



■ PROBLEMA ABORDADO

Problemas y pérdidas por las enfermedades del amarillamiento de la vid en el mundo

El cultivo de la vid y la industria de la uva y el vino se ven gravemente amenazados en todo el mundo por varias enfermedades de amarillamiento asociadas a la presencia de fitoplasmas, que están presentes con distinta prevalencia en todos los países productores de uva. Los daños en la vid asociados a la presencia de enfermedades de amarillamiento abarcan desde un menor rendimiento de las frutas hasta la muerte de las plantas. Las estrategias de gestión disponibles se basan principalmente en retirar las plantas sintomáticas e infectadas y en el uso de insecticidas para reducir el número de insectos vectores conocidos. Sin embargo, para lograr una agricultura más sostenible, estos métodos deben ir acompañados del desarrollo de variedades de vid resistentes. La identificación de la resistencia candidata es, por lo tanto, una gran ayuda para el desarrollo de herramientas de gestión para el control del amarillamiento de la vid y ayudará a reducir tanto los daños económicos como los tratamientos con insecticidas en todo el mundo.



- Síntomas de la enfermedad del amarillamiento de la vid en el racimo de una variedad roja a principios del verano.

■ RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN MÁS RECIENTES

Datos disponibles sobre la resistencia al amarillamiento de la vid

La variabilidad intraespecífica de la susceptibilidad de *Vitis vinifera* al amarillamiento de la vid es bien conocida por la experiencia madurada en terreno. Sin embargo, en condiciones controladas de inoculación solo se han obtenido unos pocos datos (Eveillard *et al.*, 2016). Sobre la base de esas observaciones, en los últimos años se han realizado estudios moleculares encaminados a identificar los rasgos genéticos de la vid que intervienen en la respuesta a la infección por amarillamiento de la vid. Se investigaron los cambios cualitativos y cuantitativos en los perfiles de proteína, expresión génica y miARN en el Chardonnay y



- Progenies de vid (Chardonnay x Tocai friulano) colocadas en campo.



algunas otras variedades (Albertazzi *et al.*, 2009; Hren *et al.*, 2009; Margaria *et al.*, 2014; Snyman *et al.*, 2017). Estos análisis se realizaron en plantas sanas e infectadas en campo, revelando así los efectos de la enfermedad en las diferentes variedades con distinta susceptibilidad. En uno de los últimos trabajos publicados se informó de la presencia de una respuesta transcriptómica temprana de la planta a la infección y al insecto vector, lo que sugiere la existencia de mecanismos de defensa pasiva expresados constitutivamente y de reacciones de defensa activa de una variedad muy poco susceptible, Tocai friulano o Sauvignonasse (Bertazzon *et al.*, 2019). El proyecto TROPICSAFE tiene por objeto identificar los determinantes genéticos de la resistencia en esta variedad.

■ ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE TROPICSAFE

Caracterización de una población F1 de plantas de vid segregadas para la resistencia al amarillamiento de la vid

Al cruzar Chardonnay (susceptible) con Tocai friulano (poco susceptible), se obtuvieron más de 700 plantas de vid. Parte de la progenie ya se ha multiplicado mediante injerto en el portainjertos de SO4 y se ha plantado en un viñedo experimental (20 plantas por genotipo), mientras que otra parte se está propagando actualmente en el vivero.

El trabajo posterior incluye: fenotipado de la progenie, genotipado para obtener un mapa genético denso basado en marcadores moleculares SNP ("Single Nucleotide polymorphism"), y la unión de los datos para inferir QTLs ("Quantitative Trait Loci") asociados con la resistencia al amarillamiento de la vid. El fenotipado se obtiene mediante la infección controlada en el campo por el insecto vector específico. Se colocaron jaulas en cada planta, que contenían 20 insectos vectores recogidos en viñedos muy infectados. Los síntomas (gravedad, prevalencia) y la concentración del patógeno se evaluarán en 2020 y 2021.

Se extrajo ADN de las plantas F1 y se realizó un cribado preliminar para verificar el origen parental de las plántulas (por ejemplo, descartando las derivadas de la autofecundación) mediante un análisis SSR ("Simple Sequences Repeats") con diez marcadores moleculares. El genotipado de las plantas seleccionadas se está llevando a cabo por GBS ("Genotyping by Sequencing") para las llamadas posteriores de SNP. A partir de estos datos se elaborará un mapa genético. La información fenotípica y molecular se usará para encontrar los QTLs asociados con la resistencia de la vid al amarillamiento. Además, la integración de los datos con los perfiles transcriptómicos obtenidos mediante el análisis RNAseq de las variedades de baja y alta susceptibilidad, obtenidos anteriormente (Bertazzon *et al.*, 2019), y el genoma completo mediante la secuenciación de nueva generación (NGS) de unas 20 variedades de vid con un comportamiento de enfermedad contrastado, será la base para la identificación de los genes candidatos asociados a la resistencia al amarillamiento de la vid.



- Instalación de jaulas para insectos en las plantas individuales del campo (en grande), y detalle de una jaula (abajo a la derecha). Se colocó una jaula con 20 insectos vectores en cada planta, con el fin de infectar todas las plantas de vid.



Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación e innovación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión N° 727459

www.tropicsafe.eu

Esta ficha de innovación se ha producido como parte del proyecto TROPICSAFE. Aunque el autor ha trabajado con la mejor información disponible, ni el autor ni la UE serán en ningún caso responsables de cualquier pérdida, daño o perjuicio que se produzca directa o indirectamente en relación con el proyecto.



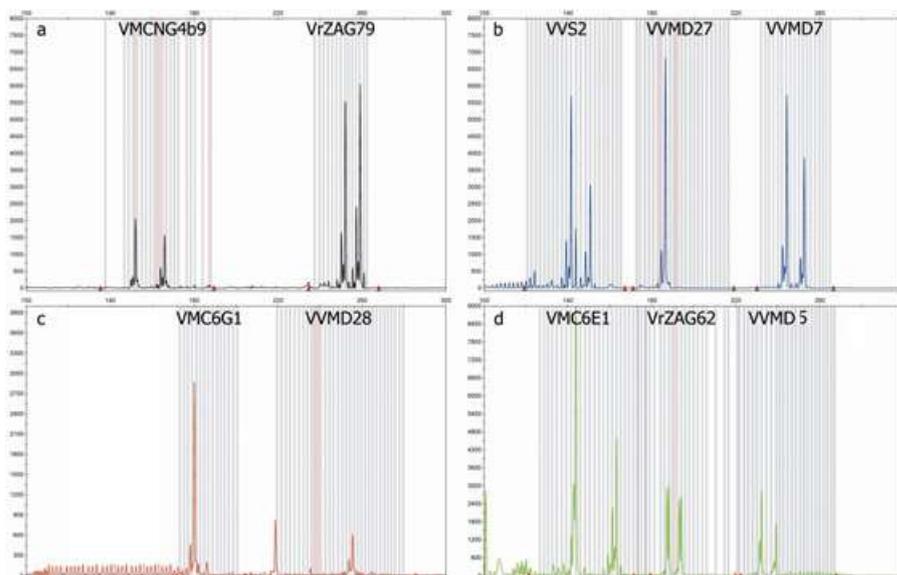
■ DATOS CIENTÍFICOS Y PRIMEROS RESULTADOS

Primeros resultados y perspectivas

El primer resultado fue la obtención de un número suficiente de progenies por medio de la cría y su próspera multiplicación y plantación en el campo. Se extrajo ADN de más de 300 genotipos, seguido de un cribado con diez marcadores SSR para discriminar entre la progenie cruzada y la autocruzada. Los resultados mostraron que aproximadamente el 20% de la progenie era auto-cruzada, por lo que estas plantas fueron descartadas.

La labor de secuenciación de nucleótidos comenzó con la extracción de ADN de muestras de hojas de 208 plantas, incluidos los dos progenitores Tocai friulano y Chardonnay. Tras la evaluación de la calidad y la cantidad de los extractos de ADN, se enviaron un total de 188 muestras para su secuenciación por EGB a fin de obtener un mapa genético de alta densidad.

En 2019, un total de 140 plantas fueron enjauladas con insectos infecciosos. Al final del trabajo, la identificación de los rasgos genéticos asociados a la resistencia y la susceptibilidad al amarillamiento de la vid se pudo explotar para generar plantas de vid resistentes y para aumentar o provocar la resistencia a estas enfermedades.



• Electrotrazas del analizador genético. Ejemplo de perfil molecular de PCR de 10 *loci* multiplex usado para identificar progenie cruzada o auto-cruzada por SSR. Los 10 pares de cebadores estaban etiquetados con tintes NED(a), 6-FAM (b), PET (c), VIC (d). Las rayas grises representan el conjunto de binset casero producido con las variedades de referencia.

PALABRAS CLAVE

Amarillamiento de la vid, resistencia, tolerancia, “flavescencia dorada”, “bois noir”, enfermedad

MÁS INFORMACIÓN

Albertazzi G., Milc J., Caffagni A., Francia E., Roncaglia E., Ferrari F., Tagliafico E., Stefani E., Pecchioni N. 2009. Gene expression in grapevine cultivars in response to “bois noir” phytoplasma infection. *Plant Science* 176, 792–804.

Bertazzon N., Bagnaresi P., Forte V., Mazzucotelli E., Filippin L., Guerra D., Zechini A., Cattivelli L., Angelini E. 2019. Grapevine comparative early transcriptomic profiling suggests that “flavescence dorée” phytoplasma represses plant responses induced by vector feeding in susceptible varieties. *Genomics* 20, 526.

Eveillard S., Jollard C., Labroussa F., Khalil D., Perrin M., Desqué D., Salar P., Razan F., Hévin C., Bordenave L., Foissac X., Masson J.E., Malembic-Maher S. 2016. Contrasting susceptibilities to “flavescence dorée” in *Vitis vinifera*, rootstocks and wild *Vitis* species. *Frontiers in Plant Science* 7, 1–12.

Hren M., Nikoli P., Rotter A., Blejec A., Terrier N., Ravnikar M., Dermastia M., Gruden K. 2009. “Bois noir” phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomic* 10, 460.

Margaria P., Ferrandino A., Caciagli P., Kedrina O., Schubert A., Palmano S. 2014. Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by “flavescence dorée” phytoplasma. *Plant, Cell and Environment* 37, 2183–200.

Snyman M.C., Solofoharivelo M.C., Souza-Richards R., Stephan D., Murray S., Burger J.T. 2017. The use of high-throughput small RNA sequencing reveals differentially expressed microRNAs in response to aster yellows phytoplasma-infection in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. *Plos One* 12, e0182629.

CRÉDITOS

Elisa Angelini, Manna Crespan CREA Centro de Viticultura y Enología, Conegliano (Treviso), Italia
elisa.angelini@crea.gov.it y manna.crespan@crea.gov.it

Abril, 2020



Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación e innovación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión N° 727459

www.tropicsafe.eu

Esta ficha de innovación se ha producido como parte del proyecto TROPICSAFE. Aunque el autor ha trabajado con la mejor información disponible, ni el autor ni la UE serán en ningún caso responsables de cualquier pérdida, daño o perjuicio que se produzca directa o indirectamente en relación con el proyecto.