

## Nuevos híbridos de Monastrell tolerantes a oídio y mildiu

C. Martínez-Mora, A. Fuentes-Denia, E. Salmerón, J.A. Martínez-Jiménez, I. Hita, A. Martínez-Cutillas y L. Ruiz-García.

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA).  
Departamento de Viticultura, C/ Mayor s/n, 30150-La Alberca (Murcia).  
celia.martinez@carm.es

### Resumen

**El oídio y el mildiu son enfermedades fúngicas que reducen la calidad y la producción en *Vitis vinifera*. Su control es costoso y conlleva un impacto medioambiental. No obstante, en vides americanas y asiáticas se han identificado varias fuentes de resistencia a estas enfermedades fúngicas susceptibles de ser introducidas en *Vitis vinifera* mediante cruzamientos dirigidos. Además, se han identificado genes de resistencia a oídio y mildiu y se han desarrollado marcadores moleculares asociados a dichos alelos de resistencia. En la Región de Murcia la producción de uva de vinificación tiene gran importancia económica y social, presentando como variedad tinta preferente el cultivar Monastrell en las Denominaciones de Origen (D.O.) de Jumilla, Yecla y Bullas. El presente trabajo está dirigido a la obtención y selección asistida mediante marcadores moleculares (marker-assisted selection, MAS) de nuevas líneas derivadas de ‘Monastrell’ tolerantes a oídio y mildiu, a partir de cruzamientos dirigidos entre ‘Monastrell’ (Mn) y Regent (Rg), un híbrido portador de los genes *Ren3* y *Rpv3* que le confieren tolerancia a ambas enfermedades. En total se han analizado 1210 híbridos Mn x Rg con diferentes marcadores moleculares ligados a los genes *Ren3* y *Rpv3*. De los 1210 híbridos analizados, 192 (16%) han heredado los alelos de tolerancia a oídio y mildiu procedentes de Regent.**

**Palabras clave:** enfermedades fúngicas, genes de resistencia, mejora genética, marcadores moleculares, selección asistida, *Vitis vinifera*.

### INTRODUCCIÓN

El oídio y el mildiu, enfermedades fúngicas de la vid causadas por los patógenos *Erysiphe necator* (syn. *Uncinula necator*) y *Plasmopora viticola* respectivamente, han sido tradicionalmente combatidas mediante numerosos tratamientos preventivos con fungicidas. Estos tratamientos conllevan un elevado coste pero además afectan negativamente a los consumidores que se orientan hacia productos saludables y respetuosos con el medio ambiente.

La identificación en vides asiáticas y americanas de genotipos con distinto grado de resistencia natural a estas enfermedades (Alleweldt y Possingham, 1988; Wan et al., 2007) permite, en el marco de un programa de mejora, introducir dichas resistencias en *Vitis vinifera* a través de cruzamientos dirigidos. Solo se conocen unas pocas variedades de *Vitis vinifera* tolerantes a oídio, como la variedad Kishmish vatkana (Hoffmann et al., 2008). En la actualidad se dispone de las primeras variedades con tolerancia a estas enfermedades, de las que ya se están elaborando vinos (<http://www.icv.fr/mediatheque-viti-vinicole/guide-technique-cepages-resistants>).

La selección de estas nuevas líneas tolerantes a oídio y/o mildiu solo mediante la caracterización fenotípica es compleja, por lo que el apoyo de las herramientas

moleculares facilita y agiliza el trabajo y permite una selección más eficaz de híbridos portadores de alelos de tolerancia a estas enfermedades fúngicas. En recientes trabajos de investigación se han descrito numerosos genes de resistencia a oídio y mildiu, y se han identificado marcadores moleculares asociados a los distintos alelos de resistencia ([www.vitisgen.org/marker.html](http://www.vitisgen.org/marker.html); [www.vivc.de](http://www.vivc.de)). Dentro de los programas de mejora, es muy importante introducir diferentes genes de resistencia (piramidización) para que los híbridos resistentes obtenidos sean estables y duraderos a lo largo del tiempo (Eibach et al., 2007). La selección asistida por marcadores nos permitirá seleccionar genotipos que combinen distintos genes de resistencia e identificar las distintas fuentes de resistencia utilizadas.

En la Región de Murcia el cultivo de la uva de vinificación tiene un gran valor económico y social. El cultivar Monastrell es preferente en las zonas de cultivo de las tres D.O. regionales (Jumilla, Bullas y Yecla) como variedad tinta. El IMIDA viene desarrollando desde hace años un programa de mejora de 'Monastrell' al que se ha incorporado recientemente una nueva línea de investigación en la que se enmarca este trabajo, basada en la obtención de nuevas variedades derivadas de 'Monastrell' tolerantes a oídio y mildiu, utilizando distintas fuentes de resistencia como parentales en los cruzamientos. El trabajo que presentamos trata de la obtención y selección asistida por marcadores de nuevas líneas derivadas de 'Monastrell' tolerantes a oídio y mildiu, partiendo de cruzamientos dirigidos entre 'Monastrell' (Mn) y Regent (Rg), una variedad portadora de los genes *Ren3* y *Rpv3* que le confieren tolerancia a oídio y mildiu, respectivamente (Welter et al., 2007; Fischer et al., 2004). Se presentan los resultados preliminares obtenidos hasta la fecha.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal de partida ha sido el cultivar Monastrell disponible en el IMIDA, y la variedad Regent facilitada por el JKI Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof (Siebeldingen, Alemania). Los híbridos se obtuvieron mediante el método clásico de cruzamientos dirigidos, en el que se emascularon racimos de 'Monastrell' que fueron polinizados con polen procedente del híbrido Regent. Las semillas, una vez limpias y estratificadas a 4 °C, se germinaron en un semillero y se plantaron en campo tras su aclimatación en invernadero.

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de hojas jóvenes, recogidas en el invernadero, mediante el protocolo facilitado en el DNeasy Plant Mini Kit (QUIAGEN). Para el análisis molecular se emplearon los marcadores moleculares UDV116, VChr15CenGen06 y VVIV67 para *Ren3*, y VVIN16-cjvh y UDV108 para *Rpv3* ([www.vivc.de](http://www.vivc.de); Van Heerden et al., 2014).

Las amplificaciones vía PCR se diseñaron para un volumen total de 20µl, con 20 ng de ADN, 1X tampón PCR, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP (Bioline) y 0,4U de Taq polimerasa (BIOTAQ™ Bioline), y se llevaron a cabo en un termociclador modelo GeneAmp-9600 (Applied Biosystems). El programa de amplificación empleado fue de 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C seguido de 35 ciclos (1 min a 94 °C, 45 s a la temperatura de anillamiento de cada marcador y 1 min a 72 °C). Los marcadores que dieron lecturas dudosas se mejoraron utilizando un programa touchdown de amplificación, en el que la temperatura inicial de anillamiento se redujo 0,2 °C por ciclo en los siguientes 14 ciclos, seguidos de 20 ciclos con una temperatura de anillamiento con 3 °C menos a la de partida (Tabla 1). Los marcadores directos de cada pareja se diseñaron marcados con fluorescencia (NED o PET). Los productos de PCR se separaron en un

secuenciador de capilares ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para el análisis del tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases (pb) se empleó el programa GeneMapper v3.7 y el marcador de tamaño GS500LIZ (Applied Biosystems).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Hasta la fecha se han analizado 1210 híbridos procedentes del cruzamiento MnxRg con los marcadores moleculares empleados en este trabajo ligados a *Ren3* y *Rpv3*, genes de resistencias a oídio y mildiu. El resultado estadístico de este análisis molecular mostró que 192 híbridos (16%) son portadores de los alelos de resistencia a oídio y a mildiu, 210 híbridos (17%) solo portan alelos de resistencia a oídio, 84 híbridos (7%) portan únicamente los alelos de resistencia a mildiu y 724 híbridos (60%) no son portadores de los alelos de resistencia identificados.

En la Tabla 2 se pueden ver los genotipos obtenidos y en negrita, los alelos marcadores de resistencia de cada locus en pares de bases (pb). Para el oídio con los marcadores moleculares UDV116, VChr15CenGen06 y VVIV67, se identificaron los tamaños 145bp, 283bp y 338bp como alelos marcadores de resistencia para esta enfermedad. Para el mildiu con los marcadores de resistencia UDV108 y VVIN16- cjh, se identificaron los alelos 237bp y 245bp, respectivamente.

Actualmente estos híbridos seleccionados se encuentran en producción, por lo que la caracterización molecular se completará con una caracterización fenotípica en campo y en laboratorio de la tolerancia de estos híbridos frente a ataques de oídio y mildiu, siguiendo los códigos OIV 455 y OIV 452. Esta caracterización nos permitirá confirmar la correlación entre los marcadores de resistencia identificados y la tolerancia de estos híbridos a ambas enfermedades fúngicas.

Una vez realizada esta correlación, los híbridos MnRg seleccionados como tolerantes a oídio y mildiu se utilizarán como progenitores en nuevos cruzamientos junto con otras fuentes de resistencia, en una nueva fase del programa de mejora, para conseguir la estabilidad de la tolerancia introducida a ambos hongos. Los híbridos obtenidos finalmente, se retrocruzarán sucesivamente con 'Monastrell' para recuperar además los caracteres de calidad agronómica y enológica propios del cultivar Monastrell.

## **Agradecimientos**

Este trabajo está financiado por el proyecto de investigación FEDER1420-04, cofinanciado en un 80% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

## **Referencias**

- Alleweldt, G. y Possingham, JV. 1988. Progress in grapevine breeding. Theoretical and Applied Genetics 75: 669–673.
- Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L. y Töpfer, R. 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. Vitis – Journal of Grapevine Research, 46: 120–124.
- Fischer, BM., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, KJ., Töpfer, R. y Zyprian, EM. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance

factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 501–515. <http://doi.org/10.1007/s00122-003-1445-3>

Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Z., Testolin, R. y Kozma, P. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine ‘Kishmish vatkana’ is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 427–438. <http://doi.org/10.1007/s00122-007-0680-4>

Van Heerden, CJ., Phyllis, B., Abraham, V. y Renée, P. 2014. Detection of downy and powdery mildew resistance QTL in a ‘Regent’ x ‘RedGlobe’ population. *Euphytica* 200: 281–295. <http://doi.org/10.1007/s10681-014-1167-4>

Wan Y., Schwaninger H., He P. y Wang Y. 2007. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. *Vitis* 46(3):132–136.

Welter, LJ., Göktürk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Töpfer, R. y Zyprian, EM. 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Molecular Breeding*, 20: 359–374. <http://doi.org/10.1007/s11032-007-9097-7>

Tabla 1. Marcadores utilizados en la selección de híbridos Mn x Rg.

	Resistencia	Marcador	Fluorocromo	T <sup>a</sup> anillamiento (°C)
<i>Ren3</i>	Oídio	UDV116	NED	56
<i>Ren3</i>		VChr15CenGen06	PET	56-53 <sup>1</sup>
<i>Ren3</i>		VVIV67	PET	55-52 <sup>1</sup>
<i>Rpv3</i>	Mildiu	UDV108	PET	58-55 <sup>1</sup>
<i>Rpv3</i>		VVIN16-cjvh	NED	56

<sup>1</sup> touchdown.

Tabla 2. Genotipos y alelos de resistencia (negrita) obtenidos en MnxRg.

	UDV116	VChr15CenGen06	VVIV67	UDV108	VVIN16- cjvh
Mn ♀	123 134	273 273	357 364	241 245	250 256
Rg ♂	<b>145</b> 154	273 <b>283</b>	<b>338</b> 372	216 <b>237</b>	<b>245</b> 250
Genotipos resistentes	123 <b>145</b>	273 <b>283</b>	<b>338</b> 357	241 <b>237</b>	<b>245</b> 250
	134 <b>145</b>		<b>338</b> 364	245 <b>237</b>	<b>245</b> 256
Genotipos sensibles	123 154	273 273	357 372	216 241	250 250
	134 154		364 372	216 245	250 256