



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Titulación
Grado en Enología

Historia de la mejora genética de la vid

Alumno: Darío Pacho Martínez

Tutora: Elena Hidalgo Rodríguez

Junio de 2022

ÍNDICE

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Principales hitos en la historia de la viticultura.....	2
2.2	Posición taxonómica de la vid.....	3
3	JUSTIFICACIÓN	4
4	OBJETIVOS	5
5	MÉTODOS Y MATERIALES	5
5.1	Búsqueda y recopilación de información.....	5
5.2	Elaboración de la revisión bibliográfica.....	5
6	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
6.1	Los inicios de la mejora genética: la domesticación.....	6
6.2	La mejora genética clásica y la era de la filoxera.....	8
6.2.1	Efecto de la filoxera sobre el viñedo europeo.....	8
6.2.2	La mejora de los portainjertos.....	9
6.2.3	La mejora con fines sanitarios.....	11
6.2.4	La mejora en uva de mesa.....	12
6.3	Marcadores moleculares y su uso en mejora genética.....	12
6.3.1	Los marcadores moleculares.....	12
6.3.2	La selección clonal.....	14
6.3.3	La mejora asistida por marcadores moleculares.....	16
6.4	La modificación genética en viticultura.....	19
6.4.1	La transformación mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
6.4.2	La transformación mediante CRISPR/Cas9.....	23
6.4.3	El ARN de interferencia.....	25
7	CONCLUSIÓN	26
8	BIBLIOGRAFÍA	26

1 RESUMEN

Las variedades de vid uso actual son el producto de una serie de sucesos que se han dado a lo largo del tiempo: domesticación de la vid, hibridaciones espontáneas o artificiales y mutaciones puntuales.

La mejora genética es un proceso que se ha llevado a cabo intuitivamente por los viticultores al seleccionar y propagar los individuos con determinados rasgos de interés. Sin embargo, la participación de los genetistas en estos procesos comenzó tras la llegada de la filoxera (*Viteus vitifoliae*) procedente de América. Desde entonces, han sido numerosos los intentos de mejora llevados a cabo en el ámbito de la genética de la vid. Gracias a la mejora genética clásica se pudo dar una respuesta a la filoxera al hibridar diferentes especies de vides americanas para ser utilizadas como portainjertos. También se llevaron a cabo hibridaciones entre especies de vides americanas y europeas con el objetivo de obtener plantas resistentes a hongos como el oídio y el mildiu, con un éxito variable.

En la actualidad el conocimiento de determinados marcadores moleculares asociados a rasgos de interés y las herramientas de modificación genética como la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* o mediante CRISPR-Cas9, abren nuevas expectativas de precisión en la mejora genética. A esto hay que sumar el ARN de interferencia como método de silenciamiento de genes, la cual quedaría fuera de la legislación europea sobre organismos modificados, uno de los mayores obstáculos en la investigación en este campo.

Palabras clave: vid, viticultura, domesticación, mejora genética, marcadores moleculares, selección, hibridaciones, CRISPR-Cas9, *Agrobacterium tumefaciens*, ARNi.

ABSTRACT

The grapevine varieties currently in use are the product of a series of events that have occurred over time: vine domestication, spontaneous or artificial hybridization and specific mutations.

Genetic breeding is a process that has been carried out intuitively by winegrowers by selecting and propagating individuals with particular traits of interest. However, the involvement of geneticists in these processes began after the arrival to Europe of phylloxera (*Viteus vitifoliae*) from America. Since then, numerous breeding attempts have been made in the field of grapevine genetics. Thanks to classical breeding, it was possible to respond to phylloxera by hybridizing different species of American grapevines to be used as rootstocks. Hybridizations were also carried out between American and European grapevine species with the aim of obtaining plants resistant to fungi such as powdery mildew and downy mildew, with random success.

At present, knowledge of certain molecular markers associated with traits of interest and genetic modification tools such as transformation by *Agrobacterium tumefaciens* or by CRISPR-Cas9, open up new expectations of precision in genetic breeding. To this must be added the RNA interference as a method of gene silencing, which would remain outside the European legislation on modified organisms, one of the greatest obstacles to research in this field.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Principales hitos en la historia de la viticultura

La vid (*Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera*) es, en la actualidad, uno de los cultivos más importantes y con mayor superficie a nivel mundial y ha tenido una gran influencia en la cultura occidental a lo largo de la historia. Históricamente, el vino era considerado un regalo de los dioses: Osiris en Egipto, Dionisio en Grecia y Baco en Roma.

Los dibujos en las copas y recipientes conservados de la época griega demuestran la importancia que el vino y las uvas tenían para ellos. No se sabe con certeza quién introdujo la viticultura en el pueblo griego. Una posibilidad es que lo hicieran los Hititas desde Anatolia en su migración hacia Grecia y el Mar Egeo, y el posterior establecimiento de la civilización Minoica (2200 – 1400 a.C.). Sin embargo, hay constancia de varias rutas desde el Cáucaso hacia Grecia, pudiéndose haber introducido la viticultura más de una vez (Mullins *et al.*, 1992).

Fueron los griegos y los fenicios quienes llevaron la viticultura hacia el este de Europa (Cartago, Sicilia, sur de Italia, España (Prados Martínez, 2011) y Francia.). Los romanos aprendieron de los griegos a cultivar la vid y la difundieron hacia el norte a través del valle del Rin. Con la expansión del Imperio Romano, la viticultura y la enología quedaron establecidas a lo largo de todo el Imperio (300 d.C.). En paralelo, la importancia de los vinos de misa (también llamados sacramentales) tras la expansión del cristianismo aseguraba que el patrón de cultivo de la vid tendería a seguir el patrón de asentamiento y conversión cristianos (Mullins *et al.*, 1992).

Tras la caída del Imperio Romano, el cultivo de la vid también disminuyó. La necesidad de continuar con la producción de los vinos de misa provocó que los monasterios se convirtieran en centros para la conservación de la viticultura y la enología. Así, la expansión del cristianismo hacia el norte de Europa, marcó el auge del comercio del vino y solo en torno al año 1000 d.C. el consumo de vino se desligó de los ámbitos social y religioso a los que estaba vinculado (Gerrath *et al.*, 2015).

Entre el año 1000 y la actualidad, hay tres hechos importantes que merecen ser mencionados por sus consecuencias para la viticultura:

- La guerra de los 30 años (1618 - 1648): Provocó la destrucción y abandono de gran parte del viñedo centroeuropeo, principalmente en Alemania (Johnson, 2004).
- El gran invierno de 1709: Un período continuado de frío y heladas supuso la pérdida de la mayoría de la superficie del viñedo alemán y del norte de Francia (Derham, 1708 - 1709).
- La propagación de la filoxera (*Viteus vitifoliae*) en Europa: Las primeras manifestaciones de este patógeno (procedente de Norteamérica) en Europa se produjeron en Inglaterra hacia 1863, aunque recientes análisis de ADN mitocondrial sugieren que el patógeno se introdujo a través Francia en raíces de *V. riparia* (Downie, 2002). En 1883, y después de intentar diversas estrategias de control de esta enfermedad, a través de mejora genética, se llegó a la conclusión de que el único remedio eficaz frente a la filoxera era el uso de vides americanas como portainjertos de las vides europeas (Riley, 1883). De esta manera se consiguió salvar una buena parte del patrimonio vitícola europeo.

A finales del siglo XIX, la producción de uva se recuperó y continuó su crecimiento con España, Francia e Italia como los principales productores. A pesar de la expansión mundial de la viticultura y de su importancia creciente en países emergentes, estos tres países europeos están dentro de las 4 primeras posiciones, siendo China el tercer país con mayor superficie vitícola tras España y Francia (OIV, 2021).

2.2 Posición taxonómica de la vid

La vid pertenece a la familia de las Vitáceas (*Vitaceae*), que agrupa taxonómicamente 16 géneros y aproximadamente 950 especies (Wen *et al.*, 2018), de las cuales 60 se corresponden con especies silvestres interfértiles del género *Vitis*, que se distribuyen a lo largo de Europa, Norteamérica y Asia en diferentes situaciones climatológicas (mediterránea, subtropical y continental-templada). En la Figura 1 se recoge un árbol filogenético de las vitáceas recientemente publicado. De todas estas especies, *Vitis vinifera* es la única ampliamente utilizada en la industria vitivinícola actual. Es también la única especie del género *Vitis* autóctona de Eurasia y, según algunos autores, la primera en aparecer hace 65 millones de años (de Saporta, 1879).

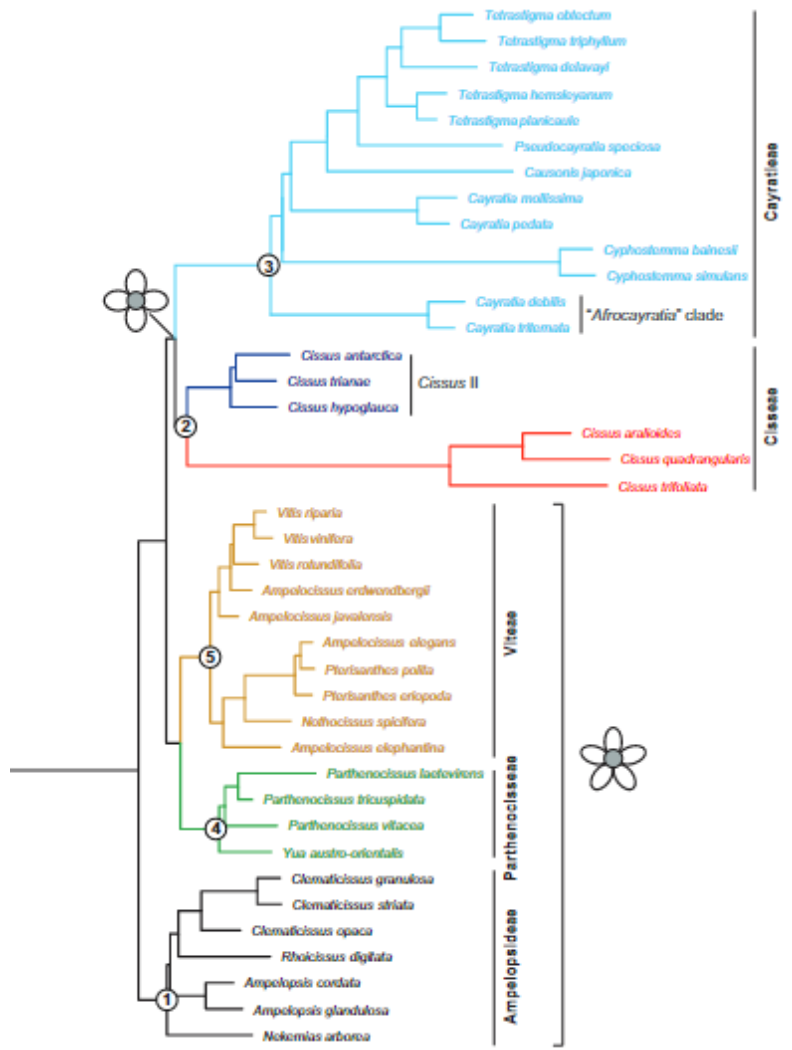


Figura 1. Árbol filogenético de las vitáceas. Las flores hacen referencia al número de pétalos que presentan las flores. Fuente: Wen *et al.*, 2018.

La vid silvestre es una liana heliófila (precisa de la luz directa del sol para desarrollarse) que se desarrolla generalmente a lo largo de las riberas de los ríos y en bosques aluviales caducifolios o semi-caducifolios. Las poblaciones de vides silvestres están en continuo declive, siendo una especie en peligro de extinción como consecuencia de la entrada de los patógenos norteamericanos y la destrucción de sus hábitats naturales (Arnold *et al.*, 2005). Esto supone un problema de conservación de la biodiversidad.

La gran mayoría de variedades actuales, independientemente de su uso (uva de mesa, uva pasa y uva de vinificación) están clasificadas como *Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera* y derivan de las vides silvestres clasificadas como *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris*, de las que se diferencian en algunos aspectos morfológicos (Levadoux, 1956; Zohary, 2003).

La **mejora genética** consiste en la selección y propagación de individuos (obtenidos a través de diferentes métodos) cuyas características puedan resultar útiles al ser humano. Entre ellos destacan los siguientes: hermafroditismo, alta fertilidad y productividad, tamaño de la baya, contenido en azúcar, acidez, etc. (Bacilieri *et al.*, 2013). Las variedades de uso actual son producto de varios sucesos que se han dado a lo largo de la historia:

- La domesticación de la vid
- Hibridaciones espontáneas o artificiales
- Mutaciones

3 JUSTIFICACIÓN

La vid es uno de los cultivos leñosos más importantes desde el punto de vista tanto económico como histórico. La entrada de la filoxera, el oídio y el mildiu a través de los intercambios comerciales con América supusieron un cambio sustancial en su forma de cultivo. La necesidad de utilizar portainjertos adecuados para los diferentes suelos vitícolas europeos sumada a la necesidad de frenar los efectos del oídio y el mildiu fueron las causas de una primera explosión de la mejora genética dedicada al cultivo de la vid a finales del siglo XIX. Sin embargo, la mejora genética tradicional es un proceso lento que no llegó a producir los resultados esperables en el corto plazo disponible para solventar la pérdida de viñedo europeo, por lo que finalmente se recurrió al injerto.

Los avances en biología molecular que se han ido produciendo desde finales del siglo XX han supuesto un cambio importante en la metodología de trabajo de la mejora genética. Por su parte, los marcadores moleculares han supuesto una reducción sustancial del proceso de mejora por cruzamientos, a través de las técnicas de MAS (Mejora Asistida por Marcadores), además de ser una herramienta indispensable dentro del ámbito de la selección clonal y la identificación varietal. Por otro lado, la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* supuso una verdadera revolución a la hora de obtener individuos modificados genéticamente de una forma mucho más precisa y rápida que la mejora tradicional. Sin embargo, la legislación restrictiva que impera dentro de la Unión Europea con respecto a los transgénicos ha impedido que existan plantaciones comerciales con variedades obtenidas a partir de esta técnica. A esto hay que sumar las dificultades para la regeneración de plantas tras su transformación.

Ya en el siglo XXI, el desarrollo del complejo CRISPR/Cas9 y sus posibilidades tanto de introducción de genes de interés como de edición de genes hacen de esta técnica una herramienta muy útil de cara a los desafíos que se puedan presentar en la viticultura del futuro. Otras técnicas, aún en estudio, podrían dar grandes resultados en los próximos

años. Entre ellas destaca el ARN de interferencia, una herramienta capaz de disminuir tanto la susceptibilidad de la vid frente a diferentes patógenos como la virulencia de los mismos. Presumiblemente, esta técnica no entrará dentro de la legislación de transgénicos, lo cual la convierte en una posible candidata a sustituir a los productos fitosanitarios actuales.

La reducción del uso de fungicidas y pesticidas en favor de una viticultura más sostenible comienza a ser un tema de preocupación dentro del sector y será necesario estar preparado para poder hacer frente a dicha situación.

El objetivo de la presente revisión bibliográfica es analizar el estado actual de la mejora genética de la vid, ya que, a día de hoy el desarrollo de todas estas técnicas, junto con la evaluación y la conservación eficaz del germoplasma existente en gran cantidad de viñedos antiguos, serán las responsables de hacer frente al contexto de cambio al que se enfrenta la viticultura mundial.

4 OBJETIVOS

Los principales objetivos de esta revisión bibliográfica son los siguientes:

- Revisar el proceso evolutivo de la vid desde las vides silvestres hasta las vides actuales
- Revisar las técnicas de mejora genética clásicas y su aplicación en vid
- Revisar el uso de marcadores moleculares en identificación, certificación y mejora de la vid
- Revisar las modernas tecnologías de introducción de genes y de control de su expresión

5 MÉTODOS Y MATERIALES

5.1 Búsqueda y recopilación de información

Esta revisión bibliográfica se ha elaborado utilizando diferentes buscadores de interés académico como *Web of science (WOS)*, *Uva Doc*, *Springer link* o *Google Scholar* entre otros, para luego llevar a cabo una selección de los artículos, tesis o libros teniendo en cuenta la relevancia de los autores, así como el número de citas en las que aparecen en otros artículos o libros. Se ha tenido en cuenta también la fecha de publicación para los artículos consultados más actuales.

Los métodos utilizados para buscar y recopilar información relacionada con el tema de esta revisión han consistido en la búsqueda de palabras clave (*keywords*) en inglés en los buscadores mencionados anteriormente. Además, otro método de búsqueda ha sido la consulta de las referencias correspondientes a la mayoría de los artículos de interés.

De cara a obtener información sobre algunas de las técnicas que se mencionarán en este trabajo, se ha recurrido a la consulta de bibliografía correspondiente a otras especies vegetales para facilitar la comprensión y la redacción del texto.

5.2 Elaboración de la revisión bibliográfica

Para la elaboración de la revisión se ha elaborado un esquema conceptual con los acontecimientos que han supuesto cambios importantes en la historia de la mejora genética de la vid. El esquema conceptual consta de los siguientes puntos:

- La mejora genética anterior y posterior a la invasión de la filoxera

- Las selecciones clonales y sanitarias
- La mejora genética asistida por marcadores moleculares
- Las técnicas de modificación genética y el control de la expresión

A partir de este esquema conceptual se han elaborado de la forma más ordenada posible (desde el punto de vista cronológico) los diferentes capítulos de la revisión bibliográfica.

Esta revisión bibliográfica se ha llevado a cabo siguiendo las normas recogidas en el documento “Normas de Estilo y Formato de TFG Enología” así como en la nueva propuesta aprobada por la Junta de Centro y el Comité del Grado de Enología que entró en vigor en el curso 2018/2019, en formato de “Normas de Revisión bibliográfica para Enología”.

Gran parte de la información sobre cómo ha avanzado el cultivo de la vid a lo largo de la historia y la mejora genética está recogida en libros y artículos publicados a partir de 1980. A la hora de discriminar contenido, se ha tenido en cuenta principalmente la claridad de lo expuesto además del impacto o la fecha de publicación.

6 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

6.1 Los inicios de la mejora genética: la domesticación

La domesticación de la vid es el primer resultado remarcable de la mejora genética del cultivo y, aunque parece ligada al descubrimiento del vino, no está claro cuál de los dos sucesos precedió al otro (Royer, 1988; McGovern, 2013).

En el caso de la vid, al seleccionar de forma intuitiva las vides más aptas para su cultivo, se seleccionaron automáticamente y de forma inconsciente las que mostraban mayor productividad (las plantas hermafroditas, aunque la vid silvestre es dioica; y las mejor adaptadas a las prácticas de cultivo: homogeneidad en la fenología, buena respuesta a la poda, al estaquillado, etc.). Así, la domesticación de la vid fue un proceso muy gradual apoyado en fenómenos como la reproducción sexual, la propagación vegetativa y a la aparición y selección intuitiva de mutaciones somáticas (This *et al.*, 2006).

Respecto a la reproducción sexual, conviene recordar que la vid es una especie altamente heterocigótica, es decir, que presenta alelos diferentes para cada posición (o *locus* del genoma). Por consiguiente, cada descendiente heredará una combinación distinta de alelos, por lo que, con cada evento de reproducción sexual de la vid, ya sea espontánea o provocada, se producen numerosos individuos (uno diferente por cada semilla) todos ellos distintos entre sí y distintos de los progenitores (This *et al.*, 2006).

Una vez obtenida una progenie, a partir de un cruzamiento, habrá que seleccionar entre todos esos descendientes, y de la forma más eficaz posible, aquel cuyo fenotipo particular, como un nivel particular de productividad, puede ser un proceso largo teniendo en cuenta el período juvenil de la planta (de 3 a 5 años) y el tiempo posterior para evaluar sus aptitudes ya sea uva de mesa o uva de vinificación (This *et al.*, 2006).

A su vez, y debido a la gran complejidad genética de los rasgos de interés de la vid, pueden ser necesarias varias generaciones (varios eventos de reproducción sexual independientes y sucesivos) para obtener las características deseadas. Una vez identificado el individuo deseado, este ya se puede propagar asexualmente mediante estaquillas para obtener viñedos homogéneos. Aunque la multiplicación asexual asegura que todos los individuos son iguales a sus progenitores, la aparición de

mutaciones somáticas en cualquier individuo de dicha población puede dar lugar a la aparición de diferentes genotipos y a veces de diferentes fenotipos, como es el caso bien documentado de la variedad Tempranillo Blanco (Martínez *et al.*, 2001).

El conocimiento e identificación del progenitor silvestre de un cultivo es el prerequisite principal para poder reconstruir su evolución tras producirse su domesticación. Una vez se conocen en profundidad tanto la distribución (Figura 2) (con la intención de conocer dónde pudo tener lugar la domesticación) como las características del ancestro silvestre, se puede llevar a cabo la comparación para determinar exactamente lo que ocurrió durante todo ese proceso (Zohary, 2003).

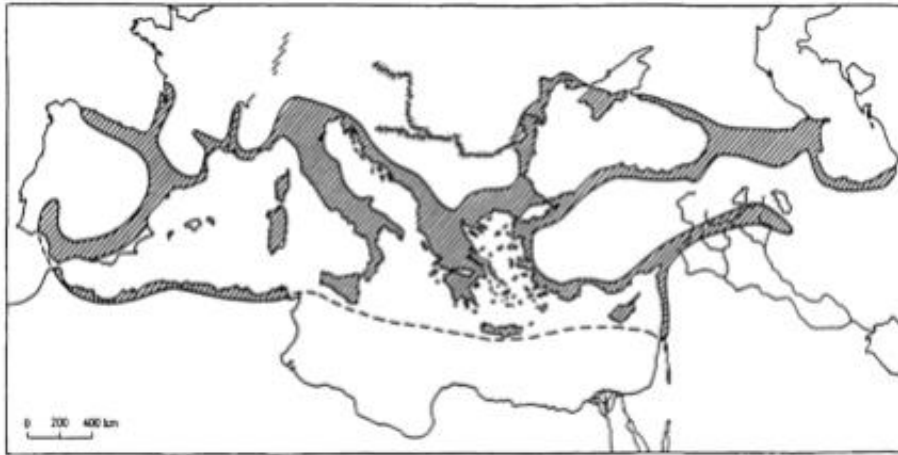


Figura 2. Distribución espacial de *Vitis vinifera subsp. sylvestris*. Fuente: McGovern *et al.*, 2013.

Las vides silvestres se distribuyen a lo largo del sur de Europa y el oeste de Asia. Su hábitat natural son las riberas de los ríos y bosques aluviales caducifolios o semi-caducifolios. En zonas de oriente próximo las vides silvestres se suelen encontrar en desfiladeros y en las proximidades de los arroyos, aunque también se han encontrado poblaciones silvestres en zonas templadas de Europa a lo largo del Rin y el Danubio. Y, según Zohary (2003), hay hallazgos paleobotánicos que indican que durante los períodos más cálidos del Pleistoceno y el Holoceno las vides silvestres se llegaron a extender incluso más al norte.

Las diferencias entre las especies silvestres y cultivadas son notables no solo a nivel morfológico, sino a nivel genético, como demuestran distintos estudios basados en técnicas moleculares (SNP: Polimorfismo de nucleótido único y SSR: Repetición de secuencias discretas) (Lopes *et al.*, 2009; Aradhya *et al.* 2003). A nivel morfológico, las principales diferencias entre las vides silvestres y las cultivadas se dan en las hojas, racimos, flores (la vid pasa de ser una especie dioica a una hermafrodita) y pepitas, tal como se indica en la Figura 3.

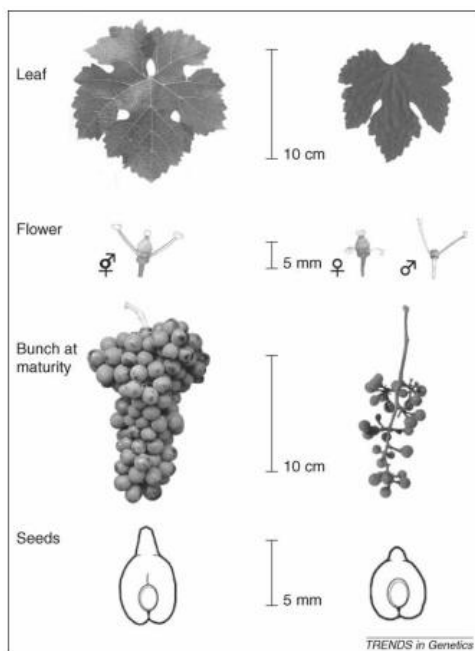


Figura 3. Diferencias morfológicas entre las vides cultivadas (a la izquierda) y las vides silvestres (panel derecho). Fuente: *This et al., 2006*.

No hay un consenso generalizado sobre si hubo uno o varios eventos de domesticación y dónde tuvieron lugar. Una serie de hallazgos de recipientes de cerámica apuntan a que la domesticación se produjo en el Cáucaso entre el 4000 a.C. y 6000 a.C. (Mc Govern *et al.*, 2007). Otros autores apuntan a que se produjo otro evento de domesticación en la región mediterránea, como apunta un estudio basado en el polimorfismo del ADN de cloroplastos (Arroyo-García *et al.*, 2006) y otro, desarrollado en Portugal basándose en análisis de SSR (Lopes *et al.*, 2009).

6.2 La mejora genética clásica y la era de la filoxera

6.2.1 Efecto de la filoxera sobre el viñedo europeo

Aunque ya se practicaba sobre otros cultivos, la mejora genética comenzó a desarrollarse en la vid en los inicios del siglo XIX en Norteamérica. Los colonos no fueron capaces de cultivar las vides traídas de Europa (*Vitis vinifera*) como acostumbraban debido a diferentes causas como las fuertes heladas, los daños producidos por insectos como la filoxera y la presencia endémica de patógenos como el oídio y el mildiu. Por el contrario, las vides americanas, eran muy resistentes a estas condiciones ambientales, pero producían vinos de escasa calidad organoléptica. En 1822, investigadores de la Universidad de Harvard recomendaron el desarrollo de híbridos entre las vides europeas y americanas con el fin de combinar el sabor procedente de las vides europeas con la resistencia a enfermedades y plagas de las vides americanas. Durante las siguientes décadas, diferentes mejoradores americanos obtuvieron diferentes variedades, algunas de ellas conocidas como Ada, Brighton, Diamond, Herbemont o Isabella. A las variedades obtenidas durante este período se las conoce como híbridos americanos (Eibach & Töpfer, 2015).

En Europa, previamente a la invasión de la filoxera eran escasos los ejemplos de mejora genética dirigida. Los más importantes fueron: en 1824, Louis Bouschet obtuvo la variedad Petit Bouschet, procedente del cruce entre las variedades Teintourier y Aramon. Posteriormente, su hijo, Henri Bouschet obtuvo la hoy conocida como

Garnacha Tintorera a partir del cruce entre Petit Bouschet y Garnacha (Santiago *et al.*, 2008). La Garnacha Tintorera ha sido una de las variedades más cultivadas en determinadas zonas del noroeste de España y también cultivada en diferentes zonas de Europa. Henri Bouschet también obtuvo otras variedades mediante cruzamientos, algunas de las cuales también se cultivaron por diferentes zonas del continente europeo.

Aunque tradicionalmente se han considerado como producto de cruces espontáneos, hay algunos autores que afirman que algunas de las variedades de uso actual más afamadas son producto de cruces intencionados. Algunos ejemplos son el Cabernet Sauvignon (Sauvignon Blanc x Cabernet Franc, siglo XVII) y algunas de las variedades Borgoñesas como Aligoté, Auxerrois, Chardonnay, Gamay Noir o Melon, todas ellas procedentes de cruces entre la Gouais Blanc y otras variedades como la Pinot Noir (Bowers *et al.*, 1999; Myles *et al.*, 2011).

La entrada de la filoxera (1863) en Europa, además de la entrada del oídio (1845) y del mildiu (1878) fueron los detonantes de la explosión de la mejora genética de la vid en Europa. La destrucción de miles de hectáreas de viñedo inicialmente en Francia provocó que científicos, viticultores y mejoradores se pusieran manos a la obra para dar continuidad al cultivo de la vid con el fin de mitigar los efectos de la filoxera y los daños causados por el mildiu y el oídio. Sin embargo, este interés no pudo evitar la enorme pérdida de biodiversidad tanto de vides cultivadas como de las silvestres.

En 1869 Leo Laliman, un viticultor de Burdeos, informó de que algunas especies de vides americanas eran más resistentes a la filoxera que *Vitis vinifera*, lo que corroboró Gaston Bacille en 1871. Estas dos personas sugirieron por primera vez la idea de injertar las vides europeas sobre las vides americanas (Pouget, 1990). Posteriormente en 1883, se adopta el injerto como la única vía eficaz para luchar contra la filoxera.

Las vides americanas se utilizaron (y se siguen utilizando) como portainjertos, tanto de forma directa, como a través de la obtención de híbridos interespecíficos resistentes a diferentes enfermedades, lo que constituye uno de los ejemplos más notorios de control biológico frente a una plaga.

6.2.2 La mejora de los portainjertos

En 1885, Pierre Marie Alexis Millardet estableció una clasificación de diferentes especies americanas en función de su resistencia a la filoxera (Tabla 1). También fue el primero en demostrar que la resistencia a la filoxera era una característica heredable.

Tabla 1. Clasificación según Millardet de diferentes vides americanas y asiáticas en función de su resistencia a la filoxera. Fuente: Ollat *et al.*, 2014.

Resistencia alta	Resistencia intermedia	Sensibles
<i>V. riparia</i> <i>V. rupestris</i> <i>V. cordifolia</i> <i>V. cinerea</i> <i>V. aestivalis</i>	<i>V. labrusca</i> <i>V. lincecumii</i> <i>V. candicans</i>	<i>V. vinifera</i> <i>V. amurensis</i>

Los primeros intentos de mejora en el ámbito de los portainjertos fueron cruces entre *V. riparia* y *V. vinifera*, los cuales se caracterizaron por presentar una resistencia insuficiente a la filoxera.

De las aproximadamente 30 especies del género *Vitis* procedentes de Norteamérica, solo unas pocas fueron utilizadas para la mejora de los portainjertos debido a las

dificultades para obtener descendientes y la baja fertilidad de dichas especies. *V. riparia* y *V. rupestris* fueron inicialmente las especies más atractivas puesto que eran resistentes a la filoxera, se podía injertar sobre ellas sin problema y enraizaban fácilmente. Sin embargo, eran muy poco tolerantes a altos contenidos de caliza activa en el suelo (Galet, 1988).

Posteriormente, se estudiaron las características de diversas especies de los géneros *Vitis* y *Muscadinia*, y se descubrió que *V. berlandieri* tenía una elevada resistencia a la caliza y a la filoxera, si bien tenía ciertas dificultades de enraizamiento. *V. candicans* es una especie que se caracteriza por un alto vigor y por presentar tolerancia a los nemátodos (*Meloidogyne sp.*), a la sequía y a la salinidad del suelo. *Muscadinia rotundifolia* fue considerada más adelante como una especie interesante en mejora genética debido a su resistencia a plagas y enfermedades. Sin embargo, presenta una aptitud muy baja para el injerto debido a las diferencias genéticas que presenta frente a las especies del género *Vitis* (entre otros, el género *Muscadinia* presenta $2n=40$ cromosomas, frente a los $2n=38$ de las especies del género *Vitis*).

Existen aproximadamente 70 u 80 portainjertos utilizados en todo el mundo. Una parte son especies americanas que se usan directamente, pero la mayoría son híbridos interespecíficos que se obtuvieron mayoritariamente entre finales del siglo XIX y principios del siglo XX (Ollat *et al.*, 2014). A continuación, se expone una lista con las principales familias de portainjertos, algunos ejemplos y sus características más reseñables:

- *Vitis riparia* (Riparia Gloire de Montpellier): Una de las dos especies que se utiliza de forma pura, sin cruzar. Presenta resistencia a la filoxera y buenas aptitudes para el injerto y el enraizamiento. Posee un vigor medio-bajo, baja resistencia a la sequía y a la caliza y muy baja resistencia a la salinidad.
- *Vitis rupestris* (Rupestris du Lot o St. Georges): Es la otra especie que se utiliza de forma pura. Presenta resistencia a la filoxera y buenas aptitudes para el injerto y el enraizamiento. Posee un vigor considerado entre alto y muy alto, resistencia media a la sequía y a la salinidad y baja a la caliza.
- *Vitis riparia* x *Vitis rupestris* (3309C, 101-14MG): Presentan una elevada resistencia a la filoxera, enraízan bien y poseen un vigor medio-bajo. Su resistencia a la caliza y a la sequía es muy baja. Es por esto que los portainjertos de esta familia se utilizan en suelos fértiles para la producción de uva de buena calidad.
- *Vitis riparia* x *Vitis berlandieri* (SO4, 5BB, 161-49C, 420A): Es la familia más común de portainjertos. Proceden de cruces artificiales debido a la floración en diferentes épocas de las especies parentales. Presentan resistencia elevada a la filoxera, media a la caliza y la sequía y diversas aptitudes para el enraizamiento y el injerto en función del descendiente. El vigor es medio-alto.
- *Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris* (110R, 99R, 1103P, 140Ru): Los portainjertos descendientes de esta familia presentan una resistencia a la sequía elevada, lo que los hace ideales en zonas mediterráneas. Presentan dificultades para el injerto y el enraizamiento, pero una vez establecidos, confieren un vigor elevado a la variedad injertada.
- *Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* (41B, 333EM, Tisserand): Esta familia se caracteriza por una buena resistencia a la caliza y por una resistencia media a la filoxera, pero suficiente en la práctica. Enraízan con dificultad y confieren un vigor medio-alto en función del tipo de suelo.

- *Vitis candicans* (*V. solonis*, *V. longii*, *V. champinii*, 1613C): Los portainjertos de esta familia se caracterizan por presentar cierta resistencia los nemátodos y a la salinidad del suelo y se utilizan principalmente en viñedos irrigados y con suelos infestados por nemátodos. Se obtienen por hibridaciones tanto naturales como artificiales a partir de individuos pertenecientes a dicha especie. Algunos de los portainjertos pertenecientes a esta familia son poco resistentes a la filoxera, como es el caso del 1613C.
- *Muscadinia*: Los híbridos procedentes de *Muscadinia* se caracterizan por presentar resistencia a nemátodos del género *Xiphinema* y una alta resistencia a la filoxera. Los mayores problemas que presentan son la dificultad para el injerto y el enraizamiento debido al parentesco procedente del género *Muscadinia*. Suelen ser también poco tolerantes a la caliza y a la sequía.

La identificación clásica de portainjertos se ha llevado a cabo mediante técnicas ampelográficas (Galet, 1988). En la actualidad, las técnicas de biología molecular permiten identificar tanto portainjertos como su progenie. En 2019, Riaz *et al.* llevaron a cabo un estudio para conocer la progenie y la diversidad genética de 26 portainjertos a partir de marcadores moleculares de tipo SSR. Se llegó a la conclusión de que la diversidad genética en términos de portainjertos es muy estrecha debido a que la mayoría de ellos proceden probablemente de muy pocos ejemplares de las 3 especies de vides americanas mencionadas en párrafos anteriores. También se corrigió el supuesto parentesco de algunos portainjertos, lo cual indica que la información proporcionada por los mejoradores de la época no fue del todo exacta. De esta manera se puede concluir que sería aconsejable ampliar la base genética de los portainjertos para afrontar el cambio en la viticultura europea en el contexto del cambio global.

6.2.3 La mejora con fines sanitarios

A finales del siglo XIX, de forma paralela a la mejora genética de los portainjertos se iniciaron programas de mejora genética en Europa con el objetivo de combinar la resistencia natural de las vides americanas a la filoxera, oídio, mildiu y otras enfermedades con la calidad enológica proporcionada por las vides europeas. Gracias a los resultados de estos programas de mejora, se plantaron por toda Europa, principalmente en Francia, decenas de hectáreas de los conocidos como híbridos productores directos (HPD). En 1929, existían alrededor de 250.000 hectáreas de viñedo plantado con híbridos, llegando a alcanzar las 500.000 hectáreas en 1958 (Töpfer *et al.*, 2011).

Algunas de las variedades híbridas más conocidas son las siguientes: Baco Noir, Baco Blanc, Chambourcin, Folla Redonda, Vignoles, Villard Blanc, Villard Noir, Rosette, Seyval Blanc, Chelois, etc. La mayoría de los híbridos desarrollados no son el resultado de cruces directos entre *V. vinifera* y especies americanas, sino que son el resultado de sucesivos cruces entre dichas especies. Algunas variedades de HPD son el resultado de la sexta generación de cruces.

Entre los mejoradores más destacados están los siguientes: Albert Seibel, Francois Baco, Georges Couderc, Eugene Kuhlmann, Bertille Seyve (Padre), Bertille Seyve (Hijo), Joannes Seyve, Pierre Landot, Ferdinand Gaillard, J.F. Ravatt, etc. (Reynolds, 2015).

Estos híbridos productores directos destacaban por ser medianamente resistentes a la filoxera, por su resistencia a enfermedades y su productividad, pero por el contrario los vinos elaborados a partir de los híbridos eran de una calidad bastante baja, lo cual les

hizo adquirir mala fama. La reducción de la superficie de plantación con HPD en Francia se recoge en la Tabla 2.

Tabla 2. Superficie de algunas variedades de híbridos productores directos plantada en Francia en el siglo XX. Fuente: Reynolds, 2015.

Cultivar	France (ha)	
	1958–1968	1975–1998
Baco noir	12,000	188 ^c
Chambourcin	–	3369 ^a
		1204 ^b
Marechal Foch	105	13 ^b
Leon Millot	271	21 ^b
Vignoles	–	–
Rosette	3683	–
Aurore	289	–
Rougeon	5	–
Chancellor	–	–
De Chaunac	–	–
Chelois	905	651 ^a
Cascade	177	–
Seyval blanc	1309	26 ^b
Villard blanc (S.V. 12–375)	21,379	2775 ^b
Villard noir ^b	30,375	2537
Vidal blanc ^c	–	5

La mala calidad de los vinos, junto con el descubrimiento de las propiedades antifúngicas del azufre y el cobre, además del éxito de los portainjertos como medio de lucha contra la filoxera propiciaron las restricciones y prohibiciones de plantación de los híbridos productores directos, provocando a su vez la finalización de las actividades de mejora genética de la época.

6.2.4 La mejora en uva de mesa.

La mejora en uva de mesa se ha basado en cruces entre diferentes variedades pertenecientes al género *Vitis vinifera*. En la uva de mesa se han buscado otras características como pueden ser: apirenia (uvas carentes de semillas), variedad de sabor, dulzor, color, uniformidad en el color y en las bayas, fresca, textura, tamaño de la baya, resistencia a la botrytis, período de maduración (de muy precoz a muy tardío, para aumentar la disponibilidad en el mercado), estabilidad en el transporte (dificultad para que la baya se desprenda del racimo), tolerancia a la sequía y a las quemaduras del sol, etc.

Cabe destacar en España el papel del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) en colaboración con la empresa privada ITUM (Investigación y Tecnología de Uva de Mesa), de lo que se tratará en el apartado 6.3.

6.3 Marcadores moleculares y su uso en mejora genética

6.3.1 Los marcadores moleculares

Por definición, los marcadores moleculares son regiones (o '*loci*', plural de '*locus*') genéticas que pueden ser fácilmente rastreadas y cuantificadas en una población y que pueden estar asociados con un gen o con un rasgo de interés (Hayward *et al.*, 2015).

Existen diferentes tipos de marcadores:

- Marcadores clásicos o morfológicos: Son rasgos fenotípicos que suelen depender de genes menores (o aditivos) cuyo comportamiento es muy difícil de prever. En el caso de la vid, en esta categoría se engloban rasgos como el sexo de las flores, el color del hollejo o la apirenia.
- Marcadores bioquímicos: Pueden ser antígenos o isoenzimas, siendo los segundos los más utilizados en el campo de la genética de la vid. Estos marcadores se basan en las diferencias en la secuencia de aminoácidos que pueden presentar las diferentes enzimas que catalizan la misma reacción química. Este tipo de marcadores presentan unas importantes desventajas: reducido número de isoenzimas conocidas y su influenciabilidad por los factores ambientales, por lo que han caído en desuso.
- Marcadores moleculares: Están basados en la secuencia del ADN. Sus principales ventajas son su abundancia, su estabilidad, y su independencia con respecto a las condiciones ambientales.

Antes de conocerse la secuencia completa del genoma de la vid en 2007 (Jaillon *et al.*, 2007), los marcadores moleculares eran ya una realidad. Sin embargo, el avance científico en las técnicas de secuenciación y el progresivo abaratamiento de las mismas han facilitado el progresivo aumento del conocimiento sobre el genoma de la vid y su funcionamiento.

Existen diferentes tipos de marcadores moleculares como los RAPDS (Amplificación al azar de ADN polimórfico), los AFLPS (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados, por sus siglas en inglés), los SSR o microsatélites (Repetición de Secuencias Simples) y SNP (Polimorfismo de Nucleótido Único), entre otros. En la actualidad, en el ámbito del estudio de la vid, los más utilizados son los SSR y los SNP (Vezzulli *et al.*, 2019).

Los microsatélites o SSR son secuencias cortas de 1 a 6 pares de bases que se repiten en tándem en todos los organismos superiores (eucariotas) (Tautz & Renz, 1984). Estas repeticiones se distribuyen ampliamente en todo el genoma de la vid, especialmente en regiones intergénicas. Los SSR son codominantes y tienen un alto nivel de variación alélica, de ahí su utilidad como marcadores moleculares. En la actualidad, hay más de 400 SSR disponibles para su uso (Maul *et al.*, 2012). Más allá de la mejora genética, los SSR tienen también otras utilidades como la caracterización de germoplasma (Identificación de variedades), los estudios de diversidad genética, los estudios de parentesco basados en el ADN de cloroplastos, etc. (Vezzulli *et al.*, 2019).

Los SNP son variaciones en único nucleótido entre dos o más secuencias de ADN, incluyendo las inserciones o deleciones de un nucleótido (Ganal *et al.*, 2009). Los SNP son la forma más usual de variabilidad en el genoma, suelen ser bialélicos y consecuentemente menos polimórficos con respecto a los SSR. Sin embargo, esta limitación se ve compensada por su abundancia. Los SNP no son tan utilizados en mejora genética como los SSR, pero cada vez son más utilizados en otros ámbitos como la elaboración de mapas genéticos, los estudios de parentesco, los estudios de diversidad, la identificación varietal, los estudios de desequilibrio de ligamiento, etc. Este tipo de marcador ha empezado a sustituir a los microsatélites cuando se ha asociado a la tecnología de los *arrays* y *microarrays*, también conocidos como chips de ADN. En ellos se colocan en filas y columnas un gran número de fragmentos del genoma, lo que permite analizar de forma simultánea muchas regiones del mismo. Un ejemplo de este tipo es el GrapeReSeq 18k Vitis, el cual permite la lectura simultánea de 18.000 SNP (Le Paslier *et al.*, 2013).

Los SSR y los SNP también se han utilizado conjuntamente en la evaluación de la estructura genética de poblaciones, la elaboración de mapas genéticos de alta resolución, o en la mejora genética asistida por marcadores (MAS), entre otras aplicaciones.

6.3.2 La selección clonal

A finales de siglo XX la viticultura europea experimentó un gran cambio. Desde las instituciones europeas surgió el deseo de modernizar el viñedo y, para ello, se subvencionaron tanto los arranques como las nuevas plantaciones lo cual requería disponer de material vegetal bien identificado y certificado.

Los programas de selección clonal comenzaron tímidamente en Alemania a finales del siglo XIX y posteriormente, en la segunda mitad del siglo XX, comenzaron a ejecutarse por el resto de Europa en países como Francia e Italia. En España los programas de selección clonal comenzaron alrededor de 1970 en Cataluña y La Rioja.

El objetivo inicial de estos programas fue el de proporcionar al viticultor material vegetal sano (libre de virus) y más productivo. En la actualidad, estos programas también se centran en la obtención de material vegetal para la producción de vinos de calidad, o en la adaptación a condiciones concretas, en algunos casos en detrimento de la productividad.

La multiplicación vegetativa de la gran mayoría de variedades actuales a lo largo de la historia ha propiciado la acumulación de mutaciones, las cuales han provocado la aparición (que ha permitido a su vez la selección visual) de pequeñas diferencias entre los numerosos individuos que conforman las diferentes variedades. La selección clonal se apoya en este fenómeno natural, seleccionando de una forma más sistemática a los individuos cuyas características diferentes puedan ser aprovechables para el viticultor o por el consumidor como la acumulación de determinado nivel de azúcares, la compacidad del racimo, un perfil aromático particular del vino obtenido, etc. En este caso, la selección ya no es visual, sino que debe ir acompañada de estudios científicos comparativos para identificar a las “mejores” plantas, según las necesidades que se definan.

Ibañez *et al.* (2015) describieron los pasos del largo proceso de selección clonal que dura entre 10 y 15 años (Figura 4):

- Prospección de individuos en campo. Normalmente en parcelas de más de 30 años de edad, puesto que así hay mayor probabilidad de encontrar mutaciones. Las vides seleccionadas son estudiadas in situ durante 3 años en un proceso conocido como **preselección clonal**. El estudio requiere una caracterización agronómica y enológica tan completa como sea posible: peso de madera de poda, productividad, parámetros enológicos deseados, el estado sanitario (incluyendo el test ELISA) o la verificación de la identidad varietal de cada individuo (mediante estudios ampelográficos o moleculares, por ejemplo, a partir del estudio de microsatélites).
- Multiplicación vegetativa de las plantas elegidas para su posterior plantación en una **parcela de comparación** y en contenedores individuales para mantenerlas aisladas de nuevas infecciones. Deben pasar 2 o 3 años para que las plantas en la parcela de comparación entren en producción.
- Caracterización plena de los candidatos de la parcela de comparación. Esta parte del proceso tiene una duración de al menos otros 3 años. En esta parte del proceso se caracterizan muchos rasgos, desde agronómicos a enológicos,

que llega a pasar por un análisis sensorial llevado a cabo por un panel de expertos. La cantidad de datos recolectada durante este período de tiempo se analiza estadísticamente con el fin de elegir a los candidatos finales que serán certificados.

- El paso previo a la certificación, que puede durar otros 3 años, es la **evaluación sanitaria** oficial del material vegetal que se quiere certificar. En España, esta certificación la lleva a cabo el IMIDA (www.imida.es), que verifica la presencia de virus basándose en técnicas de inmunoabsorción (ELISA), técnicas moleculares (SSR o microsatélites) y técnicas de indexaje biológico.
- El último paso es la **certificación del material vegetal**. Esta se lleva a cabo por las autoridades competentes, las cuales no evalúan la calidad de los clones sino su identidad varietal y la ausencia de un corto listado de virus: entrenudo corto infeccioso, el enrollado y el mosaico del Arabis. Además, de manera opcional se puede concretar la ausencia del virus del jaspeado y del virus de la madera rugosa. Una vez tiene lugar la certificación, el material vegetal se pone en manos de los viveros para su distribución. El material certificado es distribuido con una etiqueta azul, mientras que el material estándar se distribuye con una etiqueta amarilla.

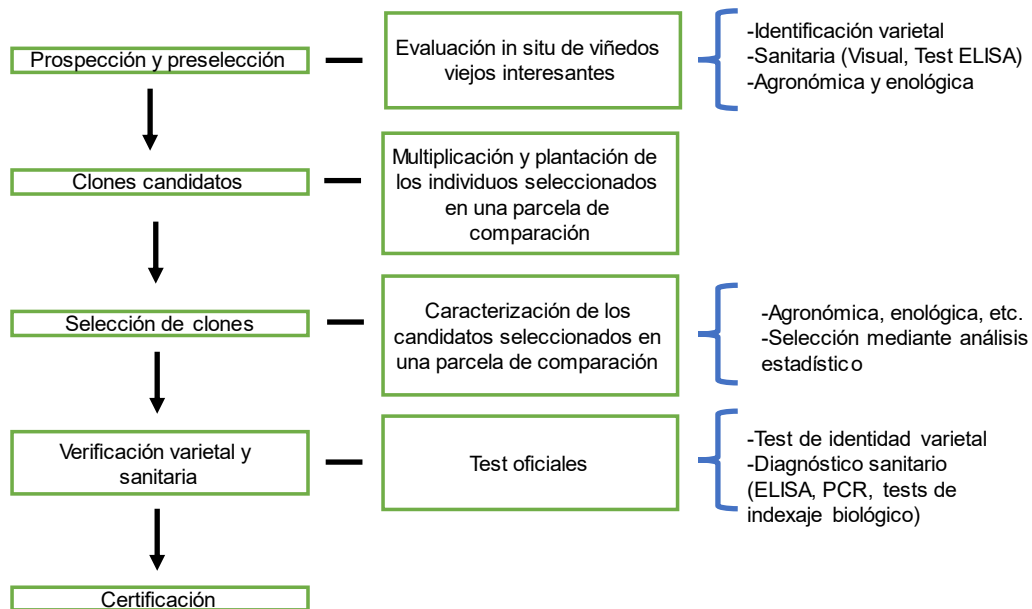


Figura 4. Representación esquemática del proceso de selección clonal. Adaptado de: Ibáñez et al., 2015.

Las ventajas del uso de material certificado son: la mejor previsión del comportamiento de las vides en el terreno, la posibilidad de elección de clones adaptados a determinados ambientes, la garantía del estado sanitario vegetal, la uniformidad en el viñedo para facilitar el manejo y la vendimia, etc. Sin embargo, una de las mayores desventajas es la pérdida de diversidad genética dado que todas las plantas provienen de un mismo individuo y son idénticas genéticamente (Ibáñez et al., 2015).

En este apartado cabe destacar la enorme función desarrollada por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL). Desde el ITACYL, se han llevado a cabo dos programas de selección clonal. El primer programa (iniciado en 1990) se centró en las variedades principales de la región (Albillo Mayor, Albillo Real, Verdejo, Garnacha Tinta, Juan García, Mencía, Prieto Picudo y Tempranillo) (Yuste et al., 2006). El segundo (2002) se centró en las variedades minoritarias de la región (Godello,

Malvasía Castellana (sinonimia Doña Blanca), Moscatel de Grano Menudo, Puesta en Cruz, Verdejo Serrano, Garnacha Roja, Verdejo Colorado, Bastardillo Chico (sinonimia Merenzao), Bruñal, Estaladiña (sinonimia Pan y Carne), Gajo Arroba, Mandón, Negro Saurí (sinonimia Merenzao), Prieto Picudo Oval, Rufete y Tinto Jeromo) (Ibáñez *et al.*, 2015).

Paralelamente a los procesos de selección clonal, desde ITACYL se aprovecharon las prospecciones de parcelas para identificar correctamente a las variedades de la región, en las que la nomenclatura de las variedades en las distintas zonas de cultivo era muy confusa. Además, en muchos casos, se recogieron con objeto de estudiarlas más a fondo, una gran cantidad de variedades en peligro de desaparición. En este caso se apoyaron en un análisis molecular, en el que Santana *et al.* (2010) llevaron a cabo el análisis de 16 loci SSR nucleares y 3 cloroplásticos de un total de 421 muestras cuyos resultados se compararon con diferentes bases de datos. Se hallaron 300 muestras redundantes, 13 homónimos y 27 genotipos desconocidos. Este estudio basado en el análisis de marcadores moleculares contribuyó a resolver el problema de las sinonimias y homonimias en Castilla y León y a identificar con más precisión el germoplasma disponible.

6.3.3 La mejora asistida por marcadores moleculares

Como ya se mencionó anteriormente, la rápida evolución en las técnicas de secuenciación ha tenido una influencia importante en los programas de mejora genética. La mejora asistida por marcadores (MAS) se emplea tanto en uva de mesa y uva de vinificación como en portainjertos, con el objetivo de disminuir los tiempos para la obtención de individuos con las características deseadas (Vezzulli *et al.*, 2019).

Aunque el conocimiento del genoma de la vid es aún incompleto, es imprescindible hablar sobre el término locus de rasgo cuantitativo o QTL (*Quantitative Trait Loci*). Un QTL es un *locus* definido por los marcadores moleculares que lo flanquean, y que se relaciona con la variación de un rasgo fenotípico cuantitativo (resistencia a enfermedades, apirenia, fenología, etc.). Los QTL que explican menos del 20% de la variación fenotípica total se conocen como QTL menores, mientras que los que explican más del 20%, se conocen como QTL mayores. Del genoma de la vid se conocen principalmente genes de resistencia al oídio y al mildiu, caracterizándose la resistencia a estos patógenos por ser oligogénica (dependiente de un número relativamente pequeño de genes). Otros rasgos que también se conocen son los relacionados con la apirenia, con el tamaño de la baya y el racimo o la fenología. Se han establecido 9 categorías diferentes, las cuales se exponen en la siguiente tabla, para la clasificación de los numerosos rasgos fenotípicos en el ámbito de la genética de la vid. En la Tabla 3 se exponen los rasgos fenotípicos sobre los cuales hay estudios de QTL disponibles en la bibliografía.

Tabla 3. Listado de los rasgos fenotípicos de la vid divididos en diferentes categorías. Se han incluido los rasgos fenotípicos de los cuales hay estudios disponibles. Adaptado de: Vezzulli *et al.*, 2019.

Categoría	Rasgos afectados
Resistencia a patógenos	<ul style="list-style-type: none"> • Oídio • Mildiu • Antracnosis • Filoxera • Enfermedad de Pierce • Xiphinema index (Nemátodos) • Black rot • Botrytis • Nemátodos de la raíz (<i>Meloidogyne spp.</i>)

Metabolitos de la baya	<ul style="list-style-type: none"> • Antocianos • Ácidos • Azúcares • Terpenos 	<ul style="list-style-type: none"> • Taninos de la pulpa o de la baya • Potasio • Flavonoides
Morfología de la baya	<ul style="list-style-type: none"> • Peso de la baya • Firmeza de la baya • Diámetro de la baya 	<ul style="list-style-type: none"> • Volumen de baya • Peso de la baya verde
Fenología	<ul style="list-style-type: none"> • Maduración • Envero 	<ul style="list-style-type: none"> • Floración • Desborre
Rasgos vegetativos	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento • Morfología de las hojas • Eficiencia en el uso de agua • Superficie foliar 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de nietos • Magnesio foliar • Metabolitos foliares • Tricomas foliares • Exclusión de sodio foliar
Rasgos relacionados con las pepitas	<ul style="list-style-type: none"> • Número • Peso 	<ul style="list-style-type: none"> • Contenido en materia seca • Respuesta a las giberelinas
Rasgos relacionados con el racimo	<ul style="list-style-type: none"> • Fertilidad • Número de bayas • Longitud del pedúnculo • Forma 	<ul style="list-style-type: none"> • Peso • Longitud • Respuesta a las giberelinas
Estrés abiótico	<ul style="list-style-type: none"> • Estrés hídrico • Clorosis 	
Morfología de las flores	<ul style="list-style-type: none"> • Morfología de las flores 	

Los objetivos principales de la mejora asistida por marcadores son la introgresión de genes o alelos favorables procedentes de especies silvestres o la introducción de genes o alelos a partir de otras variedades de *Vitis vinifera*, la eliminación de los desequilibrios de ligamiento (conseguir que los alelos se hereden de forma independiente, no ligados) y la selección de los individuos con las características (fondo genético) deseadas. Para alcanzar estos objetivos existen diferentes estrategias de mejora:

- Retrocruzamientos asistidos por marcadores (MABC, *Marker-assisted Backcrossing*) y selección de fondo genético asistida por marcadores (MABS, *Marker-assisted Background Selection*): Estas dos estrategias se pueden englobar dentro de la misma. Los MABC permiten la selección de aquellos individuos que poseen el gen de interés, mientras que la MABS posibilita la elección de los individuos que, además, tienen una mayor proporción de genoma procedente del progenitor domesticado frente al progenitor silvestre. Esto se consigue analizando una parte importante del genoma gracias al desarrollo de la tecnología de los *arrays* o chips de ADN, lo que permite el análisis de un número elevado de SNPs en un número elevado de plantas (200 marcadores de 300 plantas, por ejemplo).
- Retrocruzamientos avanzados basados en QTL (AB-QTL, *Advanced Backcross QTL Strategy*): El concepto de QTL se ha tratado en párrafos anteriores. El

análisis de QTL ha permitido identificar alelos favorables para diversos rasgos, generalmente en vides silvestres o en vides americanas. El concepto de AB-QTL surge del deseo de introducir esos alelos en las variedades cultivadas. Esta estrategia se basa en el análisis de los QTL en generaciones tardías como BC2 o BC3 (segundo o tercer retrocruzamiento con la variedad cultivada original), en combinación con una selección fenotípica de los individuos con menor porcentaje de material genético procedente del progenitor silvestre.

- Acumulación en pirámide asistida por marcadores (MAP, *Marker Assisted Pyramidization*): Esta estrategia, usada principalmente en el área de la resistencia a patógenos, se basa en la selección asistida por marcadores para verificar la introducción de diferentes genes que controlan el mismo rasgo. La introducción sucesiva de los dos genes se lleva a cabo con el objetivo de asegurar la resistencia a un patógeno determinado en caso de que este evolucione adaptándose a uno de los genes de resistencia. En resumidas cuentas, se trata de poner dos barreras a un determinado patógeno por si este fuera capaz de superar una de las dos. En el caso de otras áreas de mejora, esta estrategia es también útil para asegurar la presencia del fenotipo deseado. Esta estrategia también se puede aplicar para la selección de varios rasgos simultáneamente. El procedimiento para ejecutar esta estrategia de mejora consiste en cruzar entre sí diferentes líneas de mejora, cada una de las cuales es portadora de genes o haplotipos complementarios de interés. Posteriormente se examina la progenie en busca de los individuos que hayan heredado los alelos beneficiosos en los loci objetivo (Di Gaspero & Foria, 2015).

El proceso clásico de mejora encaminado a la eliminación, por ejemplo, de las vides sensibles al mildiu, se lleva a cabo en el invernadero y tiene una duración estimada de entre 25 y 30 años, y comprende distintas etapas en las que se van evaluando un número creciente de plantas. Este proceso se puede acelerar mediante MAS para evaluar rápidamente y de forma más fiable dichos rasgos. Y esto se puede aplicar en todas las fases de testaje: desde la inicial, que se lleva a cabo de forma individual hasta las etapas de testaje principal sobre 500 individuos, tal como se refleja en la Figura 5. Finalmente, independientemente de la técnica de selección habrá que evaluar el material vegetal en campo.

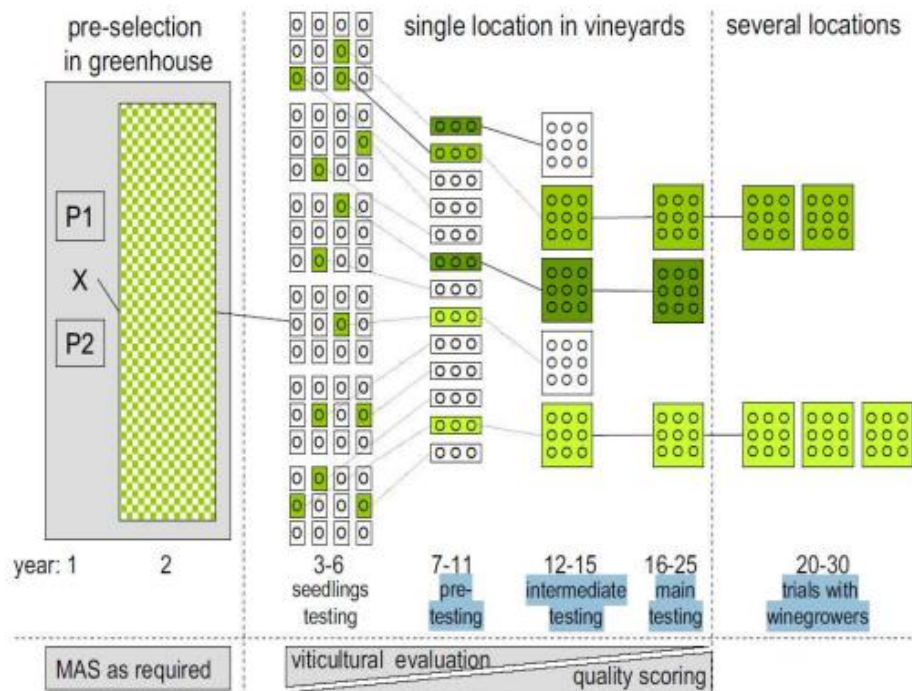


Figura 5. Pasos y esquema temporal de un programa típico de mejora genética de vid. Fuente: Töpfer et al., 2011.

Existen diferentes ejemplos de mejora asistida por marcadores. En Alemania, en el Julius Kuhn Institut, se han creado variedades de vid resistentes al oídio y al mildiu conocidas como PIWI (abreviatura del término alemán *'pilzwiederstandsfähig'*, que significa resistencia a enfermedades fúngicas) cuyo objetivo es combinar la resistencia a las enfermedades fúngicas con la calidad y tipicidad de las variedades tradicionales. Algunas de estas variedades tienen nombres como Sauvignier gris o Cabernet cortis. Los PIWI son un tema de debate en la actualidad puesto que hay opiniones a su favor (reducción del uso de pesticidas, sostenibilidad) y en su contra (pérdidas de diversidad varietal, erosión genética).

Otro ejemplo de mejora asistida por marcadores es el de la identificación de dos alelos de un gen (*PdR1*) de resistencia a la enfermedad de Pierce llevado a cabo por la Universidad de California. El gen *PdR1* es un gen mayor de resistencia frente a *Xylella fastidiosa* en especies del género *Vitis*. En la actualidad estos dos alelos se están introduciendo en una gran cantidad de fondos genéticos utilizando marcadores moleculares estrechamente ligados a dicho gen (Di Gaspero & Foria, 2015).

En España, destaca el papel del IMIDA en colaboración con la empresa privada ITUM (Investigación y Tecnología de Uva de Mesa). Este proyecto conjunto tiene como objetivo el desarrollo de nuevas variedades de uva de mesa resistentes a patógenos de origen fúngico como pueden ser el oídio y el mildiu, centrándose también en el desarrollo de nuevas variedades apirenas altamente productivas y de calidad comercial (Ibáñez et al., 2015).

6.4 La modificación genética en viticultura

Cabe señalar que los individuos obtenidos a partir de la mayoría de estas técnicas se consideran organismos genéticamente modificados (OGM's). La mejora de los cultivos, cuando implican la obtención de OGM's suele estar asociada a preocupaciones de seguridad, riesgos ambientales, una mala aceptación social y problemas de salud dada

la presencia de ADN ajeno. A la pobre aceptación social de los OGM, hay que sumar la legislación restrictiva promovida por la Unión Europea, siendo el maíz Bt la única especie modificada cuyo cultivo está permitido en ciertos países de la Unión Europea incluyendo España (Saporta *et al.*, 2016). A pesar de esto, el genoma de la vid se conoce cada vez mejor y van emergiendo nuevas tecnologías, por lo que se espera que los intentos de mejora aumenten conforme avancen los años.

Como se ha visto en apartados anteriores, la transferencia de genes que confieren la resistencia a determinados patógenos es un hecho. Sin embargo, el alto nivel de heterocigosidad, la introgresión no deseada de genes de la especie donante y el largo período que requiere la vid para su establecimiento en el campo (larga juvenilidad) y posterior evaluación hacen de la mejora por cruzamientos (ya sea por la vía tradicional o asistida por marcadores) un proceso largo y tedioso. Debido a esto, las técnicas de edición genética se han convertido en una alternativa interesante para la incorporación de genes útiles a la vid sin cambiar las características deseables de las variedades ya conocidas (Saporta *et al.*, 2016).

A partir de mediados de los años 80, surgen los primeros intentos de introducción de genes en vid. Estos intentos fueron parcialmente satisfactorios puesto que se consiguió introducir genes, aunque no se logró la regeneración de plantas estables. No es hasta 1990, cuando se obtiene la primera planta de vid transgénica (Mullins *et al.*, 1990). En 1994, Le Gall *et al.* consiguieron introducir genes de interés agronómico al incorporar un gen que codifica la proteína de la cubierta del GCMV (*Grapevine Chrome Mosaic Virus*, Virus del mosaico del cromo amarillo de la vid). A partir de dicho momento, las técnicas para la transferencia de genes han avanzado notablemente, si bien siguen existiendo dificultades para la regeneración de plantas no quiméricas (plantas cuyas células poseen el mismo ADN en todos sus tejidos y órganos) (Dalla Costa *et al.*, 2019). El conocimiento de la secuencia del genoma de la vid (que contiene en torno a 30.400 genes) abrió el camino para la obtención de plantas cisgénicas, aquellas que contienen genes o secuencias regulatorias procedentes de especies compatibles. Sin embargo, actualmente aún se conocen muy pocos genes y caracteres cuantitativos, por lo que, hoy en día, la mejora mediante modificación genética se ha dirigido principalmente hacia la resistencia a patógenos como hongos y virus. Con el creciente conocimiento sobre la función y regulación de los genes y promotores de la vid se espera poder trabajar con un abanico más amplio. Existen diferentes técnicas para la obtención de plantas modificadas genéticamente, las cuales se comentarán en los siguientes apartados.

6.4.1 La transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens* es una técnica que se conoce desde los años 90. Hiei *et al.* (1997) describieron con gran detalle como es el proceso de transformación, que se resume a continuación.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria presente en los suelos capaz de transformar genéticamente células vegetales mediante un segmento de ADN (llamado ADN de transferencia, abreviado como ADN-T) procedente de un plásmido inductor de tumores (plásmido Ti), nativo en *A. tumefaciens*. El resultado de la infección es la formación de agallas (tumores) en la especie afectada. El proceso de formación de las agallas consiste en una serie de etapas: 1) Las bacterias se adhieren a las raíces de la planta, atraídas por determinados compuestos fenólicos exudados por las células de las plantas cuando están heridas y penetran en la planta por dichas heridas. 2) Una vez dentro, el ADN-T de la bacteria (contenido en el plásmido Ti) es transferido al núcleo interior de las células e incorporado en el genoma de la planta, utilizando una compleja maquinaria

que se denomina “región de virulencia”. 3) El ADN-T que se transfiere contiene genes para que la planta sintetice auxinas y citoquininas (hormonas vegetales) que inducen la división celular de forma desordenada y dan lugar a la formación de las agallas. 4) En el ADN-T hay también codificadas enzimas que inducen la producción de opinas por parte de las células infectadas, que constituyen una fuente de carbono y energía para *A. tumefaciens*. Las opinas son aminoácidos no proteicos variados, cada uno de los cuales es utilizado específicamente por la cepa de *A. tumefaciens* capaz de metabolizarlos. Esto hace que las poblaciones de bacterias pertenecientes a dichas cepas aumenten enormemente.

El plásmido Ti, de inducción de tumores contiene, pues, dos zonas de importancia: la región ADN-T que es la que físicamente se transfiere al núcleo de las células vegetales y que contiene los genes de la producción de opinas y los de la síntesis de hormonas, y una región llamada “región de virulencia” en la que se localizan los genes responsables de que dicha transferencia y su inserción en el genoma vegetal se lleve a cabo de forma eficaz. El proceso de transferencia se produce incluso cuando los genes de virulencia y el ADN-T se encuentran en replicones separados dentro de la célula de *A. tumefaciens*. Comprender este proceso natural fue fundamental para diseñar los primeros vectores de transferencia de genes.

La estrategia que se sigue para utilizar *A. tumefaciens* en la transformación de plantas consiste en sustituir los genes del ADN-T (opinas y hormonas) por los genes que se quieren introducir en la planta, acompañados de un agente selectivo (también llamado gen “chivato”) que ayudará a identificar las células transformadas, es decir, aquellas que hayan incorporado los genes de interés.

Generalmente se utiliza un sistema binario, en el cual se manejan dos plásmidos: el plásmido Ti, que proporciona los genes de virulencia, y un plásmido previamente “desarmado” (en el que se han eliminado los genes inductores del tumor) en el que se introduce el ADN-T exógeno, que contiene los genes de interés además de un marcador (también llamado agente selectivo) para comprobar si tras la infección se ha producido la transferencia. El uso de estos vectores permite la transferencia de largos segmentos de ADN que no suelen producir reordenamiento de genes y la integración de los genes del ADN-T en un bajo número de copias en los cromosomas de la planta. Los genes introducidos por este método se transmiten a la descendencia de forma Mendeliana. Este mecanismo está resumido en la Figura 6.

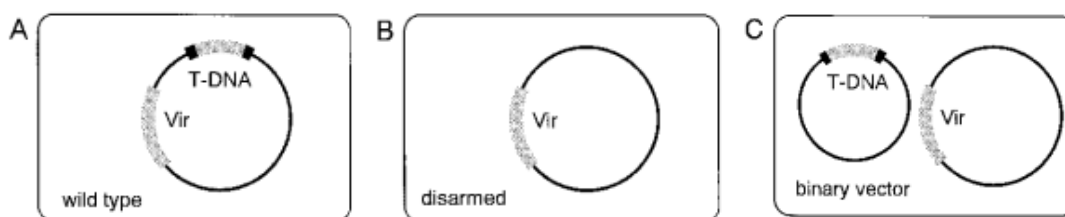


Figura 6. Representación esquemática de diferentes cepas y vectores de *A. tumefaciens*. A: Cepa salvaje. B: Cepa desarmada. C: Cepa portadora de un vector binario. Abreviaciones: T-DNA, ADN de transferencia; Vir, región de virulencia. Fuente: Hiei et al., 1997.

A pesar del gran interés existente en esta tecnología, esta no ha llegado a ser utilizada de forma amplia debido a que se pueden producir problemas durante el proceso de transformación y/o en la regeneración de plantas modificadas genéticamente. En un artículo publicado por Saporta *et al.* (2016) se enumeran los principales factores limitantes a la hora de regenerar las plantas de vid modificadas:

- El genotipo: Independientemente de la metodología utilizada para la transferencia de genes, el genotipo es el factor más influyente para la consecución de la regeneración. Antes de generar plantas transgénicas, se necesita un protocolo eficiente para la regeneración adventicia, el cual está altamente influenciado por el genotipo y las condiciones de cultivo (explantos utilizados, medio de cultivo, etc.). Existen diferentes QTL relacionados con la regeneración, lo cual es indicativo de la implicación de diferentes genes en el proceso de regeneración, aunque el proceso sigue siendo muy experimental. Variedades como 'Shiraz' o 'Cabernet Sauvignon' son más fáciles de regenerar que 'Sauvignon Blanc' o 'Riesling'.
- Regeneración adventicia: La regeneración adventicia puede producirse mediante organogénesis o embriogénesis somática, siendo la segunda técnica la más utilizada para las especies del género *Vitis*. La embriogénesis somática tiene como objetivo la obtención de embriones a partir de células somáticas. Como explantos iniciales se han utilizado hojas, anteras, estambres, flores completas, semillas, estigmas y estilos, peciolos, zarcillos y protoplastos. Los problemas que suelen ocurrir y que reducen la tasa de regeneración de plantas son diversos: germinación de embriones aberrantes, embriones sin cotiledones, embriones con diferente número de cotiledones o cotiledones con formas extrañas. La mayoría de estos embriones anormales no suelen convertirse en plantas normales. Para el proceso de transformación se usan comúnmente 3 tipos de tejidos embriogénicos: embriones somáticos de hojas, anteras u óvulos; callo embriogénico de hojas, anteras, ovarios o flores enteras; suspensiones celulares de anteras u ovarios.
- La cepa de *Agrobacterium* y el agente selectivo durante la regeneración: En diferentes estudios se ha constatado que la eficacia en la transformación mediante *Agrobacterium* depende del cultivar utilizado. Además, tras la inoculación de *Agrobacterium*, en algunas especies vegetales pueden aparecer necrosis y pardeamiento de los tejidos como resultado de reacciones oxidativas. Para promover únicamente el crecimiento de las células transformadas, se introducen genes de resistencia a determinados antibióticos como la kanamicina, la paromomicina o la neomicina. Sin embargo, los tejidos celulares de algunos cultivares de vid pueden ser particularmente sensibles a la kanamicina, por lo que puede ser complicado ajustar la concentración de este antibiótico que permita únicamente el desarrollo de las células transformadas.

En el ámbito de la mejora mediante *Agrobacterium*, Saporta *et al.* (2016) enumeran los 3 ámbitos principales en los cuales se han llevado a cabo intentos de mejora:

- Resistencia a hongos y bacterias patógenas: La respuesta natural de la vid frente a un patógeno pasa por la producción de enzimas, como las quitinasas o glucanasas, capaces de degradar la pared celular de los agentes patógenos. Otro mecanismo de defensa consiste en la producción de fitoalexinas, como los estilbenos, que inhiben el crecimiento de los agentes patógeno. Debido a esto, la mejora en este ámbito ha tratado de introducir genes relacionados con propiedades antifúngicas. Ha habido intentos de introducir quitinasas del arroz (Nirala *et al.*, 2010), de especies del género *Trichoderma* (Kikkert *et al.*, 1998), de otras especies del género *Vitis*, etc. También se han intentado introducir genes que codifiquen la estilbeno sintasa, una enzima clave para la producción de trans-resveratrol (Dai *et al.*, 2015), la principal fitoalexina de la vid.

- Resistencia a virus y otros patógenos: Como se ha comentado anteriormente, los primeros ejemplos de plantas modificadas genéticamente estuvieron dirigidos a conseguir resistencia frente a determinados virus mediante la introducción de genes que codificaran las proteínas de la cubierta de dichos virus (Le Gall *et al.*, 1994). Estos virus fueron el entrenudo corto infeccioso y el virus del mosaico del Arabis. Los resultados obtenidos no fueron los esperados. Con respecto a otros patógenos, se introdujeron 3 secuencias que codificaban la síntesis de un glicósido para hacer frente a la filoxera sin obtener los resultados deseados (Franks *et al.*, 2006).
- Tolerancia al frío, rendimiento y calidad de la uva: La respuesta de la vid para hacer frente al estrés abiótico se rige a través de rutas metabólicas complejas con un alto grado de interacción entre genes. Esto es indicativo de la dificultad adicional que conlleva la mejora genética en este ámbito. Un ejemplo de resistencia al frío fue la introducción de genes que codificaban proteínas anticongelantes. Aunque estas plantas no fueron evaluadas en campo, se halló un contenido en alanina más alto con respecto al control (Jin *et al.*, 2009). Otro ejemplo, esta vez ligado al rendimiento, fue la introducción de un gen para incrementar el número de flores por racimo. En la primera floración, las plantas modificadas presentaron el doble de flores. Sin embargo, en la segunda floración el número fue similar con respecto al control (Mezzetti *et al.*, 2002).

6.4.2 La transformación mediante CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 se basa en la inmunidad adaptativa de las bacterias, y actualmente es la técnica más potente para la edición genética en un amplio abanico de campos como la medicina o la mejora vegetal y animal. CRISPR, acrónimo en inglés de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (en español Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas) hace referencia a familias de secuencias repetidas en el ADN de bacterias. Estas repeticiones, de 29 nucleótidos de longitud, fueron inicialmente identificadas en 1987 en *Escherichia coli*. Cas9 es una nucleasa, es decir, una enzima capaz de catalizar la ruptura de los enlaces que conforman un segmento de ADN (Samanta *et al.*, 2016).

El sistema CRISPR/Cas9 se ha concebido para la introducción de mutaciones deseadas en genes de interés. El sistema opera a través de un ARN guía, complementario a la secuencia de ADN dirigida, unido a la proteína Cas9 formando un complejo. El complejo Cas9/ARN guía desenrolla la doble cadena de ADN para su posterior inspección en busca de la secuencia complementaria. El proceso de desenrollado del ADN tiene lugar gracias al motivo adyacente de protoespaciador (PAM), una secuencia de ADN de 2 a 6 pares de bases que se encuentran justo después de la secuencia de ADN a la que es dirigida Cas9. Una vez encontrada la secuencia complementaria objetivo, la nucleasa se encarga de cortar la secuencia dando lugar a la rotura de la doble hebra (Dalla Costa *et al.*, 2019). La reparación de la rotura se puede dar a través de dos rutas, la unión de extremos no homólogos (NHEJ: *Non-homologous DNA End Joining*) o la recombinación homóloga directa (HDR: *Homology Directed Repair*). La NHEJ consiste en la unión directa de los dos extremos resultantes lo que conduce a la inactivación del gen debido a los cambios producidos en la pauta de lectura. La HDR tiene lugar en presencia de un fragmento de ADN donante, cuyos brazos son homólogos a los extremos generados tras la rotura de la doble hebra. Este segundo mecanismo puede dar lugar a una mutación puntual o la inserción de algún gen interesante (Samanta *et al.*, 2016). En la Figura 7, se muestra de forma esquemática lo expuesto con anterioridad.

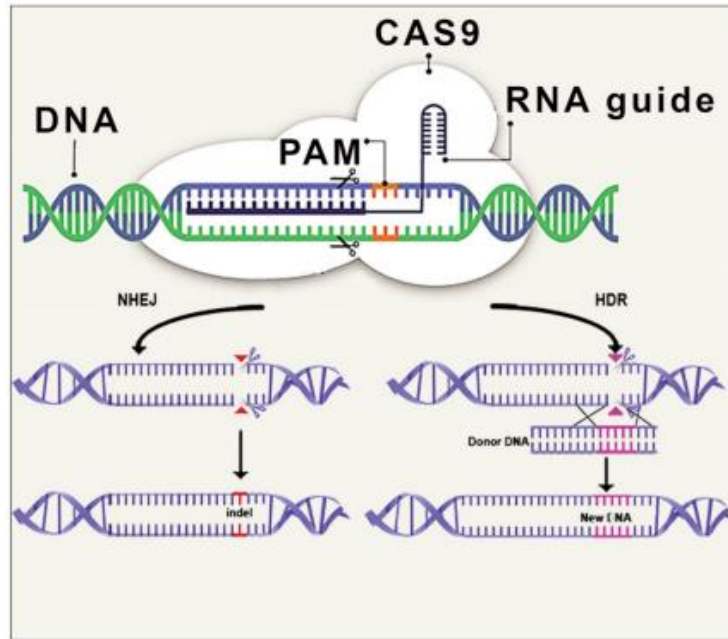


Figura 7. Representación esquemática del funcionamiento de la nucleasa CRISPR-Cas9. Abreviaciones: PAM, motivo adyacente del protoespaciador; NHEJ, unión de extremos no homólogos; HDR, recombinación homóloga directa. Fuente: Dalla Costa et al., 2019.

La aplicación de estas tecnologías puede resultar de gran utilidad en el ámbito de la mejora genética de la vid (Figura 8), dado que permiten la modificación precisa de genotipos de interés y a que las plantas resultantes de este proceso no se consideran OGMs. Los sistemas utilizados en la actualidad para la introducción del complejo CRISPR-Cas9 en las células objetivo son los siguientes (Dalla Costa et al., 2019):

- Introducción mediante *A. tumefaciens*
- Introducción mediante protoplastos que contienen la proteína Cas9 y el ARN guía
- Biolísticos

Existen otros sistemas en estudio y que han arrojado resultados prometedores como son los materiales derivados de los nanotubos de carbono (Campos et al., 2021).

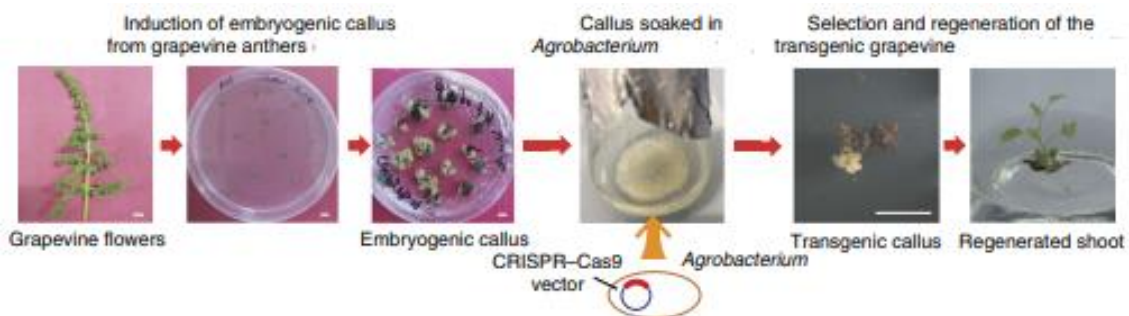


Figura 8. Procedimiento para la transformación de células de vid y su posterior regeneración. Inicialmente, se obtienen callos embrionarios a partir de anteras. Posteriormente, se incuban los callos en presencia de *Agrobacterium*, el cual ejerce de vector de transporte del complejo CRISPR/Cas9. Finalmente, se seleccionan las células transformadas para su posterior regeneración. Fuente: Osakabe et al., 2018.

El sistema CRISPR/Cas9 presenta también ciertas desventajas como son las rupturas de la doble cadena en zonas no deseadas; la obligada presencia de las secuencias PAM (NGG) restringe de cierta forma las zonas del genoma editables; el gran tamaño de la

nucleasa Cas9 que puede resultar limitante. Actualmente existen líneas de investigación dirigidas a solventar progresivamente estos problemas. Por ejemplo, existe la posibilidad de modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína Cas9 con el objetivo de que reconozca otras secuencias PAM diferentes a NGG. A estos problemas hay que añadir los ya comentados problemas para la regeneración de plantas comentados en apartados anteriores (Dalla Costa *et al.*, 2019).

Existen diferentes ejemplos de vides modificadas genéticamente mediante CRISPR/Cas9. Ren *et al.* (2016) modificaron una suspensión de células de la variedad Chardonnay utilizando *A. tumefaciens* como vector de transporte. Consiguieron inactivar el gen que codifica la enzima *L-idonato deshidrogenasa (idnDH)* con el fin de alterar la ruta biosintética del ácido tartárico. Ren *et al.* (2019) también han sido capaces de inactivar el gen que codifica la enzima *fitoeno desaturasa* en las variedades Neo Muscat, Chardonnay y en el portainjerto 41B. Wan *et al.* (2020) introdujeron mutaciones en el locus O de resistencia al mildiu (*MLO*) en la variedad Thompson Seedless. En este locus es donde se cree que residen los genes de susceptibilidad al mildiu. Tras la edición de los genes *VvMLO3* y *VvMLO4*, las plantas regeneradas exhibieron una mayor resistencia a la infección por mildiu con respecto a las plantas control. Por último, cabe destacar el estudio llevado a cabo por Jiao *et al.* (2020). En este estudio se modificó el gen que codifica la proteína *VvPR4b*, relacionada con la patogenicidad, ya que, forma parte del mecanismo de defensa de la planta frente a un patógeno invasor. Tras la modificación de la proteína mediante CRISPR/Cas9 y su consecuente inactivación, las plantas modificadas mostraron una mayor susceptibilidad frente al mildiu, confirmando el papel que ejerce la proteína *VvPR4b* frente al mildiu.

6.4.3 El ARN de interferencia

En el apartado anterior se ha hablado de la posibilidad de evitar la expresión de determinados genes relacionados con la susceptibilidad de la planta frente a determinados patógenos. Este mecanismo, denominado silenciamiento génico constituye una manera atractiva para aumentar la resistencia a los diferentes patógenos que pueden afectar a la vid, además de ser una alternativa a la introducción de genes de resistencia.

El silenciamiento se puede conseguir por transformación mediante modificación genética, lo cual está estrictamente regulado en el ámbito europeo. Por el contrario, el ARN de interferencia es una técnica emergente que permite silenciar genes selectivamente sin necesidad de realizar modificaciones genéticas (aunque no está regulado oficialmente, esta técnica no entraría dentro de la legislación de transgénicos) (Marcianò *et al.*, 2021).

Esta técnica se basa en el mecanismo natural de gran número de organismos para regular la expresión génica o para defenderse de la presencia de ADN exógeno. Para el primer caso, la planta produce específicamente moléculas conocidas como micro ARNs (miARN) con forma de horquilla que sirven de guía para degradar el ARN mensajero de los genes objetivo. Para el segundo caso, al detectar ARN de doble cadena (ARNdc) la planta produce pequeños ARN de interferencia (siARN) que defienden a la planta de la presencia del ARN exógeno. En resumen, tanto el miARN como el siARN son ARN complementarios a una porción del ARN mensajero que producen los patógenos. Cuando se va a producir la unión entre ambas moléculas, se inhibe la traducción y consecuentemente la expresión del gen o del fragmento exógeno introducido (Marcianò *et al.*, 2021).

El silenciamiento postranscripcional de genes puede ser estimulado a través de la adición de moléculas en forma de horquillas de ARNdc o de miARNs artificiales. Uno de los mayores obstáculos de esta técnica es la introducción del ARN de interferencia en el interior de la célula. Las diferentes posibilidades de introducción pasan por la aplicación directa, el uso de transportadores proteicos o nanopartículas de diferentes materiales (Dubrovina *et al.*, 2020).

Existen ejemplos de aplicación por vía foliar de ARN de interferencia. Dubrovina *et al.* (2020) disminuyeron los niveles de transcripción del gen que codifica la enzima *neomicina fosfotransferasa II* en la especie *Arabidopsis thaliana*. Marcianò *et al.* (2021) silenciaron con éxito el gen *VviLBDIf7* en la variedad Pinot Noir, uno de los genes de susceptibilidad al mildiu. Las plantas tratadas con el ARN de interferencia exhibieron mayor resistencia al mildiu con respecto a las plantas control. En otro ejemplo, Haile *et al.* (2021) consiguieron silenciar los genes de virulencia *PvDCL1* y *PvDCL2* del mildiu. Los tratamientos tuvieron un efecto preventivo y curativo al disminuir la tasa de progreso de las hojas ya infectadas.

Esta técnica, si en el futuro es llevada a gran escala, podría suponer una revolución en el ámbito de la protección de cultivos al tener un doble enfoque, el de silenciar los genes de susceptibilidad de la especie vegetal afectada y el de silenciar los genes de virulencia de la especie patogénica.

7 CONCLUSIÓN

Al ser la vid un cultivo de gran importancia cultural y económica, a lo largo de la historia, se han utilizado todas las estrategias de mejora disponibles en cada momento. Sin embargo, los resultados obtenidos en vid, a diferencia de otros cultivos, no han sido los esperables y no han logrado dar respuesta a los problemas que se han ido planteando, todo ello debido a las características genéticas de la vid.

Recientemente, el actual nivel de conocimiento sobre la genética de la vid, derivado de la aplicación de técnicas moleculares está permitiendo identificar cada vez con mayor precisión las bases genéticas de muchos rasgos de interés vitícola. A su vez, estas técnicas permiten una evaluación más precisa del germoplasma disponible tanto en variedades minoritarias como en poblaciones silvestres.

Por otro lado, el reciente desarrollo de las técnicas de transformación genética podría suponer un cambio sustancial en el enfoque de la mejora de la vid en relación con su adaptación al cambio global.

Es aconsejable que el mundo vitícola esté atento y abierto a los nuevos avances para que estos puedan ser incorporados. A su vez, será necesario estar atento a la legislación europea sobre estas técnicas de mejora puesto que cuales podría ser limitante para la aplicación en campo de todas estas novedades. De esta manera, a través de estas técnicas, se podría hacer frente de una manera más rápida al contexto de cambio al que se enfrenta la vitivinicultura mundial.

8 BIBLIOGRAFÍA

Arnold, C., Schnitzler, A., Douard, A., Peter, R., & Gillet, F. (2005). Is there a future for wild grapevine (*Vitis vinifera* subsp. *silvestris*) in the Rhine Valley?. *Biodiversity & Conservation*, 14(6), 1507-1523.

- Arroyo-García, R., Ruiz-García, L., Bolling, L., Ocete, R., López, M. A., Arnold, C., ... & Martínez-Zapater, J. M. (2006). Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular ecology*, *15*(12), 3707-3714.
- Bacilieri, R., Lacombe, T., Le Cunff, L., Vecchi-Staraz, D., Laucou, V., Genna, B., ... & Boursiquot, J. M. (2013). Genetic structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection. *BMC plant biology*, *13*(1), 1-14.
- 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*(5433), 1562-1565.
- Campos, G., Chialva, C., Miras, S., & Lijavetzky, D. (2021). New technologies and strategies for grapevine breeding through genetic transformation. *Frontiers in plant science*, *12*.
- Dai, L., Zhou, Q., Li, R., Du, Y., He, J., Wang, D., ... & Wang, Y. (2015). Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *121*(2), 397-412.
- Dalla Costa, L., Malnoy, M., Lecourieux, D., Deluc, L., Ouaked-Lecourieux, F., Thomas, M., & Torregrosa, L. J. M. (2019). The state-of-the-art of grapevine biotechnology and new breeding technologies (NBTS). *Oeno One*, *53*(2), 189-212.
- de Saporta, G. (1879) *Le monde des plantes avant l'apparition de l'homme*. Masson
- Derham, W. I. The history of the great frost in the last winter 1703 and 1708/9. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *26*(324), 453-478.
- Di Gaspero, G., & Foria, S. (2015). Molecular grapevine breeding techniques. In *Grapevine breeding programs for the wine industry* (pp. 23-37). Woodhead Publishing.
- Downie, D. A. (2002). Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology*, *11*(10), 2013-2026.
- Dubrovina, A. S., Aleynova, O. A., Suprun, A. R., Ogneva, Z. V., & Kiselev, K. V. (2020). Transgene suppression in plants by foliar application of in vitro-synthesized small interfering RNAs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(5), 2125-2135.
- Eibach, R., & Töpfer, R. (2015). Traditional grapevine breeding techniques. In *Grapevine breeding programs for the wine industry* (pp. 3-22). Woodhead Publishing.
- Franks, T. K., Powell, K. S., Choimes, S., Marsh, E., Iocco, P., Sinclair, B. J., ... & Van Heeswijck, R. (2006). Consequences of transferring three sorghum genes for secondary metabolite (cyanogenic glucoside) biosynthesis to grapevine hairy roots. *Transgenic Research*, *15*(2), 181-195.
- Galet, P. (1988). *Cepages et vignobles de France. Tome 1 Les vignes Americaines*. Charles Déhan, Montpellier, France.
- Ganal, M. W., Altmann, T., & Röder, M. S. (2009). SNP identification in crop plants. *Current opinion in plant biology*, *12*(2), 211-217.

- Gerrath, J., Posluszny, U., & Melville, L. (2015). *Taming the wild grape: Botany and horticulture in the Vitaceae*. Springer.
- Haile, Z. M., Gebremichael, D. E., Capriotti, L., Molesini, B., Negrini, F., Collina, M., ... & Baraldi, E. (2021). Double-stranded RNA targeting dicer-like genes compromises the pathogenicity of *Plasmopara viticola* on grapevine. *Frontiers in plant science*, 12.
- Hayward, A. C., Tollenaere, R., Dalton-Morgan, J., & Batley, J. (2015). Molecular marker applications in plants. *Plant genotyping*, 13-27.
- Hiei, Y., Komari, T., & Kubo, T. (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant molecular biology*, 35(1), 205-218.
- Ibáñez, J., Carreño, J., Yuste, J., & Martínez-Zapater, J. M. (2015). Grapevine breeding and clonal selection programmes in Spain. *Grapevine breeding programs for the wine industry*, 183-209.
- Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Cassagrande, A., ... & Wincker, P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *nature*, 449(7161), 463-7.
- Jin, W.; Dong, J.; Hu, Y.; Lin, Z.; Xu, X.; Han, Z.; 2009: Improved cold-resistant performance in transgenic grape (*Vitis vinifera* L.) overexpressing cold-inducible transcription factors AtDREB1b
- Johnson H. The story of wine. New York: Sterling Publishing Co.; 2004.
- Kikkert, J. R., Ali, G. S., Wallace, P. G., Reisch, B., & Reustle, G. M. (1998, July). Expression of a fungal chitinase in *Vitis vinifera* L.'Merlot'and'Chardonnay'plants produced by biolistic transformation. In *VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding 528* (pp. 299-306).
- Le Gall, O., Torregrosa, L., Danglot, Y., Candresse, T., & Bouquet, A. (1994). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). *Plant Science*, 102(2), 161-170.
- Le Paslier, M. C., Choisne, N., Scalabrin, S., Bacilieri, R., Berard, A., Bounon, R., ... & Topfer, R. (2013, April). The GRAPERSEQ 18K *Vitis* genotyping chip. In *IX International Symposium on Grapevine Physiology&Biotechnology*.
- Levadoux, L. Les populations sauvages et cultivées des *Vitis vinifera* L. *Annales de l'amélioration des plantes* 6, 59–118 (1956).
- Li, M. Y., Jiao, Y. T., Wang, Y. T., Zhang, N., Wang, B. B., Liu, R. Q., ... & Liu, G. T. (2020). CRISPR/Cas9-mediated VvPR4b editing decreases downy mildew resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Horticulture research*, 7.
- Marcianò, D., Ricciardi, V., Fassolo, E. M., Passera, A., Bianco, P. A., Failla, O., ... & Toffolatti, S. L. (2021). RNAi of a putative grapevine susceptibility gene as a possible downy mildew control strategy. *Frontiers in plant science*, 12.
- Martínez, J., Martínez, T., & Renedo, T. V. (2001). Tempranillo blanco: una nueva variedad para personalizar los vinos blancos de Rioja: El CIDA presenta en Salical el primer blanco tempranillo. *Cuaderno de campo*, (18), 14-16.

Maul, E., Sudharma, K. N., Kecke, S., Marx, G., Müller, C., Audeguin, L., ... & This, P. (2012). The European Vitis Database (www. eu-vitis. de): A technical innovation through an online uploading and interactive modification system.

McGovern, P. E. (2013). *Ancient wine*. Princeton University Press.

Mezzetti, B., Pandolfini, T., Navacchi, O., & Landi, L. (2002). Genetic transformation of *Vitis vinifera* organogenesis. *BMC biotechnology*, 2(1), 1-10.

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

Mullins, M. G., Tang, F. C., & Facciotti, D. (1990). Agrobacterium-mediated genetic transformation of grapevines: transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. *Bio/technology*, 8(11), 1041-1045.

Myles, S., Boyko, A. R., Owens, C. L., Brown, P. J., Grassi, F., Aradhya, M. K., ... & Buckler, E. S. (2011). Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3530-3535.

Nirala, N. K., Das, D. K., Srivastava, P. S., Sopory, S. K., & Upadhyaya, K. C. (2010). Expression of a rice chitinase gene enhances antifungal potential in transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 49(4), 181-187.

OIV. (2021, abril). *Activity report 2021*. <https://www.oiv.int/js/lib/pdfjs/web/viewer.html?file=/public/medias/8767/activityreporteng.pdf>

Ollat, N., Bordenave, L., Tandonnet, J. P., Boursiquot, J. M., & Marguerit, E. (2014, October). Grapevine rootstocks: origins and perspectives. In *International Symposium on Grapevine Roots 1136* (pp. 11-22).

Osakabe, Y., Liang, Z., Ren, C., Nishitani, C., Osakabe, K., Wada, M., ... & Nagamangala Kanchiswamy, C. (2018). CRISPR–Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. *Nature protocols*, 13(12), 2844-2863.

Pouget, R. (1990). The history of phylloxera control in vines in France (1868-1895).

Prados Martínez, F. (2011). La producción vinícola en el mundo fenicio-púnico: apuntes sobre cultivo de la vid y consumo del vino a través de las fuentes arqueológicas y literarias.

Ren, C., Liu, X., Zhang, Z., Wang, Y., Duan, W., Li, S., & Liang, Z. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific reports*, 6(1), 1-9.

Ren, F., Ren, C., Zhang, Z., Duan, W., Lecourieux, D., Li, S., & Liang, Z. (2019). Efficiency optimization of CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *Frontiers in plant science*, 10, 612.

Reynolds, A. G. (2015). Grapevine breeding in France – a historical perspective. *Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry*, 65–76.

Riaz, S., Pap, D., Uretsky, J., Laucou, V., Boursiquot, J. M., Kocsis, L., & Andrew Walker, M. (2019). Genetic diversity and parentage analysis of grape rootstocks. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(6), 1847-1860.

- Riley, C. V. (1883). The Grape Phylloxera in France: Compte rendu des travaux du service du Phylloxera. Année 1882. Procès verbaux de la session annuelle de la Commission supérieure du Phylloxera. Rapports et pièces annexes. Lois, décrets et arrêtés relatif au Phylloxera. Paris, Impr. nat., 1883. 603 p. 4°. *Science*, (20), 576-578.
- Royer, C. (1988). Mouvement historiques de la vigne dans le monde. *La Vigne et le Vin*, 15-25.
- Samanta, M. K., Dey, A., & Gayen, S. (2016). CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic research*, 25(5), 561-573.
- Santana, J. C., Heuertz, M., Arranz, C., Rubio, J. A., Martínez-Zapater, J. M., & Hidalgo, E. (2010). Genetic structure, origins, and relationships of grapevine cultivars from the Castilian Plateau of Spain. *American journal of enology and viticulture*, 61(2), 214-224.
- Santiago, J. L., González, I., Gago, P., Alonso-Villaverde, V., Boso, S., & Martínez, M. C. (2008). Identification of and relationships among a number of teinturier grapevines that expanded across Europe in the early 20th century. *Australian journal of grape and wine research*, 14(3), 223-229.
- Saporta, R., San Pedro, T., & Gisbert, C. (2016). Attempts at grapevine (*Vitis vinifera* L.) breeding through genetic transformation: the main limiting factors. *Vitis*, 55(4), 173-186.
- Tautz, D., & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*, 12(10), 4127-4138.
- This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics*, 22(9), 511-519.
- Töpfer, R., Hausmann, L., Harst, M., Maul, E., Zyprian, E., & Eibach, R. (2011). New horizons for grapevine breeding. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology*, 5(1), 79-100.
- Vezzulli, S., Doligez, A., & Bellin, D. (2019). Molecular mapping of grapevine genes. In *the grape genome* (pp. 103-136). Springer, Cham.
- Wan, D. Y., Guo, Y., Cheng, Y., Hu, Y., Xiao, S., Wang, Y., & Wen, Y. Q. (2020). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3 results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Horticulture research*, 7.
- Wen, J., Lu, L. M., Nie, Z. L., Liu, X. Q., Zhang, N., Ickert-Bond, S., ... & Chen, Z. D. (2018). A new phylogenetic tribal classification of the grape family (Vitaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 56(4), 262-272.
- Wen, J., Nie, Z. L., Soejima, A., & Meng, Y. (2007). Phylogeny of Vitaceae based on the nuclear GAI1 gene sequences. *Botany*, 85(8), 731-745.
- Yuste, J., Arranz, C., Albuquerque, M. V., & Rubio, J. A. (2006). Variedades autóctonas de vid en Castilla y León: clones certificados a disposición de la viticultura. *La Semana Vitivinícola*, 3123, 1942-7.
- Zohary, D. (2003). The domestication of the grapevine *Vitis vinifera* L. in the Near East. In *The origins and ancient history of wine* (pp. 44-51). Routledge.