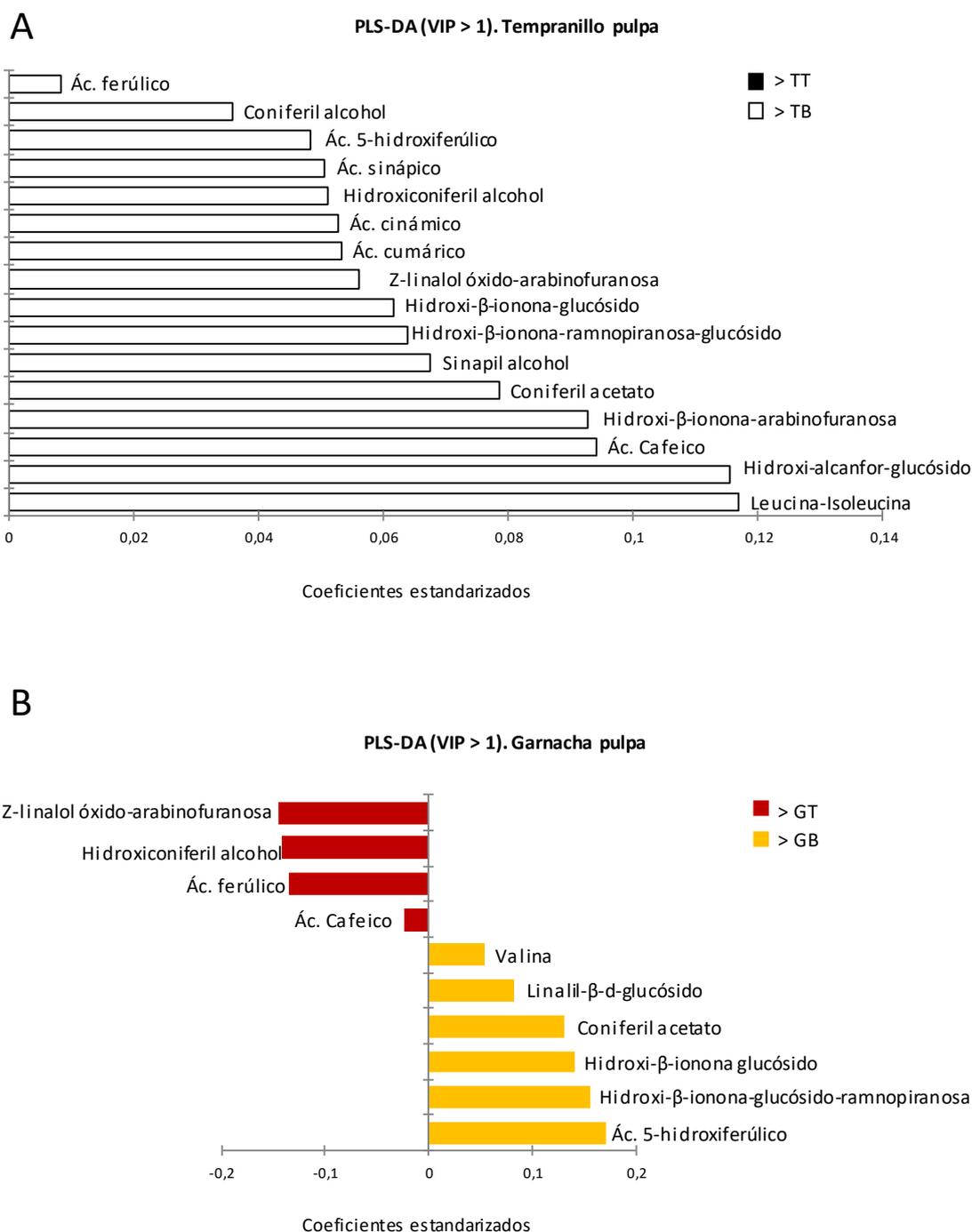
Se realizaron análisis PLS-DA adicionales considerando el efecto del color de forma específica en muestras de hollejo y pulpa de cada variedad con el objetivo de identificar los compuestos que contribuyeron a la separación de las variantes de color (VIP >1) en cada caso. En hollejo, como efecto común en ambas variedades, el PLS-DA indicó una mayor acumulación de  $\alpha$ -óxido de linalool-ramnopiranososa glucosa y menor acumulación de coniferil aldehído en las variantes blancas (Figura 4.27). Además de estas coincidencias, las variantes blancas de cada variedad mostraron mayor acumulación de distintos glicósidos de monoterpene y C13-norisprenoídes (hidroxi- $\beta$ -ionona ramnopiranososa glucósido en TB e hidroxi- $\beta$ -damascenona arabinofuranosa en GB) respecto a sus variantes tintas. También se identificaron efectos específicos del color en cada variedad, confirmándose la mayor acumulación en TB respecto a TT de aminoácidos precursores de fenilpropanoídes (leucina-isoleucina y fenilalanina) junto con la de distintos ácidos fenólicos (caféico, benzoico, cinámico y ferúlico). En el caso de Garnacha se dieron algunos efectos invertidos del color respecto a Tempranillo, ya que GB acumuló niveles menores que GT en cinco monoterpene glicosilados, dos norisprenoídes glicosilados y dos ácidos fenólicos (Figura 4.27).



**Figura 4.27. Precursores semipolares que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en el hollejo.** Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un VIP >1 en los análisis PLS-DA para el factor color realizados sobre las muestras de hollejo de uvas maduras de 2016 de Tempranillo (A) y Garnacha (B).

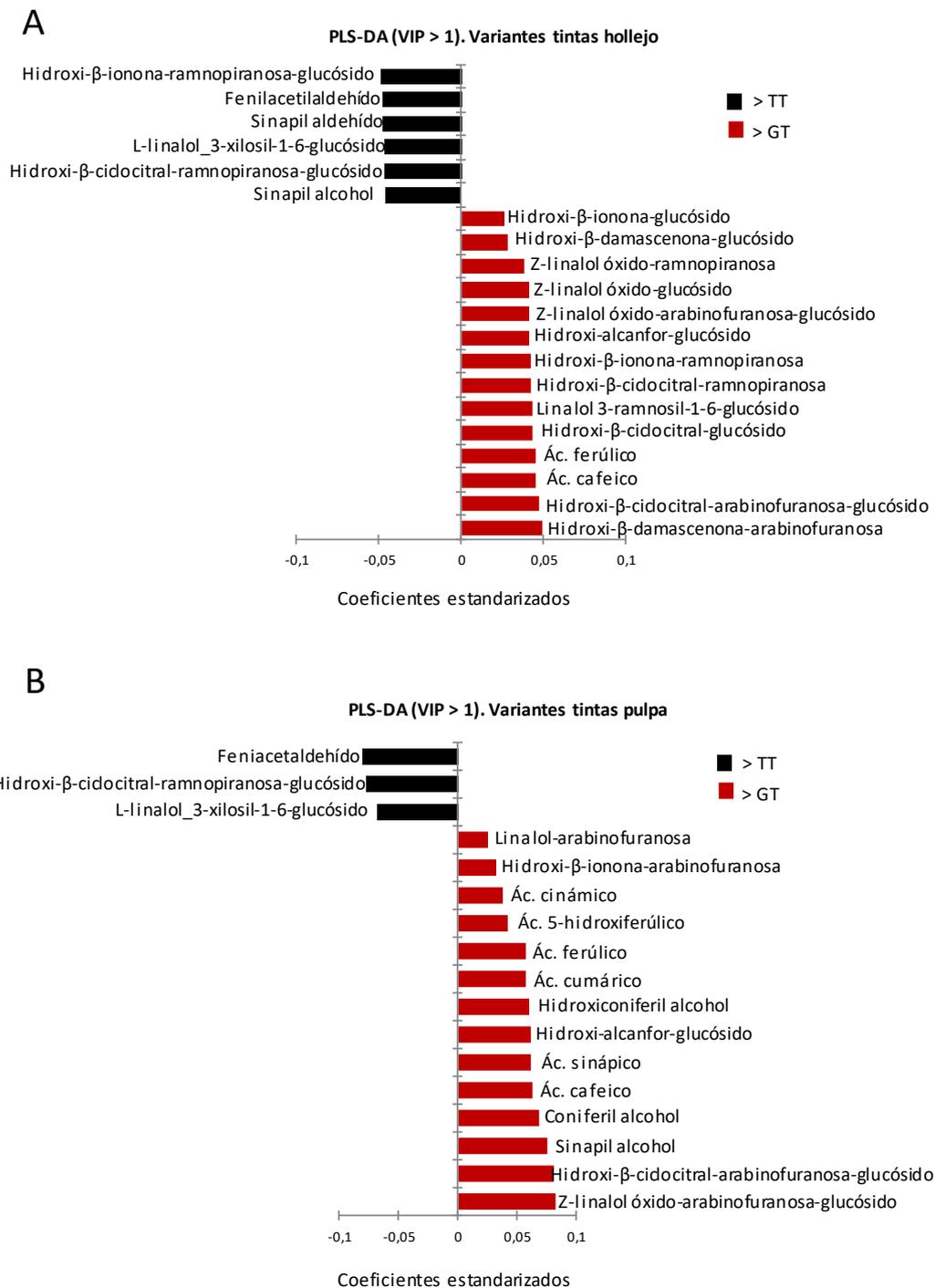
En lo que respecta a los precursores semipolares de la pulpa, de nuevo un efecto común del color en ambas variedades fue la mayor acumulación de aminoácidos precursores de fenilpropanoides en las variantes blancas (leucina e isoleucina TB y valina GB) (Figura 4.28). Las variantes blancas también mostraron mayores niveles de distintos glicósidos de norisoprenoides como la β-ionona, de ácido fenólico 5-hidroxi-ferúlico y de alcohol coniferil-acetato. También de manera similar al hollejo, hubo efectos del color invertidos entre las dos variedades, coincidiendo también la mayor acumulación de distintos ácidos fenólicos y glicósidos de

monoterpenos relacionados con linalol en la pulpa de TB respecto a TT, mientras que algunos de ellos mostraron menor acumulación en GB que en GT. También cabe destacar que, según los resultados del PLS-DA, TB no acumuló ningún precursor semipolar en menor cantidad que TT, lo que junto con resultados anteriores apunta a que en TB la pérdida de color se asocia a una clara ganancia de potencial aromático (Figura 4.28).



**Figura 4.28. Precursores semipolares que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en la pulpa.** Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un VIP >1 en los análisis PLS-DA para el factor color realizados sobre las muestras de pulpa de uvas maduras de 2016 de Tempranillo (A) y de Garnacha (B).

Las diferencias en el contenido de z-óxido de linalool-ramnopiranos glucosa en el hollejo, con mayor contenido en TB y GB que en TT y GT, respectivamente, fueron significativas en ambas variedades según un análisis T-test ( $P \leq 0,05$ ), mientras que las diferencias entre variantes de color en el contenido en la pulpa de los glicósidos de  $\beta$ -ionona fueron significativas en ambas variedades en un caso (hidroxi  $\beta$ -ionona ramnopiranos glucósido) y solo en Tempranillo en otro (hidroxi  $\beta$ -ionona glucósido) (Tablas suplementarias S6-S9).



**Figura 4.29. Precursores semipolares que contribuyen a la variación entre TT y GT. Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un VIP >1 en los análisis**

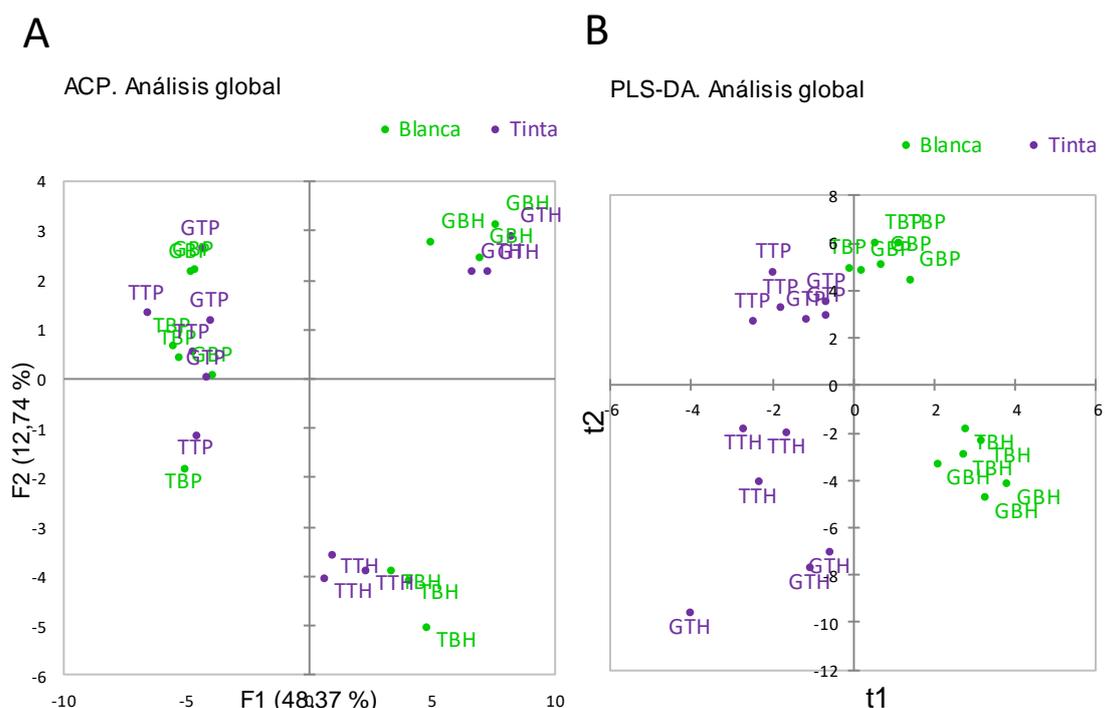
PLS-DA para el factor variedad realizados sobre las muestras madurez de 2016 de hollejo (A) y de pulpa (B).

Finalmente, la comparación directa de las medidas de los precursores semipolares entre ambas variedades tintas mediante PLS-DA indicó que GT presenta niveles de ácidos fenólicos y glicósidos de monoterpenos y norisoprenoides mayores que TT tanto en hollejo como en pulpa (Figura 4.29). Esto de nuevo muestra que GT presenta una composición de baya más parecida a las variantes blancas que TT, lo cual podría relacionarse con el menor contenido en antocianinas de GT y que el efecto de la pérdida de color sea menor en Garnacha y con que algunas de las respuestas se vean incluso invertidas.

Por tanto, los resultados de la comparación de precursores semipolares entre variantes blancas y tintas mostraron en las variantes blancas mayor contenido en ciertos ácidos fenólicos y glicósidos de monoterpenos y norisoprenoides respecto a las variantes tintas.

#### 4.3.1.3.3 Compuestos volátiles

En lo relativo a compuestos volátiles el análisis permitió cuantificar un total de 55 compuestos entre los que se encontraron mayoritariamente alcoholes, aldehídos y ácidos, norisoprenoides y monoterpenos (Tablas suplementarias S6-S9). Todos estos compuestos volátiles se cuantificaron mediante cromatografía de gases GC-MS tanto en hollejo como en pulpa en muestras de uvas recolectadas en el estadio de madurez de 2016. En el análisis de componentes principales realizado conjuntamente en hollejo y pulpa para todas las muestras de las variantes somáticas consideradas (TB, TT, GB y GT), la componente 1 permitió diferenciar claramente las muestras de hollejo y pulpa en base a su contenido en compuestos volátiles (Figura 4.30A). El componente 1 mostró también cierto efecto en la diferenciación del color de la baya en las muestras de hollejo, sobre todo en Tempranillo. Por otra parte, la componente 2 diferenció las muestras de hollejo de ambas variedades.



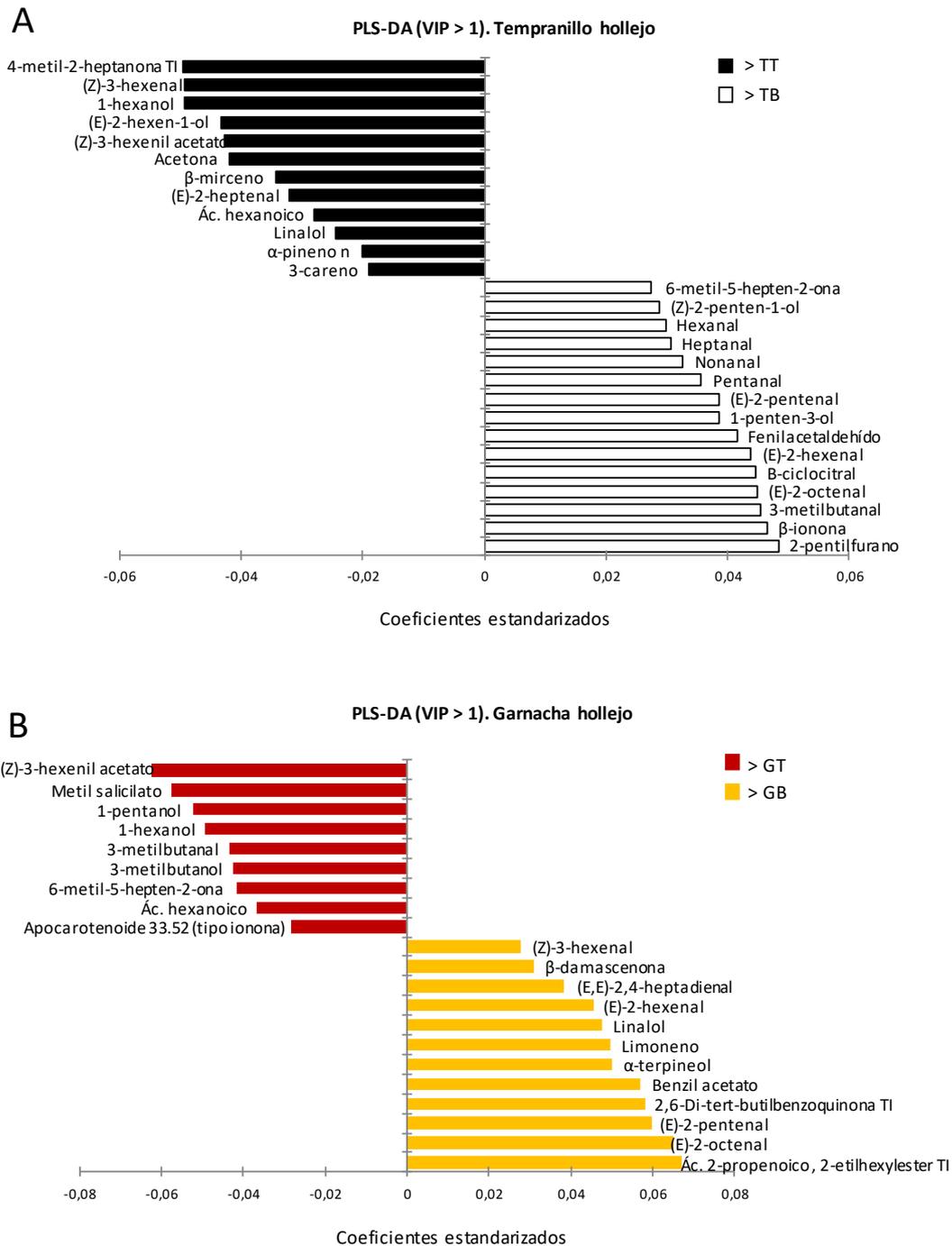
**Figura 4.30. Análisis de Componentes Principales y análisis PLS-DA para el efecto del color sobre la composición de compuestos volátiles.** Se representan el ACP (A) y el PLS-DA para el factor color (B) del conjunto de todas las muestras recolectadas en hollejo y pulpa de uvas maduras de 2016 en ambas variedades y variantes de color. La representación corresponde a la variación en los 55 compuestos volátiles. TT, Tempranillo Tinto; TB, Tempranillo Blanco; GT, Garnacha Tinta; GB, Garnacha Blanca; H, hollejo y P, pulpa; F1, F2, t1 y t2, variables generadas por los análisis.

El análisis PLS-DA considerando el factor color separó claramente las muestras blancas y las tintas (Figura 4.30B), y esta diferenciación fue mayor en el hollejo que en la pulpa en consonancia con los resultados del APC. Pese a que las muestras de las variantes blancas de Tempranillo y Garnacha aparecieron relativamente agrupadas, las muestras de GT mostraron cierta tendencia a aparecer en una posición intermedia entre las de TT y las de las variantes blancas, tanto en pulpa como en hollejo, de manera similar a lo observado para otro tipo de compuestos.

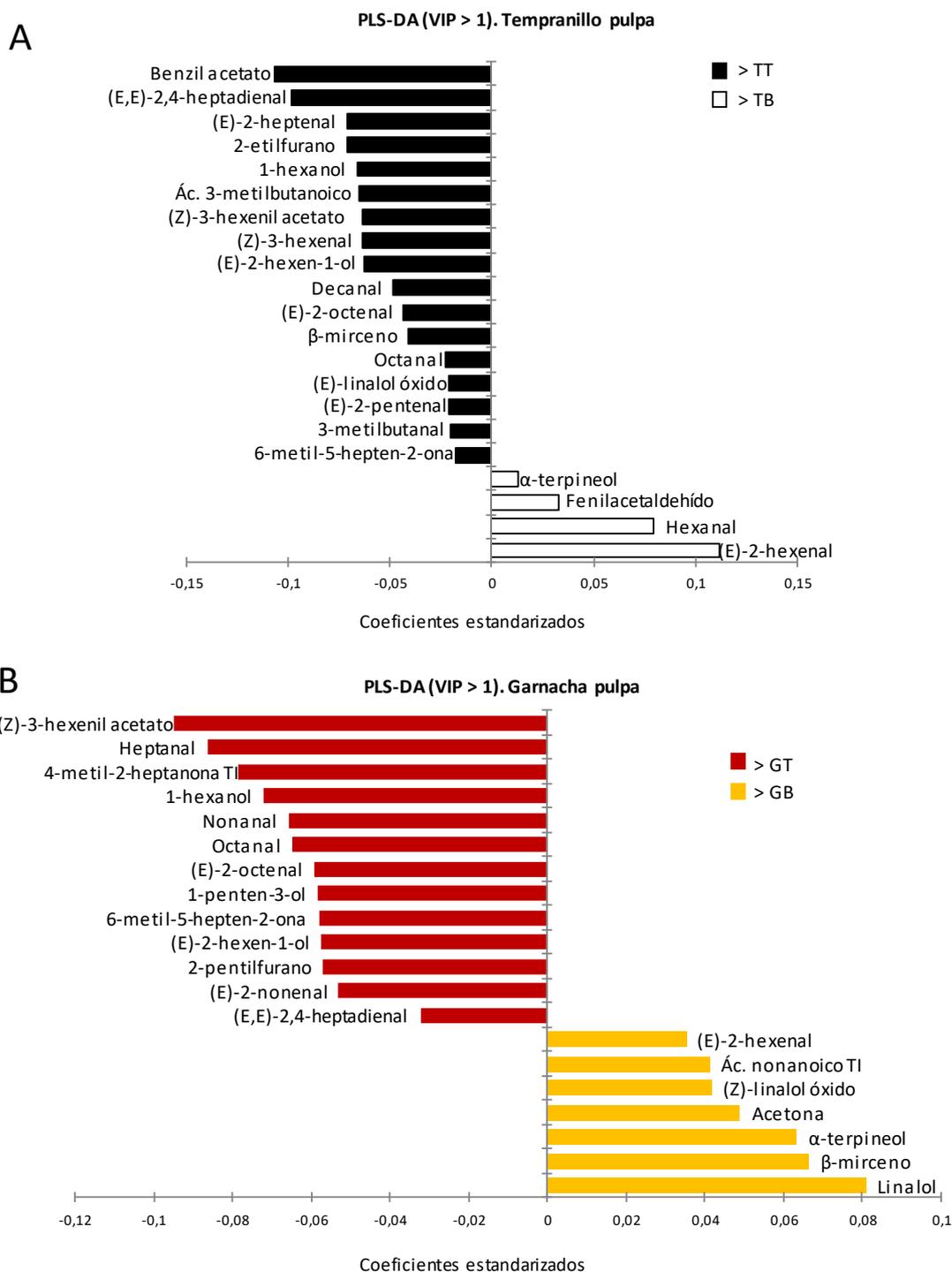
Con el objetivo de identificar los compuestos con mayor contribución a la separación de las variantes de color (VIP >1) se realizaron análisis PLS-DA adicionales específicamente sobre las muestras de cada tejido y variedad. En hollejo, en ambas variantes blancas se observó mayor acumulación de C-13 norisoprenoides ( $\beta$ -ionona en TB y  $\beta$ -damascenona en GB) y de ciertos compuestos derivados de ácidos grasos (específicamente el (E)-2-octenal, el (E)-2-hexenal y el (E)-2-pentenal en ambas variedades) (Figura 4.31). Por otro lado, las variantes blancas mostraron menor acumulación de otros compuestos derivados de ácidos grasos respecto a las variantes tintas (ácido hexanoico, 1-hexanol y (Z)-3-hexenil acetato en ambas variantes blancas). Sin embargo, el comportamiento observado respecto al efecto del color en la acumulación de monoterpenos fue distinto en cada variedad. En el caso del Tempranillo, la variante blanca no mostró mayor acumulación de ningún monoterpeno y sí una reducción en el contenido de cuatro moléculas de esta familia ( $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -pineno n, 3-careno y linalol) (Figura 4.31A). Todos ellos, excepto el linalol, se asocian a aromas que recuerdan a resinas de pino. En Garnacha se observó una tendencia distinta, ya que según el modelo del PLS-DA, la variante blanca mostró mayor acumulación de tres monoterpenos (linalol, limoneno y  $\alpha$ -terpineol), que en este caso se asocian a aromas florales (Figura 4.31B). En cuanto a volátiles derivados de aminoácidos, en concreto de la leucina, el PLS-DA indicó que TB presenta mayor acumulación que TT del aldehído 3-metilbutanal, mientras que, a diferencia de esto, GB presentó un menor contenido de 3-metilbutanal y 3-metilbutanol que GT.

En lo que respecta a la pulpa, al igual que en el hollejo, en la pulpa de ambas variantes blancas se observó mayor acumulación del derivado C6 (E)-2-hexenal respecto a las tintas (Figura 4.32). El monoterpeno  $\alpha$ -terpineol también se acumuló más tanto en TB (Figura 4.32A) como en GB (Figura 4.30B) respecto a TT y GT. En ambas variantes blancas se observó, de nuevo de modo similar al hollejo, menor acumulación de 1-hexanol y (Z)-3-hexenil acetato respecto sus variantes tintas, además de otros compuestos derivados de ácidos grasos. Al igual que ocurría en hollejo, el efecto del color sobre los monoterpenos fue distinto en cada variedad. En TB se acumuló menos  $\beta$ -mirceno y óxido de (E)-linalol y más  $\alpha$ -terpineol respecto a TT, mientras que en Garnacha todos los monoterpenos significativos en el PLS-DA para el efecto color (VIP>1)

mostraron mayor acumulación en GB que en GT e incluyeron óxido de linalol,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -miraceno y linalol.



**Figura 4.31. Compuestos volátiles que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en el hollejo.** Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un VIP >1 en los análisis PLS-DA para el factor color realizados sobre las muestras de hollejo de uvas maduras de 2016 de Tempranillo (A) y de Garnacha (B).



**Figura 4.32. Compuestos volátiles que contribuyen a la variación entre variantes blancas y tintas en la pulpa.** Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un VIP >1 en los análisis PLS-DA para el factor color realizados sobre las muestras de pulpa de uvas maduras de 2016 de Tempranillo (A) y Garnacha (B).

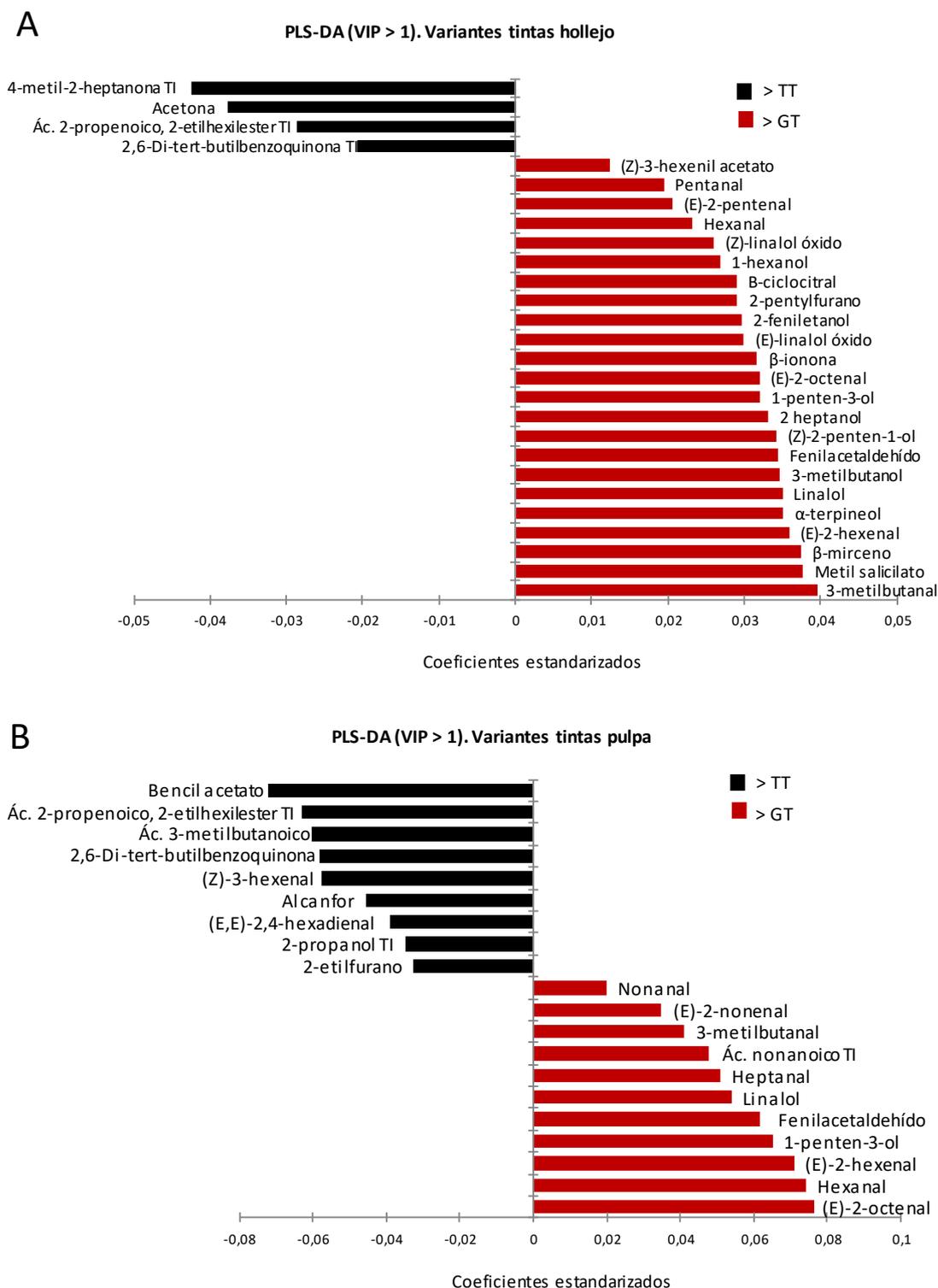
En lo relativo a la comparación de medias para el contenido de los compuestos volátiles, la mayor acumulación de (E)-2-hexenal y la menor acumulación de (Z)-3-hexenil acetato y 1-hexanol en las variantes blancas respecto a las tintas indicada por el PLS-DA en ambos tejidos de la baya, fueron significativas según un análisis T-test en el hollejo de Tempranillo, en ambos tejidos de Garnacha y en el hollejo de ambas variedades respectivamente (Tablas

suplementarias S6-S9). En el caso del (E)-2-octenal y del (E)-2-pentenal, con mayor contenido en hollejo en TB y GB respecto a TT y GT, las diferencias fueron significativas en ambas variedades, mientras que la mayor acumulación de  $\alpha$ -terpineol en la pulpa de TB y de GB no lo fue en ninguno de los dos casos (Tablas suplementarias S6-S9).

Para tratar de comprender mejor los efectos varietales del color, también se realizaron análisis PLS-DA comparando el contenido de compuestos volátiles entre las variedades tintas en cada tejido (Figura 4.33). De manera similar a lo que en ocurría en el caso de los precursores semipolares, los resultados indican que GT acumuló mayores contenidos que TT en un gran número de compuestos volátiles en el hollejo, entre ellos cinco monoterpenos (dos óxidos de linalol, linalol,  $\alpha$ -terpineol y  $\beta$ -mirceno), dos C-13 norisoprenoides ( $\beta$ -ciclocitral y  $\beta$ -ionona) y varios derivados de ácidos grasos entre otros, mientras que ningún volátil terpenoide presentó mayor acumulación en TT que en GT (Figura 4.33A). En pulpa se obtuvo un resultado similar, aunque con un menor número de compuestos terpénicos afectados (Figura 4.33B). En este caso, Garnacha también se asemejó a las variantes blancas excepto en la tendencia de los terpenos, que está invertida en TB respecto a GB.

En conjunto, los resultados indican que la pérdida de color incrementa en mayor medida los terpenos volátiles con notas florales y frutales en Garnacha, a pesar de que la variante tinta es aparentemente más aromática en ese sentido que la de Tempranillo. Además, la pérdida de color modifica el perfil de compuestos C6 derivados de ácidos grasos.

Globalmente, los resultados de los análisis de la composición de la baya mostraron unas tendencias generales que indican que las variantes blancas acumulan mayores niveles de aminoácidos precursores de fenilpropanoides y el carotenoide zeaxantina y menos flavonoles tri-hidroxilados, aminoácidos relacionados con la protección frente a estrés y compuestos apolares derivados de clorofilas. En cuanto a los efectos del color sobre los precursores y volátiles, éstos fueron más acusados en el hollejo que en la pulpa y en algunos casos las respuestas fueron dependientes del genotipo varietal. El efecto varietal, entre otros factores, podría asociarse a la diferencia en el contenido de antocianinas entre las variantes tintas, con mayor contenido en TT frente a GT. En general, los resultados mostraron un comportamiento intermedio de GT respecto a TT y las variantes blancas, siendo la composición de GT más similar que la de TT a la de las variantes blancas en general y a la de TB en particular. Mención aparte merece el caso de los monoterpenos y sus precursores, ya que la pérdida de color parece resultar en un incremento preferencial de conjugados glicosilados en Tempranillo y de formas volátiles en Garnacha, lo cual podría responder a diferencias en la estabilidad de los conjugados.



**Figura 4.33. Compuestos volátiles que contribuyen a la variación entre TT y GT.** Se representa el coeficiente estandarizado de los compuestos que tienen un VIP >1 en los análisis PLS-DA para el factor variedad realizados sobre las muestras madurez de 2016 de hollejo (A) y de pulpa (B).

#### 4.3.2 Análisis transcriptómico del efecto de la variación en el color de la baya

En vista de las diferencias observadas en la composición de las uvas entre las variantes blancas y tintas, y con el objetivo de conocer los posibles mecanismos implicados en su regulación, así

como de detectar otros posibles procesos asociados con el cambio de color, se llevó cabo un análisis transcriptómico. Para ello se analizaron tres réplicas de hollejo y pulpa por separado en cada variante mediante secuenciación RNA-seq. Se consideró que la composición de la uva al final de la maduración es el resultado del metabolismo en la misma a lo largo del proceso de maduración, por lo que se estudiaron tres estadios previos a la madurez en 2016 (PE, E y PM) (Tabla 4.9). Las muestras de E tenían una densidad entre 90-100 g/l, con un CCS medio de 14,5 °Brix y un pH medio de 3,1; y las de PM una densidad entre 120-130 g/l, con un CCS medio de 20,6 °Brix y un pH medio de 3,2. La presencia de uvas verdes de PE y de pulpa en el análisis transcriptómico permite evaluar efectos indirectos asociados al cambio de color ya que estas muestras no acumulan antocianinas en ninguna de las muestras estudiadas.

A partir del ARN extraído de las muestras se construyeron 72 librerías (tres repeticiones de hollejo y pulpa de TT, TB, GT y GB en tres estadios) usando Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Prep y se secuenciaron en Illumina HiSeq 2000 (Véase Material y Métodos punto 3.6.2). Alrededor del 60% de las lecturas obtenidas alinearon con el genoma de referencia PN40024 con calidad de mapeo (MAPQ) de 60 y se utilizaron para el subsiguiente conteo y normalización, previos a los análisis de variación en la expresión génica (Ver Material y Métodos punto 3.6.2).

A partir de los alineamientos de lecturas de secuencia en los transcritos anotados en el genoma de la vid (versión v1 de la anotación; Grimplet *et al.*, 2012) se llevaron a cabo dos tipos de análisis principales en las muestras: un análisis de reducción multidimensional (MDS) de la variación y un análisis de expresión génica diferencial entre las variantes de color de cada variedad en cada tejido.

#### 4.3.2.1 *Análisis MDS de la variación de la expresión génica en los datos RNA-seq*

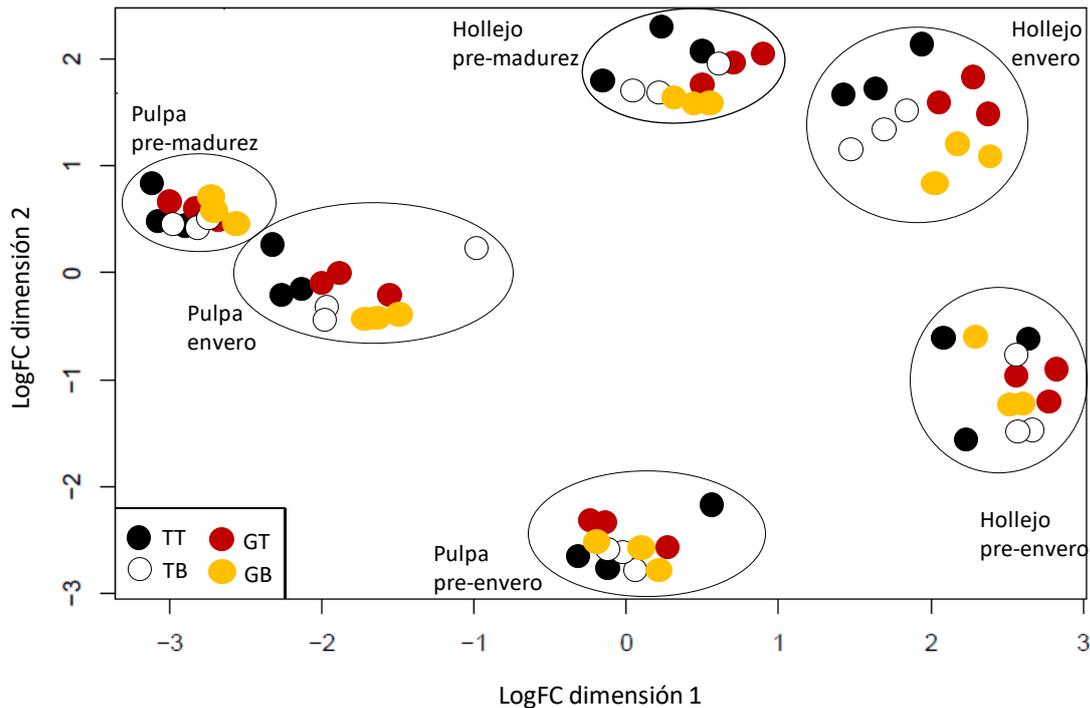
Como primera aproximación general a la variación en la expresión génica se realizó un escalado multidimensional (MDS) en el que se consideraron las dos primeras dimensiones. Se realizó a partir del conteo de lecturas normalizado FPKM (Fragments Per Kilobase per Million) de cada muestra con el conjunto de todas las muestras sobre los 500 genes con mayor variación como control previo al análisis diferencial (Tablas suplementarias S25-S28).

Este análisis muestra la agrupación de todas las réplicas biológicas que corresponden a un mismo estadio y tejido en cada genotipo, lo que implica que las muestras son consistentes (Figura 4.34). Los resultados del MDS indicaron también que los factores que determinan la primera dimensión de la variación son el tejido y en menor medida el estadio de maduración. La segunda dimensión distinguió sobre todo las muestras de PE de las demás y marcó cierto efecto del color de la baya, sobre todo en muestras de hollejo de E. En el hollejo de E también se observaron diferencias varietales que no fueron tan marcadas en la pulpa.

#### 4.3.2.2 *Identificación y caracterización de genes expresados diferencialmente entre variantes de color de baya*

Con el fin de identificar genes con expresión diferencial asociada a la variación en el color de la baya se compararon las series temporales de maduración entre estas variantes blancas y tintas en cada variedad (Tempranillo y Garnacha) y en cada tejido (hollejo y pulpa) mediante el algoritmo de maSigPro (Conesa *et al.*, 2017) (véase Material Métodos punto 3.6.2.2). En la selección se consideraron los umbrales de significación estadística FDR del 5% y  $R^2$  para series temporales  $>0,6$  en maSigPro. Además, se consideraron como genes expresados diferencialmente (DEG) aquellos que superasen un nivel de cambio entre variantes somáticas

blancas y tintas  $>1,75$  en al menos un estadio, en el que, además, al menos una de las variantes presentase un valor promedio de FPKM  $>1$  para filtrar genes con expresión demasiado baja (véase Material Métodos punto 3.6.2.2). De este modo se identificaron 1220, 1047, 529 y 398 DEG en las series de hollejo en Tempranillo, pulpa en Tempranillo, hollejo en Garnacha y pulpa en Garnacha, respectivamente (Tablas suplementarias S12-S15 y Figura 4.35). Estos resultados indican que la variación en el color está relacionada con un mayor número de genes diferenciales en Tempranillo que en Garnacha y que en ambas variedades el efecto es mayor en hollejo que en pulpa, aunque las diferencias son menores entre tejidos dentro de cada variedad que entre variedades.



**Figura 4.34. Análisis MDS de la variación de los datos RNA-seq.** Se representan todas las muestras analizadas en base al logaritmo de las distancias euclídeas (LogFC) de los 500 genes con mayor variación en las dos primeras dimensiones del análisis MDS. Las muestras analizadas fueron Tempranillo Tinto (TT), Tempranillo Blanco (TB); Garnacha Tinta (GT) y Garnacha Blanca (GB) en los estadios de pre-enero, enero y pre-madurez y en los tejidos de hollejo y pulpa.

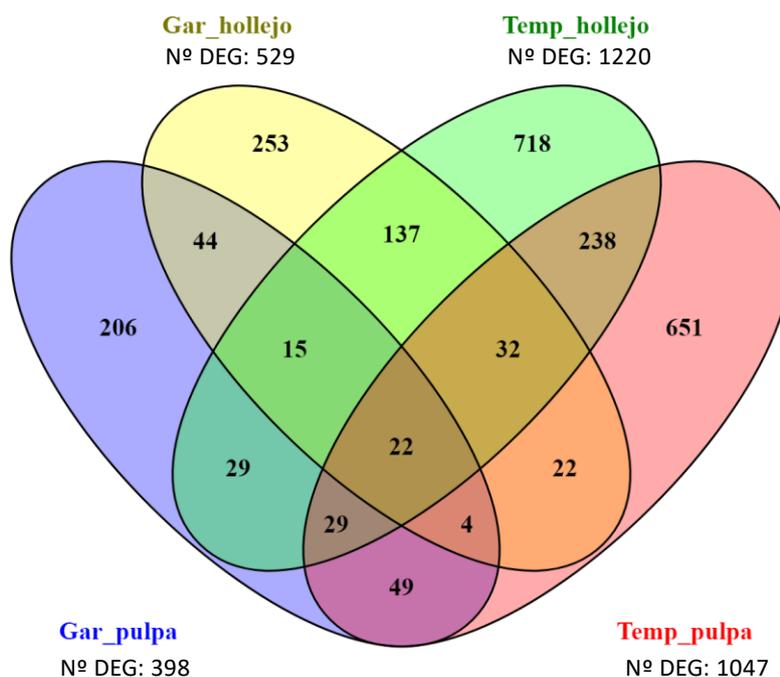
La comparación de los genes diferenciales identificados en cada variedad y tejido se realizó mediante un diagrama de Venn (Figura 4.35) (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Este diagrama muestra la existencia de 206 DEG comunes en el hollejo de ambas variedades y 104 en la pulpa. Por otra parte, 321 fueron DEG tanto en hollejo como en pulpa en Tempranillo y 85 lo fueron en Garnacha.

El número total de genes que se expresaron diferencialmente entre variantes blancas y tintas en ambos tejidos y en las dos variedades fue de 22 (Tabla 4.11 y Tabla suplementaria S16). Un análisis de enriquecimiento funcional mediante FatiGO mostró que en estos 22 genes comunes están sobrerrepresentadas las categorías funcionales del Fotosistema I de la fotosíntesis y de la biosíntesis de fenilpropanoides, con mayor y menor expresión en las muestras de las variantes blancas respectivamente (Tabla suplementaria S17). De hecho, entre los 22 DEG predominan genes relacionados con la biosíntesis de fenilpropanoides y acumulación de antocianinas, infra-

expresados en las variantes blancas, y genes relacionados con la fotosíntesis y respuesta a la radiación lumínica, sobre-expresados en las variantes blancas. En el diagrama de Venn también se detectó un componente específico de cada tejido que fue consistente en ambas variedades, con 137 DEGs específicos de hollejo (Tabla suplementaria S18) y 49 de pulpa (Tabla suplementaria S19). Pese a que no se encontró enriquecimiento significativo en ninguna categoría funcional particular, gran parte de los DEG específicos de hollejo comunes a ambas variedades pertenecen a las mismas categorías funcionales. Entre los infra-expresados en las variantes blancas se incluyen genes de síntesis de fenilpropanoides como los codificantes de flavonoide-5'3'-hidroxilasas (F5'3'H) implicadas en la trihidroxilación de los mismos (Castellarin *et al.*, 2006), transportadores de macromoléculas, factores de transcripción MYB y WRKY, genes de señalización de ácido abscísico y brasinosteroides, y genes relacionados con la respuesta a estrés biótico y abiótico. Entre los genes con mayor expresión en el hollejo de ambas variantes blancas se identificaron principalmente genes relacionados con la fotosíntesis y genes relacionados con la síntesis de terpenos. En cuanto a los DEGs específicos de pulpa comunes a ambas variedades, algunos de los sobre-expresados en las variantes blancas también se relacionan con respuestas a la luz y la fotosíntesis, pero muchos de ellos tienen funciones desconocidas y no se halló ningún gen relacionado con el metabolismo secundario.

**Tabla 4.11. DEG en hollejo y pulpa de Tempranillo y de Garnacha.**

Gen ID	Anotación funcional
VIT_00s0477g00030	Proteína de flujo de la familia MATE de respuesta en madurez
VIT_01s0010g03510	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa
VIT_02s0012g01570	Cinamoil-CoA reductasa
VIT_02s0033g00390	VvMYBA2
VIT_03s0017g00870	Transferasas
VIT_04s0023g03370	Flavonona- 3-hidroxilasa
VIT_05s0136g00260	Chalcona sintasa
VIT_06s0004g08150	Trans-cinamato 4-monooxigenasa
VIT_06s0080g00920	Subunidad O del fotosistema I (PSAO)
VIT_08s0007g02360	Proteína1 inductora de harpin -tipo 9
VIT_08s0007g03560	Proteína de membrana antocianina (Anm1)
VIT_09s0002g05990	6-4 fotoliasa
VIT_10s0003g04350	Subunidad X del fotosistema I (PSAK)
VIT_11s0037g00290	Proteína de unión a plastocianina
VIT_12s0059g00270	NADPH- protoclorofilida oxidoreductasa
VIT_13s0019g03890	Proteína de unión a calmodulina
VIT_13s0019g04460	Fenilalanina amonio liasa (PAL)
VIT_14s0060g01830	Proteína desconocida
VIT_16s0050g00910	Proteína de flujo de la familia MATE
VIT_18s0001g09400	Citocromo b5 DIF-F
VIT_18s0072g00160	Peroxidasa 12
VIT_19s0014g03660	LHCII tipo III, precursor de cloroplasto



**Figura 4.35.** Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados entre variantes blancas y tintas a lo largo de la maduración para hollejo y pulpa en Tempranillo (Temp) y Garnacha (Gar).

#### 4.3.2.3 Análisis de los perfiles de expresión y caracterización funcional de los genes expresados diferencialmente entre variantes somáticas de color de baya

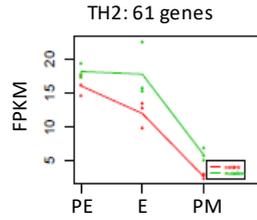
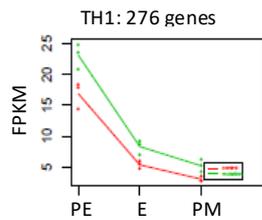
Con el fin de caracterizar las diferencias de expresión entre las variantes de color se realizó un análisis de agrupamiento de los DEG de cada una de las cuatro series descritas en el apartado anterior. En cada una de las cuatro comparaciones (series de hollejo en Tempranillo, pulpa en Tempranillo, hollejo en Garnacha y pulpa en Garnacha) se produjeron nueve grupos (o perfiles) de DEGs con expresión similar mediante la aplicación maSigPro (Figura suplementaria S1). De los nueve grupos identificados en cada serie se seleccionaron aquellos con diferencias claras entre las respectivas variantes somáticas de color para el hollejo de Tempranillo (Figura 4.36), la pulpa de Tempranillo (Figura 4.37), el hollejo de Garnacha (Figura 4.38) y la pulpa de Garnacha (Figura 4.39). Para cada grupo de DEG con el mismo perfil se analizó la presencia de categorías funcionales sobre-representadas, que se indican en las correspondientes Figuras si las hubiere (Tablas suplementarias S20-S23).

Los perfiles de expresión identificados en el hollejo de Tempranillo incluyeron cuatro grupos de genes con mayor expresión en TB que suman un total de 563 genes (Figura 4.36). Entre ellos destacó por su mayor número de genes (276) el grupo TH1 que mostró un perfil de represión a lo largo de la maduración en TB y TT, pero mayor expresión en TB en todos los estadios a pesar de que en PE el hollejo de ambas variantes de color es verde. El grupo TH2, al igual que TH1, también siguió un perfil de represión de la expresión a lo largo de la maduración en ambas variedades, pero menos pronunciada en TB en E. En ambos perfiles de expresión están sobre-representados genes que corresponden a categorías funcionales relacionadas con la fotosíntesis, que son características de uvas inmaduras de PE. En relación a ello, el grupo TH1 incluyó el gen del factor de regulación transcripcional dependiente de luz *VviHY5-1* (*VIT\_04s0008g05210*) (Brown *et al.*, 2005) y el TH2 el que codifica la violaxantina de-epoxidasa

(*VviVDE*) (*VIT\_04s0043g01010*) implicada en la protección del estrés foto oxidativo en los cloroplastos (Demming-Adams y Adams 1992; Horton y Ruban 2004). Los perfiles TH3 y TH4 agruparon genes con mayor inducción en TB a lo largo de la maduración. En ambos casos, el E fue el momento a partir del cual se marcaron las diferencias, en relación al comienzo del cambio de color entre ambas variantes por la acumulación de las antocianinas en las uvas tintas. En el perfil TH3, que se caracteriza por una inducción transitoria en E mayor en TB, están sobre-representados genes implicados en la biosíntesis de flavonoides. Esto indica que, pese a la ausencia de antocianinas, existen ramas de la ruta de biosíntesis de flavonoides que se activan en mayor medida en el hollejo de la variante blanca, posiblemente relacionados con la mayor acumulación identificada para ciertos flavonoles. En el TH4 se agruparon genes cuya expresión fue similar en ambas variantes hasta el estadio de E, a partir del cual se expresaron con mayor intensidad en las uvas blancas.

Un total de 657 genes se agruparon en cinco perfiles de expresión que indican menor expresión en el hollejo de TB respecto al de TT (Figura 4.36). El grupo TH5 (110 genes) fue el único que mostró un claro perfil de represión a lo largo de la maduración desde PE tanto en TB como en TT. Agrupó genes que mostraron expresión diferencial en todos los estadios, al igual que los genes incluidos en el TH1, a pesar de no existir diferencias en el color de la baya hasta el E. Por su parte, TH6 incluyó 147 genes que se indujeron específicamente en TT a partir de E, mientras que en TB su expresión fue baja y constante a lo largo del tiempo. En este perfil están sobre-representados genes implicados en la biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides en relación con la acumulación de antocianinas, y también en factores de transcripción de la familia BES1 que median respuestas de la ruta hormonal de brasinosteroides. Dentro de este grupo se encontraron también el factor de transcripción *VviMYBA1* (*VIT\_02s0033g00410*) y uno de sus genes diana que codifica la UDP-glucosa:flavonoid 3-O-glucosiltransferasa (UFGT, *VIT\_16s0039g02230*), necesarios para la síntesis de antocianinas. En este sentido, se sabe que la síntesis de antocianinas en el hollejo de las uvas de variedades tintas se inicia en el envero (Kobayashi *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2007). En el mismo perfil se identificaron genes codificantes de flavonoide 3',5'-hidroxilasas. Tanto el perfil TH7 (113 genes) como el TH8 (223 genes) incluyeron genes que mostraron incremento de la expresión en el estadio E, transitoria en TH7 y mantenida en PM en TH8. En ambos casos las diferencias de expresión entre uvas blancas y tintas comenzaron en E, manteniéndose hasta PM en el segundo caso. TH7 incluyó al factor de transcripción *VviMYBPA1* (*VIT\_15s0046g00170*) que activa la ruta de los flavonoides (Bogs *et al.*, 2007). TH8 destacó por ser el perfil de infra-expresión en el hollejo de TB que agrupó un mayor número de genes (223). En este perfil están sobrerrepresentadas diversas categorías funcionales, destacando varias relacionadas con respuestas a patógenos y también con la señalización de estrés biótico y abiótico como son la señalización por etileno, los factores de transcripción DREB y WRKY y las fosfatasa PP2C. TH8 incluyó también el factor de transcripción *VviMYBA2* (*VIT\_02s0033g00390*), requerido junto al *VviMYBA1* para la activación de la síntesis de antocianinas en el hollejo y cuya expresión, al igual que la de *VviMYBA1*, se inicia en E (Kobayashi *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2007). Finalmente, el grupo TH9 (64 genes) mostró un perfil de inducción a lo largo de la maduración que fue más pronunciada desde el estadio E en TT. Entre los genes que forman parte de este grupo no se detectó sobrerrepresentación de ninguna categoría funcional.

**Grupos de genes sobre-expresados en el hollejo de Tempranillo Blanco**

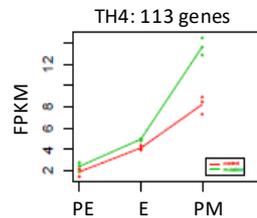
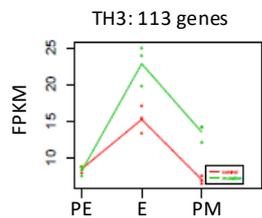


- BIOSÍNTESIS DE CLOROFILA
- PROTEÍNAS DE ANTENA
- CICLO DE CALVIN
- FOSFORILACIÓN DE CADENAS FOTOSINTÉTICAS
- FOTOSISTEMA I
- FOTOSISTEMA II
- RUTA DE MARCAJE HACIA TILACOIDES

- FOTOSISTEMA II

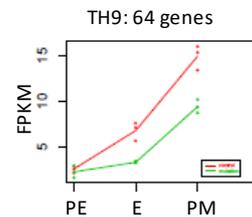
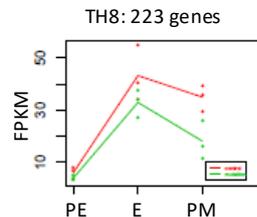
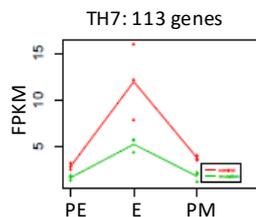
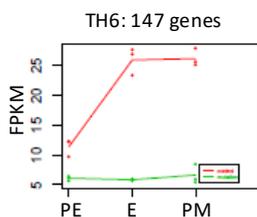
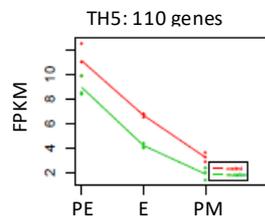
Terpenoides: *Violaxantina de-epoxidasa*

Radiación: *HY5-1*



- BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES

**Grupos de genes infra-expresados en el hollejo de Tempranillo Blanco**



- BIOSÍNTESIS DE FENILPROPANOIDEOS
- BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES
- TF DE LA FAMILIA BES1

TF: *VvMYBPA1*

TF: *VviMYBA1*

Flavonoides: *UFGT, F3'5'H (8)*

- MODIFICACIÓN DE XILOGLICANO
- CATABOLISMO DE GLICEROLÍPIDOS
- PROTEÍNAS R DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO
- VÍA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR ETILENO
- SEÑALIZACIÓN Y SENSORES DE CALCIO
- FOSFATASA. PP2C
- TF: WRKY, BES1, DREB

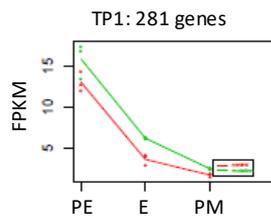
TF: *VviMYBA2*

**Figura 4.36. Agrupamiento según su perfil de expresión de los genes expresados diferencialmente entre Tempranillo Blanco y Tempranillo Tinto en el hollejo a lo largo de la maduración.** En el caso de grupos con categorías funcionales sobrerrepresentadas, bajo el perfil correspondiente, en letras mayúsculas, se muestra un resumen de las mismas (las categorías más específicas y no redundantes del total, mostrado en la Tabla Suplementaria S20). Para cada grupo, en letras minúsculas cursivas se indica la presencia de genes destacados en relación a la síntesis de flavonoides y terpenoides y de respuesta a luz. Para isogenes codificantes de F5'3'H se representa entre paréntesis el número de isogenes presentes en el grupo. PE, pre-envero; E, envero; PM, pre-madurez. TF, factor de transcripción. Las líneas verde y roja representan, respectivamente, los niveles promedio de expresión normalizada (FPKM) en TB y TT.

En el caso de la pulpa de Tempranillo, se detectaron cuatro perfiles con mayor expresión en TB, agrupando un total de 509 genes (Figura 4.37). Más de la mitad de estos genes se encuentran en el perfil TP1 (281 genes) que agrupó genes que se reprimieron a lo largo del proceso de maduración. Estos genes están sobrerrepresentados en categorías funcionales relacionadas con la fotosíntesis y con la biosíntesis de carotenoides, genes con mayor expresión en uva verde antes del envero y en respuesta a la incidencia de luz (Lijavetzky *et al.*, 2012 y Ma *et al.*, 2014). Concretamente, en este perfil se identifica también el gen que codifica la violaxantina de-epoxidasa que cataliza la reacción que deriva en la producción de zeaxantina. Este gen también mostró mayor expresión en TB que en TT en el hollejo (Figura 4.36). En los demás perfiles las diferencias entre uvas blancas y tintas se observaron a partir del envero. El TP2 mostró un perfil de inducción transitoria en E específica en TB, mientras que el perfil TP3 agrupó genes con inducción en PM en TB y represión transitoria en E en TT. Finalmente, TP4 agrupó genes que se indujeron en mayor medida en TB, a lo largo de la maduración. En paralelo a lo detectado en el hollejo de TB, y en relación al cambio en la opacidad de las uvas ligado al cambio de color entre TB y TT a partir del envero, tanto en TP2 como en TP4 se detectaron genes que codifican factores de transcripción relacionados con la respuesta a luz, *HY5-2 (VIT\_05s0020g01090)* y *HY5-1* respectivamente (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2014).

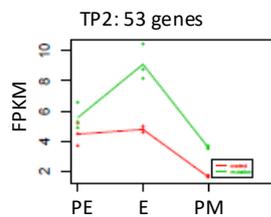
Los 339 genes con menor expresión en la pulpa de TB se agruparon en tres perfiles (Figura 4.37). Entre ellos, TP5 (52 genes) mostró un perfil de represión transitoria en E más acusada en TB, opuesto al perfil de expresión transitoria en E que caracteriza al TP6 (105 genes). Ambos grupos engloban genes que se expresan diferencialmente a lo largo de toda la maduración, incluso en PE, momento en el que todavía no hay distinción de color entre ambas variantes. Por su parte TP7 (182 genes) agrupó el mayor número de genes que mostraron un perfil de inducción a lo largo de la maduración. El cambio de expresión entre ambas variantes de color para estos genes tuvo lugar, de nuevo, a partir de envero, coincidiendo con el cambio de color de la baya. Los genes agrupados en TP7 están sobrerrepresentados en las categorías funcionales relacionadas con respuestas a estrés abiótico y respuestas a herida.

### Grupos de genes sobre-expresados en la pulpa de Tempranillo Blanco

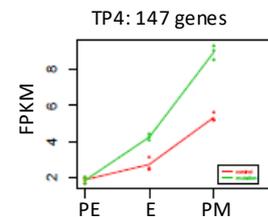
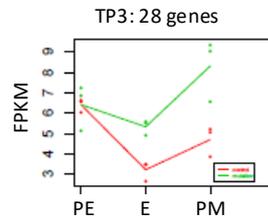


- BIOSÍNTESIS DE CLOROFILA
- TRANSPORTE DE ELECTRONES
- PROTEÍNAS DE ANTENA
- CICLO DE CALVIN
- FOSFORILACIÓN DE CADENAS FOTOSINTÉTICAS
- FOTOSISTEMA I
- FOTOSISTEMA II
- RUTA DE MARCAJE HACIA TILACOIDES
- BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES
- TRANSPORTE DE OLIGOPÉPTIDOS

Carotenoides: *Violaxantina depoxidasa*

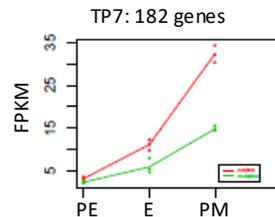
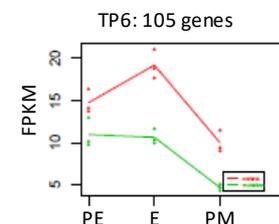
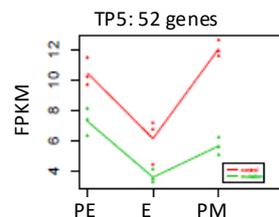


Radiación: *HY5-2*



Radiación: *HY5-1*

### Grupos de genes infra-expresados en la pulpa de Tempranillo Blanco



• RESPUESTA A ESTRÉS ABIÓTICO. RESPUESTA A HERIDA.

**Figura 4.37. Agrupamiento según su perfil de expresión de los genes expresados diferencialmente entre Tempranillo Blanco y Tempranillo Tinto en la pulpa a lo largo de la maduración.** En el caso de grupos con categorías funcionales sobrerrepresentadas, bajo el perfil correspondiente, en letras mayúsculas, se muestra un resumen de las mismas (las categorías más específicas y no redundantes del total, mostrado en la Tabla Suplementaria S21). Para cada

grupo, en letras minúsculas cursivas se indica la presencia de genes destacados en relación a la síntesis de flavonoides y terpenoides y de respuesta a luz. PE, pre-envero; E, envero; PM, pre-madurez. TF, factor de transcripción. Las líneas verde y roja representan, respectivamente, los niveles promedio de expresión normalizada (FPKM) en TB y TT.

En resumen, se observa que las diferencias de expresión entre TT y TB ocurren sobre todo a partir del envero, momento en el que se produce la diferenciación en el color de la baya entre ambas variantes, y que son mayores en el hollejo, tejido que acumula las antocianinas. Tanto en hollejo como en pulpa se observaron perfiles de expresión a lo largo de la maduración con mayor expresión en TB y que incluyeron genes relacionados con la fotosíntesis, con respuesta a luz (como los genes *HY5*) y la protección del estrés foto-oxidativo en los cloroplastos (*VvIVDE*). De igual manera, se detectaron perfiles de genes con menor expresión en TB frente a TT, que en el hollejo estuvieron sobrerrepresentados principalmente en genes relacionados con la síntesis de fenilpropanoides y con protección frente a estrés biótico y abiótico, mientras que los infraexpresados en la pulpa mostraron sobrerrepresentación de genes relacionados con la respuesta a estrés abiótico en forma de herida.

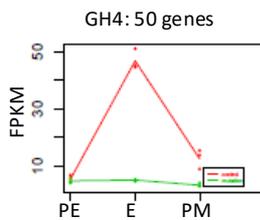
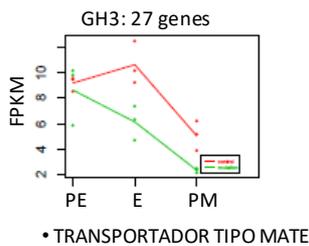
En el hollejo de Garnacha solamente se identificaron dos grupos de DEG que implicaron mayor expresión en GB que en GT (63), GH1 (46 genes) y GH2 (17 genes), ambos con perfil de inducción. GH1 englobó genes que se indujeron de manera transitoria en E en GB y no en GT, mientras que GH2 englobó genes con perfil de sobre-expresión en ambas variedades hasta E, y después de este estadio solo lo hicieron en GB (Figura 4.38). Al igual que en el hollejo de TB, estos perfiles incluyeron genes de respuesta a la luz como el gen que codifica la 6-4 fotoliasa (*VIT\_09s0002g05990*) en GH2. Sin embargo, no se identificó ninguna categoría funcional sobrerrepresentada en los mismos.

Los genes infra-expresados en el hollejo de GB respecto al de GT (277 genes) se agruparon en cinco perfiles (Figura 4.38). En todos los casos, las diferencias en la expresión entre GB y GT se observaron a partir del estadio E, al igual que ocurría en casos anteriores. GH3 (27 genes) es el único grupo con perfil de represión, más temprana en GB. Entre los genes del grupo están sobrerrepresentados los que codifican transportadores tipo multi-resistencia antimicrobiana (MATE). GH4 (50 genes) destacó por agrupar genes con una fuerte inducción transitoria en GT en E y con expresión muy baja sin cambios en GB, con gran similitud al grupo TH6 identificado en el hollejo de Tempranillo (Figura 4.36). Precisamente en este perfil en Garnacha también están sobrerrepresentados genes implicados en la síntesis de fenilpropanoides y flavonoides, relacionados con la capacidad de producir antocianinas y precursores. Entre ellos se encontraron seis isogenes codificantes de la flavonoid 3',5'-hidroxilasa. En el perfil GH4 también están sobrerrepresentados genes que codifican transportadores tipo multi-resistencia antimicrobiana (MATE). GH5, GH6 y GH7 mostraron perfiles de inducción en ambas variantes. GH5 (76 genes) corresponde a genes que se inducen a lo largo de la maduración, desde PE en GT y desde E en GB. En GH6 (44 genes) la inducción fue mantenida y mayor en GT hasta E para luego reducirse hasta la maduración. Este perfil agrupó genes que están sobrerrepresentados en categorías funcionales relacionadas con la interacción planta-patógeno. Además, este perfil incluyó también el factor de regulación transcripcional *VviMYBA2*. Por último, el perfil GH7 se caracterizó por una inducción sostenida hasta el estadio de PM en GT, y hasta E en GB. En este perfil están sobrerrepresentados genes relacionados con el transporte de calcio.

### Grupos de genes sobre-expresados en el hollejo de Garnacha Blanca

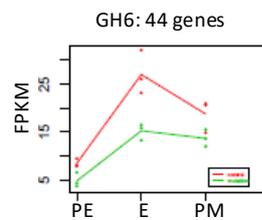
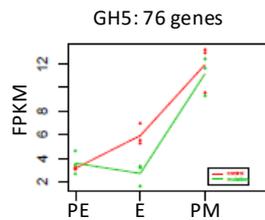


### Grupos de genes infra-expresados en el hollejo de Garnacha Blanca



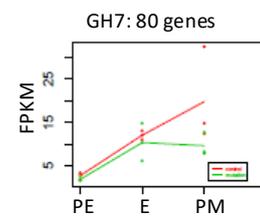
- BIOSÍNTESIS DE FENILPROPANOIDES
- BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES
- TRANSPORTADOR DE PIROFOSFATO DE TIAMINA
- TRANSPORTADOR TIPO MATE

*Flavonoides: F3'5'H (6)*



- INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

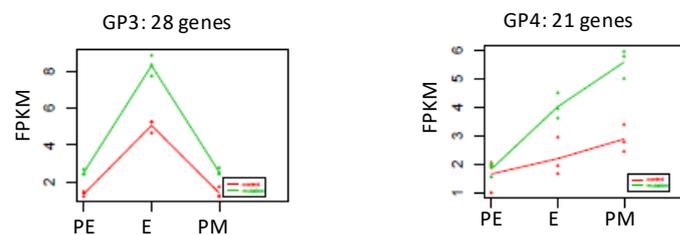
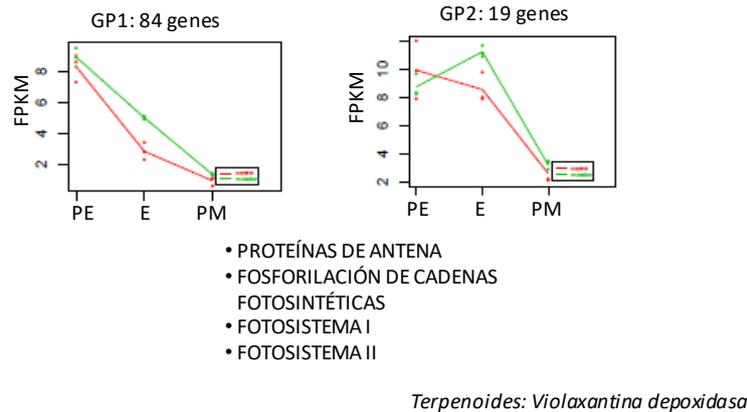
*TF: VviMYBA2*



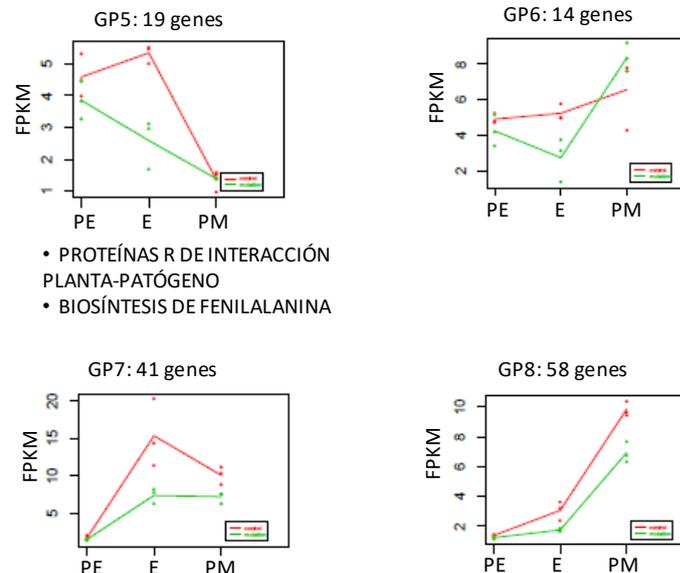
- CA<sup>2+</sup> ATPASA

**Figura 4.38. Agrupamiento según su perfil de expresión de los genes expresados diferencialmente entre Garnacha Tinta y Garnacha Blanca en el hollejo a lo largo de la maduración.** En el caso de grupos con categorías funcionales sobrerrepresentadas, bajo el perfil correspondiente en, letras mayúsculas, se muestra un resumen de las mismas (las categorías más específicas y no redundantes del total, mostrado en la Tabla Suplementaria S22). Para cada grupo, en letras minúsculas cursivas se indica la presencia de genes destacados en relación a la síntesis de flavonoides y terpenoides y de respuesta a luz. Para isogenes codificantes de F5'3'H se representa entre paréntesis el número de isogenes presentes en el grupo. PE, pre-enero; E, enero; PM, pre-madurez. TF, factor de transcripción. Las líneas verde y roja representan, respectivamente, los niveles promedio de expresión normalizada (FPKM) en GB y GT.

### Grupos de genes sobre-expresados en la pulpa de Garnacha Blanca



### Grupos de genes infra-expresados en la pulpa de Garnacha Blanca



**Figura 4.39. Agrupamiento según su perfil de expresión de los genes expresados diferencialmente entre Garnacha Tinta y Garnacha Blanca en la pulpa a lo largo de la maduración.** En el caso de grupos con categorías funcionales sobrerrepresentadas, bajo el perfil correspondiente, en letras mayúsculas, se muestra un resumen de las mismas (las categorías más específicas y no redundantes del total, mostrado en la Tabla Suplementaria S23). Para cada grupo, en letras minúsculas cursivas se indica la presencia de genes destacados en relación a la síntesis de flavonoides y terpenoides y de respuesta a luz. PE, pre-envero; E, envero; PM, pre-madurez. TF, factor de transcripción. Las líneas verde y roja representan, respectivamente, los niveles promedio de expresión normalizada (FPKM) en GB y GT.

En el caso de la pulpa en Garnacha se detectaron 152 genes con mayor expresión en GB que en GT, que se estructuraron en cuatro perfiles de expresión (Figura 4.39). Los grupos GP1 (84 genes) y GP2 (19 genes) se consideraron de forma conjunta en el análisis funcional, ya que ambos implican un perfil de represión, más tardía en GB que en GT. Al igual que en la pulpa de TB, estos perfiles corresponden a genes sobrerrepresentados en categorías funcionales relacionadas con la fotosíntesis. GP2, asemejando al grupo TP1 de Tempranillo, incluye el gen de la violaxantina de-epoxidasa. Los perfiles GP3 (28 genes) y GP4 (21 genes) mostraron perfiles de inducción, en ambos casos con mayor intensidad en GB que en GT, pero no mostraron sobre-representación en ninguna categoría funcional.

Un total de 132 genes agrupados en cuatro perfiles (GP5-GP8) mostraron menor expresión en la pulpa de GB respecto a GT (Figura 4.39). En todos los casos se observaron diferencias entre GT y GB en E. El GP5 (19 genes) mostró un perfil de represión en GB a lo largo de la maduración, mientras que en GT se produjo una inducción transitoria leve en E. En este perfil están sobrerrepresentados genes de categorías funcionales relacionadas con la biosíntesis de fenilalanina y con proteínas R de interacción planta-patógeno, asemejándose al grupo GH6 en el hollejo de Garnacha (Figura 4.38). El GP6 (14 genes) mostró un perfil de represión transitoria en E específica en GB. En el GP7 (41 genes) se dio una inducción transitoria en E, menos acusada en GB. Por último, el GP8 fue el perfil que agrupó mayor número de genes (58), los cuales se indujeron al avanzar la maduración, más intensamente en GT, pero no se identificó enriquecimiento para ninguna categoría funcional en el mismo.

De manera general, el comportamiento de los genes en Garnacha fue similar al observado en Tempranillo en lo que respecta al cambio de color, mostrando diferencias entre variantes tintas y blancas principalmente a partir del envero. Se observó mayor expresión en las variantes blancas de genes característicos de uvas verdes como los relacionados con la fotosíntesis. Esto ocurrió tanto en hollejo como en pulpa, lo que indica que deben ser efectos indirectos de la ausencia de antocianinas. Por otro lado, en el hollejo de las variedades tintas se inducen genes relacionados con la biosíntesis de fenilpropanoides y de flavonoides en relación con la síntesis de antocianinas, que no se encuentran en las variantes blancas. En este sentido, tanto en Tempranillo (TH6) como en Garnacha (GH4), hubo un perfil de expresión que agrupó a genes relacionados con la síntesis de flavonoides, que en caso de Tempranillo incluyó al *VviMYBA1*. En las variantes tintas también se observó mayor expresión de rutas relacionadas con la activación de defensas frente a patógenos. En concreto, la menor expresión en GB de genes de respuesta a patógenos y del factor *VviMYBA2* en los perfiles GH6 y GH7 se asemeja a los patrones identificados en el grupo TH8 del hollejo de Tempranillo, lo que indica que pueden ser efectos asociados a la variación en el color de la baya. Además, el número de genes de los perfiles relacionados con estas diferencias fue mayor en Tempranillo que en Garnacha, en línea con los efectos observados a nivel de composición de baya.

#### 4.3.2.4 Niveles de expresión de los genes que se encuentran en hemicirosis en las variantes de uva blanca

Las variantes de uva blanca estudiadas en el análisis transcriptómico comparten la característica de que su pérdida de color de baya está asociada a variación estructural que deja regiones monosómicas en el genoma. Esto afecta a la región del cromosoma 2 que alberga a los genes *VviMYBA* responsables de la acumulación de antocianinas durante la maduración del hollejo (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017; Figura 4.8). Sin embargo, la extensión de las regiones

monosómicas es distinta en ambas variantes blancas, brindando la oportunidad de evaluar el efecto de la reducción de dosis génica sobre los niveles de expresión.

Los segmentos hemicigóticos en TB (en el cromosoma 2 en los fragmentos correspondientes a las posiciones 13 – 13,5 Mb; 13,7 - 17,1 Mb y 17,4 – 18,2 Mb y en el cromosoma 5 a los segmentos 13,56 - 14,23 Mb; 17,26 - 18,39 Mb y 20,95 - 21,90 Mb) incluyen un total de 313 genes (165 en el cromosoma 2 y 148 en el cromosoma 5). Gran parte de estos genes se detectaron como DEG en el análisis transcriptómico. En el hollejo de Tempranillo detectó expresión en 85 genes hemicigóticos del cromosoma 2 de TB, de los cuales 57 fueron DEG en las comparaciones de TB frente a TT; en pulpa, de los 87 genes expresados, 64 fueron DEG (Tablas suplementarias S12, S13, S25 y S27). En relación a los genes hemicigóticos del cromosoma 5, se expresaron en el hollejo 63 genes, siendo 39 de ellos DEG en dichas comparaciones; en la pulpa, de los 62 genes en hemicigosis expresados, 41 fueron DEG (Tablas suplementarias S12, S13, S25 y S27).

En el caso de Garnacha, según los resultados de su re-secuenciación descritos en el apartado 4.2, la accesión de GB estudiada a nivel transcriptómico presenta un segmento de aproximadamente 1,4 Mb en estado de hemicigosis que se sitúa entre las posiciones 14,1 Mb y 15,5 Mb del cromosoma 2 y contiene 35 genes anotados (Figura 4.8; Tablas suplementarias S26 y S28). De ellos, tanto en hollejo como en pulpa se expresaron diez, siendo tres de ellos DEG en el caso del hollejo y dos en el de la pulpa en las comparaciones de GB frente a GT (Tablas suplementarias S14, S15, S26 y S28).

Tanto en Tempranillo como en Garnacha, todos los DEG ubicados en las regiones en hemicigosis se hallaban infra-expresados en las correspondientes variantes blancas respecto a las tintas e incluyeron a los genes *VviMYBA1* y *VviMYBA2* en el hollejo, perteneciendo el resto de genes a diferentes categorías funcionales, sin ninguna sobre-representada ni en hollejo ni en pulpa. Además, los niveles de expresión de estos DEG en las variantes blancas fueron en torno a la mitad de los detectados en las variantes tintas correspondientes. Estos resultados sugieren que, en muchos casos, los niveles de expresión de un gen están directamente relacionados con el número de copias homólogas presentes en la célula.

#### 4.3.3 Relación entre los cambios del transcriptoma y de la composición de la baya resultantes de la variación para el color

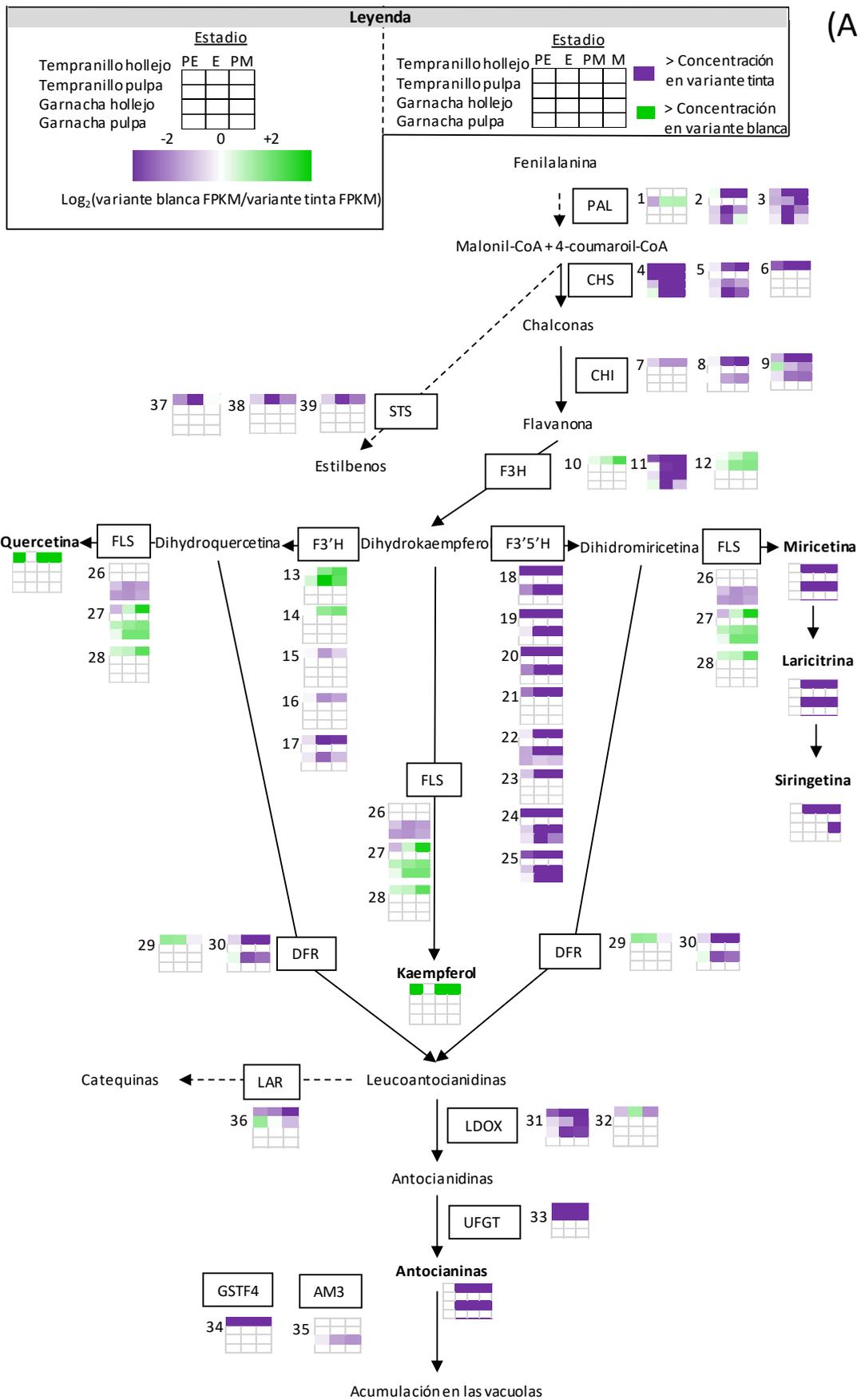
Como se ha descrito en el apartado anterior, uno de los objetivos del análisis transcriptómico fue tratar de conocer el origen de las diferencias observadas en la composición de las uvas entre variantes blancas y tintas. Con ese fin, se construyeron representaciones de rutas del metabolismo secundario para las que se identificaron diferencias significativas entre las variantes somáticas de color de baya en niveles de acumulación de metabolitos y de expresión de genes implicados. En dichas rutas se representan los genes diferenciales y su expresión relativa entre variantes somáticas para cada variedad, tejido y estadio estudiado, así como la mayor acumulación significativa en variantes blancas o tintas de metabolitos según los análisis T-test ( $P \leq 0,05$ ) o PLS-DA para el factor color (VIP >1) realizados sobre las muestras específicas de cada variedad en cada tejido.

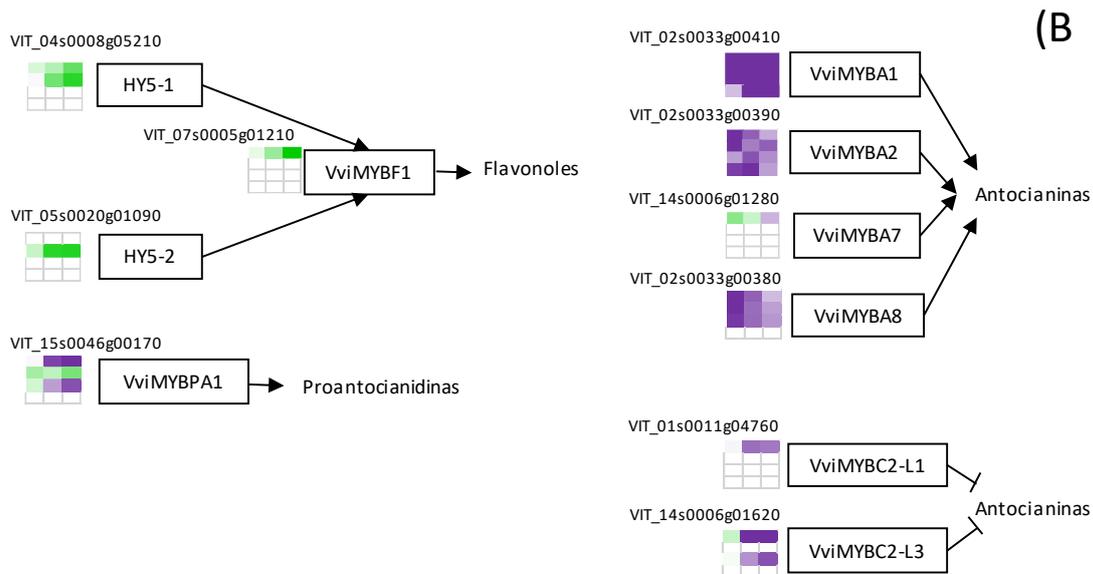
#### 4.3.3.1 Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de flavonoides y factores de transcripción relacionados

En la ruta de biosíntesis de flavonoides se identificaron DEG para un gran número de reacciones y en la mayoría de casos con perfiles que implican menor expresión en las variantes blancas (Figura 4.40A). De igual manera se identificaron también cambios de expresión en factores de transcripción *VviMYB* relacionados con la regulación de la ruta (Figura 4.40B). En conjunto, se detectó un mayor número de DEG en Tempranillo que en Garnacha (48 de los 49 DEG mostraron expresión diferencial en el hollejo y/o pulpa de Tempranillo y 24 en Garnacha). La mayoría de DEG (48) mostró expresión diferencial en el hollejo, mientras que en pulpa este número fue mucho menor (22).

En relación con la ausencia de antocianinas en el hollejo de las variantes blancas, el perfil de expresión de los genes *VviMYBA1* (*VIT\_02s0033g00410*) y *VviMYBA2* (*VIT\_02s0033g00390*) (Figura 4.40A) mostró represión durante toda la maduración en el hollejo de ambas variantes blancas, como cabía esperar de la ausencia de alelos funcionales en las variantes somáticas de uva blanca estudiadas (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017 y Figura 4.8), a pesar de que en Garnacha no se superaron todos los criterios de significación estadística y no sale como DEG (Tabla suplementaria S24). El mismo comportamiento mostró el gen *UFGT* (*VIT\_16s0039g02230*) (Figura 4.40A y Tabla suplementaria S24). Cabe destacar que *VviMYBA1* no mostró expresión en las variantes blancas, mientras que *VviMYBA2* sí. Otros genes de la familia MYB relacionados con la regulación de la biosíntesis de antocianinas que se reprimieron en ambas variantes blancas respecto a las tintas fueron los factores de transcripción *VviMYBA8* (*VIT\_02s0033g00380*) (Matus *et al.*, 2017) a lo largo de toda la maduración y el represor *VviMYBC2-L3* (*VIT\_14s0006g01620*, Cavallini *et al.*, 2015), a partir del estadio E (Figura 4.40B). El factor de transcripción *VviMYBPA1* (*VIT\_15s0046g00170*) que regula la expresión del gen codificante de la leucoantocianidina reductasa (LAR, *VIT\_01s0011g02960*) (Bogs *et al.*, 2007) también se reprimió en el hollejo de las variantes de baya blanca frente a las tintas a partir del estadio E.

En cuanto a la reducida acumulación de flavonoles tri-hidroxiados cuantificada en el hollejo de las variantes blancas (Figura 4.21), el análisis transcriptómico detectó que ocho isogenes que codifican enzimas F5'3'H implicadas en la trihidroxilación de flavonoides están reprimidos en el hollejo de las variantes blancas frente a las tintas, en la mayoría de casos con mayor intensidad a partir del estadio E ((18) *VIT\_06s0009g02810*, (19) *VIT\_06s0009g02830*, (20) *VIT\_06s0009g02840*, (22) *VIT\_06s0009g02920*, (24) *VIT\_06s0009g03000* y (25) *VIT\_06s0009g03010*), y dos específicamente en el hollejo de Tempranillo ((21) *VIT\_06s0009g02860* y (23) *VIT\_06s0009g02970*) (a la izquierda del gen, entre paréntesis, se indica el número con el que se nombra en la Figura 4.40A). En conjunto estos resultados sugieren que se requiere de los genes *VviMYBA* funcionales para activar la partición de flavonoides hacia formas tri-hidroxiadas.





**Figura 4.40. Ruta de biosíntesis de flavonoides y factores de transcripción relacionados.** Se representa por un lado A) la ruta de biosíntesis de flavonoides y por otro B) los factores de transcripción relacionados. Los metabolitos analizados se muestran en negrita. PE, pre-envero; E, envero; PM, pre-madurez y M, madurez. PAL, fenilalanina amonio-liasas; CHS, chalcona sintasas; CHI, chalcona isomerasas; F3H, flavonona- 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilasa; FLS, flavonol sintasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; LDOX, leucoantocianidina dioxigenasa; UFGT, UDP-glucosa:flavonoide 3-O-glucosiltransferasa; GST, glutation S-transferasa phi; AM3, AnthoMATE; LAR, leucoantocianidina reductasa; STS, estilbeno sintasa; 1, VIT\_06s0004g02620; 2, VIT\_08s0040g01710; 3, VIT\_13s0019g04460; 4, VIT\_05s0136g00260; 5, VIT\_14s0068g00920; 6, VIT\_16s0022g01020; 7, VIT\_07s0151g01060; 8, VIT\_13s0067g02870; 9, VIT\_13s0067g03820; 10, VIT\_02s0025g02970; 11, VIT\_04s0023g03370; 12, VIT\_18s0001g14310; 13, VIT\_03s0063g01690; 14, VIT\_05s0094g01190; 15, VIT\_09s0002g01090; 16, VIT\_17s0000g07210; 17, VIT\_17s0000g07200; 18, VIT\_06s0009g02810; 19, VIT\_06s0009g02830; 20, VIT\_06s0009g02840; 21, VIT\_06s0009g02860; 22, VIT\_06s0009g02920; 23, VIT\_06s0009g02970; 24, VIT\_06s0009g03000; 25, VIT\_06s0009g03010; 26, VIT\_10s0003g02450; 27, VIT\_13s0047g00210; 28, VIT\_18s0001g03470; 29, VIT\_16s0039g02350; 30, VIT\_18s0001g12800; 31, VIT\_02s0025g04720; 32, VIT\_08s0105g00380; 33, VIT\_16s0039g02230; 34, VIT\_04s0079g00690; 35, VIT\_16s0050g00900; 36, VIT\_01s0011g02960; 37, VIT\_16s0100g00910; 38, VIT\_16s0100g01030; 39, VIT\_16s0100g01200.

Además de los efectos directos de la variación del color en genes de hidroxilación de flavonoides y de producción de antocianinas, se identificaron DEG que codifican enzimas en otras reacciones de la ruta de biosíntesis de flavonoides, que presentan un perfil de represión en el hollejo de ambas variantes blancas a partir del estadio E y que por tanto podrían responder también directamente a la falta de genes *VviMYBA* funcionales (Figura 4.40A). Este fue el caso de dos fenilalanina-amonio-liasas en la base de la ruta (PAL, (2) *VIT\_08s0040g01710*, (3) *VIT\_13s0019g04460*). También de tres chalcona sintasa (CHS, (4) *VIT\_05s0136g00260*, (5) *VIT\_14s0068g00920* y (6) *VIT\_16s0022g01020*), que codifican la primera reacción comprometida con la síntesis de flavonoides, así como de genes implicados en la síntesis de

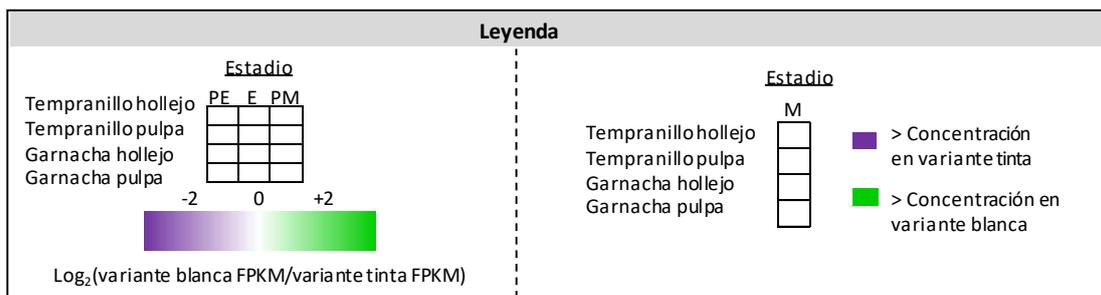
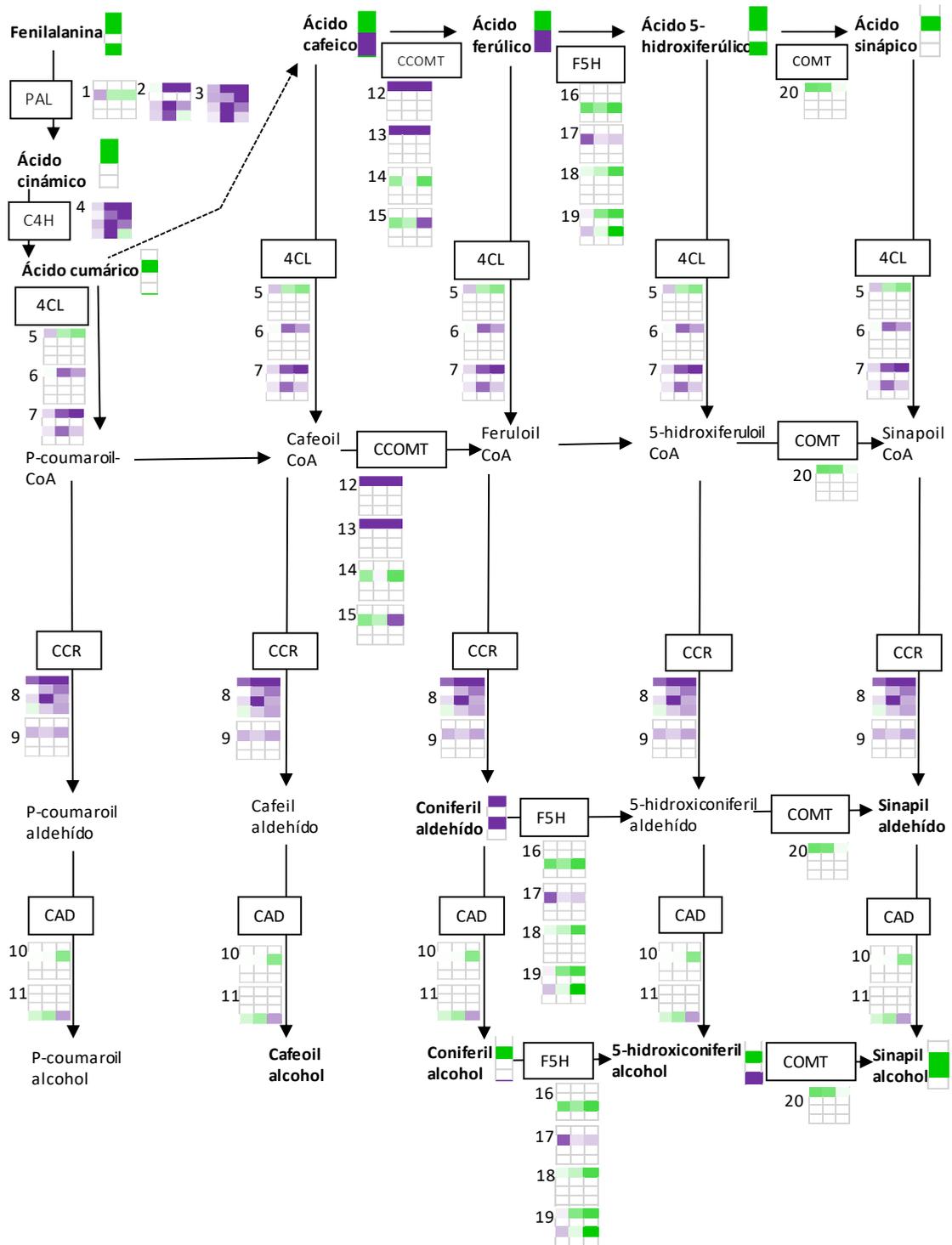
flavonoides como dos chalcona isómerasas (CHI, (8) *VIT\_13s0067g02870* y (9) *VIT\_13s0067g03820*), una flavonona-3-hidroxilasa ((11) *VIT\_04s0023g03370*), una dihidroflavonol reductasa ((30) *VIT\_18s0001g12800*) y una lecuoantocianidina dioxigenasa ((31) *VIT\_02s0025g04720*). También fue el caso de los transportadores de antocianinas hacia las vacuolas glutathion S-transferasa (GSTF4, *VIT\_04s0079g00690*) y anthoMATE3 (AM3, *VIT\_16s0050g00900*), a pesar de que en el primer caso en Garnacha no se superaron todos los criterios de significación estadística y en el segundo no se superaron en Tempranillo (Tabla suplementaria S24). Esto indicaría que la función de los genes *VviMYBA* es necesaria para activar la mayoría de reacciones a lo largo de la ruta de síntesis de flavonoides durante la maduración. Por otro lado, en alguno de los isogenes de la ruta solo se identificó represión en una de las variantes blancas indicando que algunos efectos dependen del genotipo varietal. En relación a la acumulación de antocianinas, éste fue el caso del gen *VviMYBC2-L1* (*VIT\_01s0011g04760*), reprimido en TB frente a TT. La represión se produjo principalmente a partir del estadio E. Además, en el hollejo de Tempranillo se detectó también un efecto específico en la ruta de síntesis de estilbenos, con tres genes codificantes de estilbenos sintasas ((37) *VIT\_16s0100g00910*, (38) *VIT\_16s0100g01030* y (39) *VIT\_16s0100g01200*) reprimidos en TB.

Por otro lado, llama la atención una serie de genes de la ruta de síntesis de flavonoides que presentó perfiles de expresión contrarios a la tónica general, ya que mostraron sobre-expresión en las variantes blancas (Figura 4.40A). Este fue el caso de dos genes codificantes de flavonol sintasa (FLS, (28) *VIT\_18s0001g03470* en TB y (27) *VIT\_13s0047g00210*, también en el hollejo de GB). En relación con esta sobre-expresión, el factor de transcripción *VviMYBF1*, que participa en la regulación de la expresión de las flavonol sintasas (Czemmel *et al.*, 2009), también mostró mayor expresión en el hollejo de TB frente a TT (Figura 38B) que de hecho acumuló mayores niveles del flavonol quercetina (Figura 4.22A). *VviMYBF1* activa la síntesis de flavonoles en respuesta a la luz (Czemmel *et al.*, 2009), lo que concuerda con que el gen *VviHY5-1* (*VIT\_04s0008g05210*) que participa en la regulación transcripcional en respuesta a la luz (Brown *et al.*, 2005), también muestre un perfil de inducción en TB (Figura 4.40B).

El conjunto de los resultados para esta ruta muestra expresión diferencial en hollejo entre variantes blancas y tintas en todos los pasos de la misma siendo, de manera general, esta expresión mayor en las variantes tintas.

#### 4.3.3.2 Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de ácidos hidroxicinámicos y derivados hidroxicinámicos

Asociados a la ruta de biosíntesis de ácidos hidroxicinámicos y de sus derivados fenólicos, se observaron 20 DEG que codifican distintas actividades enzimáticas de la misma (Figura 4.41). Al igual que en la ruta de biosíntesis de flavonoides, el número de genes con expresión diferencial fue mayor en Tempranillo que en Garnacha (17 DEGs frente a 9 DEGs respectivamente). De forma similar a lo observado en la ruta de biosíntesis de flavonoides, en esta ruta también se detectaron genes cuya expresión se reprimió en el hollejo de TB y GB respecto a las variantes tintas.



**Figura 4.41. Ruta de biosíntesis de ácidos fenólicos.** Los metabolitos analizados se muestran en negrita. PE, pre-envero; E, envero y PM, pre-madurez y M, madurez. PAL, fenilalanina amonio-liasa; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato-CoA ligasa; CCR, cinamoil-CoA reductasa; CAD, cinamil alcohol dehidrogenasa; CCOMT, cafeoil-CoA O-metiltransferasa; F5H, ferulato-5-hidroxilasa y COMT, cafeato 3-O-metiltransferasa; 1, VIT\_06s0004g02620; 2, VIT\_08s0040g01710; 3, VIT\_13s0019g04460; 4, VIT\_06s0004g08150; 5, VIT\_02s0109g00250; 6, VIT\_11s0052g01090; 7, VIT\_16s0039g02040; 8, VIT\_02s0012g01570; 9, VIT\_18s0122g00630; 10, VIT\_00s0615g00010; 11, VIT\_13s0064g00270; 12, VIT\_01s0010g03470; 13, VIT\_01s0010g03490; 14, VIT\_07s0031g00350; 15, VIT\_12s0028g03110; 16, VIT\_03s0038g00500; 17, VIT\_04s0023g02900; 18, VIT\_17s0000g03930; 19, VIT\_17s0000g03940; 20, VIT\_15s0048g02480.

A partir de la fenilalanina, precursor inicial de los ácidos hidroxicinámicos, se sintetiza el ácido cinámico mediante la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL). Dos isogenes codificantes de dicha enzima se reprimieron en el hollejo de ambas variantes blancas respecto a las tintas a lo largo de la maduración ((2) VIT\_08s0040g01710 y (3) VIT\_13s0019g04460) (a la izquierda del gen, entre paréntesis, se indica el número con el que se nombra en la Figura 4.41). También en hollejo de TB y GB se reprimieron a lo largo de la maduración tres genes más que codifican una enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H, (4) VIT\_06s0004g08150), una 4-cumarato-CoA ligasa (4CL, (7) VIT\_16s0039g02040) y una cinamoil-CoA reductasa (CCR, (8) VIT\_02s0012g01570). La C4H y la 4CL son enzimas comunes de la ruta de los fenilpropanoides. La C4H hidroxila el ácido cinámico a ácido cumárico, mientras que la 4CL transforma los respectivos ácidos en compuestos conjugados con -CoA. La CCR reduce los respectivos compuestos -CoA en aldehídos. La represión de estos genes en el hollejo de ambas variedades blancas respecto a las tintas podría significar que dichos genes están regulados directa o indirectamente por los genes *VviMYBA*, que han perdido la funcionalidad en las variantes blancas.

En relación a los compuestos cuantificados, esta represión podría relacionarse con la menor acumulación de coniferil aldehído en el hollejo de ambas variantes blancas frente a sus respectivas variantes tintas. En el caso de TB, la menor acumulación de coniferil aldehído podría también relacionarse con la mayor acumulación respecto a TT de los precursores fenilalanina y ácido cinámico y de los ácidos cafeico y ferúlico detectada en el hollejo. En Garnacha, sin embargo, no se detectó incremento de estos compuestos en la variante blanca. Al contrario que en Tempranillo, se observó menor acumulación de ácido cafeico y ácido ferúlico en la variante blanca que en la tinta.

Por otro lado, un gen que codifica la enzima ferulato-5-hidroxilasa (F5H, (19) VIT\_17s0000g03940), que transforma el ácido ferúlico en ácido hidroxiferúlico presentó mayor expresión en el hollejo de ambas variedades blancas respecto a las tintas a partir del estadio E. En TB este cambio de expresión puede estar relacionado con la detección de un mayor contenido en ácido 5-hidroxiferúlico en el hollejo respecto a TT; mientras que en GB podría relacionarse con el mayor contenido en sinapil alcohol detectado en hollejo con respecto a GT. Otros dos isogenes que codifican la enzima F5H se sobre-expresaron en el hollejo de las variantes blancas respecto a las tintas a lo largo de la maduración, (18) VIT\_17s0000g03930 en TB y (16) VIT\_03s0038g00500 en GB, lo que también podría relacionarse con el aumento de ácido 5-hidroxiferúlico y de sinapil alcohol en TB y GB respectivamente.

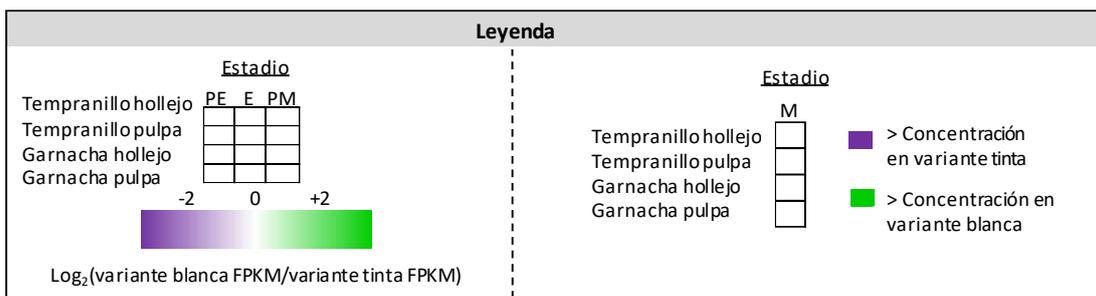
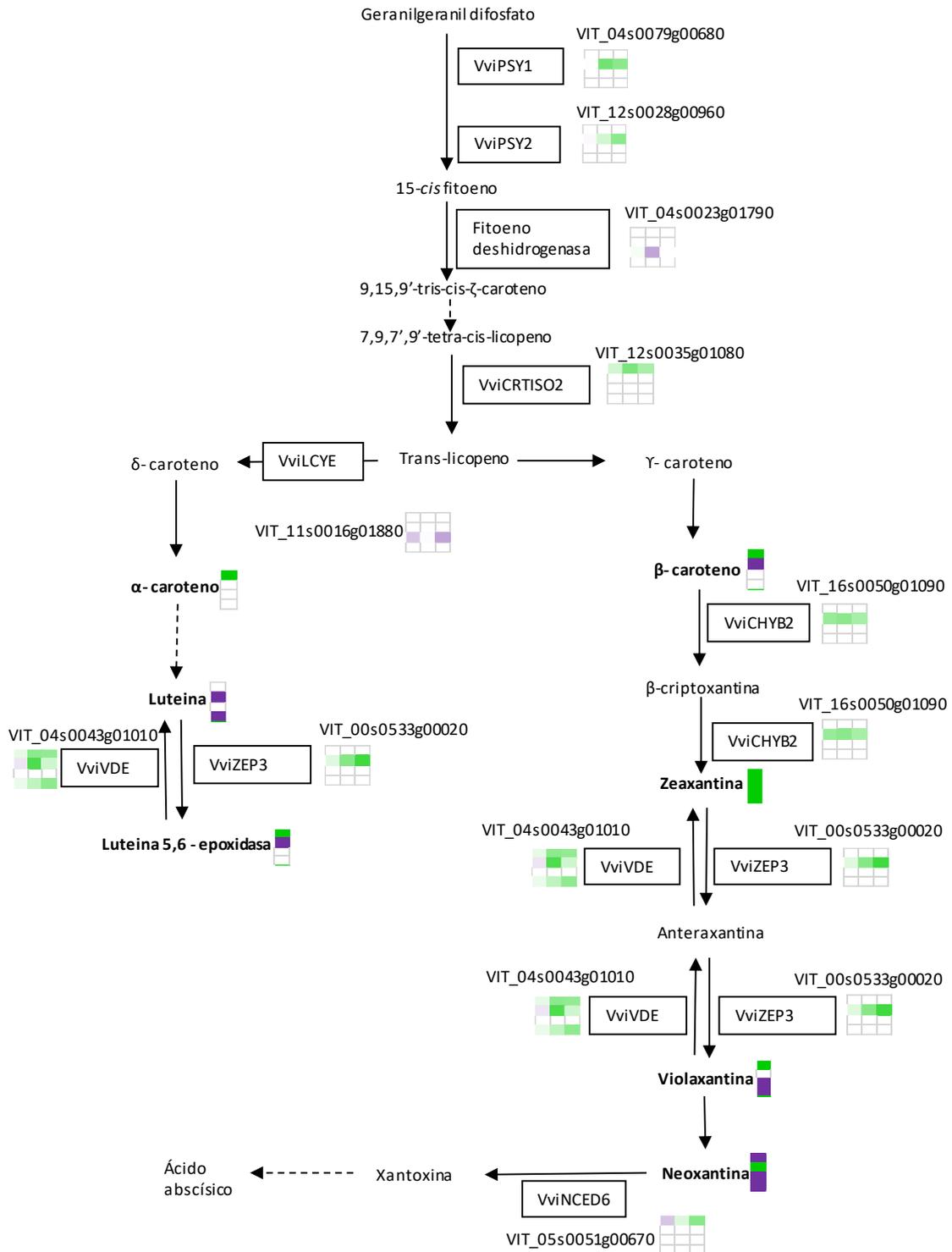
En la pulpa de TB en el estadio PM, también se detectó de manera específica mayor expresión que en TT de isogenes codificantes de PAL ((1) *VIT\_06s0004g02620*) y de CCOMT ((14) *VIT\_07s0031g00350*), que podrían estar relacionados con la mayor acumulación de los ácidos cinámico, cumárico, cafeico y ferúlico en este tejido de TB frente a TT. En la pulpa de TB y en el estadio PM también se sobre-expresó respecto a TT un gen codificante de la enzima cinamil alcohol dehidrogenasa (CAD, (10) *VIT\_00s0615g00010*), necesaria para la transformación de los adhéidos fenólicos en alcoholes fenólicos, lo que correlacionó con un mayor contenido en la pulpa de TB respecto a TT de coniferil alcohol, 5-hidroxiconiferil alcohol y sinapil alcohol.

Por lo tanto, al contrario que lo observado en la ruta de los flavonoides, no se observó mayor expresión de los genes en las variantes tintas frente a las blancas en todos los pasos de la ruta, sino que dependió del enzima en concreto y de los isogenes. TB acumuló más ácidos hidroxicinámicos que TT, al contrario que GB, que acumuló algunos de ellos, ácido cafeico y ácido ferúlico, en menor cantidad que GT.

#### 4.3.3.3 *Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de carotenoides*

En relación a la acumulación diferencial de carotenoides observada entre variantes blancas y tintas (Figuras 4.24 y 4.25), se realizó un seguimiento de los DEG identificados en esta ruta (Figura 4.42). En el inicio de la ruta el 7,9,7',9'-tetra-cis-licopeno se transforma en trans-licopeno gracias a una isomerasa codificada por el gen *VviCRTISO2* (*VIT\_12s0035g01080*, Leng *et al.*, 2017). Este gen mostró mayor expresión a lo largo de la maduración en el hollejo de TB respecto a TT, lo que podría relacionarse con la mayor acumulación en este tejido de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno en TB frente a TT.

La enzima violaxantina de-epoxidasa cataliza reacciones en varios niveles de la ruta, transformando en la rama del  $\beta$ -caroteno la violanxantina en anteraxantina y ésta en zeaxantina y en la ruta del  $\alpha$ -caroteno la luteína 5,6-epoxidasa en luteína. El gen que codifica esta enzima *VviVDE* (*VIT\_04s0043g01010*, Leng *et al.*, 2017) mostró mayor expresión a partir del estadio E en la pulpa de las variantes blancas de ambas variedades respecto a las variantes tintas. En el hollejo de TB este gen también mostró mayor expresión que en TT, principalmente en envero. Paralelamente a la sobre-expresión de *VviVDE* en todas las muestras (excepto en el hollejo de GB), se observó mayor acumulación de zeaxantina, carotenoide inducible por radiación solar (Young *et al.*, 2016), tanto en hollejo como en pulpa de ambas variantes blancas respecto a las tintas. En GB, tanto en el hollejo como en la pulpa, se acumularon menos niveles de violaxantina y neoxantina, lo que podría indicar que la ruta en GB se desplaza hacia la síntesis de zeaxantina. En el caso del TB se observó una menor acumulación respecto a TT de varios carotenoides (luteína 5,6-epoxidasa, luteína,  $\beta$ -caroteno) en la pulpa, lo que también parece indicar que en este tejido la ruta se desplazó hacia la rama del  $\beta$ -caroteno, aumentando la síntesis de zeaxantina en la variante blanca de Tempranillo.



**Figura 4.42. Ruta de síntesis de carotenoides.** Los metabolitos analizados se muestran en negrita. PE, pre-envero; E, envero y PM, pre-madurez y M, madurez. PDH, fitoeno dehidrogenasa; PSY, fitoeno sintasa; CRTISO, carotenoide isomerasa; LCYE,  $\xi$ -licopeno ciclasa; CHYB,  $\beta$ -caroteno hidroxilasa; VDE, violaxantina de-epoxidasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; NCED, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa.

Por otro lado, varios genes codificantes de enzimas implicadas en la síntesis de neoxantina mostraron mayor expresión en la pulpa de TB respecto a TT a lo largo de la maduración. Éste fue el caso de los isogenes *VviPSY1* y *VviPSY2* (*VIT\_04s0079g00680* y *VIT\_12s0028g00960*, Leng et al., 2017), que codifican la fitoeno sintasa, responsable de la síntesis de 15-cis fitoeno a partir de geranilgeranil difosfato, precursor inicial de la ruta; del gen *VviCHYB2* (*VIT\_16s0050g01090*, Leng et al., 2017), que codifica la  $\beta$ -caroteno hidroxilasa, que transforma el  $\beta$ -caroteno en  $\beta$ -criptoxantina y ésta en zeaxantina; y del gen *VviZEP3* (*VIT\_00s0533g00020*, Leng et al., 2017), codificante de la zeaxantina epoxidasa, responsable de las reacciones inversas a la violaxantina de-epoxidasa. La mayor expresión de todos ellos en TB, podrían relacionarse con la mayor acumulación de neoxantina en la pulpa de TB frente a TT.

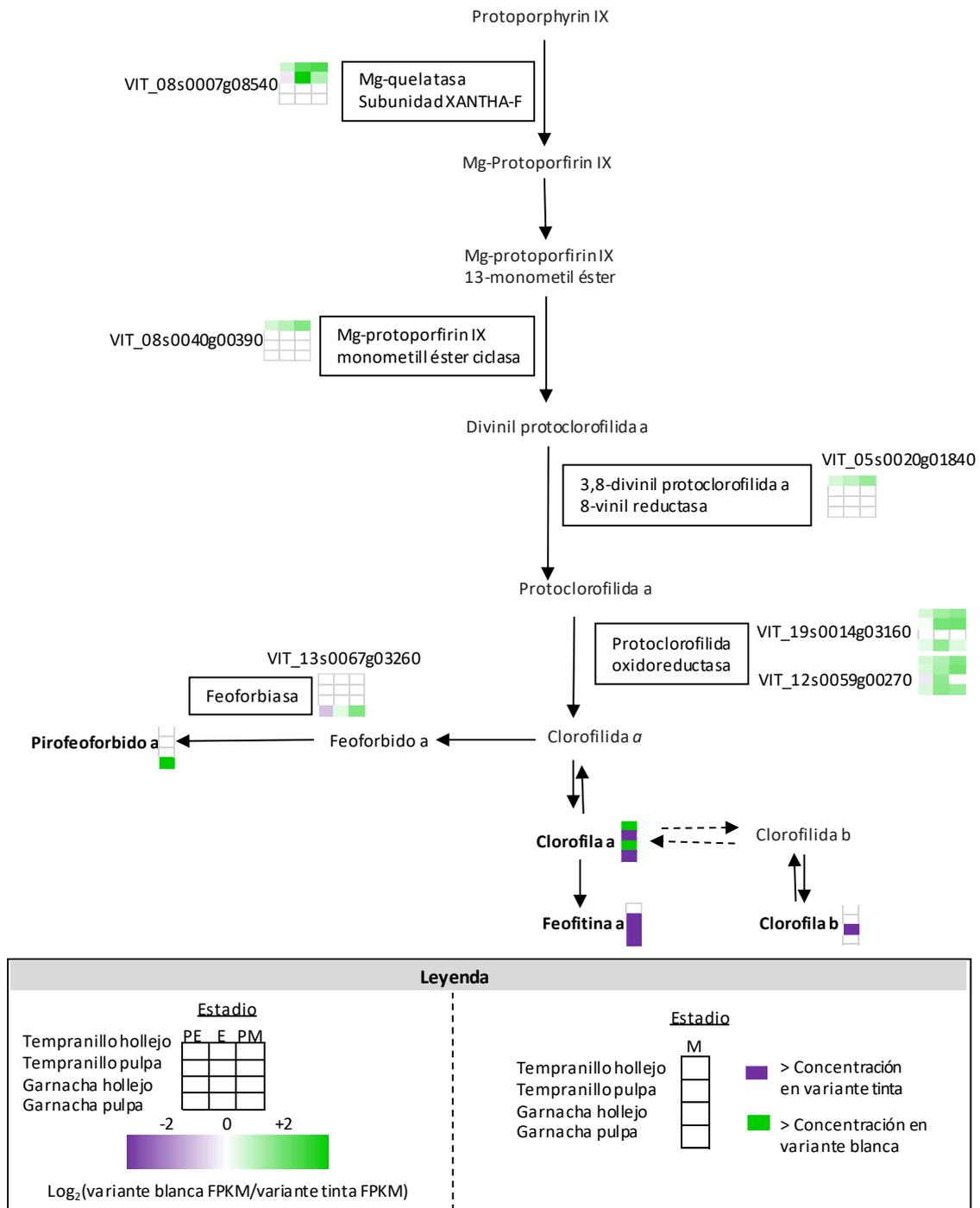
En conjunto, en lo que respecta a la ruta de síntesis de carotenoides, se detectaron cambios de expresión que pueden explicar la mayor acumulación de zeaxantina en todos los tejidos de las variantes blancas con respecto a las tintas. En ocasiones, esta acumulación de zeaxantina podría producirse a costa de la disminución de otros carotenoides como la neoxantina y la luteína que presentaron menor acumulación en las variantes blancas.

#### 4.3.3.4 Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de clorofilas

Entre los compuestos apolares se observó distinta acumulación de compuestos relacionados con las clorofilas en las variantes blancas que en las tintas (Figura 4.24 y Figura 4.25). El sustrato inmediato de la clorofila a es la clorofilida a, que se sintetiza a partir de divinil protoclorofilida mediante la enzima protoclorofilida oxidoreductasa. Uno de los isogenes codificantes de protoclorofilida oxidoreductasa (*VIT\_12s0059g00270*) mostró mayor expresión en el hollejo de ambas variantes blancas respecto a las tintas, a lo largo de toda la maduración en TB y principalmente en E en GB (Figura 4.41). Esta expresión diferencial está correlacionada con la mayor acumulación de clorofila a en el hollejo de TB y GB respecto a las variantes tintas (Figura 4.43). En TB, la mayor acumulación de clorofila a también se relacionó con la sobre-expresión en el hollejo a lo largo de la maduración de otro isogen codificante de protoclorofilida oxidoreductasa (*VIT\_19s0014g03160*) y de tres genes que codifican enzimas responsables de reacciones previas a la síntesis de clorofilida: Mg-quelatasa Subunidad XANTHA-F, que sintetiza Mg-protoporfirina IX a partir de protoporfirina IX, gen *VIT\_08s0007g08540*; Mg-protoporfirina IX monometil éster ciclasa que sintetiza divinil protoclorofilida a a partir de Mg-protoporfirina IX 13-monometil éster, gen *VIT\_08s0040g00390*; 3,8-divinil protoclorofilida a 8-vinil reductasa que sintetiza protoclorofilida a partir de divinil protoclorofilida a, gen *VIT\_05s0020g01840*. La mayor acumulación de clorofila a en el hollejo de ambas variedades blancas frente a las tintas, se relaciona a su vez con una mayor expresión de genes relacionados con la fotosíntesis en las mismas (Figura 4.43).

Los isogenes *VIT\_19s0014g03160* y *VIT\_12s0059g00270* codificantes de la protoclorofilida oxidoreductasa, además de en el hollejo, también se sobre-expresaron en la pulpa de ambas

variantes blancas respecto a las tintas a lo largo de la maduración. Sin embargo, la acumulación de clorofila a en la pulpa de TB y GB fue menor que en TT y GT. En GB esta menor acumulación de clorofila a en la pulpa podría estar relacionada con un aumento en la expresión en el estadio de PM del gen que codifica la enzima feoforbida (VIT\_13s0067g03260). Esta enzima cataliza la transformación de feoforbido a en pirofeoforbido a, catabolitos ambos del pigmento fotosintético. Ello indicaría que, al menos al final de la maduración en GB, la clorofila a presente en la pulpa se transformaría en catabolitos sin función fotosintética.



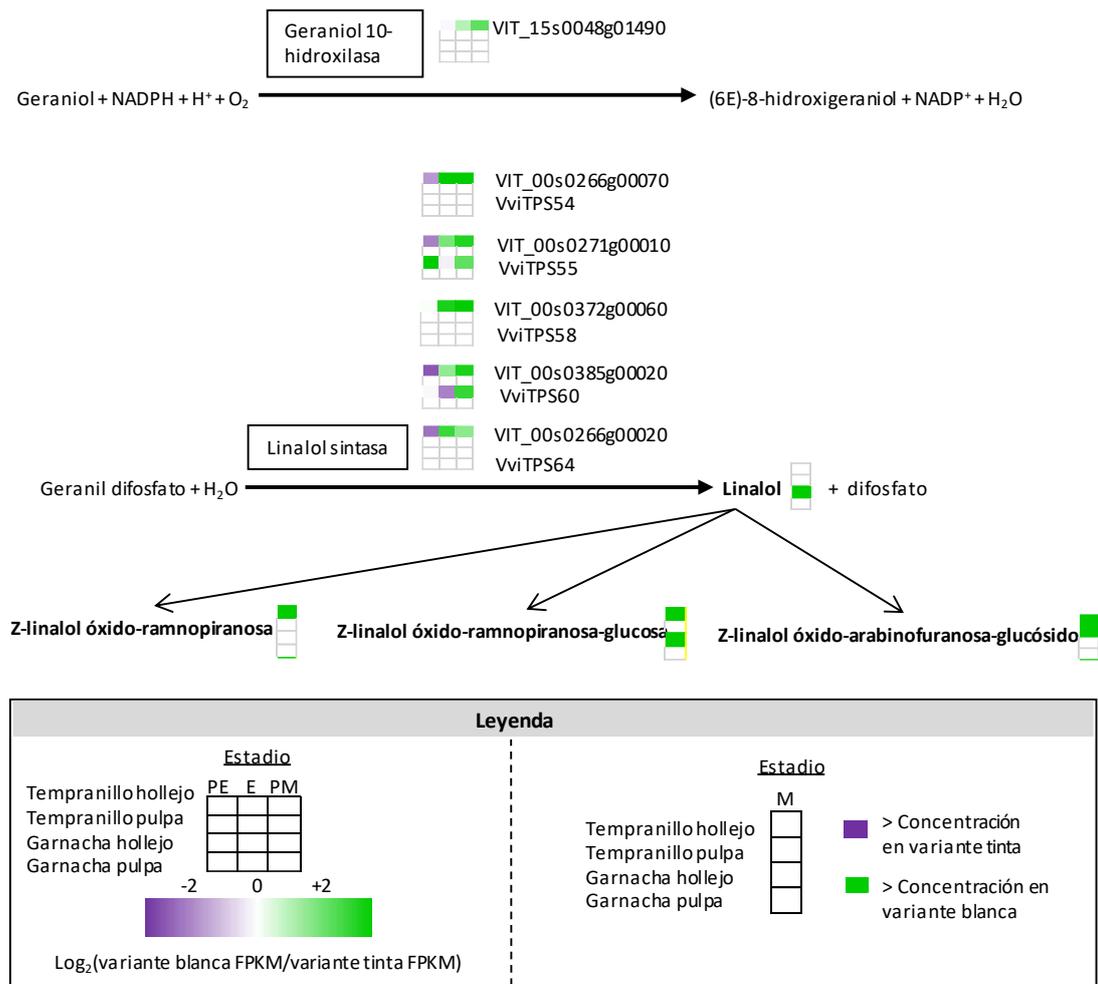
**Figura 4.43. Diferencias de expresión génica y de composición entre variantes de color de baya en la ruta de biosíntesis de clorofilas.** Los metabolitos analizados se muestran en negrita. PE, pre-enero; E, enero y PM, pre-madurez y M, madurez.

En resumen, tanto en el hollejo como en la pulpa de ambas variantes blancas se sobre-expresa el gen que codifica los pasos previos a la síntesis de clorofila *a*, lo que se traduce en un mayor contenido de clorofila en el hollejo de las variantes blancas.

#### 4.3.3.5 Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de monoterpenos

En lo que respecta a la ruta de biosíntesis de monoterpenos, se identificaron seis DEG entre variantes blancas y tintas, todos ellos específicos de hollejo (Figura 4.44). Los seis genes se sobre-expresaron en TB en las muestras de los estadios E y PM. Uno de ellos, codifica una geraniol 10-hydroxilasa (VIT\_15s0048g01490) que sintetiza (6E)-8-hydroxygeraniol. Los cinco genes restantes codifican linalol sintasas implicadas en la producción de linalol (*VviTPS54*, VIT\_00s0266g00070; *VviTPS55*, VIT\_00s0271g00010; *VviTPS58*, VIT\_00s0372g00060; *VviTPS60*, VIT\_00s0385g00020 y *VviTPS65*, VIT\_00s0266g00020 según Martin *et al.*, (2010)). En Garnacha las diferencias fueron menores y solo dos de estos genes mostraron diferencias significativas en la ruta, *VviTPS55* y *VviTPS60*, mostrando también sobre-expresión en el hollejo de la variante blanca GB respecto a la tinta GT, al menos en el estadio PM. Entre los metabolitos relacionados directamente con las reacciones en las que intervienen los productos de estos DEG tan solo se cuantificaron los niveles de linalol. Su acumulación fue significativamente mayor en el hollejo de GB respecto al de GT y no mostró diferencias significativas en Tempranillo. Sin embargo, un conjugado semipolar de linalol, el Z-oxido de linalol-ramnopiranos-glucosa, mostró mayor acumulación en el hollejo de las variantes blancas en ambas variedades y otros conjugados monoterpénicos también se acumularon de forma significativa en el hollejo de TB (Tablas suplementarias S6 y S7).

En conjunto los resultados indican que varias *TPS* se inducen en el hollejo de las variantes blancas, lo que está asociado a un aumento de la producción de monoterpenos volátiles y/o precursores glicosilados en las mismas.



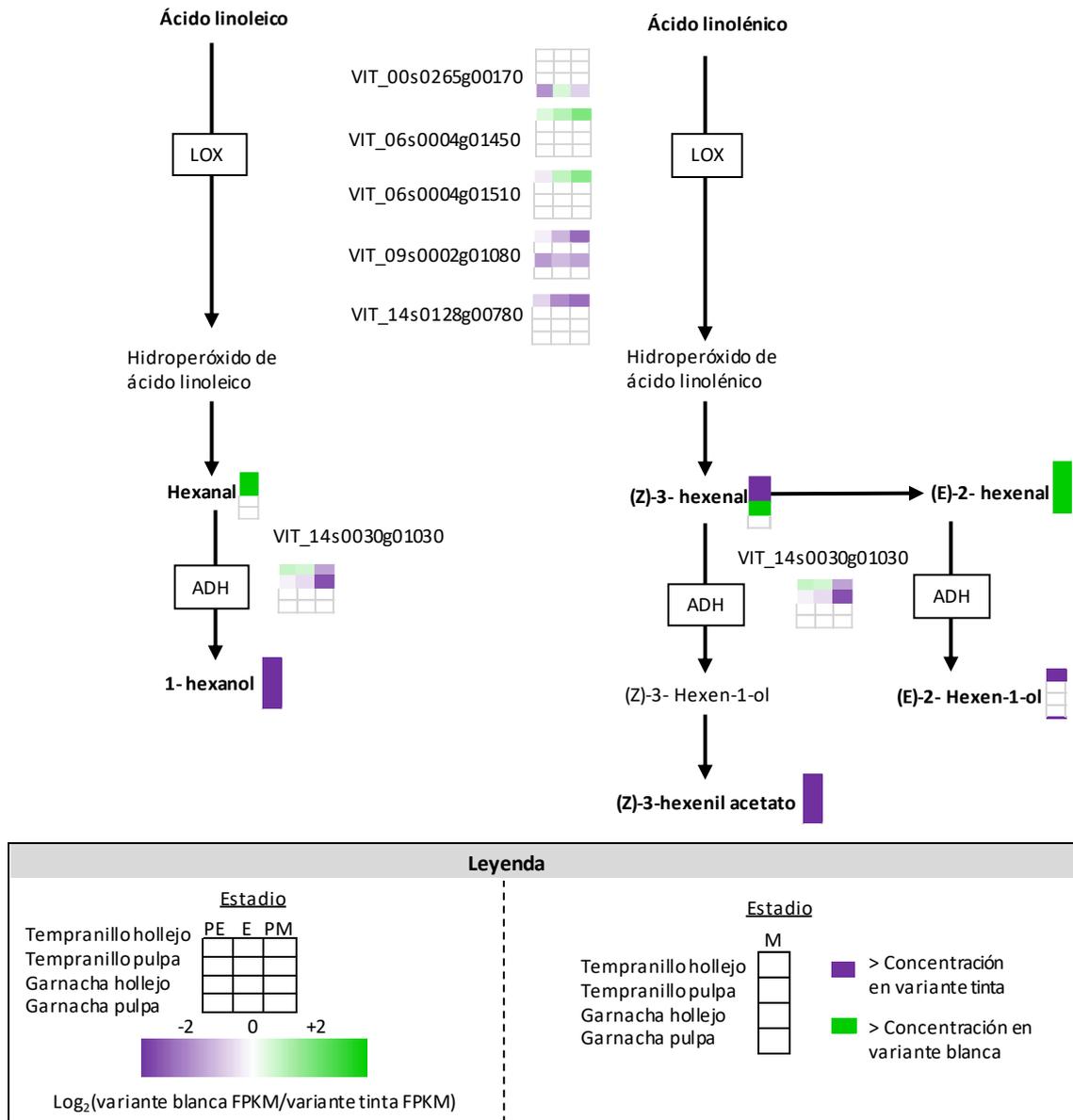
**Figura 4.44. Diferencias de expresión génica y de composición en la ruta de biosíntesis de monoterpenos entre variantes de color de baya.** Los monoterpenos identificados en las muestras analizadas se presentan en **negrita**. PE, pre-envero; E, envero y PM, pre-madurez y M, madurez.

#### 4.3.3.6 Diferencias de expresión y de acumulación de metabolitos en la ruta de biosíntesis de compuestos C6 volátiles derivados de ácidos grasos

Distintos compuestos C6 volátiles derivados de ácidos grasos mostraron acumulación diferencial entre las variantes de color (Figura 4.31 y Figura 4.32). En relación con esta acumulación se realizó un seguimiento de los DEG correspondientes a la ruta de síntesis de aldehídos, alcoholes y ésteres a partir del ácido linoleico y del ácido linolénico (Figura 4.45). El primer paso de esta ruta implica la transformación de los ácidos linoleico y linolénico en sus derivados volátiles que está catalizado por enzimas lipoxigenasa, que lo transforma en sus respectivos peróxidos. Uno de los genes codificantes de esta enzima (*VvLOXO*, VIT\_09s0002g01080) mostró menor expresión en el hollejo de ambas variantes blancas respecto a sus variantes tintas a lo largo de la maduración y de manera específica en el hollejo, lo que indica que su expresión podría depender también de la presencia de genes *VviMYBA* funcionales, como ocurre para los genes descritos previamente en la ruta de fenilpropanoides. Otro isógeno LOX (VIT\_14s0128g00780, *VviLOXC*) también mostró menor expresión en el hollejo de TB. La menor expresión de estas lipoxigenasas podría estar relacionada con la menor acumulación de (Z)-3-hexenal en el hollejo de TB respecto a TT. En contraste, otros dos genes que codifican enzimas LOX se sobre-

expresaron en el hollejo de TB respecto a TT, con mayor intensidad al avanzar la maduración (*VIT\_06s0004g01450* y *VvLOXA*, *VIT\_06s0004g01510*). Esta menor expresión podría relacionarse con la mayor acumulación en el hollejo de TB respecto a TT de hexanal.

Se observó también que el gen codificante de la alcohol deshidrogenasa *VIT\_14s0030g01030*, que cataliza la formación de alcoholes a partir de los respectivos aldehídos, mostró menor expresión en hollejo y pulpa de TB en PM, lo que podría estar relacionado con la menor acumulación de 1- hexanol y de (Z)-3-hexenil acetato en TB que en TT de en ambos tejidos estudiados, y de (E)-2- hexen-1-ol en hollejo.



**Figura 4.45. Diferencias de expresión génica y de composición entre variantes de color de baya en la ruta de síntesis de alcoholes, aldehídos y ésteres volátiles C6 derivados de los ácidos grasos ácido linoleico y ácido linolénico. Los metabolitos analizados se muestran en negrita. PE significa pre-enero; E, enero y PM, pre-madurez y M, madurez. LOX significa lipoxigenasa y ADH, alcohol deshidrogenasa.**

En resumen, no se observa un comportamiento homogéneo entre los isogenes que codifican la enzima principal de la ruta, la LOX, ni en el contenido en los distintos compuestos C6. Sin embargo, la infra-expresión de *VviLOXO* sí fue consistente en el hollejo de las variantes blancas y podría estar asociada a la falta de función de los genes *VviMYBA*, mientras que la sobreproducción de E-(2) hexenal y la menor acumulación de 1-hexanol y Z-(3)-hexenil acetato en todos los tejidos de las variantes blancas podría responder a un efecto indirecto de la pérdida de color.



# 5. Discusión



## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 INFLUENCIA DE FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN LA VARIACIÓN PARA CARACTERES DE PRODUCCIÓN Y COMPACIDAD EN GARNACHA BLANCA

Las variedades blancas de vid pueden tener orígenes diferentes. Algunas de ellas son el resultado de la reproducción sexual entre variedades blancas y/o tintas heterocigóticas para el locus del color, mientras que otras han surgido por mutaciones somáticas que afectan al alelo funcional del locus del color en variedades tintas heterocigóticas para dicho locus (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017; Lijavetzky *et al.*, 2006; Migliaro *et al.*, 2014; Pelsy *et al.*, 2015; Vezzulli *et al.*, 2012). La GB se enmarca en el segundo grupo, habiendo surgido a partir de la GT (*Vitis* International Variety Catalogue, VIVC). Las accesiones aquí estudiadas proceden de plantas de GB encontradas en plantaciones de GT (Cibriain *et al.*, 2014), pudiendo haberse originado por lo tanto a partir de distintos linajes clonales de GT que podrían tener diferencias genéticas intrínsecas que se reflejen en sus características fenotípicas. De hecho, esta diferencia genética parece darse al menos entre las accesiones de la D.O.Ca. Rioja estudiadas aquí y el resto de las incluidas en este estudio (Tabla suplementaria S2 y Figura 4.5), como se discute más adelante. La caracterización fenotípica intravarietal se lleva a cabo habitualmente con el objetivo de desarrollar programas de mejora clonal (Anderson *et al.*, 2008; Ruehl *et al.*, 2015; Vujovic *et al.*, 2016), de conocer la diversidad genética existente (Meneguetti *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2014; De Lorenzis *et al.*, 2017) o de realizar estudios genéticos (Tello *et al.*, 2015; Grimplet *et al.*, 2019). En este sentido, son varios los trabajos realizados con la variedad GT (Aguirrezabal *et al.*, 2004; Mercerano *et al.*, 2016; Grimplet *et al.*, 2017), progenitora de la GB. Sin embargo, la variedad GB apenas se ha estudiado hasta el momento. En este trabajo se ha caracterizado el fenotipo para distintos caracteres de planta, racimo y baya de distintas accesiones pertenecientes a una colección de GB susceptible de selección clonal. Los caracteres estudiados se seleccionaron partiendo de la hipótesis de que, por un lado, son caracteres que determinan la producción y la compacidad del racimo y, por otro, que debe de existir variación genética que permita explicar la variabilidad observada en la producción y en la compacidad en trabajos previos con estas accesiones (Andreu *et al.*, 2016).

La mayoría de los caracteres estudiados mostraron unos niveles de variación importantes en GB. Los caracteres con mayor variación en el conjunto de todas las plantas y racimos estudiados fueron la producción por planta (10,8 kg y 6,9 kg de diferencia entre la de mayor producción y la de menor en 2015 y 2017 respectivamente) y el peso del racimo (780 g – 552 g), seguidos del número de bayas con semilla por racimo (440 bayas – 307 bayas) y del cuajado (65,5 % - 49,4 %) (Tabla 4.1). La compacidad también fue uno de los caracteres que mayor variación mostró, más marcada en 2017 que en 2015 (de 3 a 9 vs 1 a 9). Por su parte, la anchura (4,5 mm – 5,1 mm) y la longitud de la baya (4,9 mm – 5,5 mm) fueron los caracteres que menor variación mostraron (Tabla 4.1). En GT también se ha detectado mayor variación en la producción por planta respecto al peso de baya y al número de racimos por planta, definiéndose las dimensiones de la baya como uniformes (Mercerano *et al.*, 2016).

En general, las correlaciones encontradas entre caracteres parecen ser causales; por ejemplo, las observadas entre la producción por planta, el peso del racimo, el número de bayas y el cuajado están de acuerdo con que compartan niveles similares de variación y con que son

caracteres que están interrelacionados. Por su parte, el peso del racimo correlacionó positivamente en mayor medida con el número de bayas que con el peso de la baya, lo que concuerda con que la variación encontrada para el número de bayas fue mayor que para el peso de la baya ambos años (Tabla 4.2). A nivel multivarietal también se ha observado que el peso del racimo se relaciona en mayor medida con el número de bayas por racimo que con el peso de la baya (Tello *et al.*, 2015), y se observó asimismo en la variedad de uva de mesa Muscat Hamburg (Vujovic *et al.*, 2017). En la vid se ha descrito que el porcentaje de cuajado se ajusta en función del número de flores, para alcanzar números no muy dispares de bayas normales por racimo (Eltom *et al.*, 2017). Esto está de acuerdo con la correlación negativa detectada entre la tasa de cuajado y el número de flores por racimo ambos años (Tabla 4.2). Con el cuajado también se observó correlación positiva del número de bayas normales tanto en 2015 como en 2017 (Tabla 4.2), por lo que el número final de bayas sería menos dependiente del número inicial de flores y más del cuajado. El conjunto de los resultados parece indicar que la variación en la producción de GB depende en última instancia del cuajado.

En lo que respecta a la compacidad, se ha descrito que, a nivel multivarietal, depende del número de bayas por racimo, así como de su tamaño y de la arquitectura del raquis (Tello *et al.*, 2015). En la colección de accesiones de GB también se observó una relación positiva entre la compacidad y dichos caracteres. Sin embargo, en los dos años analizados, la correlación fue mayor con las variables inter-relacionadas peso del racimo, número de bayas por racimo y cuajado que con la arquitectura del raquis y las dimensiones de la baya (Tabla 4.2). En la caracterización fenotípica de racimos de GT también se observó relación entre las diferencias existentes en la compacidad de los racimos de los clones evaluados y su número de bayas (Grimplet *et al.*, 2017), al igual que en Tempranillo Tinto, en el que además la compacidad también se relacionó con el peso del racimo (Grimplet *et al.*, 2019). Por lo tanto, al igual que en el caso de la producción por cepa, los resultados parecen indicar que la variación para la compacidad en la colección estudiada de GB depende en mayor medida del cuajado.

Considerando los datos de GB en su conjunto, muchos de los caracteres presentaron, además de alta variación en cada año, diferencias significativas entre los valores medios de los dos años, es decir, baja estabilidad frente al ambiente. Entre los más influenciados por el ambiente estuvieron tanto la producción por cepa como la compacidad y los caracteres que más los determinan, el peso del racimo, el número de bayas con semilla y el cuajado, presentando valores significativamente más bajos en 2017 que en 2015 (Tabla 4.1). Las condiciones del año sin embargo no influyeron en el número de racimos por planta, ni en las dimensiones de la baya, siendo los caracteres que mayor estabilidad presentaron. La influencia ambiental sobre caracteres relacionados con la producción y la compacidad no es exclusiva de la variedad GB. En vid, las condiciones meteorológicas durante la floración condicionan el cuajado final (Carbonneau *et al.*, 2010), influyendo en el número de bayas del racimo. El comportamiento inestable aquí descrito para GB podría estar respondiendo a este factor ambiental en la determinación del número de bayas final. Esto indicaría un alto grado de sensibilidad de la variedad a estos factores, como le ocurre a su parental GT, la cual es conocida por su alta tendencia al corrimiento (Aguirrezabal *et al.*, 2004; Keller, 2010). Este comportamiento estaría relacionado con las dispares condiciones meteorológicas que se dieron durante el periodo de floración los dos años (Figura 3.2). Así, durante 2015, las temperaturas durante el periodo de floración fueron más altas y las condiciones ambientales menos húmedas que en el mismo

periodo de 2017. En 2015, el día 1 de junio un 40% de los racimos estaban en flor y las temperaturas medias de la siguiente semana se mantuvieron entre 20-25°C con un solo día de lluvia que acumuló 2,2 l/m<sup>2</sup> (Figura 3.2A). En 2017, el día 26 de mayo un 30% de los racimos estaban en flor y las temperaturas medias de la siguiente semana bajaron de 21°C hasta 14°C, con tres días de lluvia que acumularon 20 l/m<sup>2</sup> (Figura 3.2C). Está descrito que el cuajado es menor con temperaturas medias de 14°C durante la floración que con temperaturas medias de 20°C (Buttrose y Hale 1973, en Kliewer 1977). Además, se ha observado que la fertilidad del óvulo y el número de semillas por baya es mayor con temperaturas medias durante la floración de 25°C durante el día que de 15°C (Roubelakis y Kliewer 1976). Esta influencia de la temperatura en la floración explicaría los resultados obtenidos en este trabajo con GB, en relación con el menor cuajado, número de bayas, peso de racimo y menor número de semillas por baya durante 2017 (Tabla 4.1). Dado que la viabilidad del polen fue alta ambos años y en todas las accesiones (Tabla 4.6), cabe descartarla como un factor influyente en los resultados, que en 2017 serían debidos a una menor eficiencia en los procesos de polinización y/o fertilización provocada por las condiciones ambientales.

En un estudio intra-varietal, y más en un marco de selección clonal, el factor genotipo (accesión) es esencial. La alta dispersión de los datos, la variación interanual, la interacción genotipo x ambiente detectada (Tabla 4.5) y, en algunos casos, las virosis conocidas en el transcurso del trabajo (Tabla suplementaria S1), dificultan la posibilidad de alcanzar conclusiones definitivas. No obstante, la diversidad detectada en la producción por planta, peso del racimo, cuajado, número de bayas por racimo y compacidad permitió revelar diferencias significativas entre accesiones, que se mantuvieron ambos años (Tabla 4.3). Son varios los ejemplos de trabajos en distintas variedades donde ha sido posible diferenciar accesiones o clones de una misma variedad en relación a estos caracteres agronómicos de interés. En Chardonnay, distintos clones se distinguieron entre sí por los caracteres productivos de rendimiento, número de bayas por racimo y peso de racimo (Anderson *et al.*, 2008). El rendimiento en clones de Riesling y Pinot Gris también permitió su diferenciación (Ruehl *et al.*, 2015), como lo hizo el peso del racimo en clones de Aglicano y de Muscat de Alexandria (De Lorenzis *et al.*, 2017). Al igual que en GB (Tabla 4.3), en el caso de GT se han observado diferencias entre distintas accesiones para los caracteres de producción por planta, peso del racimo, número de bayas por racimo y compacidad (Aguirrezabal *et al.*, 2004; Mercenaro *et al.*, 2016; Grimplet *et al.*, 2017) y no se han encontrado en el número de racimos por planta (Aguirrezabal *et al.*, 2004; Grimplet *et al.*, 2017). Sin embargo, al contrario de lo observado en GB, en algunos trabajos con GT también se han descrito diferencias estables entre accesiones para el tamaño de la baya (Grimplet *et al.*, 2017).

Entre las accesiones con mayor cuajado y compacidad, destacó GB06 por ser la accesión que mostró menos respuesta ambiental (Figuras 4.1 y 4.2). Las accesiones GB53, GB55 y GB64 mostraron fenotipo de producción y peso de racimo relativamente bajos de manera estable en ambos años. Por su parte, GB11 mostró un comportamiento intermedio ambos años (Figuras 4.1 y 4.2). Estas accesiones, junto a GB45 fueron las que presentaron comportamientos más repetibles en los dos años (Figura 4.2). Esta estabilidad indica que las características fenotípicas de estas seis accesiones pueden estar determinadas por variación genética intravarietal. Estudios de genotipado extensivo como la secuenciación de genoma completo podrían dilucidar el nivel de variación somática genética entre estas accesiones y su posible relación con la variación fenotípica.

Uno de los planteamientos iniciales del trabajo fue analizar si la variabilidad fenotípica encontrada en GB era consecuencia de variación en el tamaño o características de las deleciones del locus de color. En el total de accesiones de GB estudiadas sólo se detectaron dos tipos de deleciones causantes de la pérdida de color que además correlacionaron con el origen geográfico de la accesión (Tabla suplementaria S2). Con el fin de tratar de comprobar si el tipo de deleción influye en los caracteres estudiados se compararon ambos grupos de accesiones, pero no se detectaron diferencias consistentes. En los ACP realizados tampoco se observó agrupación de las accesiones en función del tipo de deleción (Figuras 4.1 y 4.2). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el número de accesiones incluidas en cada grupo es muy diferente, solamente tres de las accesiones estudiadas muestran la deleción del tipo G2, o continua, y los doce restantes la deleción tipo G1, o discontinua, lo que limita la potencia de los análisis estadísticos y la capacidad de extraer conclusiones a este respecto. Sería necesario caracterizar un mayor número de accesiones portadoras de la deleción G2 para obtener unos resultados representativos y comprobar si realmente existen diferencias fenotípicas que puedan relacionarse con el tipo de deleción.

En resumen, los resultados indican que, en la colección de GB estudiada, tanto la producción como la compacidad dependen en gran medida del cuajado, el cual es muy dependiente del ambiente. A pesar de ello hay excepciones, como es el caso de GB06, con los mayores niveles de producción junto a valores de cuajado y de compacidad que no son los mayores, y más independientes del ambiente. La variación encontrada en los caracteres más relacionados con la producción permite distinguir entre accesiones. Otros caracteres relacionados con la producción y la compacidad, como son los caracteres de baya, son menos dependientes del ambiente, pero presentan menor variación, y no distinguen de forma estable entre las accesiones estudiadas. Tanto la variación, como la inestabilidad, como la interacción Genotipo x Ambiente detectadas para muchos de los caracteres, indican que para llevar a cabo una correcta caracterización de las accesiones es necesario estudiar un mayor número de racimos en las accesiones durante varios años.

## 5.2 ORIGEN GENÉTICO DE GARNACHA BLANCA

### 5.2.1 Las variantes blancas de la variedad Garnacha se originan como consecuencia de deleciones en el cromosoma 2.

En algunas variedades de uva de vinificación tinta es relativamente frecuente observar la aparición de variantes somáticas de pérdida de color de baya que pueden mostrar un color gris/rojo o blanco. En distintas variedades, estas variantes se han asociado con la aparición de deleciones en la región del cromosoma 2 que alberga los genes *VviMYBA*. Estas deleciones afectarían a todas las células de la planta en el caso de variantes blancas (Walker *et al.*, 2006; Yakushiji *et al.*, 2006; Giannetto *et al.*, 2008; Vezzulli *et al.*, 2012; Migliaro *et al.*, 2014; Pelsy *et al.*, 2015; Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017), o se encontrarían en estado de quimeras estables afectando a la L2 en el caso de variantes rojas o grises de algunas variedades (Walker *et al.*, 2006; Vezzulli *et al.*, 2012). Diversos trabajos previos han analizado la pérdida de heterocigosidad (LOH, *loss of heterocigosity*) a lo largo del cromosoma 2 mediante amplificación y secuenciación de marcadores o amplicones específicos (Giannetto *et al.*, 2008; Vezzulli *et al.*, 2012; Migliaro *et al.*, 2014; Pelsy *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2018) como forma de valorar la presencia de deleciones entre variantes de color.

Para el presente trabajo, en la variedad Garnacha, aprovechando la alta heterocigosidad en las cultivares de vid y partiendo de la hipótesis de que la pérdida de color se debe a una disminución en el número de copias homólogas de los genes *VviMYBA* presentes en el cromosoma 2, hemos desarrollado un chip de 45 SNP diseñado especialmente para esta variedad, que permite una valoración de la pérdida de heterocigosidad a lo largo del cromosoma 2 que mucho más rápida otras estrategias utilizadas hasta el momento (Giannetto *et al.*, 2008; Vezzulli *et al.*, 2012; Migliaro *et al.*, 2014; Pelsy *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2018). El empleo de este chip ha permitido además abordar el análisis de múltiples aislados de GB, confirmando que la heterocigosidad presente en el cromosoma 2 de GT se pierde en todas las accesiones blancas en las regiones del cromosoma 2 que contienen los genes *VviMYBA* (Tabla suplementaria S2). Por otra parte, la re-secuenciación del genoma completo de dos de las accesiones de GB junto con dos accesiones tintas confirmó la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 2 detectada con el chip (Figuras 4.6 y 4.7). Además, el análisis de la variación en el número de copias en el cromosoma 2 indica que la pérdida de heterocigosidad está asociada a una reducción en el número de lecturas obtenidas en la región afectada del cromosoma 2, lo que apoya la hipótesis de que se trata en efecto de una delección que elimina una de las dos copias homólogas de esas regiones cromosómicas, pasando las mismas de estado disómico a monosómico en las variantes blancas (Figura 4.8). Es decir, como consecuencia de esta delección, la región genómica afectada se encontraría en hemicigosis en las accesiones de Garnacha Blanca. El análisis de la secuencia genómica también ha permitido comprobar que el haplotipo que queda en hemicigosis en accesiones de GB con distinto perfil de delección corresponde al alelo nulo del locus del color y que, por tanto, la delección del alelo funcional es lo que causa la pérdida de color (Figuras 4.9, 4.10 y 4.40). El estudio de la segregación de los marcadores SNP en dos progenies de autofecundación de GB para cada uno de los dos tipos de delección (Tablas 4.8 y 4.9) indica también que los SNP con pérdida de heterocigosidad se hayan en hemicigosis y que, por lo tanto, la pérdida de color se debe a una delección. Todos estos resultados excluyen que la pérdida de heterocigosidad se haya producido como resultado de un fenómeno de reemplazamiento cromosómico, hipótesis propuesta previamente, aunque no demostrada, para algunas accesiones de Pinot Blanc (Pelsy *et al.*, 2015). La presencia de delecciones que dan lugar a regiones en hemicigosis como origen de la pérdida de color en variedades tintas solo se ha demostrado hasta el momento para los casos de variantes blancas de las variedades Pinot Noir (Yakushiji *et al.*, 2006), Cabernet Sauvignon (Walker *et al.*, 2006) y Tempranillo Tinto (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017), mediante técnicas de Southern blot en los dos primeros casos y mediante análisis de re-secuenciación del genoma en el tercero.

### 5.2.2 La pérdida de color se ha producido de manera independiente en múltiples ocasiones en Garnacha

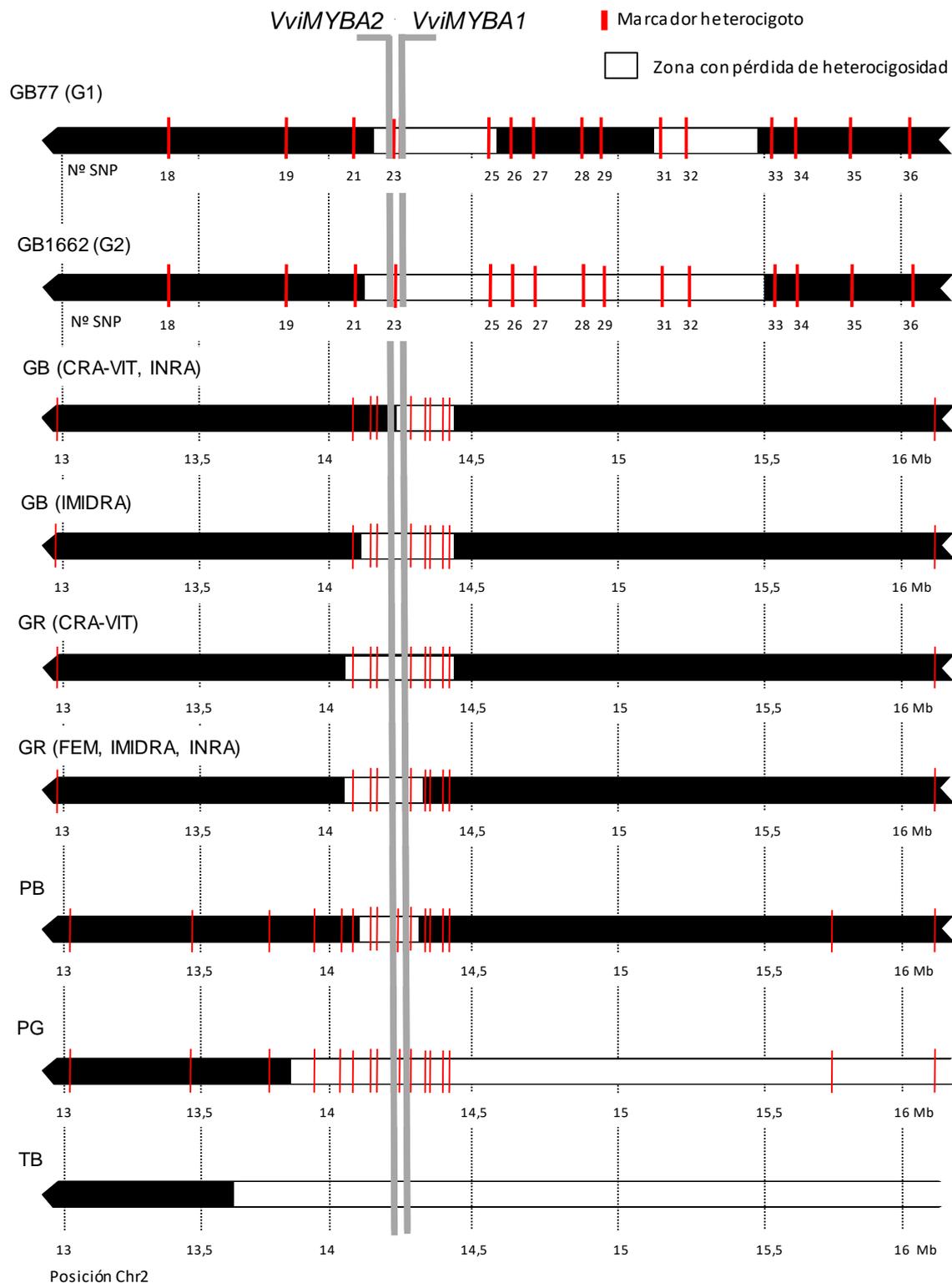
El análisis de los genotipos obtenidos para las distintas accesiones de GB mediante el chip de SNP detectó la presencia de tan sólo dos tipos de muestras, G1 y G2, según su perfil de pérdida de heterocigosidad (Figura 4.4 y Tabla Suplementaria S2). En el caso de G1, se detectó pérdida de heterocigosidad que afecta al menos a la región entre las posiciones 14.209.508 y 14.661.047 (con un tamaño mínimo de ca. 0,451 Mb y máximo de 0,647 Mb en función de los SNP analizados) y también a la región entre las posiciones 15.113.892 y 15.130.499 (con un tamaño mínimo de ca. 0,017 Mb y máximo de 0,576 Mb en función de los SNP analizados). En G2, la delección se encuentra como mínimo entre las posiciones 14.209.508 y 15.130.499 (lo que

corresponde a un tamaño entre ca. ~1 Mb y 1,48 Mb en función de los SNP analizados) (Figura 4.4 y Tabla Suplementaria S2). La existencia de estos dos genotipos se confirmó también mediante la re-secuenciación de accesiones de GB de ambos genotipos. La re-secuenciación permitió además definir con mayor precisión la región afectada por la delección. Así, tanto el análisis de pérdida de heterocigosidad como el de variación en el número de copias realizado sobre la secuencia ampliaron las regiones afectadas mínimas que fueron detectadas mediante el chip de SNP tanto en GB77 (GB1) como en GB1662 (G2) (Figura 4.8). Según los resultados de la secuenciación de genoma, la primera región afectada en GB77 alcanzó un tamaño de ~0,52 Mb y la segunda ~0,46 Mb, mientras que en GB1662 la zona afectada alcanzó un tamaño de ~1,37 Mb (Figura 4.8).

En muestras de GB y GR procedentes de distintos repositorios de Italia (CRA-VIT y FEM), Francia (INRA) y España (IMIDRA), el análisis de la región de los *VviMYBA* del cromosoma 2 mediante marcadores específicos identificó también genotipos con regiones de pérdida de heterocigosidad diferentes (Migliaro *et al.*, 2014) (Figura 5.1). Ese trabajo también encontró dos perfiles diferentes en GB. El primero, en las accesiones del CRA-VIT y del INRA, en las que se detectó pérdida de heterocigosidad afectando al menos a los marcadores 14,248 - 14,330 Mb del chr2 y los situados entre ellos (Figura 5.1). Por otra parte, en la muestra del IMIDRA se detectó pérdida de heterocigosidad al menos entre los marcadores 14,149 – 14,330 Mb y los situados entre ellos. Dadas las posiciones a partir de las que se detecta la pérdida de heterocigosidad, en el primer caso podrían coincidir con las delecciones de tipo G1 observadas en esta tesis, mientras que en el segundo caso con las de tipo G2 (Figura 5.1). El clon comercial de GB analizado en esta tesis es el Clon 141 que fue seleccionado por el INRA en Francia y es portador de la delección G1 como las accesiones de GB del INRA estudiadas por Migliario *et al.*, (2014). En cuanto a GR, en ese trabajo detectaron dos tipos distintos de pérdida de heterocigosidad. En ambos casos esta pérdida afectaba a un marcador (Chr2: 14,069 Mb) anterior a las posiciones en las que se detecta el inicio de la delección tanto en G1 como G2, por lo que no parecen corresponder con ninguna de las aquí estudiadas y podrían ser delecciones distintas a las presentes en las accesiones de GB analizadas en este estudio. La resolución en la detección de la pérdida de heterocigosidad en ese trabajo es baja respecto al presente estudio hasta la posición 14 Mb y a partir de la posición 14,5 Mb, dejando grandes regiones de incertidumbre cuya pérdida de heterocigosidad no han sido analizadas con marcadores (Figura 5.1). Por ello, es difícil realizar comparaciones precisas respecto a los límites de dicha pérdida. Por tanto, se puede concluir que al menos cuatro tipos de delección distintos se asocian con pérdida de color de baya en la variedad Garnacha, lo cual podría corresponderse con al menos cuatro eventos de variación somática independientes que hayan generado este tipo de fenotipo.

La existencia de distintos eventos de mutación que han dado lugar a distintas variantes blancas o grises de Garnacha se ha observado también en Pinot, donde se han descrito muestras de Pinot Blanc y Pinot Gris de origen independiente (Vezulli *et al.*, 2012; Pelsy *et al.*, 2015). En alguna de las accesiones de Pinot Blanc, la pérdida de heterocigosidad es más reducida que la caracterizada en Garnacha, ya que afecta a un mínimo de 101 kb entre las posiciones 14,149 Mb y 14,250 Mb (Vezulli *et al.*, 2012; Pelsy *et al.*, 2015). De hecho, en Pinot la diversidad del tamaño de la región afectada es grande y en algunas accesiones tanto de PB como de PG llega a más de 4 Mb (Vezulli *et al.*, 2012; Pelsy *et al.*, 2015) (Figura 5.1). En todos los casos las delecciones incluyen los genes *VviMYBA*. En otras variedades, como Tempranillo Blanco, hasta el momento

solo se ha caracterizado un evento de mutación que haya generado el fenotipo de uva blanca (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017). En este caso, en Tempranillo Tinto se delecionaron varias regiones en los cromosomas 2 y 5 (más de 8 Mb de genoma en hemigosis), siendo el fragmento que alberga a los genes *VviMYBA*, el mayor entre los delecionados en TB, con una pérdida de tamaño mayor que la observada en GB, 3,4 Mb entre las posiciones 13,7 Mb y 17,1 Mb (Figura 5.1).



**Figura 5.1. Resumen de los patrones de pérdida de heterocigosidad identificados en el cromosoma 2 en accesiones de Garnacha Blanca (GB), Garnacha Roja (GR), Pinot Blanc (PB), Pinot Gris (PG) y Tempranillo Blanco (TB).** El esquema corresponde a una ampliación de la zona afectada en el cromosoma 2. Las regiones con pérdida de heterocigosidad se representan como zonas en blanco dentro del esquema del cromosoma. Los patrones obtenidos en el presente trabajo mediante secuenciación del genoma de GB77 y GB1662 se comparan con los publicados previamente para GB y GR, Pinot Blanc (PB), Pinot Gris (PG) y Tempranillo Blanco (TB) (Vezulli et al., 2012; Migliaro et al., 2014; Carbonell-Bejerano et al., 2017). Los marcadores heterocigotos en las correspondientes variedades tintas se representan por barras verticales a lo largo del cromosoma. El esquema indica también la posición de los dos genes VviMYBA1 y VviMBA2. Se indica el orden de los SNP a lo largo del cromosoma 2 (Nº SNP) para las accesiones estudiadas en este trabajo. Se indican las posiciones a lo largo del cromosoma en mega bases según la versión 12X.0 del genoma de referencia de PN40024. En PG y en TB la delección continúa a lo largo de cromosoma más allá de 16 Mb.

En lo que respecta a la comparación con Tempranillo, la mayor longitud en el conjunto de las tres delecciones del cromosoma 2 de TB respecto a GB conlleva un mayor número de genes en hemicingosis. Así, en TB se pierde una copia de 165 genes del cromosoma 2 mientras que en las GB del G1, con la delección discontinua, solamente 32 y en el G2 con delección continua 35 (Véase punto 4.3.2.4 en Resultados). En TB, además, las reorganizaciones cromosómicas conllevan también cambios en el cromosoma 5, con un total de 148 genes en hemicingosis respecto a TT en este cromosoma.

Dada la estrategia utilizada en la recolección del material vegetal de GB (al menos en el caso de Navarra) en la que se seleccionaron plantas de GB detectadas en plantaciones mayoritariamente de GT con una edad comprendida entre 40 y 60 años, nuestra hipótesis inicial era que muchas de las accesiones analizadas debían representar sucesos independientes de variación. Esto nos llevaba a predecir que las delecciones detectadas podían ser diferentes en muchos de los casos. Sin embargo, la detección de solo dos tipos de delección entre las 69 accesiones estudiadas en la variedad Garnacha (Tabla suplementaria S2) no encaja con la hipótesis inicial, lo cual se puede explicar en base a distintas posibilidades: 1) Las accesiones recolectadas no son sucesos independientes, sino que corresponden a plantas multiplicadas vegetativamente a partir de dos tipos de variantes de color ancestrales. No podemos descartar esta situación en el caso de las accesiones de la D. O. Ca. Rioja que fueron recolectadas en parcelas en las que se encontraron otras variedades además de GB. Sin embargo, en el caso de Navarra esta situación es improbable, dado que la mayor parte de las GB analizadas fueron localizadas en plantaciones de GT mezcladas con las plantas de GT de manera aleatoria y muchas de ellas de forma individual. El hecho de encontrar plantas de GB entre plantas de GT en este supuesto significaría que a la hora de realizar la plantación se plantaron unas pocas GB entre las GT por error. Es poco probable que se plantaran por error, dado que en el momento en que se realizaron esas plantaciones eran los propios viticultores quienes recogían el material vegetal de aquellas plantas que más les interesaban y realizaban sus propios injertos. De hecho, la existencia de GB77, que procede de un brazo de una cepa de Garnacha Tinta (GT77) que sigue generando racimos tintos, y que pese a tratarse un suceso de variación somática independiente al resto de accesiones GB reproduce el patrón de delección G1 (Tabla suplementaria S2), también sugiere que puede haber algo más que una simple multiplicación de material vegetal.

2) Las accesiones de GB podrían corresponder a sucesos de delección independientes, pero estos sucesos podrían tener lugar con mayor frecuencia en regiones específicas del cromosoma 2, lo que se denomina puntos calientes o “hot spots” de recombinación (Raflaski *et al.*, 2004; Blas *et al.*, 2010), mitótica en este caso. La existencia de dichos puntos provocaría que el cromosoma 2 sufra mutaciones con mayor probabilidad en los puntos de inicio y fin de las delecciones detectadas. El hecho de que en otras variedades las posiciones de inicio y fin de las delecciones del cromosoma 2 sean distintas (Tabla 5.1) (Vezulli *et al.*, 2012; Pelsy *et al.*, 2015; Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017) indicaría que estos puntos calientes de recombinación serían específicos de la variedad Garnacha. Esta posibilidad no encaja con los otros tipos de delección identificados en Garnacha (Tabla 5.1) (Migliaro *et al.*, 2014) y tampoco está de acuerdo con la asociación detectada entre el tipo de delección y la zona geográfica de la que proceden las muestras estudiadas (Figura 4.5), aunque no podemos descartar que sean las variedades de GT progenitoras las que contienen reorganizaciones cromosómicas con un patrón geográfico.

3) Finalmente, podría darse el caso de que los viñedos de GT estén formados por cepas portadoras de delecciones en la L1 sin un gran efecto fenotípico (no se conoce el efecto de las delecciones de los genes de color en la L1). Las células portadoras de las delecciones en la L1 podrían invadir la L2 generando la aparición de uvas blancas sobre distintas cepas tintas. Esta hipótesis, al igual que la anterior, indicaría que existe una distribución previa de linajes clonales de GT en las diferentes zonas geográficas. La aparición del fenotipo de uva blanca de GB77 sin pasar por un fenotipo intermedio de uva roja junto con la recapitulación del mismo patrón de delección que se encuentra en accesiones de GB de origen anterior apoyarían esta hipótesis de la presencia de quimerismo en GT. De hecho, el estudio de la secuencia genómica también indica que GT77 es portadora de la delección en estado mosaico en la L1 ya que el número de lecturas obtenidas para el alelo funcional de *VviMYBA1* parece ser menor que para el alelo nulo (Figuras 4.9A y 4.10), y eso a su vez se relaciona con que las diferencias de LOH y número de copias en las regiones afectadas no llegan a ser tan claras entre GB77 y GT77 (Figura 4.6) como entre GB1662 y GB1608 (Figura 4.7). Según esto, a partir de un suceso de mutación único que se conserva de manera quimérica al menos en un linaje de GT cultivado en Navarra, podrían aparecer variantes de uva blanca con el mismo perfil de delección recurrentemente tras procesos de reorganización celular y tisular en los meristemos sin la participación de puntos calientes de mutación. La regeneración de plantas a partir de la L1 de GT permitiría comprobar si GT presenta o no delección en esta línea celular que provoque el desarrollo de uvas blancas y así confirmar o descartar el quimerismo de GT. GT77 supone un candidato ideal para analizar el posible caso de quimerismo. Si GT no fuera quimérica, la comprobación de la existencia de puntos calientes requeriría la re-secuenciación de un mayor número de muestras de GB. Por un lado, la re-secuenciación de muestras de GB procedentes de un número mayor de bancos de germoplasma permitiría determinar con exactitud el punto de recombinación en todas ellas y comprobar la existencia de distintos patrones de delecciones además de los aquí encontrados. También sería importante re-secuenciar un mayor número de muestras de GT. La re-secuenciación de GT procedentes de las parcelas correspondientes a cada grupo de delección de GB permitiría detectar polimorfismos entre ellas que pudieran explicar el patrón geográfico, mientras que la re-secuenciación de GT procedentes de distintas zonas geográficas permitirían buscar polimorfismos propios de esta variedad que puedan provocar la existencia de puntos calientes en esta región del genoma.

En conclusión, con los datos disponibles no se puede determinar con certeza si la existencia de dos únicos tipos de deleción se debe en todos los casos a la presencia de quimerismo en GT como parece haberse originado GB77, o si también se puede deber a la presencia de puntos calientes de recombinación. En cualquier caso, los tipos de deleción detectados en las accesiones de GB estudiadas podrían estar condicionados por el linaje clonal de GT a partir de la cual se han originado.

### 5.2.3 La presencia de las deleciones identificadas en GB no se asocia con una disminución de la viabilidad del polen ni con efectos deletéreos en la producción.

Partiendo de la hipótesis de que la presencia de deleciones causantes del cambio de color puede provocar alteraciones en la segregación normal de los gametos, tal como se ha observado en TB (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017), se estudió la segregación de los marcadores SNP a lo largo del cromosoma 2 en accesiones portadoras de cada uno de los dos tipos de deleción encontrados. Al contrario de lo observado en TB, que mostró segregación anómala de los marcadores a lo largo de todo el cromosoma (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017), la segregación de los SNP estudiados en el cromosoma 2 en GB no mostró ningún sesgo incluso en la región del cromosoma que se encuentra en hemicigosis (Tabla 4.9). En línea con los resultados de segregación genética, tampoco se observó reducción de la viabilidad del polen en GB respecto a GT (Tabla 4.6) ni del número de semillas en sus bayas (Tabla Suplementaria S1; Grimplet *et al.*, 2017). En conjunto, estos resultados indican que los gametos portadores de las deleciones del cromosoma 2 caracterizadas en GB son viables. En la misma línea, tanto el número de bayas en GB como el peso de los racimos (Tabla Suplementaria S1) fueron equivalentes o incluso superiores a lo descrito en GT (Aguirrezabal *et al.*, 2004; Grimplet *et al.*, 2017).

Por lo tanto, la presencia en GB de deleciones de hasta 1 Mb de tamaño no afecta a la segregación de los marcadores adyacentes en el genoma ni a la viabilidad de los gametos lo que permite mantener unos valores de producción en GB similares a GT.

## 5.3 RELACIONES ENTRE EL COLOR DE LA UVA Y SU COMPOSICIÓN

A nivel transcriptómico, el estudio de variedades que difieren en el color de la baya (Massonnet *et al.*, 2017) y de plantas transgénicas en las que se sobre-expresa *VviMYBA1* o se silencian los genes *VviMYBA* (Rinaldo *et al.*, 2015) ha mostrado el diferente comportamiento entre uvas blancas y tintas tanto en relación al metabolismo de los fenilpropanoides como de otros procesos biológicos. Partiendo de la hipótesis de que las diferencias observadas entre variantes somáticas de uva blanca y tinta que se dan exclusivamente en el hollejo a partir del envero se puedan deber a la falta de funcionalidad de los genes *VviMYBA* en las variantes blancas, hemos comparado la composición y el transcriptoma entre variantes somáticas de color de baya de Garnacha y Tempranillo en hollejo y pulpa por separado.

Los resultados del trabajo confirman los efectos a nivel de expresión génica descritos anteriormente en la ruta de fenilpropanoides (Rinaldo *et al.*, 2015; Massonnet *et al.*, 2017) e identifican la activación de mecanismos de protección frente a estrés en las variantes tintas no identificados con anterioridad. Por otra parte, el uso de variantes somáticas proporciona un fondo genético cuasi isogénico y nos ha permitido identificar diferencias asociadas principalmente a la falta de antocianinas. Además, los estudios metabólicos y

transcriptómicos conjuntos permiten confirmar que los cambios en el transcriptoma tienen consecuencias en la composición de baya, no sólo a nivel fenólico sino también a nivel aromático, algo muy poco estudiado hasta el momento entre uvas blancas y tintas (Rambla *et al.*, 2016). Por otro lado, el hecho de realizar el estudio separadamente en hollejo y pulpa ha permitido identificar diferencias que pueden deberse a efectos directos de la falta de funcionalidad de los *VviMYBA* que tienen lugar principalmente en el hollejo; y diferencias que se deben a efectos indirectos, como las respuestas a la radiación que derivan en cambios en la composición y el potencial aromático de las uvas y que ocurren tanto en hollejo como en pulpa.

### 5.3.1 La función de los genes *VviMYBA* se asocia a la activación de mecanismos de protección durante la maduración del hollejo

#### 5.3.1.1 *Los genes VviMYBA activan la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides a distintos niveles*

Varios genes codificantes de enzimas de biosíntesis en la rama de los ácidos fenólicos y, principalmente, en la de los flavonoides, disminuyeron su expresión en el hollejo en las variantes blancas en comparación con sus variantes tintas, y en mucha menor medida en la pulpa (Figura 4.40A). Esto muestra que la falta de función de los genes *VviMYBA* no afectó exclusivamente a la expresión del gen *UFGT*, pese a que este sea el paso limitante para la síntesis de antocianinas (Boss *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2001) y se haya descrito como diana directa de los factores de transcripción *VviMYBA1* y *VviMYBA2* (Kobayashi *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2007). Esta reducción en la expresión se observó desde las primeras reacciones en isogenes codificantes de PAL (*VIT\_08s0040g01710*), C4H (*VIT\_06s0004g08150*) y 4CL (*VIT\_16s0039g02040*) en el hollejo (Figuras 4.38, 4.39 y 5.2). Esta misma respuesta se observó en la rama inicial de la ruta que se desvía hacia la síntesis de alcoholes en un isogen de CCR (*VIT\_02s0012g01570*) (Figura 4.41). De un modo similar, la sobre-expresión de genes codificantes de PAL, 4CL y C4H fue característica del hollejo de uvas tintas cuando se compararon, mediante RNA-seq, cinco variedades blancas y cinco tintas cultivadas en las mismas condiciones (Massonnet *et al.*, 2017), apoyando la idea de que su sobre-expresión responde a la presencia de genes *VviMYBA* funcionales. En cuanto a la biosíntesis del esqueleto flavonoideo y la acumulación final de antocianinas, se observaron genes con menor expresión en el hollejo de las variantes blancas que codifican enzimas de todas las reacciones de la ruta, desde el precursor inicial fenilalanina hasta los genes de transporte de antocianinas al interior de las vacuolas (Figura 4.40A). Fue el caso de genes codificantes de CHS (*VIT\_05s0136g00260* y *VIT\_14s0068g00920*), CHI (*VIT\_13s0067g02870* y *VIT\_13s0067g03820*), F3H (*VIT\_04s0023g03370*), DFR (*VIT\_18s0001g12800*), LDOX (*VIT\_02s0025g04720*), UFGT (*VIT\_16s0039g02230*) y del gen de transporte GST4 (*VIT\_04s0079g00690*) (Figura 5.2). La mayor expresión de genes codificantes de estas enzimas en uvas tintas frente a blancas también se ha descrito al comparar diferentes variedades blancas y tintas (Massonnet *et al.* 2017). En otros estudios la sobre-expresión de F3H (*VIT\_04s0023g03370*) fue coincidente con la síntesis de antocianinas en hollejo (Castellarin *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2015). En los resultados de esta tesis, todos estos genes mostraron el mismo perfil de expresión a lo largo de la maduración que los genes *VviMYBA*. En el mismo sentido, Cutanda-Perez *et al.* (2009), en raíces adventicias, y Rinaldo *et al.*, (2015), en uvas, también observaron mayor expresión de genes codificantes de PAL, CHS, F3H, LDOX, además de UFGT y genes relacionados con el transporte de las antocianinas a las vacuolas (*GST4*) en respuesta a la sobre-expresión de *VviMYBA1*. En conjunto,

estos resultados indican que, directa o indirectamente, todos ellos son genes diana de los factores de regulación transcripcional MYBA.

Además de estos genes cuyo perfil de expresión coincide con los genes *VviMYBA*, se detectaron otros genes relacionados con la síntesis de fenilpropanoides con mayor expresión en el hollejo de las variantes tintas respecto a las blancas. Fue el caso del gen de transporte *AM3* (*VIT\_16s0050g00900*) (Gomez *et al.*, 2009), y de los factores de transcripción *VviMYBPA1* (*VIT\_15s0046g00170*), que regula la síntesis de proantocianidinas (Bogs *et al.*, 2007), y *VviMYBC2-L3* (*VIT\_14s0006g01620*), que reprime la síntesis de antocianinas (Cavallini *et al.*, 2015) (Figura 4.40B y Tabla suplementaria S24). La sobre-expresión de *VviMYBA1* no tuvo efecto en la sobre-expresión de *VviMYBPA1* en raíces tumorales (Cutanda-Perez *et al.* 2009; Rinaldo *et al.*, 2015), ni tampoco se ha detectado para este gen diferencias de expresión entre variedades tintas y blancas (Massonet *et al.*, 2017). Esto podría indicar que la sobre-expresión detectada en *VviMYBPA1* en las variantes tintas no se debe a un efecto directo de los genes *VviMYBA* o que si lo hay sería genotipo-dependiente. Por otro lado, la represión del gen *VviMYBC2-L3* en las variantes blancas refuerza la teoría de Cavallini *et al.*, (2015) según la cual, este gen podría contribuir a un balance óptimo de la síntesis de flavonoides mediante el control de la expresión de los genes reguladores de la ruta, como *VviMYBPA1* (Figura 4.40B).

En lo relativo a las estilbeno sintasas, en el caso concreto de Tempranillo se observaron tres isogenes con mayor expresión en el hollejo de TT respecto a TB (*VIT\_16s0100g00910*, *VIT\_16s0100g01030* y *VIT\_16s0100g01200*). Estos resultados están de acuerdo con el efecto de la expresión de *VviMYBA1* en líneas transgénicas de Shiraz, dónde también se observó la sobre-expresión de genes *STS* en las bayas (Rinaldo *et al.*, 2015), y con la mayor expresión de *STS* en bayas de variedades tintas descrita por Massonet *et al.*, (2017). Estos resultados indican que las *STS* podrían estar reguladas por los *VviMYBA*, bien directamente o indirectamente. En paralelo a la inducción de genes *STS*, la activación específica de algunos isogenes de la *PAL* podría desviar el flujo de la ruta hacia la síntesis de estilbenos, como sugieren Massonet *et al.*, (2017).

En lo que respecta a los genes *VviMYBA*, *VviMYBA2* se expresó tanto en las variantes tintas como en las blancas, mientras que *VviMYBA1* solo lo hizo en tintas, como se ha observado previamente (Massonet *et al.*, 2017) (Figura 4.40B y Tabla suplementaria S24). Estos resultados son congruentes con el hecho de que la mutación existente en el alelo de *VviMYBA2* presente en las variantes blancas no afecta a la expresión, sino a la traducción de la proteína (Walker *et al.*, 2007). *VviMYBA2* se halló infra-expresado en las variantes blancas frente a las tintas (Figuras 4.34, 4.36, 4.38B y Tabla suplementaria S24), lo que puede ser debido a su estado de hemicigosis en las blancas, o bien podría sugerir que la expresión de *VviMYBA2* puede requerir de *VvMYBA1* para ser plena. En las variantes tintas se detectó expresión en pulpa además de hollejo, tanto de los genes *VviMYBA* como de *UFGT* y del transportador vacuolar de antocianinas *GST4* (Figura 4.40B y Tabla suplementaria S24). Sin embargo, la expresión en pulpa fue muy débil en comparación con la detectada en hollejo, al igual de lo observado en otros trabajos (Kobayashi *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2015). Dada la ausencia de antocianinas en la pulpa, estos niveles de expresión tan bajos no parecen tener efecto en la acumulación de antocianinas y se debe requerir un determinado umbral. En el mismo sentido, se detectó la expresión de estos genes en hollejo desde pre-envero. En este caso los niveles de expresión fueron mayores a los detectados en la pulpa, pero muy bajos en relación a la expresión en envero (Tablas

suplementarias S12-S15 y S24). Sin embargo, desde pre-envero se detectó cambio de expresión entre uvas blancas y tintas en muchos genes (Figuras 4.36-4.39), en algunos casos relacionados con la fotosíntesis y con la síntesis de clorofila (Figuras 4.36, 4.37 y 4.43). Esto podría indicar que la ruta de síntesis de antocianinas se activa en el hollejo previo al envero (al menos dos semanas antes, dado el momento de la toma de muestras en este trabajo), a unos niveles imperceptibles, pero que tienen efectos sobre la fisiología de la baya (Fasoli *et al.*, 2018).

Además de los genes implicados en la ruta de flavonoides hacia la síntesis de antocianinas, varios genes codificantes de flavonoides-3'5'-hidroxilasas (*VIT\_06s0009g02810*, *VIT\_06s0009g02830* y *VIT\_06s0009g02840*) se reprimieron en el hollejo de las uvas blancas respecto a las tintas mostrando el mismo perfil de expresión que el gen *VviMYBA1* en ambas variedades. Este cambio de expresión se correlacionó con la falta de acumulación del flavonol trihidroxilado mirecitina y de sus formas metiladas laricitina y sirengitina en las uvas de variantes blancas (Figura 4.40A, 4.21 y 5.2). Estudios previos también observaron este comportamiento en distintas variedades y variantes somáticas de uva blanca. Ferreira *et al.*, (2016) analizaron el contenido en flavonoles en variantes de color de distintas variedades y no encontraron mirecitina en ninguna variante blanca, al igual que en el estudio realizado por Mattivi *et al.* (2006) con distintas variedades. Rinaldo *et al.*, (2015) observaron la sobre-expresión de isogenes codificantes de la flavonoide 3'5' hidroxilasa en líneas de Chardonnay sobre-expresantes de *VviMYBA1* frente a la variedad nativa y en Shiraz frente a líneas transgénicas de la variedad en las que se silenciaron los *VviMYBA*. Esto, junto con los resultados de este trabajo en variantes somáticas sin *VviMYBA* funcionales, sugiere que puede ser una respuesta directa a los mismos. Por su parte, Massonet *et al.*, (2017) estudiaron el transcriptoma de la baya a lo largo de la maduración de distintas variedades tintas y blancas y encontraron fuerte sobre-expresión en uvas tintas de genes codificantes de flavonoide 3'5' hidroxilasa además de *VviMYBA1* y *UFGT*. En el mismo sentido, Matus *et al.*, (2017) observaron la inducción de la flavonoide 3'5' hidroxilasa tras la sobreexpresión de *VviMYBA1* en raíces adventicias. En conjunto, estos resultados indican que se requiere al menos de la función del gen *VviMYBA1* para la trihidroxilación de los flavonoles.

En relación a la menor activación de la ruta de fenilpropanoides en las variantes blancas a nivel de expresión génica, se observó una mayor acumulación en éstas de los aminoácidos precursores de fenilpropanoides fenilalanina, tirosina y aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina (Figura 4.17). Ello podría indicar una menor demanda de precursores de fenilpropanoides en uvas blancas, como se sugiere en otros estudios (Degu *et al.*, 2015). El menor consumo de estos aminoácidos, sobre todo de fenilalanina, podría además relacionarse con la menor expresión de isogenes *PAL* en las variantes blancas (*VIT\_06s0004g02620* y *VIT\_13s0019g04460*) (Figura 4.40A), las cuales además mostraron un perfil de expresión similar al de *VviMYBA1*.

Se ha descrito que la ruta de los fenilpropanoides se activa en respuesta a infección por *Botrytis* en uva (Blanco-Ulate *et al.*, 2015). Así, en uvas de la variedad blanca Semillon se detectó expresión de isogenes de *PAL*, *C4H*, *4CL*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, en relación a la síntesis de flavonoides y antocianinas, y de *STS* en la ruta de síntesis de estilbenoides, al igual que lo que ocurre de manera natural durante la maduración en uvas tintas (Figuras 4.40 y 4.41; Rinaldo *et al.*, 2015; Massonet *et al.*, 2017). En este sentido se puede considerar que la acumulación de antocianinas y otros polifenoles promovida por la acción de los genes *VviMYBA* tras el envero, es un mecanismo de desarrollo que protege al embrión de radiaciones mutagénicas y que ejerce

funciones antioxidantes y antibióticas (Tamura *et al.*, 1994; Steyn *et al.*, 2002; Blanco-Ulate *et al.*, 2015). La mayor acumulación de flavonoles trihidroxilados en las uvas tintas podría responder al mismo mecanismo, dado que los flavonoles son compuestos con capacidad antioxidante (Hernandez *et al.*, 2009; Agati y Tattini, 2010; Agati *et al.*, 2013;). De hecho, la capacidad antioxidante de la miricetina (flavonols trihidroxilado) es mayor que la de la quercetina y el kaempferol (flavonoles dihidroxilado y monohidroxilado respectivamente) (Evans *et al.*, 1997; Gordon *et al.*, 1998; Pekkarinen *et al.*, 1999). Sin embargo, la activación de la ruta en respuesta a patógenos en ausencia de sobre-expresión de los genes *VviMYBA* (Blanco-Ulate *et al.* 2015) indica que los genes de la ruta de fenilpropanoides no están regulados únicamente por estos factores (Deluc *et al.*, 2006; Deluc *et al.*, 2008; Matus *et al.*, 2017). Por tanto, los genes *VviMYBA* podrían mediar la protección ontogénica frente a patógenos que se da durante el proceso de desarrollo que conlleva la maduración del hollejo, mientras que otros factores activarían las mismas rutas en respuesta a la presencia de los patógenos.

#### 5.3.1.1.1 Los genes *VviMYBA* activan mecanismos de protección frente a estrés biótico y abiótico

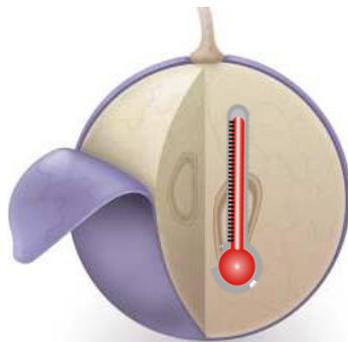
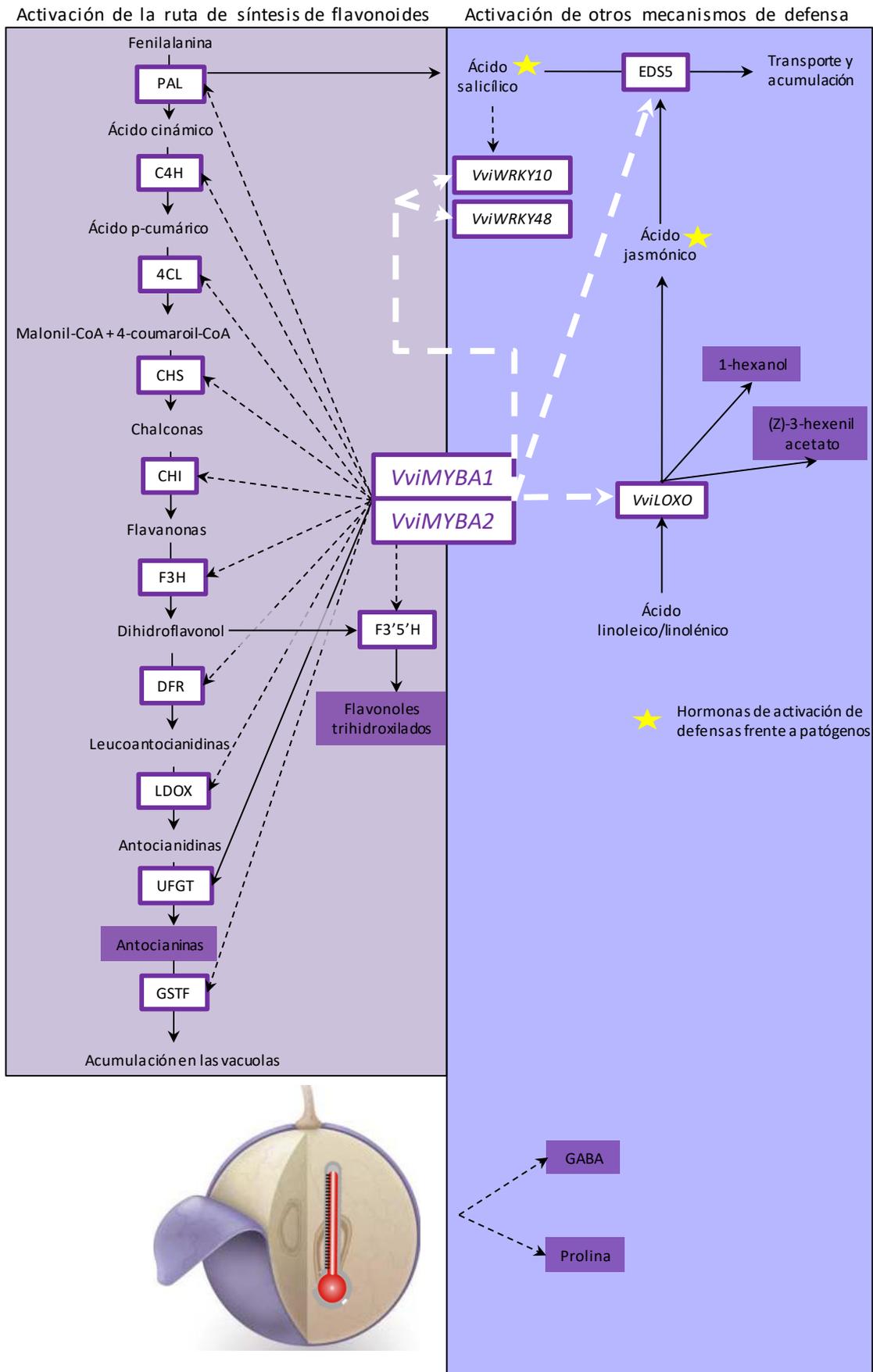
Los resultados del análisis transcriptómico indican que en presencia de genes *VviMYBA* funcionales se activan varios mecanismos de protección frente a estrés en el hollejo de las variantes tintas además de la activación de la ruta de síntesis de fenilpropanoides. Esto lo evidencia la sobre-expresión de genes implicados en las rutas de síntesis del ácido jasmónico y de compuestos C6 relacionadas, como los codificantes de enzimas lipoxigenasas, y de factores de transcripción WRKY y de proteínas de interacción planta-patógeno (Figuras 4.34 y 4.36 y Tablas suplementarias S20 y S22). Los resultados del análisis metabolómico mostraron que en el hollejo de las variedades tintas también se inducen respuestas a estrés abiótico, como es el incremento de los aminoácidos GABA y prolina (Figura 4.17).

Los resultados mostraron la sobre-expresión de la lipoxigenasa *VviLOXO* (*VIT\_09s0002g01080*) en el hollejo de ambas variantes tintas respecto a las blancas, con el mismo perfil de expresión que los genes *VviMYBA* (Tablas suplementarias S12 y S14; Figura 5.2). Se observó además mayor concentración de ciertos compuestos C6 derivados de ácidos grasos (1-hexanol y de (Z)-3-hexenil acetato) (Figuras 4.45 y 5.2) y la activación de genes de señalización de jasmonato (Tablas suplementarias S12, S14 y S18). Así, se detectó la sobre-expresión en el hollejo de ambas variantes tintas con el mismo perfil de expresión que *VviMYBA2* de un isogen del transportador de ácido salicílico del cloroplasto al citoplasma, el *EDS5* (*VIT\_03s0038g00430*), esencial para la acumulación de ácido salicílico (Serrano *et al.*, 2013) e inducido por jasmónico (Mine *et al.*, 2017) (Tabla suplementaria S18; Figura 5.2). La oxigenación de las 13-lipoxigenasas es el paso inicial tanto de la síntesis de compuestos C6 derivados de ácidos grasos como de la síntesis de ácido jasmónico (Avanzi *et al.*, 2010), por lo que tanto la mayor acumulación de los compuestos C6 como la activación de genes de señalización de jasmonato podría ser consecuencia de la sobre-expresión de *VviLOXO*. En este sentido, la *VviLOXO* se ha relacionado con respuestas a herida e infección por patógenos en uvas (Podolyan *et al.*, 2010; Blanco-Ulate *et al.*, 2015), habiéndose sugerido además que esta LOX podría participar en la síntesis de ácido jasmónico (Podolyan *et al.*, 2010). Por otra parte, los compuestos volátiles C6 tienen funciones de respuesta antimicrobiana y frente a insectos herbívoros, y el incremento de jasmonato en respuesta a estos tipos de estrés se ha correlacionado con el aumento en los niveles de compuestos volátiles C6 (Feussner y Wasternack 2002; Matsui 2006). En cuanto a reguladores de la transcripción se

refiere, se observó la sobre-expresión de dos factores de transcripción de la familia WRKY (Tabla suplementaria S18; Figura 5.2), relacionada con la protección frente a patógenos, en el hollejo de las variantes tintas respecto a las blancas con el mismo perfil de expresión que los genes *VviMYBA*: *VviWRKY48*, *VIT\_15s0046g01140* y *VviWRKY10*, *VIT\_04s0008g05760*. La inducción de *VviWRKY48* se ha observado en uvas infectadas con *Botrytis* (Blanco-Ulate *et al.*, 2015) y la de *VviWRKY10*, en hojas de vid infectadas con oídio (Toth *et al.*, 2016). En *Arabidopsis*, la expresión ectópica del gen *VviWRKY10* de vid se relaciona con la respuesta a la infección por distintos patógenos (Schön *et al.*, 2012). Estas evidencias apoyarían la hipótesis de que *VviMYBA1* y *VviMYBA2* podrían activar mecanismos de protección biótica a través de los mencionados isogenes *WRKY*, *LOXO* y *EDS5*. Así, la inducción de *VviWRKY10* en plantas sometidas a tratamientos de ácido salicílico (Toth *et al.*, 2016) permite plantear que la sobre-expresión observada en uvas tintas de estos genes se deba a la regulación de los mismos por los genes *VviMYBA*, dado que la síntesis de ácido salicílico puede derivarse de la vía de la PAL (Chen *et al.*, 2009; Shine *et al.*, 2016). Sería necesario realizar una cuantificación de las hormonas ácido jasmónico y ácido salicílico en relación con la variación de color para poder probar esta hipótesis. Por tanto, los genes *VviMYBA* podrían mediar en la protección basada en otros mecanismos distintos a la síntesis de fenilpropanoides durante la maduración del hollejo.

Otro posible mecanismo de protección frente a estrés en variantes tintas observado en ambas variedades fue la acumulación de los aminoácidos de respuesta a estrés abiótico GABA y prolina (Kinnersley *et al.*, 2000; Bouche *et al.*, 2004; Hayat *et al.*, 2012) (Figuras 4.17 y 5.2). En relación a ello, en TT se detectó sobre-expresión de un gen codificante de un transportador de GABA (*VIT\_13s0074g00570*). Los resultados obtenidos por Ayenew *et al.*, (2015) sugieren, al igual que los obtenidos por Sweetman *et al.*, (2014), que el aumento de temperatura induce la acumulación de estos aminoácidos. Esto podría relacionarse con la pigmentación oscura de las uvas de las variantes tintas que, en experimentos realizados en nuestro laboratorio, alcanzan mayor temperatura en la baya que las variantes blancas durante las horas del día de incidencia solar. Entre los genes sobre-expresados en el hollejo de las variantes tintas con perfiles similares a los *VviMYBA* también se encuentran factores *DREB* y fosfatasa *PP2C* que podrían activar protección a estrés abiótico (Vardhini *et al.*, 2010; Khan, 2011; Singh *et al.*, 2015; Zhu, 2016).

En resumen, durante el proceso de maduración se activan de manera natural en el hollejo de las uvas mecanismos de defensa y protección (Lijavetzky *et al.*, 2012). En variantes blancas, en ausencia de los genes *VviMYBA*, esta respuesta se ve disminuida, lo que sugiere que una de sus funciones sea la regulación de esta respuesta en el hollejo para proteger al fruto cuando las semillas han completado su desarrollo y comienzan a acumular azúcares con la maduración (Lijavetzky *et al.*, 2012; Massonet *et al.*, 2017). En el caso de Garnacha, la mayor activación de estos mecanismos de defensa en la GT con respecto a GB puede explicar la descripción que se hace de GB como más sensible a oídio que GT (Robinson *et al.*, 2012; Cabello *et al.*, 2012; Cibriain *et al.*, 2014; Balda y Martínez de Toda, 2017), algo que también podría ocurrir en TB con respecto a TT aunque no ha sido analizado en profundidad.



**Figura 5.2. Resumen de los procesos activados en uvas tintas.** En la figura se muestran encuadrados en morado con fondo blanco los enzimas cuyos genes codificantes se sobre-expresan en uvas tintas; se destacan en morado los metabolitos con mayor acumulación en uvas tintas. Flechas negras: continuas, relaciones demostradas previamente en bibliografía; discontinuas, relaciones observadas previamente en bibliografía. Flechas blancas discontinuas: relaciones hipotéticas establecidas en este trabajo. PAL, fenilalanina amonio-*liasa*; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato-CoA ligasa; CHS, chalcona sintasas; CHI, chalcona isomerasas; F3H, flavonona- 3-hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; LDOX, leucoantocianidina dioxigenasa; UFGT, UDP-glucosa:flavonoide 3-O-glucosiltransferasa; GSTF, glutation S-transferasa phi; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilasa. Isogenes codificantes de todas las enzimas del esqueleto de la ruta de flavonoides, desde el precursor inicial fenilalanina, hasta los transportadores de las antocianinas a las vacuolas, se sobre-expresan en variantes tintas con el mismo perfil de expresión que los genes VviMYBA (VviMYBA1 y VviMYBA2) al igual que isogenes codificantes de F3'5'H. Con el mismo perfil también se sobre-expresa el gen codificante de lipoxigenasas VviLOXO, lo que se asocia con mayor acumulación en variantes tintas de ciertos compuestos C6. Además, se ha relacionado al gen VviLOXO con la producción de ácido jasmónico en uva (Podolyan et al., 2010). Por otro lado, el ácido jasmónico es capaz de inducir la expresión de EDS5 (Mine et al., 2017), gen esencial para la acumulación de salicílico ya que media su transporte del cloroplasto al citoplasma (Serrano et al., 2013). La sobre-expresión de isogenes PAL en uvas tintas podría dar lugar a la acumulación de salicílico y a la activación de genes de defensa aguas abajo en la ruta como varios factores WRKY sobre-expresados en uvas tintas, incluyendo el gen VviWRKY10 que se induce por salicílico (Toth et al., 2016). Así, VviMYBA1 y VviMYBA2 podrían activar mecanismos de protección biótica a través de los isogenes LOXO, EDS5 y WRKY. Por último, la mayor acumulación de los aminoácidos de respuesta a estrés abiótico GABA y prolina se podría relacionar con una respuesta a la mayor temperatura de las uvas tintas debido a la absorción de radiación por las antocianinas.

### 5.3.2 La ausencia de antocianinas desencadena efectos indirectos relacionados con una mayor percepción de la radiación solar en uvas blancas

Los resultados del análisis transcriptómico y de cuantificación de metabolitos indican que la ausencia de antocianinas en el hollejo de uvas blancas permite que la cantidad de radiación solar que penetra en las células de éstas sea mayor que en uvas tintas. Así, se observó que las variantes blancas mostraron sobre-expresión de genes relacionados con la actividad fotosintética, tanto en hollejo como en pulpa (Figura 4.43). El hecho de que estas respuestas se activen en la pulpa, tejido en el que la débil expresión de los VviMYBA no tiene efecto sobre la acumulación de antocianinas (Tabla suplementaria S24) (Kobayashi et al., 2002; Xie et al., 2015), indica que deben ser efectos indirectos de la ausencia de antocianinas, al permitir la entrada de mayor radiación. Massonet et al., 2017 también observaron sobre-expresión de genes relacionados con la fotosíntesis en variedades de hollejo blanco en relación a variedades de hollejo tinto. Además, en la variante de uva blanca de Tempranillo se observó la activación de HY5-1 (VIT\_04s0008g05210), un gen de señalización clave en la cascada de respuesta a la radiación solar (Brown et al., 2005) (Figura 5.3). De hecho, este gen también responde a radiación ultravioleta en el hollejo de TT (Carbonell-Bejerano et al., 2014) y está sobre-expresado en uvas de variedades blancas respecto a variedades tintas (Massonet et al., 2017). En el mismo sentido que los resultados transcriptómicos, en el hollejo de las variantes de uva

blancas se observó una mayor acumulación de clorofilas (Figuras 4.43 y 5.3), principalmente en hollejo, y se ha demostrado que su acumulación se induce por radiación en órganos fotosintéticos (De Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2014). Por lo tanto, la mayor acumulación de clorofila observada en el hollejo de uvas blancas podría ser también una respuesta a la mayor incidencia de radiación solar, relacionada con su mayor expresión de genes implicados en fotosíntesis y de los genes codificantes de las enzimas presentes en la ruta de síntesis de las clorofilas (protoclorofilida oxireductasa en ambas variedades; *VIT\_12s0059g00270* y *VIT\_19s0014g03160*; Figura 4.43). Sin embargo, otros estudios que compararon el contenido en clorofila en uvas expuestas a menor y mayor radiación solar, no encontraron diferencias entre tratamientos en el contenido en clorofila (Joubert *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2016). Esta falta de coincidencia podría deberse al genotipo varietal utilizado (Sauvignon Blanc) o relacionarse con diferencias en el rango de radiación utilizada.

Al igual que en el caso de la clorofila, se observó también una mayor acumulación de otros pigmentos fotosintéticos, los carotenoides, en hollejo y pulpa de ambas variantes blancas (Figuras 4.42 y 5.3). Se acumularon xantofilas fotoprotectoras, concretamente la zeaxantina, en todos los tejidos de ambas variantes blancas, en la línea de lo que observaron Young *et al.* (2016) y Joubert *et al.*, (2016) en uvas con mayor exposición a radiación solar. Este mayor contenido en zeaxantina en las variantes blancas está en relación con la mayor expresión del gen codificante de la VDE dentro del ciclo violaxantina-zeaxantina (Figuras 4.42 y 5.3), como ocurre también en respuesta a una mayor exposición a radiación solar (Young *et al.*, 2016; du Plessis *et al.*, 2017). Varios estudios han descrito el papel de la zeaxantina como fotoprotector en plantas en condiciones de alta intensidad de radiación, incrementándose su concentración mediante la depoxidación enzimática de la violaxantina a zeaxantina en el ciclo violaxantina-zeaxantina (Demming-Adams y Adams, 1996; Horton y Ruban 2004).

Otro grupo de metabolitos relacionados con la respuesta al incremento de radiación UV son los fenilpropanoides (Matus 2016), entre los que se encuentran los flavonoides y los ácidos fenólicos. En el hollejo de TB se cuantificó un mayor contenido en los flavonoles quercitina y kaempferol, relacionado con la mayor expresión en el mismo tejido de la flavonol sintasa *FLS4* (*VIT\_18s0001g03470*) y del factor de transcripción que regula a esta última, el *VviMYBF1* (*VIT\_07s0005g01210*) (Czemmel *et al.*, 2009) (Figuras 4.22, 4.40 y 5.3). Al igual que en este caso con TB, diversos trabajos que han analizado el efecto de una mayor incidencia de radiación en las uvas han detectado un aumento en la expresión de la flavonol sintasa *FLS4* (*VIT\_18s0001g03470*) en relación con un mayor contenido en flavonoles en general (Azuma *et al.*, 2012b; Loyola *et al.*, 2016; Malacarne *et al.*, 2016), o en particular de quercitina y kaempferol (Friedel *et al.*, 2016; Carbonell-Bejerano *et al.*, 2014; Pererira *et al.*, 2006). También se ha descrito la expresión de *FLS4* en respuesta a luz (Czemmel *et al.*, 2009) y su regulación por el factor de transcripción *VviMYBF1* (Azuma *et al.*, 2012). En este sentido, se ha sugerido que el gen de respuesta a luz *HY5* tiene capacidad para regular el *VviMYBF1* y a su vez la *FLS4* (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2014; Loyola *et al.*, 2016), dado que todos ellos responden a la radiación en la baya. Estos tres genes también se inducen en TB en este trabajo, apoyando la idea de que el efecto se debe a una mayor percepción de luz que en TT. En GB esta respuesta no fue tan clara, en relación con la mayor incidencia lumínica que podría recibir GT en comparación con TT ya que acumula menos de la mitad de antocianinas de las que presenta TT (Figura 4.19). Otros estudios con variedades de uva de diferente color también han detectado

un mayor contenido de flavonoles en las variedades blancas asociado a un incremento en quercetina (Degu *et al.*, 2015). En variantes somáticas de baya blanca se acumula también mayor contenido de quercitina (Ferreira *et al.*, 2016), al igual que se observó en TB en este trabajo. En relación a estos resultados, los flavonoles se han considerado como los flavonoides más implicados en la fotoprotección frente a la radiación UV (Hernandez *et al.*, 2009; Agati y Tattini, 2010; Agati *et al.*, 2013; Carbonell-Bejerano *et al.*, 2014). En este sentido, la mayor acumulación de los flavonoles quercetina y kaempferol en las variantes blancas y la mayor acumulación del flavonol trihidroxilado mirecitina y de sus formas metiladas laricitina y sirengitina en las variantes tintas, podrían estar respondiendo en ambos casos a esta función fotoprotectora y antioxidante de los flavonoles, pero sería regulada de manera diferente. En el primer caso, la acumulación se activaría por respuesta a la luz, mientras que en el segundo caso sería una activación mediada por los genes *VviMYBA* y ligada al proceso de maduración en las uvas tintas.

En lo que respecta a los ácidos fenólicos, también en TB, se detectó un mayor contenido tanto en hollejo como en pulpa de los ácidos hidroxicinámicos, ácido cinámico, cafeico, ferúlico y 5-hidroxiferúlico, y solamente en pulpa de los ácidos sinápico y cumárico (Figuras 4.41 y 5.3). Esta acumulación podría deberse a la inducción, en el hollejo de TB, de varios genes de la ruta de síntesis de los ácidos hidroxicinámicos relacionada, como en el caso de los flavonoles, con una respuesta a la mayor incidencia de radiación solar. De hecho, varios estudios han detectado mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos en uvas expuestas a mayor radiación solar en distintas variedades (Du Plessis *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). Más concretamente, Carbonell-Bejerano *et al.*, 2014, observaron un mayor contenido de ácido p-cumárico en uvas de TT expuestas a radiación UV. En la misma línea que en el caso de los flavonoles, también en variantes de color de distintas variedades se ha observado mayor contenido en ácidos fenólicos en uvas blancas que en uvas tintas, al igual que en este caso en TB. Es el caso de Degu *et al.* (2015), que describen un mayor contenido en ácido ferúlico en el hollejo de las variedades blancas del grupo de Muscat. Por otro lado, Ferreira *et al.*, 2017 observaron que los ácidos hidroxicinámicos se acumulan en mayor concentración en el hollejo de tres de las cuatro variantes blancas analizadas. Esto indica que, al igual que los flavonoles, los ácidos hidroxicinámicos también se acumularían como fotoprotectores en situaciones de mayor exposición a la radiación solar, como parece ser el caso de las uvas blancas.

El aumento de radiación solar a la que están expuestas las uvas de las variantes blancas sería también responsable del incremento de expresión de los genes que codifican fotoliasas, enzimas que reparan el daño causado por la radiación en el ADN. En el hollejo de ambas variedades blancas y en la pulpa de GB se detectó la sobre-expresión del gen codificante de la fotoliasa FOT6-4 (*VIT\_09s0002g05990*) (Figura 5.3). Carbonell-Bejerano *et al.*, 2014 encontraron el mismo gen sobre-expresado en TT sometido a radiación UV. La regulación transcripcional de la fotoliasa FOT6-4 es crucial en las respuestas específicas a UV-B y está mediada por los factores de respuesta a radiación *HY5* en la uva (Loyola *et al.*, 2016).

Por lo tanto, estas respuestas en conjunto indican que a las uvas blancas perciben más radiación al no ser absorbida por las antocianinas y, como consecuencia, inducen la producción de otras moléculas fotoprotectoras que podrían cumplir también con un papel antioxidante de protección frente al estrés lumínico (Demming-Adams y Adams, 1996; Horton y Ruban 2004;

Agati y Tattini, 2010; Agati *et al.*, 2013; Hernandez *et al.*, 2009), así como actividades enzimáticas reparadoras como las fotoliasas.

### 5.3.2.1 *La ausencia de antocianinas en uvas blancas da lugar a un carácter más afrutado y floral en relación con la mayor radiación que incide en la baya*

Ambas variantes blancas acumularon en el hollejo mayores contenidos de distintos terpenoides aromáticos. Esto incluyó a los precursores glicosilados de monoterpenos y/o monoterpenos. Concretamente se detectó mayor concentración de glucósidos de linalol en ambas variedades, así como un mayor contenido de linalol, limoneno y  $\alpha$ -terpineol en GB. Estos cambios metabolómicos se relacionaron con sobre-expresión en el mismo tejido de varios isogenes de linalol sintasa (*VviTPS55*, *VIT\_00s0271g00010*; *VviTPS60*, *VIT\_00s0385g00020*) (Figuras 4.31, 4.44 y 5.3). La inducción de genes *TPS* y la acumulación de distintos tipos de terpenos, entre ellos monoterpenos, ha sido descrita anteriormente en hojas de vid en respuesta al incremento de radiación (Gil *et al.*, 2012). En uva son varios los estudios que han detectado un aumento en el contenido de monoterpenos y/o un incremento en la expresión de *TPS* cuando las uvas se exponen a mayor radiación solar. Así, Carbonell-Bejerano *et al.*, (2014) observaron sobre-expresión de linalol sintasas en uvas de TT expuestas a mayor radiación UV, mientras que Joubert *et al.*, (2016) y Young *et al.*, (2016) detectaron un incremento en los contenidos en monoterpenos en uvas de Sauvignon Blanc expuestas a mayor radiación. Concretamente de linalol y  $\alpha$ -terpineol, los mismos monoterpenos que aumentan en GB en este trabajo (Figuras 4.29 y 4.30). Friedel *et al.*, (2016) observaron mayor expresión de terpeno sintasas que se tradujo en un mayor contenido en monoterpenos, especialmente de linalol, en uvas de Riesling sometidas a mayor radiación solar. Por su parte, Massonet *et al.*, (2017), comparando variedades blancas y tintas, observaron mayor expresión en variedades blancas de genes relacionados con la síntesis de terpenos. Sasaki *et al.*, (2016) demostraron que el contenido total en linalol en el hollejo de Riesling estaba regulado por la expresión de *DXS* (1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa). Esta enzima regula los primeros pasos de la ruta del fosfato de metileritritol (MEP) y, junto con la enzima hidroximetilbutenil 4-difosfato reductasa (HDR), que cataliza el último paso de la ruta, controlando el flujo a través de la ruta y la expresión de monoterpenos sintasas tales como las linalol sintasas. Otros estudios han reportado también la relación entre la expresión de *DXS* y la síntesis de monoterpenos (Duchêne *et al.*, 2009; Battilana *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015). En *Arabidopsis*, la expresión de *DXS* se induce por luz (Carretero-Paulet *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2005). En el hollejo de GB un gen de *DXS* (*VIT\_00s0218g00110*) se sobre-expresó respecto a GT, mientras que en el caso del TB otro isogen de *DXS* (*VIT\_00s0218g00110*) lo hizo en la pulpa (Tablas suplementarias S13 y S14; Figura 5.3). La mayor expresión de *DXS* en las variantes blancas estudiadas podría responder a la luz ya que la actividad *DXS* también se requiere para la síntesis de carotenoides (Figura 4.42) como fotoprotectores. Indirectamente, al ser la *DXS* un intermediario común en la síntesis de isoprenoides, podría derivar en un aumento de la síntesis de monoterpenos (Dubey *et al.*, 2003). En estudios con especies de coníferas se ha observado que tanto el isopreno como los monoterpenos tienen capacidad antioxidante frente a las especies reactivas de oxígeno que se forman en las hojas en presencia de altas concentraciones de ozono (Loreto *et al.*, 2001; Loreto *et al.*, 2004). En la vid, también se ha observado un aumento en la concentración de monoterpenos en uvas sometidas a un tratamiento con ozono durante la deshidratación post-cosecha (Río Segade *et al.*, 2017). Esto sugiere que los monoterpenos también pueden tener una función antioxidante en situaciones de alta radiación, protegiendo contra los radicales libres que

se producen en estas situaciones. En conjunto, todo esto sugiere que en uvas blancas, la mayor radiación percibida podría activar la biosíntesis de terpenos de manera dependiente de la variedad a través de las DXS y de las terpeno sintasas (Figura 5.3).

Otro efecto común en las variantes blancas, que podría responder a un aumento en la radiación, es el aumento de C-13 norisoprenoides libres y/o glicosilados. Tanto en las uvas de TB como en las de GB se acumularon mayor cantidad de norisoprenoides, tanto glicosilados (en hollejo y pulpa) como libres (solamente en hollejo) (Figuras 4.27, 4.28, 4.31 y 5.3). Otros trabajos también han encontrado esta respuesta al incremento de radiación. Así, Feng *et al.*, (2014) observaron un incremento en el contenido en  $\beta$ -damascenona en plantas de Pinot Noir expuestas a mayor radiación solar tras el deshojado. Tanto Young *et al.*, (2016) como Joubert *et al.*, (2016), trabajando con Sauvignon Blanc observaron un mayor contenido en C-13 norisoprenoides en plantas expuestas a mayor radiación solar, en relación con aumento en el contenido total de carotenoides, precursores de los primeros. En el primer caso detectaron incremento, entre otros, de  $\beta$ -damascenona y en el segundo de  $\beta$ -ciclocitral al igual que lo observado en el presente trabajo en GB y TB respectivamente. Los C-13 norisoprenoides son compuestos derivados de la degradación de los carotenoides y, en consecuencia, a lo largo de la maduración de la uva, el contenido en carotenoides disminuye mientras que el de C-13 norisoprenoides aumenta (Baumes *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2005; Rambla *et al.*, 2016). En este sentido, el incremento de C-13 norisoprenoides observado en la pulpa de ambas variedades blancas y en el hollejo de TB podría ser consecuencia del aumento observado para algunos carotenoides (Figuras 4.24 y 4.25). Concretamente, el incremento en glucósidos de hidroxib- $\beta$ -ionona podría estar relacionado con el aumento del carotenoide zeaxantina (Figuras 4.24 y 4.25), dado que, in vivo, la zeaxantina es el precursor de la hidroxib- $\beta$ -ionona (Mathieu *et al.* 2005).

Al igual que en otros estudios (Feng *et al.*, 2015), en este caso no se observó una relación general entre el cambio de color de baya y el contenido de compuestos volátiles C6 derivados de ácidos grasos. En ambos tejidos de las variantes blancas aumentó el (E)-2-hexenal y disminuyeron el 1-hexanol y el acetato de (Z)-3-hexenilo (Figuras 4.45, 5.2 y 5.3). Sin embargo, cabe destacar que el aumento del (E)-2-hexenal también se ha detectado en uvas de Sauvignon Blanc expuestas a mayor radiación solar (Joubert *et al.*, 2016). Si bien en algas unicelulares del género *Chlamydomonas* se ha demostrado una posible función de los compuestos derivados de la oxidación de ácidos grasos en la aclimatación a la luz (Fischer *et al.*, 2012), en el caso de las variantes de uva blanca no se puede descartar que su acumulación se produzca como un efecto indirecto de la falta de consumo de esqueletos hidrocarbonados en la síntesis de fenilpropanoides.

En general, el diferente perfil de compuestos aromáticos en las variantes de uva blanca, estaría indicando que las uvas de variedades blancas tienen un potencial aromático diferente como resultado de la ausencia de antocianinas independientemente del genotipo varietal. Así, por ejemplo, en la comparación de la variedad blanca Airén respecto a la variedad tinta Tempranillo (Rambla *et al.*, 2016), Airén mostró mayor acumulación que Tempranillo de norisoprenoides (libres y glicosilados), monoterpenos (libres y glicosilados) y de ciertos compuestos volátiles C6 como el (E)-2-hexenal y menor del 1-hexanol al igual que las variantes blancas aquí estudiadas (Figuras 4.27, 4.28, 4.31 y 4.32). Además, Airén también mostró mayor acumulación del precursor de norisoprenoides y compuesto fotoprotector, el carotenoide zeaxantina,

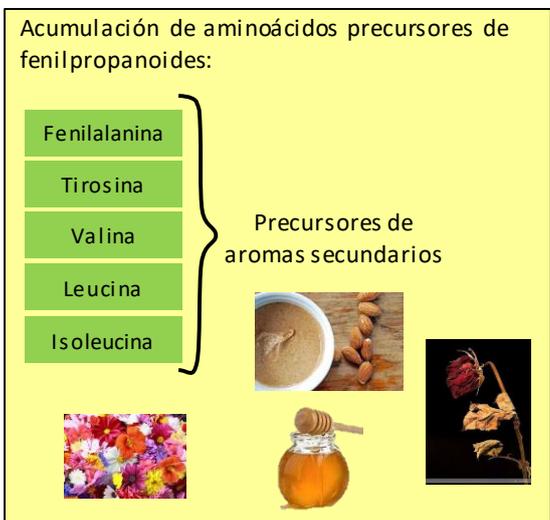
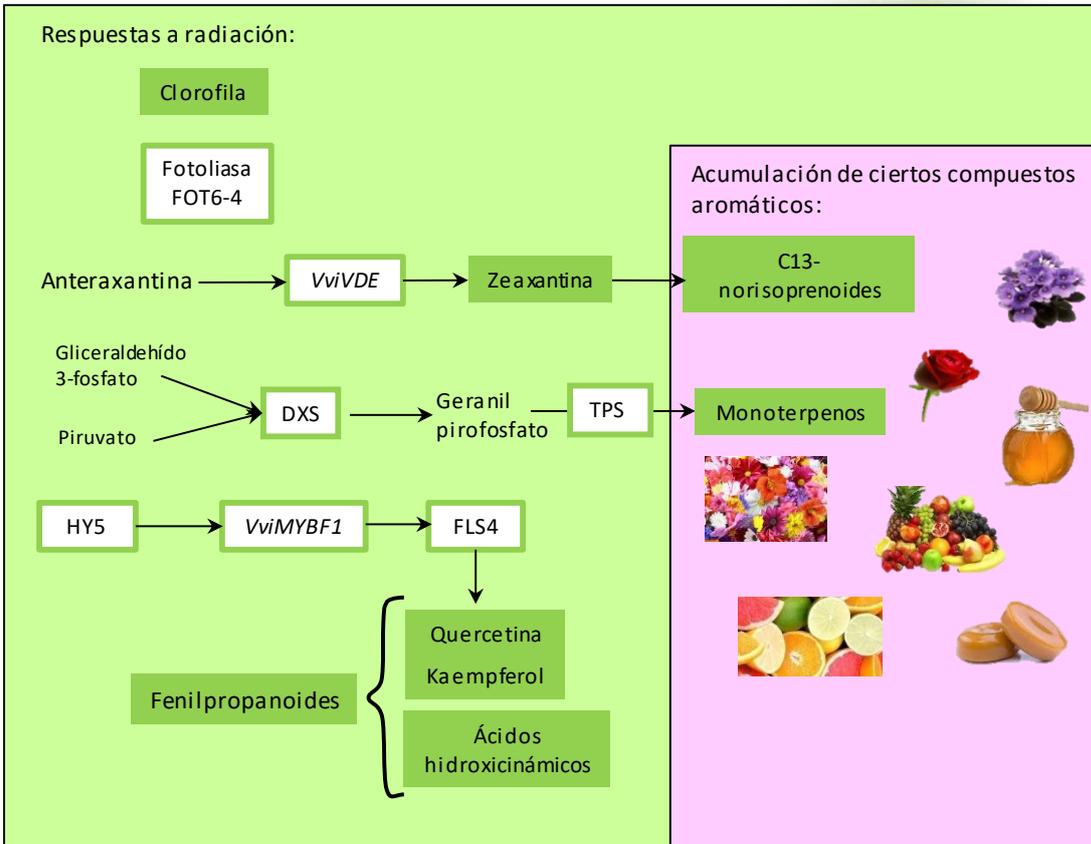
coincidiendo con los efectos observados en las variantes de uva blanca en este trabajo (Figura 4.42).

Como consecuencia de la acumulación de los compuestos volátiles en las variantes blancas, los mostos de TB y de GB podrían tener un perfil aromático diferencial respecto de TT y GT, incluso si se elaborasen como blancos de tintas. Así, la mayor acumulación de compuestos tanto libres como glicosilados de linalol (Figuras 4.27, 4.28, 4.31 y 4.32) (umbral de percepción (UP) = 6 µg/l; Fenoll *et al.*, 2009) aporta aromas con recuerdos a cítricos, flores, caramelo (Peinado *et al.*, 2004; Peinado *et al.*, 2006; Gómez-Míguez *et al.*, 2007) en la misma línea que el  $\alpha$ -terpineol (Figuras 4.31 y 4.32) (UP = 330 µg/l; Fenoll *et al.*, 2009), con recuerdos a lilas, flores y caramelo (Peinado *et al.*, 2004; Gómez-Míguez *et al.*, 2007). De la misma manera, la mayor acumulación de los C13-norisoprenoides como  $\beta$ -ionona (UP = 0,09 µg/l; Ferreira *et al.*, 2000) y  $\beta$ -damascenona (Figura 4.31) (UP = 0,05 µg/l; Guth, H., 1997) puede aportar aromas balsámicos, a rosas y violetas (Peinado *et al.*, 2004) en el primer caso y aromas a caramelo (García-Carpintero *et al.*, 2011a; Mahattanatawee *et al.*, 2007; García-Carpintero *et al.*, 2011b), fruta (García-Carpintero *et al.*, 2011a; García-Carpintero *et al.*, 2011b), flores (Mahattanatawee *et al.*, 2007), miel (Mahattanatawee *et al.*, 2007) y manzana asada (Cullere *et al.*, 2004) en el segundo. El umbral de percepción en el caso de los C13-norisoprenoides es marcadamente más bajo que en el de los monoterpenos, por lo que contribuyen de manera importante al aroma (Wu *et al.*, 2016). Además del incremento en monoterpenos y norisoprenoides, las uvas de GB y TB también acumularon más (E)-2-hexenal (Figura 4.45) (UP = 17 µg/l; Genovese *et al.*, 2013), que aporta aromas con recuerdos a hierba (Genovese *et al.*, 2013) y manzana verde (Jackson 2017). Las uvas blancas presentaron además mayores contenidos en aminoácidos precursores de compuestos aromáticos, como la fenilalanina y la leucina que pueden ser transformados por las levaduras en distintos compuestos volátiles, transformándose transitoriamente en aldehídos y posteriormente en compuestos más estables como son alcoholes y ácidos. Así, la fenilalanina puede dar lugar a 2-feniletanol (con aromas a rosa marchita; Flanzly *et al.*, 2003- (UP = 14 µg/l, Ferreira *et al.*, 2000; 10 µg/l, Guth, 1997) y a 2-fenilacetato (aromas florales, miel; Luebke, 2011) (UP = 250 µg/l; Guth, 1997) y la leucina a 3-metilbutanol (crema de almendras, Flanzly *et al.*, 2003) (UP = 6,3 µg/l, Jackson 2017) (Ehrlich, 1907; Neubauer & Fromherz, 1911).

En conjunto, la mayor acumulación de todos estos compuestos en las uvas de las variantes blancas respecto de las tintas puede dar lugar a vinos con mayor carácter afrutado y floral en TB y en GB respecto a los de TT y GT en particular y, de nuevo, en los vinos elaborados con uvas blancas respecto a los elaborados con uvas tintas en general. La comparación de vinos blancos elaborados a partir de variantes tintas y de variantes blancas con el mismo procedimiento sería una forma de comprobar esta hipótesis. En su defecto, se podría realizar la comparativa de un alto número de vinos jóvenes blancos y tintos. En el caso de Garnacha, un trabajo en el que se compararon los perfiles aromáticos de distintas elaboraciones de GB y GT mostró que el perfil aromático de ambas variedades fue distinto, siendo caracterizados los vinos de GB por aromas afrutados y toques herbáceos y florales (Cibriain *et al.*, datos no publicados).



Mayor percepción de luz



**Figura 5.3. Resumen de los procesos activados en uvas blancas.** En la figura se muestran encuadrados en verde con fondo blanco los enzimas cuyos genes codificantes se sobre-expresan en uvas blancas; se destacan en verde los metabolitos con mayor acumulación en uvas blancas. *FLS*, flavonol sintasa; *VDE*, violaxantina de-epoxidasa; *DXS*, 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; *TPS*, terpeno sintasa. Las uvas blancas acumulan mayores niveles de clorofila y se activan diversos genes relacionados con respuestas a luz: genes codificantes de enzimas fotoliasa; gen *VDE*, asociado a la acumulación de mayores niveles de zeaxantina y de compuestos aromáticos C-13 norisoprenoides; los genes *DXS* y *TPS*, lo que se asocia con un mayor contenido en monoterpenos en uvas blancas. El mayor contenido de antocianinas de TT en comparación con GT, se relaciona con que en TB, en comparación con TT, se detecte la activación de respuestas a radiación adicionales, incluyendo la inducción del gen de respuesta a luz *HY5*, que en uva activa a su vez la sobre-expresión de *VviMYBF1* (Carbonell-Bejerano et al., 2014; Loyola et al., 2016), y éste a su vez a *FLS4*, lo que desemboca en mayor acumulación de los flavonoles quercetina y kaempferol; en TB se acumulan además mayores niveles de ácidos hidroxicinámicos que también responden a la radiación. Las uvas blancas acumulan también mayores niveles de (*E*)-2-hexenal y de aminoácidos precursores de fenilpropanoides, los cuales son a su vez precursores de compuestos del aroma secundario de los vinos.

5.3.3 Factores genéticos varietales modulan los efectos del cambio de color de la baya. Algunas de las respuestas analizadas tanto a nivel metabolómico como transcriptómico fueron dependientes del genotipo varietal, siendo, además, el número de DEG mayor en Tempranillo que en Garnacha (Figura 4.35). Esto indica que existe un componente varietal relevante en los efectos asociados a la variación del color de la baya, que en algunos casos podría asociarse a la diferencia en el contenido de antocianinas entre las variantes tintas, mayor en TT respecto a GT desde envero hasta maduración (Figura 4.19). Confirmando este resultado como un carácter varietal, Hermosín y García-Romero (2004), estudiando las mismas variedades describieron contenidos en antocianinas totales entre tres y cuatro veces superior en TT que en GT. Por su parte, Balda y Martínez de Toda (2017) destacan el TT por poseer un nivel de antocianos notable, mientras que Cibriáin y Rodríguez (2016) clasifican la intensidad colorante de GT como media y la de TT como media-alta. El mayor contenido en antocianinas en TT respecto a GT debe implicar que el cambio en el microclima de la baya ante la pérdida de la capacidad de acumular antocianinas sea más intenso en Tempranillo que en Garnacha. Este efecto se evidencia en el mayor número de DEG relacionados con la fotosíntesis que se observa en TB y en la activación de genes de respuesta a la luz, como el factor *HY5* (*VIT\_04s0008g05210*, *VIT\_05s0020g01090*), que no llega a ser significativa en GB (Tabla suplementaria S16-S19). De hecho, la expresión de *HY5* es mayor en GT que en TT (96 FPKM en GT en E y 60 en TT en E en hollejo; Tablas suplementarias S25 y S26). En este mismo sentido, en TB aumentó la concentración de compuestos con respuesta la luz en mayor medida que en GB, como en el caso de los carotenoides y de los ácidos fenólicos (Figuras 4.41 y 4.42). También en el caso de los flavonoles, en TB aumentaron los niveles de quercetina y kaempferol en respuesta a la mayor incidencia de radiación solar, mientras que en GB no se observó esta respuesta (Figura 4.22). En general, en lo relativo a las respuestas mediadas por la luz, GT presentó un comportamiento intermedio entre TT y las variantes blancas. Los análisis PLS-DA mostraron siempre una posición intermedia de GT entre TT y ambas variantes blancas en el análisis de clorofilas, carotenoides (precursores polares de compuestos volátiles), de ácidos fenólicos y monoterpenos y C13-noisoprenoides

glicosilados (precursores semipolares de compuestos volátiles) y de monoterpenos y C13-norisoprenoides libres (compuestos volátiles) (Figuras 4.23B, 4.26B y 4.30B). Globalmente, la composición de GT fue más similar a la de las variantes blancas que la de TT, y en particular, la composición de GT se asemejó más a la de TB que a la de GB. Todo ello indica que en GT se activan más mecanismos de respuesta a luz que en TT debido a su menor concentración de antocianinas. Así, GT acumula más quercetina (Figura 4.22), monoterpenos y norisoprenoides glicosilados, ácidos fenólicos y compuestos volátiles que TT (Figuras 4.29 y 4.33).

Estas respuestas desembocan en un mayor componente aromático en GT respecto a TT, como muestra el trabajo de García Romero *et al.*, (2002), en el que comprobaron que los vinos de GT tenían más terpenos y en mayor concentración que los de TT. Balda y Martínez de Toda (2017) destacan los vinos tintos de GT por su intensidad aromática, con notas de frutos rojos tipo fresa, frambuesa y cereza, mientras que de TT no destacan nada de sus aromas. Por su parte, Cibrián y Rodríguez (2016) describen la GT como “muy aromática”, con notas de frutas de hueso y fresas, mientras que al TT lo califican como “buena intensidad aromática”, con aromas de frutas del bosque. De hecho, se ha detectado mayor concentración de monoterpenos y de C-13 norisoprenoides en vinos de GT respecto a vinos de TT (Garde *et al.*, 2013). En lo que respecta a los ácidos fenólicos, además de contribuir al aroma mediante su posible transformación durante la fermentación en compuestos volátiles, también contribuyen a la astringencia en los vinos. Así, la mayor concentración de estos en las uvas de GT respecto a TT podría influir en esta característica (Figura 4.29), haciendo los vinos más astringentes. Sin embargo, en los vinos tintos son los flavonoides los que contribuyen principalmente a la astringencia, especialmente los taninos de alto peso molecular, con un coeficiente de detección sensorial (DoT) mucho más alto que el de los ácidos fenólicos (248 frente a 0,6-8,1) (Hufnagel y Hofmann, 2008). En efecto, la variedad GT se define como una variedad que en boca resulta suave y agradable (Balda y Martínez de Toda, 2017).

Mención aparte merece el caso de que la pérdida de color parece resultar en un incremento preferencial de monoterpenos glicosilados en TB y de formas volátiles de estos en GB, lo cual podría responder a diferencias en la estabilidad de los conjugados o a diferente glicosilación en ambas variedades (Figuras 4.27, 4.28, 4.31 y 4.32). Se han caracterizado cuatro glicosiltransferasas relacionadas con la glicosilación de monoterpenos en uva: *GT7*, *GT14*, *GT15* y *GT16* (Bönisch *et al.*, 2014a; Bönisch *et al.*, 2014b). Todas ellas se expresaron en ambas variedades excepto la *GT16* (Tablas suplementarias S25-S28). Por su parte, en el RNA-seq, la *GT14* (*VIT\_18s0001g06060*) mostró mayor número de lecturas en TB (262 FPKM en E y 315 en PM) respecto a GB (186 FPKM en E y 219 FPKM en PM), siendo DEG para el factor color solo en Tempranillo, con mayor expresión en TB que en TT a partir de E (Tabla suplementaria S12). Las otras dos (*GT7* y *GT15*) mostraron un número similar de lecturas en TB y GB (Tablas suplementarias S25-S28). Bönisch *et al.*, (2014b) relacionaron al gen *GT14* con la glicosilación del linalol, lo que sugiere que la mayor concentración de monoterpenos glicosilados en TB se puede deber a su mayor expresión respecto a GB.

Además de las diferencias en la concentración de antocianinas, entre TT y GT también cambia la proporción entre antocianinas dihidroxiladas y trihidroxiladas (Tabla suplementaria S6 y S7), siendo la proporción de dihidroxiladas respecto del total mayor en GT que en TT. Estos resultados coinciden con los de Hermosín y García-Romero (2004) y con los de Gomez-Alonso *et*

*al.*, (2007), que describieron que en Garnacha después de la malvidina, antocianina mayoritaria en las uvas tintas, la segunda antocianina mayoritaria es una antocianina dihidroxilada, la peonidina, mientras que en TT la segunda mayoritaria es una antocianina trihidroxilada, la delphinidina. TT presenta, además, mayores niveles del principal flavonol trihidroxilado, mirecitina, que GT (Tablas suplementarias S6 y S7). El menor contenido en antocianinas unido a la menor proporción de antocianinas y flavonoles trihidroxilados en GT respecto a TT junto con la menor expresión de los genes que codifican F3'5'H y enzimas de la ruta de síntesis de antocianinas, podría sugerir que GT presenta menor actividad de los genes *VviMYBA*, o al menos del *VviMYBA1*. En este sentido, el número de lecturas de *VviMYBA1* observado en TT en el RNA-seq (289 FPKM promedio en E y 174 en PM) es algo mayor que el de GT (211 FPKM en E y 135 FPKM en PM) (Tablas suplementarias S25 y S26), por lo que podría haber polimorfismos adicionales en *cis* o en *trans* que deriven en distinta actividad. Sin embargo, el nivel de expresión de *VviMYBA2* fue similar en ambas variedades. En lo que respecta a la ruta de flavonoides y antocianinas, los genes codificantes de las enzimas CHS, CHI, F3H, DFR, UFGT y el gen de transporte de antocianinas GSTF4, presentaron menor expresión en GT respecto a TT (Tablas suplementarias S25 y S26), al igual que *VviMYBA1*. Las diferencias en el color que se aprecia entre vinos de GT y TT, más rojizos en el primer caso y más azulados en el segundo, se debería, al menos en parte, a la diferente proporción entre antocianinas trihidroxiladas y dihidroxiladas en ambas variedades, dado que las antocianinas dihidroxiladas aportan colores rojos, mientras que las antocianinas trihidroxiladas aportan colores morados (Flamini *et al.*, 2013). En el caso de los flavonoles, la diferente proporción entre mirecitina y quercetina en GT y TT no afectaría a la sensación en boca (Sáenz-Navajas *et al.*, 2012) de ambos tipos de vinos.

Por último, algunos de los efectos varietales específicos podrían estar en parte condicionados por el mecanismo mutacional que originó las variantes blancas. De esta manera, un grupo de DEG con expresión disminuida en TB en comparación con TT, independientemente del tejido de la baya, está enriquecido en genes ubicados en las regiones de los cromosomas 2 y 5 que se encuentran en hemigiosis en TB (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017) (Tablas suplementarias S25 y S27), y estas diferencias podrían resultar en alguna diferencia fenotípica adicional no identificada. Este resultado indica que el número de copias homólogas afecta a los niveles de expresión génica (Hou *et al.*, 2018).

# 6. Conclusions



## 6 CONCLUSIONS

1. In the Garnacha Blanca accesions studied, traits related with production display high phenotypic variation and low stability among years, being fruitset the main variable determining production and bunch compactness variation. Traits related with berry size present lower variation and higher stability.
2. The genetic variation detected for traits of breeding interest such as production and bunch compactness among the characterized accesions of Garnacha Blanca is suitable to develop clonal selection programs based of them.
3. The loss of heterozygosity together with the reduction of copy number in the *VviMYBA* region of chromosome 2 indicate that the somatic loss of berry color in Garnacha Blanca is due to the deletion of the functional alleles of the color locus.
4. The different deletion patterns detected in this study demonstrate the existence of at least two independent molecular events resulting in color loss of the Garnacha Blanca analyzed. The geographic distribution of the two deletions in Navarra and Rioja suggests that they could be related to the clonal lineage of Garnacha Tinta from which they were derived. None of the deletions affect gamete viability or production and bunch compactness traits.
5. Apart from their known role on the regulation of anthocyanins biosynthesis, the results indicate that *VviMYBA* genes directly or indirectly control the partitioning and acumulation of phenylpropanoids, including the biosynthesis of the flavonoid backbones, flavonols trihydroxylation and anthocyanins translocation to the vacuole.
6. The results indicate that *VviMYBA* genes are involved in the accumulation of GABA and proline amino acids and in the expression of genes such as *DREBs* y *PP2Cs*, related to protection against abiotic stress. They are also related to the synthesis of defense signaling molecules such as LIPOXYGENASE and effector genes for pathogen interaction. This altogether with the known function of phenylpropanoids suggest that the biological function of the *VviMYBA* genes is related to the activation of mechanisms that protect the embryo and the fruit.
7. In the absence of anthocyanins and of their sunscreen role, white grapes perceive more radiation and activate responses to light and promote the accumulation of alternative photoprotectors and antioxidants, including carotenoids, phenolic acids, flavonols and monoterpenes. Together with the accumulation of phenylpropanoid precursors, mainly amino acids, these light-related responses alter the composition of white grapes and may contribute to the floral, white fruit and herbaceous aromatic character of white musts and derived wines.

8. Differences in grape composition and gene expression detected between Garnacha Tinta and Tempranillo Tinto indicate that genetic variation for anthocyanin levels may indirectly determine varietal flavour attributes in black-berried cultivars due to changes in the berry microclimate.

## BIBLIOGRAFIA

- Acevedo De la Cruz, A., Hilbert, G., Rivière, C., Mengin, V., Ollat, N., Bordenave, L., Decroocq, S., Delaunay, J. C., Delrot, S., Mérillon, J. M., Monti, J. P., Gomès, E., Richard, T.** (2012). Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC-MS and LC-NMR. *Analytica Chimica Acta*, 732, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.060>
- Adam-Blondon, A-F., Jaillon, O., Vezzulli, S., Zharkikh, A., Troggio, M., Velasco, R.** (2011). Genome sequence initiatives, in: A.-F. Adam-Blondon, J.M. Martinez-Zapater, Chittaranjan Kole (Eds.), *Genetics, Science Publishers and CRC Press, Genomics and Breeding of Grapes*, 2011, pp. 211–234.
- Agati, G., Tattini, M.** (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186(4), 786–793. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x>
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M.** (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
- Aguirrezabal, F., Pejenaute, J., Pérez, J. J., Cibriain, J. F., Sagués, A., Astrain, J., Baigorri, H., Ulibarri, J., Ansorena, F., Suberviola, J.** (2004). Selección clonal y sanitaria de vid en Navarra. Variedad Garnacha. 1988-2003. Investigación Agraria. Gobierno de Navarra. ISBN 84-235-2548-1.
- Alexander MP.** 1969. Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain Technology*; 44:117-22. <https://doi.org/10.3109/10520296909063335>
- Allen, J. E., Salzberg, S. L.** (2005). JIGSAW: Integration of multiple sources of evidence for gene prediction. *Bioinformatics*, 21(18), 3596–3603. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti609>
- Anders, S., Pyl, P. T., Huber, W.** (2015) HTSeq: a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31: 166–169
- Anderson, M. M., Smith, R. J., Williams, M. A., Wolpert, J. A.** (2008). Viticultural evaluation of French and California Pinot noir clones grown for production of sparkling wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(2), 188–193.
- Andreu, J., Bruna, P., Franco, E., Usón, J., Gogorcena, Y., Domingo, C., Elorduy, X., Baroja, E., Martínez, J., Cibriáin, J. F., Rodríguez, M., Suberviola, J.** (2016). Selección clonal de la Garnacha blanca en el Valle del Ebro: propuesta de colaboración entre diferentes zonas vitícolas. 31ª Reunión del Grupo de Trabajo en Experimentación de Viticultura y Enología. Madrid, abril de 2016. ISBN 978-84-491-1478-6.
- Aynew, B., Degu, A., Manela, N., Perl, A., Shamir, M. O., and Fait, A.** (2015). Metabolite profiling and transcript analysis reveal specificities in the response of a Berry derived cell culture to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 6, 728. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00728>
- Azuma, A., Kobayashi, S., Yakushiji, H., Yamada, M., Mitani, N., Sato, A.** (2007). VvmybA1 genotype determines grape skin color. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 46(3), 154–155.

- Azuma, A., Yakushiji, H., Koshita, Y., Kobayashi, S.** (2012). Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions. *Planta*, 236(4), 1067–1080. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1650-x>
- Baggiolini, M.**, (1952). Les stades repérés dans le développement bannuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture*, 8:4-6.
- Balda, P. J. y Martínez de Toda, F.** (2017). Variedades minoritarias de vid en La Rioja. Gobierno de La Rioja.
- Balda, P. J.** (2014). Identificación y caracterización completa de (ampelográfica, genética, agronómica, enológica, polifenólica, aminoacídica, aromática y sensorial) de variedades tintas minoritarias de la D. O. Ca. Rioja. Tesis doctoral. Universidad de La Rioja.
- 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/err231>
- Baumes, R., Wirth, J., Bureau, S., Gunata, Y., Razungles, A.** (2002). Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: Experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 3–14. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01589-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01589-6)
- Becker, T., Knoche, M.** (2012). Water induces microcracks in the grape berry cuticle. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 51(3), 141–142.
- Bessis, R.** (1993) La maîtrise des rendements. *Revue Des Oenologues* 19, 7–10.
- Blanco-Ulate, B., Amrine, K. C., Collins, T. S., Rivero, R. M., Vicente, A. R., Morales-Cruz, A., Doyle, C. L., Ye, Z., Allen, G., Cantu, D.** (2015). Developmental and metabolic plasticity of white-skinned grape berries in response to *Botrytis cinerea* during noble rot. *Plant Physiology*, 169 (4) 2422-2443. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00852>
- Blas, A. L., Ming, R., Liu, Z., Veatch, O. J., Paull, R. E., Moore, P. H., Yu, Q.** (2010). Cloning of the Papaya Chromoplast-Specific Lycopene b -Cyclase, CpCYC-b, Controlling Fruit Flesh Color Reveals Conserved Microsynteny and a Recombination Hot Spot. *Plant Physiology*, 152(April 2010), 2013–2022. <https://doi.org/10.1104/pp.109.152298>
- Bogs, J., Jaffe, F. W., Takos, A. M., Walker, A. R. Robinson, S. P.** (2007). The Grapevine Transcription Factor VvMYBPA1 Regulates Proanthocyanidin Synthesis during Fruit Development. *Plant Physiology*, 143(March), 1347–1361. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093203>
- Bönisch, F., Frotscher, J., Stanitzek, S., Ruhl, E., Wüst, M., Bitz, O., Schwab, W.** (2014a). A UDP-Glucose:Monoterpenol Glucosyltransferase Adds to the Chemical Diversity of the Grapevine Metabolome. *Plant Physiology*, 165(2), 561–581. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232470>
- Bönisch, F., Frotscher, J., Stanitzek, S., Rühl, E., Wüst, M., Bitz, O., Schwab, W.** (2014b). Activity-Based Profiling of a Physiologic Aglycone Library Reveals Sugar Acceptor Promiscuity of Family 1

UDP-Glucosyltransferases from Grape. *Plant Physiology*, 166(1), 23–39. <https://doi.org/10.1104/pp.114.242578>

**Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P.** (1996a). Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2(3), 163–170. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1996.tb00104.x>

**Boss, P. K., Davies, C., & Robinson, S. P.** (1996b). Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Shiraz and implications for pathway regulation. *Plant Physiology*, 111 (4), 1059–1066.

**Bouche, N. Fromm, H.** (2004). GABA in plants: just a metabolite? *TRENDS in Plant Science*. 9, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.01.006>

**Bowers, J. Boursiquot, J. M., This, P., Chu, K., Johansson, H., Meredith, C.** (1999). Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. *Science* 285, 1562–1565. DOI: 10.1126/science.285.5433.1562

**Brandi, F., Bar, E., Mourgues, F., Horváth, G., Turcsi, E., Giuliano, G., Liverani, A., Tartarini, S., Lewinsohn, E., Rosati, C.** (2011). Study of “Redhaven” peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-24>

**Brown, B. A., Cloix, C., Jiang, G. H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D. J., & Jenkins, G. I.** (2005). A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *PNAS*, 102(50), 18225–18230. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507187102>

**Buttrose, M.S.** (1974). Climatic factors and fruitfulness in grapevines. *Horticultural Abstracts* 44, 319–326.

**Cabello, F., Ortiz, J. M., Muñoz, G., Rodríguez, I., Benito, A., Rubio, C., García, S., Sáiz, R.** (2012). Variedades de vid en España. AMV-Ediciones.

**Cabezas, J. A., Ibáñez, 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*, 2011, 11:153 <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-153>

**Canaguier, A., Grimplet, G., Di Gaspero, G., Scalabrin, S., Duchêne E., Choisne, N., Mohellibi, N., Guichard, C., Rombauts, S., Le Clainche, I., Bérard, A., Bounon, Chauveau, A., Bounon, R., Rustenholz, C., Morgante, M., Le Paslier, M-C., Brunel, D., Adam-Blondon, A-F.** (2017). A new version of the grapevine reference genome assembly (12X.v2) and of its annotation (VCost.v3). *Genomics Data*, 14(July), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.09.002>

**Candolfi-Vasconcelos, M. C., Candolfi, M. P., & Koblet, W.** (1994). Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L. *Planta*, 192, 567–573. <https://doi.org/10.1007/BF00203595>

**Carbonell-Bejerano, P., Diago, M. P., Martínez-Abaigar, J., Martínez-Zapater, J. M., Tardaguila, J., & Núñez-Olivera, E.** (2014). Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit

ripening transcriptional and phenolic responses. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-183>

**Carbonell-Bejerano, P., Rodríguez, V., Hernáiz, S., Royo, C., Dal Santo, S., Pezzotti, M., Martínez-Zapater, J. M.** (2016). Reducing sampling bias in molecular studies of grapevine fruit ripening: transcriptomic assessment of the density sorting method. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 28(1), 109–129. <https://doi.org/10.1007/s40626-016-0059-5>

**Carbonell-Bejerano, P., Royo, C., Torres-Pérez, R., Grimplet, J., Fernandez, L., Franco-Zorrilla, J. M., Lijavetzky, D., Baroja, E., Martínez, J., García-Escudero, E., Ibáñez, J., Martínez-Zapater, J. M.** (2017). Catastrophic unbalanced genome rearrangements cause somatic loss of berry color in grapevine. *Plant Physiology*, 175, pp. 786–801. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00715>

**Carbonneau, A., Deloire, A. Jaillard, B.** (2007) *La Vigne. Physiologie, Terroir, Culture.* (Dunod: Paris).

**Carmona, M. J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J. M., Thomas, M. R.** (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 59(10), 2579–2596. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern160>

**Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodríguez-Concepción, M., Ferrer, A., Boronat, A., Campos, N.** (2002). Expression and Molecular Analysis of the Arabidopsis. *Society*, 129(August), 1581–1591. <https://doi.org/10.1104/pp.003798.involved>

**Castellarin, S. D., Gaspero, G. Di, Marconi, R., Nonis, A., Peterlunger, E., Paillard, S., Adam-Blondon, A. F., Testolin, R.** (2006). Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics* 2006 7:12, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-12>

**Castellarin, S. D., Di Gaspero, G.** (2007). Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-46>

**Castellet, B.** (1865). *Enología española o tratado sobre los vinos de España y su bonificación.* Imprenta de Gomez e Inglada.

**Cavallini, E., Matus, J. T., Finezzo, L., Zenoni, S., Loyola, R., Guzzo, F., Schlechter, R., Ageorges, A., Arce-Johnson, P., Tornielli, G. B.** (2015). The Phenylpropanoid Pathway Is Controlled at Different Branches by a Set of R2R3-MYB C2 Repressors in Grapevine. *Plant Physiology*, 167(4), 1448–1470. <https://doi.org/10.1104/pp.114.256172>

**Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., Fan, B.** (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4(6), 493–496. <https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8392>

**Cheng, A.-X., Mao, Y.-B., Chen, X.-Y., Wang, L.-J., Lu, S., Lou, Y.-G.** (2007). Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2), 179–186. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x>

- Cheng, G., Liu, Y., Yue, T., Zhang, Z.** (2015). Comparison between aroma compounds in wines from four *Vitis vinifera* grape varieties grown in different shoot positions. *Food Science and Technology*, 35(2), 237–246. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Chin, C., Peluso, P., Sedlazeck, F. J., Nattestad, M., Gregory, T., Clum, A., Christopher Dunn, C., O'Malley, R., Figueroa-Balderas, R., Morales-Cruz, A., Cramer, G. R., Delledonne, M., Luo, C., Ecker, J. R., Cantu, D., Rank, D. R., Schatz, M. C.** (2017). Phased Diploid Genome Assembly with Single Molecule Real-Time Sequencing. *Nature Methods*, 13(12), 1050–1054. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4035.Phased>
- Chong, I. G., & Jun, C. H.** (2005). Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 78(1), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.011>
- Cibriáin, J. F., Sagüés, A., Caminero, L., Subirats, I., Oria, I., Arrondo, C., Marzo, J. M., Aguirrezabal, F., Suberviola, J.** (2014). Garnacha Blanca de Navarra. Recopilación, identificación y mantenimiento de viníferas en Navarra. *Navarra Agraria* 203, 15-21.
- Cibriáin, J. F. y Rodríguez, M.** (2015). Guía de variedades minoritarias I. Variedades minoritarias de Navarra. ISBN: 978-84-491-1450-2
- Clingeffer, P. R.** (2006). Management practices for Sunmuscat (*Vitis vinifera* L.): A new drying variety. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 128–134. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00052.x>
- Conesa, A., Nueda, M. J.** (2018). maSigPro: Significant Gene Expression Profile Differences in Time Course Gene Expression Data. R package version 1.54.0. DOI: 10.18129/B9.bioc.maSigPro
- Coombe B. G., Hale C. R.** (1973). Hormone content of ripening grape berries and effects of growth substance treatments. *Plant Physiology* 51, 629–634. <https://doi.org/10.1104/pp.51.4.629>
- Crupi, P., Milella, R. A., Antonacci, D.** (2010). Simultaneous HPLC-DAD-MS (ESI+) determination of structural and geometrical isomers of carotenoids in mature grapes. *Journal of Mass Spectrometry* 45,971–980. <https://doi.org/10.1002/jms.1794>
- Cutanda-Perez, M. C., Ageorges, A., Gomez, C., Vialet, S., Terrier, N., Romieu, C., Torregrosa, L.** (2009). Ectopic expression of VlmbyA1 in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant Molecular Biology*, 69(6), 633–648. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9446-x>
- Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J. Ferreira, V.** (2004). Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52, 1653–1660, doi: 10.1021/jf0350820.
- Czemmel, S., Stracke, R., Weisshaar, B., Cordon, N., Harris, N. N., Walker, A. R., Robinson, S. P., Bogs, J.** (2009). The Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor VvMYB1 Regulates Flavonol Synthesis in Developing Grape Berries. *Plant Physiology*, 151(3), 1513–1530. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142059>

- Dai, Z. W., Ollat, N., Gomès, E., Decroocq, S., Tandonnet, J. P., Bordenave, L., Pieri, P., Hilbert, G., Kappel, C., van Leeuwen, C., Vivin, P., Delrot, S.** (2011). Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), 413–425. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10116>
- De Lorenzis, G., Squadrito, M., Brancadoro, L., Scienza, A.** (2015). Zibibbo Nero Characterization, a Red-Wine Grape Revertant of Muscat of Alexandria. *Molecular Biotechnology*, 57(3), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9820-7>
- De Lorenzis, G., Squadrito, M., Rossoni, M., di Lorenzo, G. S., Brancadoro, L., Scienza, A.** (2017). Study of intra-varietal diversity in biotypes of Aglianico and Muscat of Alexandria (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(1), 132–142. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12247>
- De Saporta, G.** (1879). *Le monde des plantes avant l'apparition de l'homme*. Masson
- De Vos, R. C. H., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J. J. B., Bino, R. J., Hall, R. D.** (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2(4), 778–791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.95>
- Degu, A., Morcia, C., Tumino, G., Hochberg, U., Toubiana, D., Mattivi, F., Schneider, A., Bosca, P., Cattivelli, C., Terzi, V., Fait, A.** (2015). Metabolite profiling elucidates communalities and differences in the polyphenol biosynthetic pathways of red and white Muscat genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.006>
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J-P., Merillon, J-M. and Hamdi, S.** (2006). Characterization of a Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiology*, 140(2), 499–511. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067231>
- Deluc, L., Bogs, J., Walker, A. R., Ferrier, T., Decendit, A., Merillon, J.-M., Robinson, S. P., Barrieu, F.** (2008). The Transcription Factor VvMYB5b Contributes to the Regulation of Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis in Developing Grape Berries. *Plant Physiology*, 147(4), 2041–2053. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118919>
- Demmig-Adams, B., Adams, W. W.** (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1(1), 21–26. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80019-7)
- Díaz-Riquelme, J., Zhurov, V., Rioja, C., Pérez-Moreno, I., Torres-Pérez, R., Grimplet, J., Carbonell-Bejerano, P., Bajda, S., Van Leeuwen, T., Martínez-Zapater, J.M., Grbic, M., Grbic, V.** (2016). Comparative genome-wide transcriptome analysis of *Vitis vinifera* responses to adapted and non-adapted strains of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *BMC Genomics*, 17, 74. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2401-3>
- Doazan, J.-P. and Rives, M.** (1967). Sur le déterminisme génétique de sexe dans le genre *Vitis*. *Ann. Amélior. Plantes* 17, 105–111
- Doligez, A., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S., Meredith, C. P., Edwards, K. J., This, P.** (2002). Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for

seedlessness and berry weight. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(5), 780–795. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0951-z>

**Domingo, C., Puig, S.** (2015). *Guía de variedades minoritarias I. Variedades minoritarias de Cataluña*. ISBN: 978-84-491-1450-2

**Dry, P. R., Longbottom, M. L., McLoughlin, S., Johnson, T. E., Collins, C.** (2010). Classification of reproductive performance of ten winegrape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00085.x>

**Du Plessis, K., Young, P. R., Eyéghé-Bickong, H. A., Vivier, M. A.** (2017). The Transcriptional Responses and Metabolic Consequences of Acclimation to Elevated Light Exposure in Grapevine Berries. *Frontiers in Plant Science*, 8(July). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01261>

**Duchêne, E.; Butterlin, G.; Claudel, P.; Dumas, V.; Jaegli, N.; Merdinoglu, D.** (2009). A grapevine (*Vitis vinifera* L.) deoxy-d-xylulose synthase gene colocates with a major quantitative trait loci for terpenol content. *Theoretical and Applied Genetics* 118, 541–552. DOI: 10.1007/s00122-008-0919-8

**Dubey, V.S., Bhalla, R., Luthra, R.** (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences* 28(5):637-46.

**Eltom, M., Winefield, C. S., Trought, M. C. T.** (2014). Effect of pruning system, cane size and season on inflorescence primordia initiation and inflorescence architecture of *Vitis vinifera* L. Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(3), 459–464. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12097>

**Eltom, M., Winefield, C., Trought, M. C. T.** (2015). Effects of shoot girdling and/or periodic leaf removal on inflorescence primordia initiation and development in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(1), 118–122. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12113>

**Eltom, M., Trought, M. C. T., Agnew, R., Parker, A., Winefield, C. S.** (2017). Pre-budburst temperature influences the inner and outer arm morphology, phenology, flower number, fruitset, TSS accumulation and variability of *Vitis vinifera* L. Sauvignon Blanc bunches. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(2), 280–286. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12260>

**Emanuelli, F., Battilana, J., Costantini, L., Cunff, L. Le, Boursiquot, J., This, P., & Grando, M. S.** (2010). A candidate gene association study on muscat flavor in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*, 10(1), 241. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-241>

**Emanuelli, F., Lorenzi, S., Grzeskowiak, L., Catalano, V., Stefanini, M., Troglio, M., Myles, S., Martinez-Zapater, J. M., Zyprian, E., Moreira, F. M., Grando, M. S.** (2013). Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-39>

- Emanuelli, F., Sordo, M., Lorenzi, S., Battilana, J., Grando, M. S.** (2014). Development of user-friendly functional molecular markers for VvDXS gene conferring muscat flavor in grapevine. *Molecular Breeding*, 33(1), 235–241. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9929-6>
- Ehrlich, F.** (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *European Journal of Inorganic Chemistry* 40 (1): 1027–1047. <https://doi.org/10.1002/cber.190704001156>
- Evans, C., Paganga, G., Miller, J. N.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Fasoli, M., Richter, C. L., Zenoni, S., Bertini, E., Vitulo, N., Santo, D., Dokoozlian, N., Pezzotti, N., Battista, G.** (2018). Timing and Order of the Molecular Events Marking the Onset of Berry Ripening in Grapevine. *Plant Physiology*, 178, 1187–1206. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00559>
- Feng, H., Yuan, F., Skinkis, P. A., Qian, M. C.** (2014). Influence of cluster zone leaf removal on Pinot noir grape chemical and volatile composition. *Food Chemistry*, 173, 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.149>
- Fenoll, J., Manso, A., Hellin, P., Ruiz, L. Flores, P.** (2009). Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening. *Food Chemistry*, 114, 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.060>
- 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. *Plant Journal*, 61(4), 545–557. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04090.x>
- Fernández, L., Chäib, J., Martínez-Zapater, J. M., Thomas, M. R., Torregrosa, L.** (2013). Mis-expression of a PISTILLATA-like MADS box gene prevents fruit development in grapevine. *Plant Journal*, 73(6), 918–928. <https://doi.org/10.1111/tpj.12083>
- Ferreira, V., López, R., Cacho, J.F.,** (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wine from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1659–1667. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000901\)80:11<1659::AID-JSFA693>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1659::AID-JSFA693>3.0.CO;2-6)
- Ferreira, V., Fernandes, F., Pinto-Carnide, O., Valentão, P., Falco, V., Martín, J. P., Ortiz, J. M., Arroyo-García, R., Andrade, P. B., Castro, I.** (2016). Identification of *Vitis vinifera* L. grape berry skin color mutants and polyphenolic profile. *Food Chemistry*, 194, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.142>
- Ferreira, V., Fernandes, F., Carrasco, D., Hernandez, M. G., Pinto-Carnide, O., Arroyo-García, R., Andrade, P., Valentão, P., Falco, V., Castro, I.** (2017). Spontaneous variation regarding grape berry skin color: A comprehensive study of berry development by means of biochemical and molecular markers. *Food Research International*, 97, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.050>

**Ferreira, V., Castro, I., Carrasco, D., Pinto-Carnide, O., Arroyo-García, R.** (2018). Molecular characterization of berry skin color reversion on grape somatic variants. *Journal of Berry Research*, 8(3), 147–162. <https://doi.org/10.3233/JBR-170289>

**Fischer, B. B., Ledford, H. K., Wakao, S., Huang, S. G., Casero, D., Pellegrini, M., Merchant, S. S., Koller, A., Eggen, R. I. L., Niyogi, K. K.** (2012). SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20), E1302–E1311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116843109>

**Fischer, B. M., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K. J., Töpfer, R., & Zyprian, E. M.** (2004). Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(3), 501–515. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1445-3>

**Flamini, R., Mattivi, F., Arapitsas, P., Bavaresco, L., Rosso, M.** (2013). Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19651–19669. <https://doi.org/10.3390/ijms141019651>

**Flancy, C.** (2003). *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones.

**Foster, T. M., Aranzana, M. J.** (2018). Attention sports fans! The far-reaching contributions of bud sport mutants to horticulture and plant biology. *Horticulture Research*, 5(1), 44. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0062-x>

**Fougère-Rifot, M., Park, H. S., Bouard, J.** (1995). Données nouvelles sur l'hypoderme et la pulpe des baies normales et des baies millerandées d'une variété de *Vitis vinifera* L., le Merlot noir. *Vitis*, 34, 1–7.

**Fournier-Level, A., Le Cunff, L., Gomez, C., Doligez, A., Ageorges, A., Roux, C., Bertrand, Y., Souquet, J. M., Cheynier, V., This, P.** (2009). Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) berry: A quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study. *Genetics*, 183(3), 1127–1139. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.103929>

**Franks, T., Botta, R., Thomas, R.** (2002). Chimerism in grapevine implications for cultivar identity ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 192–199. <https://doi.org/10.1007/s001220100683>

**Friedel, M., Frotscher, J., Nitsch, M., Hofmann, M., Bogs, J., Stoll, M., Dietrich, H.** (2016). Light promotes expression of monoterpene and flavonol metabolic genes and enhances flavour of winegrape berries (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(3), 409–421. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12229>

**Galet, P.** (2000). *General Viticulture*. (J. Towey, Trans.) Chaintré, France: Oenoplurimédia.

**García-Carpintero, E. G., Sánchez-Palomo, E., Gallego, M. A. G. González-Viñas, M. A.** (2011a). Volatile and sensory characterization of red wines from cv. Moravia Agria minority grape variety cultivated in La Mancha region over five consecutive vintages. *Food Research International* 44, 1549–1560. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.022>

**García-Carpintero, E. G., Sanchez-Palomo, E., Gomez Gallego, M. A. Gonzalez-Vinas, M. A.** (2011b). Effect of cofermentation of grape varieties on aroma profiles of la mancha red wines. *Journal of Food Science* 76, C1169–C1180. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02374.x>

**García de los Salmones, N.** (1914). Las variedades de vid propias de cada comarca española y sus vinos. Estudio general conjunto. Congreso nacional de viticultura. Memoria general de las sesiones del congreso y ponencias presentadas.

**García-Romero, E., Chacón Vozmediano, J.L., Martínez Gascueña, J., Izquierdo Cañas, P.M.** (2002). Los compuestos volátiles en las uvas de las variedades Cencibel, Cabernet Sauvignon y Garnacha cultivadas en la región de La Mancha Central durante la maduración. *Viticultura enología profesional*, ISSN 1131-5679, 80, 45-58.

**Garde-Cerdán, T., González-Arenzana, L., López, N., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I.** (2013). Effect of different pulsed electric field treatments on the volatile composition of Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.08.008>

**Genovese, A., Piombino, P., Gambuti, A., Moio, L.** (2009). Simulation of retronasal aroma of white and red wine in a model mouth system. Investigating the influence of saliva on volatile compound concentrations. *Food Chemistry*, 114(1), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.022>

**Genovese, A., Lamorte, S. A., Gambuti, A. Moio, L.** (2013). Aroma of Aglianico and Uva di Troia grapes by aromatic series. *Food Research International* 53 (1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.051>

**Giannetto, S., Velasco, R., Troglio, M., Malacarne, G., Storchi, P., Cancellier, S., De Nardi, B., Crespan, M.** (2008). A PCR-based diagnostic tool for distinguishing grape skin color mutants. *Plant Science*, 175(3), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.010>

**Gil, M., Pascual, O., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., Zamora, F., Canals, J. M., Hermosín-Gutiérrez, I.** (2015). Influence of berry size on red wine colour and composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(2), 200–212. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12123>

**Gomez, C., Terrier, N., Torregrosa, L., Vialet, S., Fournier-Level, A., Verries, C., Souquet, J. M., Mazauric, J. P., Klein, M., Cheynier, V., Ageorges, A.** (2009). Grapevine MATE-Type Proteins Act as Vacuolar H<sup>+</sup>-Dependent Acylated Anthocyanin Transporters. *Plant Physiology*, 150(1), 402–415. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135624>

**Gomez, L., Bancel, D., Rubio, E., Gilles, V.** (2007). The microplate reader: an efficient tool for the separate enzymatic analysis of sugars in plant tissues – validation of a micro-method. *Journal of Science Food and Agriculture*, 87:1893–1905. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2924>

**Gómez-Alonso, S., Fernández-González, M., Mena, A., Martínez, J., García-Romero, E.** (2007). Anthocyanin profile of Spanish *Vitis vinifera* L. red grape varieties in danger of extinction. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(3), 150–156. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2007.tb00245.x>

**Gómez-Míguez, M. J., Gómez-Míguez, M., Vicario, I. M. Heredia, F. J.** (2007). Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. *Journal of Food Engineering* 79, 758–764. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.038>

**Gordon, M. H., Roedig-Penman, A.** (1998). Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 97(1), 79–85. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00098-X)

**Grimplet, J., Van Hemert, J., Carbonell-Bejerano, P., Díaz-Riquelme, J., Dickerson, J., Fennell, A., Pezzotti, M., Martínez-Zapater, J. M.** (2012). Comparative analysis of grapevine whole-genome gene predictions, functional annotation, categorization and integration of the predicted gene sequences. *BMC Research Notes*, 5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-213>

**Grimplet, J., Tello, J., Laguna, N., Ibáñez, J.** (2017). Differences in flower transcriptome between grapevine clones are related to their cluster compactness, fruitfulness, and berry size. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00632>

**Grimplet, J., Ibáñez, S., Baroja, E., Tello, J., Ibáñez, J.** (2019). Phenotypic, Hormonal, and Genomic Variation Among *Vitis vinifera* Clones With Different Cluster Compactness and Reproductive Performance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01917>

**Guth, H.** (1997). Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3022–3026. DOI: 10.1021/jf9608433

**Habran, A., Commisso, M., Helwi, P., Hilbert, G., Negri, S., Ollat, N., Gomès, E., van Leeuwen, C., Guzzo, F., Delrot, S.** (2016). Roostocks/Scion/Nitrogen interactions affect secondary metabolism in the grape berry. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01134>

**Hale, C. R., Weaver, R. J.** (1962). The effect of developmental stage on direction of translocation of photosynthate in *Vitis vinifera*. *Hilgardia*, 33, 89–131.

**Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., Ahmad, A.** (2012). Role of proline under changing environments. A review. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456–1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>

**Hed, B., Ngugi, H. K., Travis, J. W.** (2009). Relationship Between Cluster Compactness and Bunch Rot in Vignoles Grapes. *Plant Disease*, 93(11), 1195–1201. <https://doi.org/10.1094/pdis-93-11-1195>

**Hermosín-Gutiérrez, I., García-Romero, E.** (2004). Anotaciones de variedades tintas cultivadas en la Mancha perfiles varietales característicos de la uva y de los vinos monovarietales, y evolución durante la maduración de la baya . *Alimentaria Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 352, 127-139.

**Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, A., Melendez Martinez, A., Heredia, F.** (2008). Comparison of the effectiveness of solid-phase and ultrasound-mediated liquid–liquid extractions to determine the volatile compounds of wine. *Talanta*, 76(4), 929–935. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.049>

**Hidalgo, J.** (1870). *Tratado del cultivo de la vid en España y modo de mejorarlo*. Librería y fábrica de Rayados de Luis Niubo.

**Hilbert, G., Soyer, J. P., Molot, C., Giraudon, J., Milin, S., Gaudillere, J. P.** (2003). Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis*, 42(2), 69–76.

**Hilbert, G., Tamsamani, H., Bordenave, L., Pedrot, E., Chaher, N., Cluzet, S., Delaunay, J. C., Ollat, N., Delrot, S., Mérillon, J. M., Gomès, E., Richard, T.** (2015). Flavonol profiles in berries of wild *Vitis* accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. *Food Chemistry*, 169, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.079>

**Houa, J., Johnson, A. F., Cheng, J., Kanno, T., Birchler, J. A., Ji, T., Matzke, M., Chen, C., Shi, X. et al.** (2018). Global impacts of chromosomal imbalance on gene expression in Arabidopsis and other taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(48), E11321–E11330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807796115>

**Houel, C., Martin-Magniette, M. L., Nicolas, S. D., Lacombe, T., Le Cunff, L., Franck, D., I. Torregrosa, L., Conéjéro, G., Lalet, S., This, P., Adam-Blondon, A. F.** (2013). Genetic variability of berry size in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(2), 208–220. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12021>

**Houel, C., Chatbanyong, R., Doligez, A., Rienth, M., Foria, S., Luchoire, N., Roux, C., Adivèze, A., Lopez, G., Farnos, M., Pellegrino, A., This, P., Romieu, C., Torregrosa, L.** (2015). Identification of stable QTLs for vegetative and reproductive traits in the microvine (*Vitis vinifera* L.) using the 18 K Infinium chip. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0588-0>

**Howe, K. L., Chothia, T., Durbin, R., Howe, K. L., Chothia, T., Durbin, R.** (2002). GAZE: A Generic Framework for the Integration of Gene-Prediction Data by Dynamic Programming 1418–1427. <https://doi.org/10.1101/gr.149502>

**Hsieh, M.-H.** (2005). The Arabidopsis IspH Homolog Is Involved in the Plastid Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 138(2), 641–653. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058735>

**Hufnagel, J.C., Hofmann, T.** (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 1376–1386. DOI: 10.1021/jf073031n

**Ibañez, S., Grimplet, J., Baroja, E., Hernáiz, S., Ibañez, J.** (2018). Clasificación de 120 variedades de vid de vino y mesa en función de distintos indicadores reproductivos. III Jornadas de Viticultura de la SECH. Noviembre 2018. En prensa.

**Iijima, Y., Nakamura, Y., Ogata, Y., Tanaka, K., Sakurai, N., Suda, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Okazaki, K., Shibata, D. et al.** (2008). Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *Plant Journal*, 54(5), 949–962. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03434.x>

**Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choise, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., et al.** (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449(7161), 463–467. <https://doi.org/10.1038/nature06148>

**Jackson, D. I., Lombard, P. B., Kabinett, L. Q.** (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 409–430.

**Jackson, R. S.** (2017). *Wine tasting*. Elsevier.

**Joubert, C., Young, P. R., Eyéghé-Bickong, H. A., Vivier, M. A.** (2016). Field-Grown Grapevine Berries Use Carotenoids and the Associated Xanthophyll Cycles to Acclimate to UV Exposure Differentially in High and Low Light (Shade) Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7(June), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00786>

**Kähkönen, M. P., Heinonen, M.** (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 628–633. <https://doi.org/10.1021/jf025551i>

**Kamffer, Z., Bindon, K. A., Oberholster, A.** (2010). Optimization of a method for the extraction and quantification of carotenoids and chlorophylls during ripening in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Merlot). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6578–6586. <https://doi.org/10.1021/jf1004308>

**Keller, M., Kummer, M., Vasconcelos, M. C.** (2001). Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(1), 12–18. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00188.x>

**Keller, M., Mills, L. J., Wample, R. L., Spayd, S. E.** (2004). Crop load management in concord grapes using different pruning techniques. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(1), 35–50.

**Keller, M., Smithyman, R. P., Mills, L. J.** (2008). Interactive effects of deficit irrigation and crop load on cabernet sauvignon in an arid climate. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(3), 221–234.

**Keller, M., Tarara, J.M., Mills, L.J.** (2010). Spring temperatures alter reproductive development in grapevines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16,445–454. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2010.00105.x>

**Keller, M.** (2010). *The Science of Grapevines*. Elsevier.

**Khan, M. S.** (2011). The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 25(3), 2433–2442. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2011.0072>

**Kinnersley, A. M. Turano, F. J.** (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19, 479–509. <https://doi.org/10.1080/07352680091139277>

**Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S. L.** (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12, 357–360.

**Klee, H. J., Tieman, D. M.** (2018). The genetics of fruit flavour preferences. *Nature Reviews Genetics*, 19(6), 347–356. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0002-5>

**Kliewer, W. M.** (1977). Effect of High Temperatures during the Bloom-Set Period on Fruit-Set, Ovule Fertility, and Berry Growth of Several Grape Cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(4), 215–222.

**Kliewer, W. M., Dokoozlian, N. K.** (2005). Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 170–181.

**Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K., Honda, C.** (2002). Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215(6), 924–933. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0830-5>

**Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., Hirochika, H.** (2004). Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Color. *Science*, 304 (5673), 982. <https://doi.org/10.1126/science.1095011>

**Ky, I., Lorrain, B., Jourdes, M., Pasquier, G., Fermaud, M., Gény, L., Rey, P., Doneche, B., Teissedre, P. L.** (2012). Assessment of grey mould (*Botrytis cinerea*) impact on phenolic and sensory quality of Bordeaux grapes, musts and wines for two consecutive vintages. *Australian*

Journal of Grape and Wine Research, 18(2), 215–226. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00191.x>

**Laucou, V., Launay, A., Bacilieri, R., Lacombe, T., Adam-Blondon, A. F., Bérard, A., Chauveau, A., Andrés, M. T., Hausmann, L., Ibañez, J., Boursiquot, J. M. et al.** (2018). Extended diversity analysis of cultivated grapevine *Vitis vinifera* with 10K genome-wide SNPs. PLoS ONE, 13(2), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192540>

**Le Paslier, M., Choisne, N., Bacilieri, R., Bounon, R., Boursiquot, J., Bras, M., Scalabrin, S., Berard, A., Brunel, D., Chauveau, A., et al.** (2013). the Grapereseq 18K Vitis Genotyping Chip. IX International Symposium on Grapevine Physiology & Biotechnology, 18.

**Lei, Y., Xie, S., Guan, X., Song, C., Zhang, Z., & Meng, J.** (2018). Methoxypyrazines biosynthesis and metabolism in grape: A review. Food Chemistry, 245(June 2017), 1141–1147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.056>

**Leng, X., Wang, P., Wang, C., Zhu, X., Li, X., Li, H., Mu, Q., Li, A., Liu, Z., Fang, J.** (2017). Genome-wide identification and characterization of genes involved in carotenoid metabolic in three stages of grapevine fruit development. Scientific Reports, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04004-0>

**Levadoux, L., Laibusques, L.** (1956). Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera* L. Annales de l'Amélioration des Plantes 6, 59–117.

**Li, H.** (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Oxford University Press 00(00), 1–3. <https://arxiv.org/abs/1303.3997>

**Li, W., Challa, G. S., Zhu, H., Wei, W.** (2016). Recurrence of Chromosome Rearrangements and Reuse of DNA Breakpoints in the Evolution of the Triticeae Genomes. G3& Genes|Genomes|Genetics, 6(12), 3837–3847. <https://doi.org/10.1534/g3.116.035089>

**Li-Mallet, A., Rabot, A., Geny, L.** (2016). Factors controlling inflorescence primordia formation of grapevine: their role in latent bud fruitfulness? A review. Botany, 94(3), 147–163. <https://doi.org/10.1139/cjb-2015-0108>

**Lijavetzky, D., Ruiz-García, L., Cabezas, J. A., De Andrés, M. T., Bravo, G., Ibañez, A., Carreño, J., Cabello, F., Ibañez, J., Martínez-Zapater, J. M.** (2006). Molecular genetics of berry colour variation in table grape. Molecular Genetics and Genomics, 276(5), 427–435. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0149-1>

**Lijavetzky, D., Cabezas, J., Ibañez, A., Rodríguez, V., Martínez-Zapater, J. M.** (2007). High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. BMC Genomics, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-424>

Lijavetzky, D., Carbonell-Bejerano, P., Grimplet, J., Bravo, G., Flores, P., Fenoll, J., Hellín, P., Oliveros, J. C., Martínez-Zapater, J. M. (2012). Berry flesh and skin ripening features in *Vitis vinifera* as assessed by transcriptional profiling. PLoS ONE, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039547>

Liu, M., Diretto, G., Pirrello, J., Roustan, J.-P., Li, Z., Giuliano, G., Regad, F., Bouzayen, M. (2014). The chimeric repressor version of an Ethylene Response Factor (ERF) family member, Sl-ERF.B3, shows contrasting effects on tomato fruit ripening. New Phytologist, 203(1), 206–218. <https://doi.org/10.1111/nph.12771>

Lodhi, M. A., Reisch B. I. (1995). Nuclear content of *Vitis* species, cultivars and other genera of the *Vitaceae*. Theoretical and Applied Genetics 90, 11-16.

Loreto, F. (2001). Ozone Quenching Properties of Isoprene and Its Antioxidant Role in Leaves. Plant Physiology, 126(3), 993–1000. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.993>

Loreto, F., Pinelli, P., Manes, F., Kollist, H. (2004). Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. Tree Physiology, 24(4), 361–367. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.4.361>

Loyola, R., Herrera, D., Mas, A., Wong, D. C. J., Höll, J., Cavallini, E., Amato, A., Azuma, A., Ziegler, T., Aquea, F., Arce-Johnson, P. (2016). The photomorphogenic factors UV-B RECEPTOR 1, ELONGATED HYPOCOTYL 5, and HY5 HOMOLOGUE are part of the UV-B signalling pathway in grapevine and mediate flavonol accumulation in response to the environment. Journal of Experimental Botany, 67(18), 5429–5445. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw307>

Luan, F., Wüst, M. (2002). Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. Phytochemistry, 60(5), 451–459. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00147-4)

Ma, Z., Hu, X., Cai, W., Huang, W., Zhou, X., Luo, Q., Yang, H., Wang, J., Huang, J. (2014). Arabidopsis miR171-Targeted Scarecrow-Like Proteins Bind to GT cis-Elements and Mediate Gibberellin-Regulated Chlorophyll Biosynthesis under Light Conditions. PLoS Genetics, 10(8), 20–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004519>

Mahattanatawee, K., Perez-Cacho, P. R., Davenport, T. Rouseff, R. (2007). Comparison of three lychee cultivar odor profiles using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-sulfur detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 1939–1944, doi: 10.1021/jf062925p.

Malacarne, G., Costantini, L., Coller, E., Battilana, J., Velasco, R., Vrhovsek, U., Grando, M. S., Moser, C. (2015). Regulation of flavonol content and composition in (Syrah×Pinot Noir) mature grapes: Integration of transcriptional profiling and metabolic quantitative trait locus analyses. Journal of Experimental Botany, 66(15), 4441–4453. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv243>

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2018). ESRyce. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esryce/>

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2017). Anuario del viñedo. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/>

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2015). Encuesta del viñedo. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/encuestas-de-vinedo/>

Marois, J. J., Nelson, J. K., Morrison, J. C., Lile, L. S., Bledsoe, A. M., Wax, E. (1986). The Influence of Berry Contact within Grape Clusters on the Development of Botrytis cinerea and Epicuticular Wax. American Journal of Enology and Viticulture, 37(4), 293–296. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/37/4/293>

Martin, D. M.; Chiang, A.; Lund, S. T.; Bohlmann, J (2012). Biosynthesis of wine aroma: transcript profiles of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase, geranyl diphosphate synthase, and linalool/nerolidol synthase parallel monoterpenol glycoside accumulation in Gewurztraminer grapes. Planta 2012, 236, 919–929.

Martínez, J., López, E., Baroja, E., Pérez, D., Chávarri J. B., García-Escudero., E. (2006). Evaluación agronómica y enológica de la variedad Tempranillo blanco (*Vitis vinifera* L.) y de otras variedades minoritarias blancas de la D.O.Ca. Rioja. I Jornadas del Grupo de Viticultura y Enología de la SECH. Logroño, 2014. ISBN 978-84-8125-675-8, 27-33.

Martínez, J., Gonzalo, A., López, E., Rubio, P., Baroja, E., Garacía-Escudero, E. (2015). Perfil aromático de vinos blancos elaborados con variedades minoritarias de la D. O. Ca. Rioja. XIII Congreso Nacional de Investigación Enológica. Tarragona, junio 2015.

Massonnet, M., Fasoli, M., Tornielli, G. B., Altieri, M., Sandri, M., Zuccolotto, P., Paci, P., Gardiman, M., Zenoni, S., Pezzotti, M. (2017). Ripening Transcriptomic Program in Red and White Grapevine Varieties Correlates with Berry Skin Anthocyanin Accumulation. Plant Physiology, 174(4), 2376–2396. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00311>

Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., Günata, Z. (2005). A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: Functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. Journal of Experimental Botany, 56(420), 2721–2731. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri265>

Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(20), 7692–7702. <https://doi.org/10.1021/jf061538c>

Matsui K (2006) Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. Current Opinion in Plant Biology 9(3), 274–280. <https://doi:10.1016/j.pbi.2006.03.002>

**Matus, J. T., Aquea, F., Arce-Johnson, P.** (2008). Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. *BMC Plant Biology*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-83>

**Matus, J. T.** (2016). Transcriptomic and Metabolomic Networks in the Grape Berry Illustrate That it Takes More Than Flavonoids to Fight Against Ultraviolet Radiation. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01337>

**Matus, J. T., Cavallini, E., Loyola, R., Höll, J., Finezzo, L., Dal Santo, S., Vialet, S., Commisso, M., Roman, F., Schubert, A., Ageorges, A., Tornielli, G. B., Arce-Johnson, P., et al.** (2017). A group of grapevine MYBA transcription factors located in chromosome 14 control anthocyanin synthesis in vegetative organs with different specificities compared with the berry color locus. *Plant Journal*, 91(2), 220–236. <https://doi.org/10.1111/tpj.13558>

**May, P.** (2004). *Flowering and fruitset in grapevines*. Adelaide: Lythrum Press.

**Melo, M., Zorer, R., Toth, E., Bodor, P., Schultz, H., Volschenk, C., Hunter, J.** (2015). Berry Size Variation of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah: Morphological Dimensions, Berry Composition and Wine Quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(1), 1–10.

**Mendes-Pinto, M. M., Ferreria, A. C. S., Oliveira, M. B. P. P., De Pinho, P. G.** (2004). Evaluation of Some Carotenoids in Grapes by Reversed]- and Normal-Phase Liquid Chromatography: A Qualitative Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3182–3188. <https://doi.org/10.1021/jf0499469>

**Meneghetti, S., Costacurta, A., Frare, E., Da Rold, G., Migliaro, D., Morreale, G., Calo, A.** (2011). Clones identification and genetic characterization of Garnacha grapevine by means of different PCR-derived marker systems. *Molecular Biotechnology* 48, 244–254.

**Mercenaro, L., Usai, G., Fadda, C., Nieddu, G., Caro, A.** (2016). Cannonau Investigated by Fluorescence, Texture and Colorimetric Analysis. *South African Journal of Enology and Viticulture* 37, 67–78.

**McGovern, P.E., Glusker, D. L., Exner, L. J., Voigt, M. M.** (1996) Neolithic resinated wine. *Nature* 381, 480–481.

**McGovern, P.E.** (2004) *Ancient wine: the search for the origins of viniculture*. Princeton University Press

**Migliaro, D., Crespan, M., Muñoz-Organero, G., Velasco, R., Moser, C., Vezzulli, S.** (2017). Structural dynamics at the berry colour locus in *Vitis vinifera* L. somatic variants. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, 485–495. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12103>

**Miguel, M. G.** (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 7–15. DOI: 10.1021/np980501m

**Mine, A., Nobori, T., Salazar-rondon, M. C., Winkelmüller, T. M., Anver, S., Becker, D., Tsuda, K.** (2017). An incoherent feed-forward loop mediates robustness and tunability in a plant immune network, 18(3), 464–476. <https://doi.org/10.15252/embr.201643051>

**Moreno, J. J. y Peinado, R. A.** (2010). Química enológica. AMV ediciones – Mundi Prensa.

**Moreno, S., Martin, J. P., Ortíz, J. M., Cabello, F., Gallego, J. F., Vidal, J. R., Gogorcena, Y.** (1999). Formación de una colección núcleo de la variedad de vid Garnacha y germoplasma relacionado mediante la utilización de marcadores moleculares. Identificación molecular de germoplasma de vid: Jornadas Científicas. ISBN: 84-605-9053-4

**Morrison, J.C.** (1991). Bud development in *Vitis vinifera* L. Botanical Gazette 152, 304–315.

**Mullins, M. G., Bouquet, A., Williams, L. E.** (1992). Biology of the grapevine. Cambridge: Cambridge University Press.

**Muñoz, C., Di Genova, A., Maass, A., Orellana, A., Hinrichsen, P., Aravena, A.** (2014). *Vitis vinifera* genome annotation improvement using next-generation sequencing technologies and NCBI public data. *Vitis vinifera* genome annotation improvement using next-generation sequencing technologies and NCBI public data. Proceedings of the X International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Geneva, USA, 1-5 August 2010. Acta Hort 1046:349-356

**Myles, S., Peiffer, J., Brown, P. J., Ersoz, E. S., Zhang, Z., Costich, D. E., Buckler, E. S.** (2009). Association Mapping: Critical Considerations Shift from Genotyping to Experimental Design. The Plant Cell Online, 21(8), 2194–2202. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068437>

**Myles, S., Boyko, A. R., Owens, C. L., Brown, P. J., Grassi, F., Aradhya, M. K.** (2011). Genetic structure and differentiation in grape. PNAS, 108(9), 3530–3535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009363108//DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009363108>

**Nabavi, S. M., Šamec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., Suntar, I., Rastrellig, L., Dagliah, M., Shirooie, S., et al.** (2018). Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. Biotechnology Advances. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.005>

**Neubauer, O., Fromherz, K.** (1911). Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. Biological Chemistry 70 (4-5): 326–350. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1910.70.4-5.326>

**Observatorio Español del Mercado del Vino** (2018). <https://www.oemv.es/exportaciones>

**OIV** (2018). Statistical Report on World Vitiviniculture. <http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/analisis-estadisticos/analisis-anual>

**Ojeda, H., Deloire, A., Carbonneau, A., Ageorges, A., Romieu, C.** (1999). Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis*, 38(4), 145–150.

**Ollat, N., Diakou-Verdin, P., Carde, J-P., Barrieu, F., Gaudillère, J-P., Moing, A.** (2002). Grape berry development: a review. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 36 (3). <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2002.36.3.970>

**Organización de las Naciones Unidas** (2018). <https://datos.bancomundial.org>

**Organisation Internationale de la Vigne et du Vin**, (2007). OIV descriptor list for grape varieties and *Vitis* species.

**Organisation Internationale de la Vigne et du Vin**, (2018a). OIV Statistical Report on World Vitiviniculture.

**Organisation Internationale de la Vigne et du Vin**, (2018b). Aspectos de la coyuntura mundial.

**Organisation Internationale de la Vigne et du Vin**, (2018c). Grapevine varieties' area by country, 2015.

**Oria, I.** (2016). Estudio preliminar de la composición volátil y sensorial de las variedades blancas autorizadas en la DOCa. Rioja. Trabajo fin de grado. Universidad de La Rioja.

**Pacottet, P.** (1918). Viticultura. Casa editorial P. Salvat.

**Papadakis, J.** (1966). Climates of the world and their agricultural potentialities.

**Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A. Mauricio, J. C.** (2004). Comparative study of aromatic compounds in two Young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry* 84 (4), 585–590. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00282-6)

**Peinado, R. A., Mauricio, J. C. Moreno, J.** Aromatic series in sherry wines with gluconic acid subjected to different biological aging conditions by *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis*. (2006). *Food Chemistry* 94 (2), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.010>

**Pekkarinen, S. S., Heinonen, I. M., Hopia, A. I.** (1999). Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *The Science of Food and Agriculture*, 79, 499–506. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990315\)79:4<499::AID-JSFA204>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990315)79:4<499::AID-JSFA204>3.0.CO;2-U)

**Pelsy, F., Hocquigny, S., Moncada, X., Barbeau, G., Forget, D., Hinrichsen, P., Merdinoglu, D.** (2010). An extensive study of the genetic diversity within seven French wine grape variety collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 1219–1231. DOI: 10.1007/s00122-009-1250-8

**Pereira, G. E., Gaudillere, J. P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., Rolin, D.** (2006). Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6765–6775. <https://doi.org/10.1021/jf061013k>

**Peterson, R., Slovin, J. P., Chen, C.** (2010). A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology*, 1e13:66-69 <https://doi.org/10.4081/pb.2010.e13>

**Petrie, P. R., Clingeleffer, P. R.** (2005). Effects of temperature and light (before and after budburst) on inflorescence morphology and flower number of Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(1), 59–65. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00279.x>

**Podolyan, A., White, J., Jordan, B., Winefield, C.** (2010). Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Functional Plant Biology*, 37(8), 767–784. <https://doi.org/10.1071/FP09271>

**Qian, X., Xu, X. Q., Yu, K. J., Zhu, B. Q., Lan, Y. Bin, Duan, C. Q., Pan, Q. H.** (2016). Varietal dependence of GLVs accumulation and LOX-HPL pathway gene expression in four *Vitis vinifera* wine grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms17111924>

**Rafalski, A., Morgante, M.** (2004). Corn and humans: Recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. *Trends in Genetics*, 20(2), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.12.002>

**Rambla, J. L., Trapero-Mozos, A., Diretto, G., Rubio-Moraga, A., Granell, A., Gómez-Gómez, L., Ahrazem, O.** (2016). Gene-Metabolite Networks of Volatile Metabolism in Airen and Tempranillo Grape Cultivars Revealed a Distinct Mechanism of Aroma Bouquet Production. *Frontiers in Plant Science*, 7(October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01619>

**Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S. T.** (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-27>

**Reyner, A.** 2012. Manual de viticultura. Mundi Prensa.

**Rinaldo, A., Cavallini, E., Jia, Y., Moss, S. M. A., McDavid, D. A. J., Hooper, L. C., Robinson, S. P., Tornielli, G. B., Zenoni, S., Ford, C. M., Boss, P. K., Walker, A. R.** (2015). A grapevine anthocyanin acyltransferase, transcriptionally regulated by VvMYBA, can produce most acylated anthocyanins present in grape skins. *Plant Physiology*, 169(November), 1897–1916. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01255>

Río Segade, S., Vilanova, M., Giacosa, S., Perrone, I., Chitarra, W., Pollon, M., Torchio, F., Boccacci, P., Gambino, G., Gerbi, V., Rolle, L. (2017). Ozone Improves the Aromatic Fingerprint of White Grapes. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16529-5>

Roach, M. J., Johnson, D. L., Bohlmann, J., van Vuuren H. J. J., Jones, S. J. M., Pretorius, I. S., Schmidt, S. A., Borneman, A. R. (2018). Population sequencing reveals clonal diversity and ancestral inbreeding in the grapevine cultivar Chardonnay. *PLOS Genetics*, 14(11), e1007807. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007807>

Robinson, J., Harding, J., Vouillamoz, J. (2012). *Wine grapes*. Penguin Random House UK.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

Roubelakis, K. A., Kliewer, W. M. (1976). Influence of light intensity and growth regulators on fruit-set and ovule fertilization in grape cultivars under low temperature conditions. *American Journal of enology and viticulture*, 27(4), 163-167.

Royer, C. (1988). Mouvement historiques de la vigne dans le monde. In *La Vigne et le Vin (La Manufacture et la Cité des sciences et de l'industrie, eds)*, pp. 15–25, Graficas.

Royo, C., Carbonell-Bejerano, P., Torres-Pérez, R., Nebish, A., Martínez, Ó., Rey, M., Aroutiounian, R., Ibáñez, J., Martínez-Zapater, J. M. (2016). Developmental, transcriptome, and genetic alterations associated with parthenocarpy in the grapevine seedless somatic variant Corinto blanco. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 259–273. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv452>

Royo, C., Torres-Pérez, R., Mauri, N., Diestro, N., Cabezas, J. A., Marchal, C., Lacombe, T., Ibáñez, J., Tornel, M., Carreño, J., Martínez-Zapater, J. M., Carbonell-Bejerano, P. (2018). The Major Origin of Seedless Grapes Is Associated with a Missense Mutation in the MADS-Box Gene VviAGL11. *Plant Physiology*, 177(3), 1234–1253. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00259>

Ruehl, E., Konrad, H., Lindner, B. (2015). Conserving and utilizing intra-varietal variation in grapevines (*Vitis vinifera* L.). *BIO Web of Conferences*, 5, 01007. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20150501007>

Sáenz-Navajas, M. P., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V. (2012). Contribution of Nonvolatile Composition to Wine Flavor. *Food Reviews International*, 28:4, 389-411. <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2012.660717>

Salmaso, M., Faes, G., Segala, C., Stefanini, M., Salakhutdinov, I., Zyprian, E., Toepfer, R., Grando, M. S., Velasco, R. (2004). Genome diversity and gene haplotypes in the grapevine (*Vitis vinifera* L.), as revealed by single nucleotide polymorphisms. *Molecular Breeding* 14, 385–395.

- Sanchez, L. A. Dokoozlian, N. K.** (2005). Bud Microclimate and Fruitfulness in *Vitis vinifera* L. American Journal of Enology and Viticulture, 56(4), 319–329.
- Santesteban, L. G., Royo, J. B.** (2006). Water status, leaf area and fruit load influence on berry weight and sugar accumulation of cv. “Tempranillo” under semiarid conditions. Scientia Horticulturae, 109(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.03.003>
- Sapir-Mir, M., Tal-Meshulam, S., Frydman, A., Mett, A., Eyal, Y., Belausov, E., Gidoni, D.** (2008). Peroxisomal Localization of Arabidopsis Isopentenyl Diphosphate Isomerases Suggests That Part of the Plant Isoprenoid Mevalonic Acid Pathway Is Compartmentalized to Peroxisomes. Plant Physiology, 148(3), 1219–1228. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127951>
- Sasaki, K., Takase, H., Matsuyama, S., Kobayashi, H., Matsuo, H., Ikoma, G., Takata, R.** (2016). Effect of light exposure on linalool biosynthesis and accumulation in grape berries. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 80(12), 2376–2382. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1217148>
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., Lewinsohn, E.** (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. Plant Journal, 54(4), 712–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x>
- Sefc, K.M. Pejić, I., Maletić, E., Thomas, M. R. Lefort, F.** (2001) Microsatellite markers for grapevine: a state of art. Molecular Biology & Biotechnology of Grapevine (Roubelakis-Angelakis, K.A., eds), pp. 433–463, Kluwer Academic Publishers.
- Sepahi, A.** (1980). Estimating cluster compactness in Yaghouti grapes. Vitis, 19, 81–90.
- Serrano, M., Wang, B., Aryal, B., Garcion, C., Abou-Mansour, E., Heck, S., Geisler, M., Mauch, F., Nawrath, C., Metraux, J.-P.** (2013). Export of Salicylic Acid from the Chloroplast Requires the Multidrug and Toxin Extrusion-Like Transporter EDS5. Plant Physiology, 162(4), 1815–1821. <https://doi.org/10.1104/pp.113.218156>
- Shavrukov, Y. N., Dry, I. B., Thomas, M. R.** (2004). Inflorescence and bunch architecture development in *Vitis vinifera* L. Australian Journal of Grape and Wine Research, 10(2), 116–124. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00014.x>
- Shine, M. B., Yang, J. W., El-Habbak, M., Nagyabhyru, P., Fu, D. Q., Navarre, D., Ghabrial, S., Kachroo, P., Kachroo, A.** (2016). Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean. New Phytologist, 212(3), 627–636. <https://doi.org/10.1111/nph.14078>
- Singh, A., Jha, S. K., Bagri, J., Pandey, G. K.** (2015). ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in arabidopsis. PLoS ONE, 10(4), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125168>

- Song, S., del Mar Hernández, M., Provedo, I., Menéndez, C. M.** (2014). Segregation and associations of enological and agronomic traits in Graciano × Tempranillo wine grape progeny (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*, 195(2), 259–277. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0994-z>
- Srinivasan, C., Mullins, M. G.** (1981). Physiology of flowering in the grapevine - a review *American Journal of Enology and Viticulture*, 32(1), 47–63.
- Stefania, P., Daniele, B., Graziano, G., Alberto, M., Cristina, R., Franco, B., Zottini, M., Mach, F. E.** (2014). The onset of grapevine berry ripening is characterized by ROS accumulation and lipoxygenase-mediated membrane peroxidation in the skin. *BMC Plant Biology*, 14:87. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-87>
- Steyn, W. J., Wand, S. J. E., Holcroft, D. M., Jacobs, G.** (2002). Anthocyanins in vegetative tissues a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 15: 349–361. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x>
- Stumpe, M., Feussner, I.** (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemistry Reviews* 5(2–3), 347–357. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9038-9>
- Su, L., Diretto, G., Purgatto, E., Danoun, S., Zouine, M., Li, Z., Roustan, J. P., Bouzayen, M., Giuliano, G., Chervin, C.** (2015). Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0495-4>
- Sun, L., Zhu, B. Q., Sun, X. R., Xu, X. Q., Zhang, G. J., Yan, A. L., Xu, H. Y.** (2015). Monoterpene accumulation and its biosynthesis: gene transcript profiles of two grape cultivars during berry development. *ISHS Acta Horticulturae: XI International Conference on Grapevine Breeding and Genetics*, 1082, 37–42. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1082.2
- Sun, R.-Z., Cheng, G., Li, Q., He, Y.-N., Wang, Y., Lan, Y.-B., Li, S.-Y., Zhu, Y.-R., Song, W.-F., Wang, J. et al.** (2017). Light-induced Variation in Phenolic Compounds in Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L.) Involves Extensive Transcriptome Reprogramming of Biosynthetic Enzymes, Transcription Factors, and Phytohormonal Regulators. *Frontiers in Plant Science*, 8(April), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00547>
- Swanepoel, J.J. and Archer, E.** (1988). The ontogeny and development of *Vitis-vinifera* L cv Chenin Blanc inflorescence in relation to phenological stages. *Vitis* 27, 133–141.
- Sweetman, C., Sadras, V. O., Hancock, R. D., Soole, K. L., Ford, C. M.** (2014). Metabolic effects of elevated temperature on organic acid degradation in ripening *Vitis vinifera* fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(20), 5975–5988. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru343>
- Tamura, H., Yamagami, A.** (1994). Antioxidative Activity of Monoacylated Anthocyanins Isolated from Muscat Bailey A Grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1612–1615. <https://doi.org/10.1021/jf00044a005>

- Tello, J., Aguirrezábal, R., Hernáiz, S., Larreina, B., Montemayor, M. I., Vaquero, E., Ibáñez, J.** (2015). Multicultural and multivariate study of the natural variation for grapevine bunch compactness. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 277-289. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12121>
- Tello, J., Ibáñez, J.** (2017). What do we know about grapevine bunch compactness? A state-of-the-art review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, (May 2004). <https://doi.org/10.1111/ajgw.12310>
- Terrier, N., Ageorges, A., Torregrosa, L., Cheynier, V., Vialet, S., Romieu, C., Verries, C.** (2009). Ectopic Expression of VvMybPA2 Promotes Proanthocyanidin Biosynthesis in Grapevine and Suggests Additional Targets in the Pathway. *Plant Physiology*, 149(2), 1028–1041. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131862>
- This, P., Lacombe, T., Thomas, M. R.** (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.07.008>
- Thomas, M.R., Scott, N.S.** (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequencetagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* 86 (8), 985–990.
- Torregrosa, L., Fernandez, L., Bouquet, A., Boursiquot, J-M., Pelsy, F. Martínez-Zapater, JM.** (2011). Origins and consequences of somatic variation in grapevine. *Genetics, Genomics and Breeding of Grapes*.
- Torres, N., Hilbert, G., Luquin, J., Goicoechea, N., Antolín, M. C.** (2017). Flavonoid and amino acid profiling on *Vitis vinifera* L. cv Tempranillo subjected to deficit irrigation under elevated temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62(May), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.05.001>
- Toth, Z., Winterhagen, P., Kalapos, B., Su, Y., Kovacs, L., Kiss, E.** (2016). Expression of a Grapevine NAC Transcription Factor Gene Is Induced in Response to Powdery Mildew Colonization in Salicylic Acid-Independent Manner. *Scientific Reports*, 6(July), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep30825>
- Vail, M. E.** (1991). Grape Cluster Architecture and the Susceptibility of Berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-188>
- Vail, M.E., Wolpert, J.A., Gubler, W.D., Rademacher, M.R.** (1998) Effect of cluster tightness on botrytis bunch rot in six Chardonnay clones. *Plant Disease* 82, 107–109. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.1.107>
- Vardhini, B. V., Sujatha, S. A. E., Ram, S. S.** (2010). Role of Brassinosteroids in Alleviating Various Abiotic and Biotic Stresses. *Plant Stress* 4 (Special Issue 1), 55-61.

- Vasconcelos, M. C., Greven, M., Winefield, C. S., Trought, M. C. T., Raw, V.** (2009). The Flowering Process of *Vitis vinifera*\_Review. American Journal of Enology and Viticulture, 60:4, 411–434.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D. A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., FitzGerald, L. M., Vezzulli, S., Reid, J., Viola, R., et al.** (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS ONE, 2(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001326>
- 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(18), 6359–6369. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers290>
- Vujović, D., Maletić, R., Popović-Đorđević, J., Pejin, B., Ristić, R.** (2017). Viticultural and chemical characteristics of Muscat Hamburg preselected clones grown for table grapes. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(2), 587–594. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7769>
- 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(4–5), 623–635. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9043-9>
- 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. Plant Journal, 49(5), 772–785. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02997.x>
- Wang, H., Cao, G., Prior, R. L.** (1997). Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(2), 304–309. <https://doi.org/10.1021/jf960421t>
- Wong, D. C. J., Schlechter, R., Vannozzi, A., Höll, J., Hmam, I., Bogs, J., Tornielli, G. B., Castellarin, S. D., Matus, J. T.** (2016). A systems-oriented analysis of the grapevine R2R3-MYB transcription factor family uncovers new insights into the regulation of stilbene accumulation. DNA Research, 23(5), 451–466. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsw028>
- Wu, Y., Duan, S., Zhao, L., Gao, Z., Luo, M., Song, S., Xu, W., Zhang, C., Ma, C., Wang, S.** (2016). Aroma characterization based on aromatic series analysis in table grapes. Scientific Reports, 6(July), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep31116>
- Xandri, J. M., Gómez, M., Rivero, S., Fernández, D., et al.** (1946). Anuario de la vid y de la producción y comercio del vino, industrias derivadas, cervezas y sidras.
- Xie, C., Tammi, M. T.** (2009). CNV-seq, a new method to detect copy number variation using high-throughput sequencing. BMC Bioinformatics 10: 80. DOI: 10.1186/1471-2105-10-80

- Xie, S., Song, C., Wang, X., Liu, M., Zhang, Z., Xi, Z.** (2015). Tissue- specific expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in white- and red-fleshed grape cultivars. *Molecules*, 20(12), 22767–22780. <https://doi.org/10.3390/molecules201219883>
- Xie, S., Duan, B., Tang, Y., Meng, J., Zhang, Z., Song, C., Wang, P.** (2018). Influence of natural variation in berry size on the volatile profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Merlot and Cabernet Gernischt grapes. *Plos One*, 13(9), e0201374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201374>
- Yakushiji, H., Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., Tae Jeong, S., Sueta, T., Mitani, N., Azuma, A.** (2006). A Skin Color Mutation of Grapevine, from Black-Skinned Pinot Noir to White-Skinned Pinot Blanc, Is Caused by Deletion of the Functional VvmybA1 Allele. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(6), 1506–1508. <https://doi.org/10.1271/bbb.50647>
- Young, P., Eyeghe-Bickong, H. A., du Plessis, K., Alexandersson, E., Jacobson, D. A., Coetzee, Z. A., Deloire, A., Vivier, M. A.** (2015). Grapevine plasticity in response to an altered microclimate: Sauvignon Blanc modulates specific metabolites in response to increased berry exposure. *Plant Physiology*, 170(3), 1235–1254. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01775>
- Zhu, J.** (2016). Review Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zhou, Y., Cantu, D., Massonnet, M., Sanjak, J. S., Gaut, B. S.** (2017). Evolutionary genomics of grape (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(44), 11715–11720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1709257114>
- Zhou, Y., Minio, A., Massonnet, M., Solares, E., Lyu, Y., Beridze, T., Cantu, D., Gaut, B. S.** (2018). Structural variants, clonal propagation, and genome evolution in grapevine (*Vitis vinifera*). bioRxiv. The preprint server for biology. <https://doi.org/10.1101/508119>
- Zohary, D.** (1995) Domestication of the Grapevine *Vitis vinifera* L. in the Near East. In *The origins and Ancient History of Wine* (Mc Govern, P.E. et al., eds), pp. 23–30, Gordon and Breach.
- Zohary D, Hopf M** (2000). *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford University Press: London.