

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE SEGREGANTES IDENTIFICADOS CON MARCADORES DE MICROSATÉLITES, CON ÉNFASIS EN APIRENIA Y RESPUESTA A ÁCIDO GIBERÉLICO EN CRECIMIENTO DE BAYAS DE UVA¹

Phenotypic characterization of microsatellite-fingerprinted segregants, focused on seedlessness and giberelic acid response on berry size of grapes¹

Margarita Barticevic R.², Kattina Zavala M.^{2,3}, Simona De Felice², Jorge Valenzuela B.², Carlos Muñoz Sch.² y Patricio Hinrichsen R.^{2*}

ABSTRACT

In this article the characterization of a number of table grape (*Vitis vinifera* L.) crossings is reported on the development of seedlessness, berry size, and response to giberelic acid (GA3) treatment on berry growth. To do so, segregants of known identity have been used and their affiliation has been verified based on a group of five microsatellite markers selected because of their high heterozygosity evaluated on the progenitors. These markers detected between 18 and 21% of plants coming from mother self-pollination events, as well as 3% of genotypes non-related to either progenitor. The crosses studied were Ruby Seedless x Sultanina, Ruby Seedless x Perlette and their corresponding reciprocals (76 and 56 seedlings in production, respectively), as well as Black Seedless x Flame Seedless (23 seedlings in production). Forty percent of seeded descendants were identified among the different crosses, a value similar to that reported in other breeding programs that have used seedless progenitors. For all of the constitutively expressed traits evaluated (seed weight and rudiment total weight and berry size) continuous segregation and positive transgression with respect to the progenitors were detected, particularly in seed size. The size of seeds or rudiments and berries exhibited an appropriate reproducibility between seasons, contrasting with the response to GA3 which was unstable during the three evaluation seasons. In spite of that, seedlings were found that regularly had a very interesting combination, which is having negligible presence of seed rudiments and large berry size (15 to 19 mm).

Key words: *Vitis vinifera* L., genetic improvement of table grapes, affiliation, microsatellites, seedlessness, giberelic acid, berry size.

RESUMEN

En este artículo se reporta la caracterización de algunos cruzamientos de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) para los caracteres desarrollo de semilla, tamaño de bayas y respuesta al tratamiento con ácido giberélico (GA3) para crecimiento de baya. Para ello, se han usado segregantes de identidad conocida por cuanto se ha verificado su filiación en base a un conjunto de cinco marcadores de microsatélites heterocigotos en los progenitores, con los que se detectó entre 18 y 21% de autofertilización del cultivar madre, además de cerca de 3% de plantas que no coinciden genéticamente con ninguno de los progenitores. Los cruzamientos estudiados fueron Ruby Seedless x Sultanina, Ruby Seedless x Perlette y sus respectivos recíprocos (76 y 56 segregantes en producción, respectivamente), además de Black Seedless x Flame Seedless (23 segregantes en producción). Se detectó un 40% de segregantes sembrados, lo que coincide entre los diferentes cruzamientos y con lo reportado para otros cruzamientos que han usado progenitores apirenos. En todos los caracteres de expresión constitutiva (peso total de semillas y rudimentos seminales, y tamaño de bayas) se detectó segregación continua y transgresión positiva respecto de los progenitores, particularmente en el tamaño de las semillas. El tamaño de semillas o rudimentos y de bayas tuvo una adecuada reproducibilidad entre diferentes temporadas, lo que contrastó con la respuesta a GA3, que mostró inestabilidad en el curso de las tres temporadas de evaluación. A pesar de ello, se encontraron segregantes que mostraron establemente una combinación muy interesante, la cual es presentar escasos rudimentos seminales y bayas de calibre grande (15-19 mm).

Palabras clave: *Vitis vinifera* L., mejoramiento genético de uva de mesa, filiación, microsatélites, apirenia, ácido giberélico, tamaño de bayas.

¹ Fecha de recepción: 09 de mayo de 2002.

Trabajo financiado parcialmente por Proyecto FONDECYT 1990204.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación la Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile. E-mail: phinrich@platina.inia.cl *Autor para correspondencia.

³ Parte de su trabajo de tesis para optar al título de Bioquímico de la Universidad Austral de Chile.

INTRODUCCIÓN

Los cultivares de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) preferidos por los consumidores son aquellos cuyas bayas carecen de semilla palatable (apirenos), estimándose que 80% de la producción mundial es de este tipo. Por esta razón, la apirenia es uno de los caracteres más buscados en los programas de mejoramiento genético de uva de mesa. Otro carácter de interés agronómico es la respuesta a la aplicación de ácido giberélico (GA3) en el aumento de calibre de las bayas. En Chile, este regulador de crecimiento es ampliamente usado, principalmente en el cv. Sultanina (Thompson Seedless), que requiere tres aplicaciones para alcanzar calibres comerciales. El estudio de los caracteres mencionados resulta de gran interés en el programa de mejoramiento genético que se viene desarrollando desde fines de la década de 1980 en la Estación Experimental La Platina, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Idealmente se desea obtener líneas que combinen bayas sin semilla, de calibre grande, que no requieran la aplicación exógena de GA3.

Respecto de la apirenia o estenospermocarpia en vides, se han elaborado diversas hipótesis acerca del tipo de herencia y del número de genes que controlan este carácter (Bouquet y Danglot, 1996). Constantinescu *et al.* (1972) y Dudnik y Moliver (1976), citados por Bouquet y Danglot (1996), propusieron que la herencia de la apirenia se debe a un gen recesivo. Por su parte, Bozhinova-Boneva (1978) y Spiegel-Roy *et al.* (1990) postularon la existencia de dos genes recesivos, mientras que Weinberger y Harmon (1964) lo mismo que Loomis y Weinberger (1979) y Pospisilova y Palenik (1988) sugirieron la existencia de varios genes recesivos. Sin embargo, estas teorías que atribuyen la herencia de la apirenia a genes recesivos no son capaces de explicar que en la progenie resultante de cruzar dos cultivares sin semilla se produzcan individuos que producen bayas con semilla.

Por otra parte, Sandhu *et al.* (1984) y Golodriga *et al.* (1986) atribuyeron este carácter a factores cuantitativos. Según Bouquet y Danglot (1996), esto tampoco sería posible, puesto que se han

encontrado bayas con semillas en plantas de cultivares apirenos y viceversa. Esto sugiere la existencia de mutaciones del carácter, mientras que la dependencia de factores cuantitativos significaría que cada gen adicional aumentaría o disminuiría el peso de los rudimentos seminales de forma gradual.

Otros autores han atribuido este carácter a genes dominantes. Stout (1936) y Khachatryan y Martirosyan (1971) propusieron que habría un gen dominante que determina el carácter. Más recientemente, Ledbetter y Burgos (1994) sugirieron que habría tres genes dominantes, mientras que Sato *et al.* (1994) propusieron la existencia de cinco genes dominantes. Estas teorías estarían también obsoletas, pues la presencia de uno o más de estos genes dominantes no permitiría explicar que en las progenies producidas por cruzamientos entre un cultivar con semillas y otro apireno se encuentra un cierto porcentaje de individuos sin semilla.

Bouquet y Danglot propusieron en 1996 el modelo actualmente más aceptado para explicar la herencia de la apirenia; en éste, la expresión de tres genes recesivos heredados independientemente sería controlada por un gen dominante regulador. Este modelo, que fue desarrollado basándose en progenies provenientes de progenitores que presentaban diferentes tamaños de rudimentos seminales y semillas normales, ha sido validado también por datos de segregación de diversos cruzamientos que han empleado diferentes progenitores.

La apirenia también puede inducirse externamente, en genotipos tales como Moscatel de Alejandría, Italia Pirovano, Ribier y Emperor, usando aplicaciones de estreptomycin y/o GA3 en distintas dosis, en estados fenológicos de pre, plena y/o post-floración (Valenzuela y Lobato, 2000). Por otra parte, al menos dos grupos de investigadores (Universidad de Verona en Italia y Volcani Center de Israel) han trabajado paralelamente en la introducción de genes específicos que permitirían transformar cultivares o líneas semilladas de diversas especies en cultivares apirenos o partenocárpicos. En un caso, se ha desarrollado una construcción

quimérica de un gen bacteriano del metabolismo del ácido indol-acético bajo el control de un promotor específico de óvulo (DefH9-iaaM) con esta construcción han desarrollado líneas partenocárpicas de berenjena (*Solanum melongena* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) con valor comercial (Donzella *et al.*, 2000). Más recientemente, se han introducido estos genes en cvs. de vid (A. Spena, 2000. Universidad de Verona, Italia. Comunicación personal), aunque aún no se han reportado los resultados de ese trabajo. En el segundo caso, se recurrió a genes controlados por promotores específicos de semilla, llevando a inducir partenocarpia en cultivares semillados como Red Globe (Perl y Eshdat, 1998).

Existe poca o nula información sobre la genética de la respuesta a GA3 en el crecimiento de bayas en vides. Esto puede deberse a la complejidad del carácter, determinado por múltiples factores, entre los cuales se puede mencionar el estado fenológico y condiciones ambientales al momento de la aplicación del regulador de crecimiento, la dosis de GA3 aplicada, la propia capacidad de respuesta de los tejidos de la baya, y la producción de distintas formas y cantidades de giberelinas endógenas en diferentes tejidos de la baya (Pérez *et al.*, 2000; Valenzuela y Lobato, 2000).

Complementario al análisis morfológico, en los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de métodos moleculares para el análisis directo del material genético de las plantas (ADN). En las vides se han identificado un número importante de marcadores de microsatélites aplicados a estudios de diversidad genética, filiación, identificación o “fingerprinting” de cultivares, entre otras aplicaciones. Otros marcadores de tipo SCAR (loci genéticos de secuencia conocida, analizados mediante Polymerase Chain Reaction (PCR)) han sido propuestos para realizar mejoramiento asistido del carácter apirenia (Lahogue *et al.*, 1998). El carácter co-dominante de los marcadores SSR (secuencias simples repetidas) ha sido de gran utilidad para estudios de filiación, haciendo posible identificar los progenitores de cultivares como Cabernet Sauvignon y Chardonnay, entre varios otros (Bowers y Meredith, 1997; Bowers *et al.*, 1999).

En el programa de mejoramiento genético de uva de mesa del Centro Experimental La Platina del INIA, se trabaja actualmente en la búsqueda de nuevos marcadores moleculares que permitan la selección temprana de segregantes apirenos vs. semillados. En este marco, se ha realizado la evaluación fenotípica de los caracteres apirenia y respuesta a GA3 en el crecimiento de bayas, en el material segregante correspondiente a varios cruzamientos. Este trabajo presenta el análisis de estos resultados, sobre la base de individuos cuya filiación ha sido verificada con marcadores de microsatélites de alta heterocigocidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cruzamientos estudiados

Los cruzamientos analizados entre las temporadas 1999/2000 a 2001/02, fueron aquellos basados en los progenitores Ruby Seedless (Ruby) x Sultanina (Thompson Seedless) (cruzamiento #33), Ruby x Perlette (#29) y Flame Seedless (Flame) x Black Seedless (Black) (#5). Los segregantes fueron obtenidos por rescate de embriones realizado *in vitro*. Estos segregantes, así como sus respectivos progenitores, se encuentran plantados en el Centro Experimental La Platina, ubicado en la Provincia de Santiago, Región Metropolitana. El número de plantas de cada cruzamiento se indica en el Cuadro 1, señalando su etapa de desarrollo o si se encuentran en producción. Las evaluaciones morfológicas se realizaron sólo en los segregantes en producción. Aquellas plantas que no han fructificado fueron consideradas en estado juvenil, independientemente de cuántos años tuvieron en el campo.

Caracterización morfológica

Apirenia. Para determinar el grado de apirenia de cada segregante se siguió la metodología propuesta por Striem *et al.* (1992). Para ello, se estudiaron las 20 bayas de mayor tamaño tomadas de un racimo maduro de cada individuo, excepto en los casos de millerandaje, es decir, cuando en un racimo se presenta una fracción de bayas partenocárpicas pequeñas junto a otras de tamaño regular, en que se completó este número con bayas de dos o más racimos, se extrajeron separadamente todas las semillas y/o rudimentos

Cuadro 1. Segregantes de distintos cruzamientos de uva de mesa establecidos en terreno, en el INIA-Estación Experimental La Platina, a marzo de 2002.**Table 1. Table grape seedlings from different crosses established in the field at the INIA- La Platina Experimental Station, up to March 2002.**

Progenitores		Cruzamiento	Cruzamiento recíproco	Segregantes en producción	Segregantes sin fruta	Total segregantes	
Ruby	x	Sultanina	# 33	# 16	95	252	347
Ruby	x	Flame	# 25	# 8	35	196	231
Ruby	x	Dawn	# 68	---	0	164	164
Ruby	x	Perlette	# 29	# 26	77	30	107
Ruby	x	Superior	# 57	---	22	71	93
Perlette	x	Blush	# 62	---	0	87	87
Ruby	x	Black	# 32	# 14	1	78	79
Sultanina	x	Flame	# 6	# 10	15	58	73
Ruby	x	Beauty	# 84	# 89	18	54	72
Flame	x	Red	# 11	# 24	15	53	68
Red	x	Sultanina	# 23	---	13	55	68
Ruby	x	Autumn	# 58	---	2	65	67
Ruby	x	Blush	# 63	---	1	59	60
Black	x	Flame	# 5	# 22	46	12	58
Ruby	x	Centennial	# 56	---	1	47	48
Perlette	x	Sultanina	# 17	# 36	0	48	48
Sultanina	x	Black	# 4	# 18	8	36	44
Beauty	x	Sultanina	# 69	# 95	13	28	41
Superior	x	Sultanina	# 86	# 96	13	28	41
Otros cruzamientos					39	278	317
Total					414	1.699	2.113

Los cruzamientos destacados en negrita corresponden a los estudiados en este trabajo.

seminales de cada una de las bayas. Las semillas o rudimentos se clasificaron como semilla normal, rudimento seminal grande, rudimento seminal medio, o rudimento seminal pequeño. Además se determinó el peso fresco total de las semillas y rudimentos extraídos de las 20 bayas. Una forma alternativa de clasificación fue la usada por Roytchev (1998), que se basa en la detección de semilla por palatabilidad. Con esta aproximación, se clasificaron los segregantes en uno de tres grupos: semillados, con rudimentos seminales notorios, y apirenos. Este tipo de clasificación se realiza rutinariamente en todos los segregantes del programa de mejoramiento.

Tamaño y peso de bayas. Previo a su disección, se determinó el diámetro ecuatorial de cada baya y el peso total de las 20 bayas utilizadas para determinar el grado de apirenia.

Respuesta a GA3 para crecimiento de bayas.

La respuesta a GA3 en el crecimiento de bayas se estudió aplicando este regulador de crecimiento (Activol™, BASF, Alemania), en dosis de 20 mg kg⁻¹, cuando las bayas tenían cerca de 4 mm de diámetro ecuatorial y se repitió una semana después. La aplicación se realizó mediante inmersión, en tres racimos por cada segregante. La evaluación se realizó al momento de la cosecha, comparando visualmente el crecimiento de las bayas de los tres racimos tratados contra cuatro racimos testigos tomados al azar en cada segregante. Se clasificó el efecto observado como 0, 1, 2, 3, ó 9; el valor 0 significa que no se observó respuesta, el resto de los valores (1, 2 y 3) significa que las bayas de los racimos aplicados fueron de mayor tamaño que las de los racimos testigo. Los valores 1, 2 y 3 representan tres tipos de respuesta a GA3 (Figura 1) y el valor 9 se asignó en los casos que no hubo una respuesta clara.

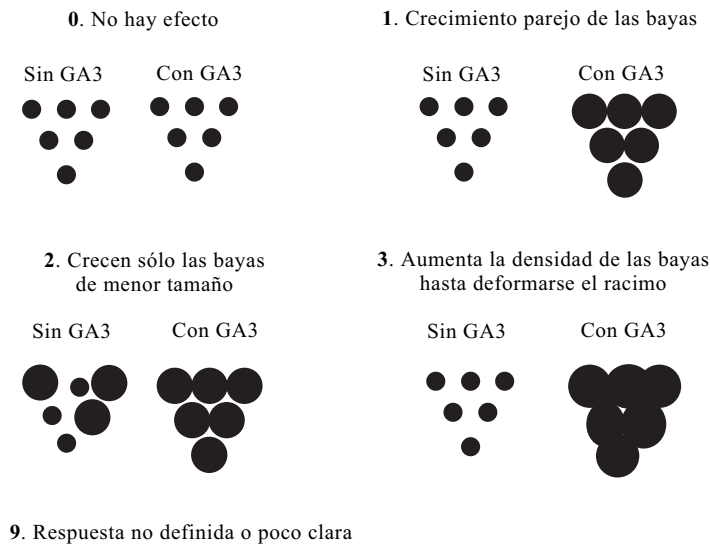


Figura 1. Esquema que representa los efectos del tratamiento de los segregantes con ácido giberélico (GA3) sobre el tamaño de las bayas.

Figure 1. Schematic representation of the effect of treatment of the segregants with gibberelic acid (GA3) on berry size.

Caracterización molecular

Filiación de las progenies. En dos de los cruzamientos y sus recíprocos estudiados (#29 y #26, y #16 y #33) se evaluó la filiación de las plantas consideradas segregantes determinando para cada una de ellas los patrones alélicos de cinco marcadores de microsatélites de alta heterocigocidad, algunos de los cuales han sido usados para establecer relaciones de filogenia de antiguas cepas de vinificación, como Cabernet Sauvignon y Chardonnay. Estos marcadores fueron de la serie VVMD (D-5, D-7, D-28, D-32 y D-36) (Bowers y Meredith, 1997; Bowers *et al.*, 1996; 1999), además de algunos de la serie VMC, desarrollados por el Consorcio Internacional de Microsatélites de vides, del cual el Instituto de Investigaciones Agropecuarias es miembro (ver sitio web www.agrogene.com). La extracción de ADN de hojas tiernas, las reacciones de PCR para marcadores de microsatélites, la separación electroforética y la interpretación de los resultados, se realizaron como fue descrito por Narváez *et al.* (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el programa de mejoramiento genético de uva de mesa de INIA se cuenta con un universo de más de 100 cruzamientos diferentes, en los cuales se han usado como progenitores cultivares comerciales, en su mayoría apirenos (Cuadro 1). Estos genotipos progenitores presentan distinto grado de desarrollo de rudimentos seminales. Además de esta diferencia, los cultivares presentan variación en aspectos tales como respuesta en el crecimiento de bayas a la aplicación de GA3, color de bayas, fecha de maduración y crocancia, entre otros caracteres de interés. Este trabajo se centró en la evaluación fenotípica de los segregantes respecto de dos de los caracteres más importantes desde el punto de vista productivo en uva de mesa: apirenia y respuesta a GA3 para crecimiento de bayas, usando para ello segregantes cuya filiación ha sido verificada con marcadores moleculares co-dominantes.

Cruzamientos seleccionados para este trabajo

Para este trabajo se eligieron tres cruzamientos cuyos padres presentan distinto grado de estenospermocarpia y un alto número de segregantes, que fueron Ruby x Sultanina (cru-

zamiento #33 y su recíproco, #16), Ruby x Perlette (cruzamiento #29 y su recíproco, #26) y Flame x Black (cruzamiento #5), con 300, 120 y 40 segregantes en terreno, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de segregantes de uva de mesa plantados a marzo 2002, INIA Estación Experimental La Platina, para cada cruzamiento estudiado.

Table 2. Number of table grape seedlings planted up to March 2002 at the INIA La Platina Experimental Station, for each cross studied.

Cruzamiento	En etapa juvenil	En producción	Total
Ruby x Sultanina (#33)	152	62	214
Sultanina x Ruby (#16)	100	33	133
Ruby x Perlette (#29)	28	69	97
Perlette x Ruby (#26)	2	8	10
Flame x Black (#5)	12	46	58

Es interesante destacar el hecho que la mayoría de los segregantes desarrollados en este programa de mejoramiento genético se encuentran establecidos en terreno, y tienen al cv. Ruby como madre. El Cuadro 3 resume esta información. Dado que todos los progenitores se usan en similar frecuencia al emasculación racimos para realizar los cruzamientos, este hecho sugiere que Ruby es el que tiene el mejor comportamiento como "cultivar madre". Las causas que explicarían este fenómeno son desconocidas, y podrían corresponder a: (a) alta resistencia a la manipulación que supone el proceso de emasculación bajo las condiciones usadas en el programa de mejoramiento genético, (b) buena capacidad receptora de polen, (c) alta fertilidad de los óvulos, y (d) buena resistencia de los embriones formados a los procesos de rescate (extracción y cultivo *in vitro*), entre otras. En lo que se relaciona a este trabajo, esto se traduce en que dos de los tres cruzamientos analizados comparten a Ruby como uno de sus progenitores. Además, esta particular "fertilidad" de Ruby definió que era necesario evaluar el porcentaje de segregantes que se hubieran originado como producto de autofertilización, como se describe a continuación.

Cuadro 3. Número de segregantes producidos por el programa de mejoramiento de uva de mesa de INIA Estación Experimental La Platina, por progenitor femenino.

Table 3. Number of table grape seedlings produced by the table grape breeding program at the INIA La Platina Experimental Station, according to the female parent.

Cultivar madre	Nº de segregantes	Porcentaje
Ruby	1.282	55,7
Sultanina	347	15,0
Flame	248	10,8
Red Seedless	206	9,0
Perlette	198	8,6
Black	14	0,6
Beauty	4	0,2
Superior	3	0,1
Total	2.302	100,0

Filiación de segregantes con marcadores moleculares

Previo a la evaluación fenotípica, se estudió la filiación de cada segregante. Para esto se extrajo ADN de cada uno y se analizó mediante marcadores co-dominantes del tipo microsatélites. Los marcadores elegidos para este propósito (ver Materiales y Métodos) fueron en su mayoría heterocigotos en ambos progenitores, es decir, tienen la forma genética *ab* x *cd*, por lo que es posible determinar cuál es el aporte genético de padre y madre en cada segregante. Además, se eligieron marcadores que se distribuyen en diferentes grupos de ligamiento (GL) de la vid. Estos fueron mapeados recientemente en los grupos de ligamiento GL-3 (VVMD-28 y D-36, separados por aprox. 25 cM), GL-4 (VVMD-32), GL-7 (VVMD-7) y GL-16 (marcador VVMD-5) (C.P. Meredith. 2001. Universidad de California, Davis, USA. Comunicación personal). Esto permitió identificar los segregantes que efectivamente fueran hijos de los respectivos progenitores, puesto que presentaron un alelo de cada uno de ellos. Este análisis, realizado en los cruzamientos #26, #29, #16 y #33, en los cuales Ruby era la madre, reveló un porcentaje de autofecundación de 21%

en Ruby x Perlette y su recíproco, y de 18% en Ruby x Sultanina y su recíproco. Al menos en este último caso, este porcentaje se ha reducido al comparar las primeras plantas establecidas en terreno vs. los segregantes más recientemente obtenidos, hasta cerca de un 12% de autofertilización, lo que sugiere que la técnica de cruzamiento en su contexto general, principalmente la emasculación y el manejo de los cartuchos de polinización, se ha perfeccionado con la práctica.

La Figura 2 muestra la separación electroforética de los alelos del marcador VVMD-28 para un grupo de segregantes del cruzamiento #33, donde se aprecian algunos genotipos que sólo presentan alelos de Ruby (marcados con un asterisco), es decir, son producto de autofecundación del cultivar madre. Además se detectaron otras plantas cuyos alelos no coincidieron con ninguno de estos progenitores, Ruby y Sultanina, lo que indica que

existe un porcentaje de escapes que pueden originarse en las etapas del rescate de embriones, manejo de plantas en invernadero o sombreadero, o bien durante el proceso de plantación en campo. Sólo las plantas verificadas como descendientes de los progenitores de interés fueron consideradas en este trabajo, así como en la construcción de un mapa de ligamiento genético realizado paralelamente.

El porcentaje de autofertilización encontrado (entre 18 y 21%) puede considerarse alto. En un cruzamiento realizado entre el cv. Moscato Bianco y un individuo de la especie *Vitis riparia*, analizado con marcadores de microsátelites, se detectó cerca de un 10% de autofertilización (ocho de 90 segregantes) (Grando *et al.*, 2000). Sin embargo, no existen antecedentes publicados de otros programas de mejoramiento genético de uva de mesa, menos aún basados en rescate de embriones, que

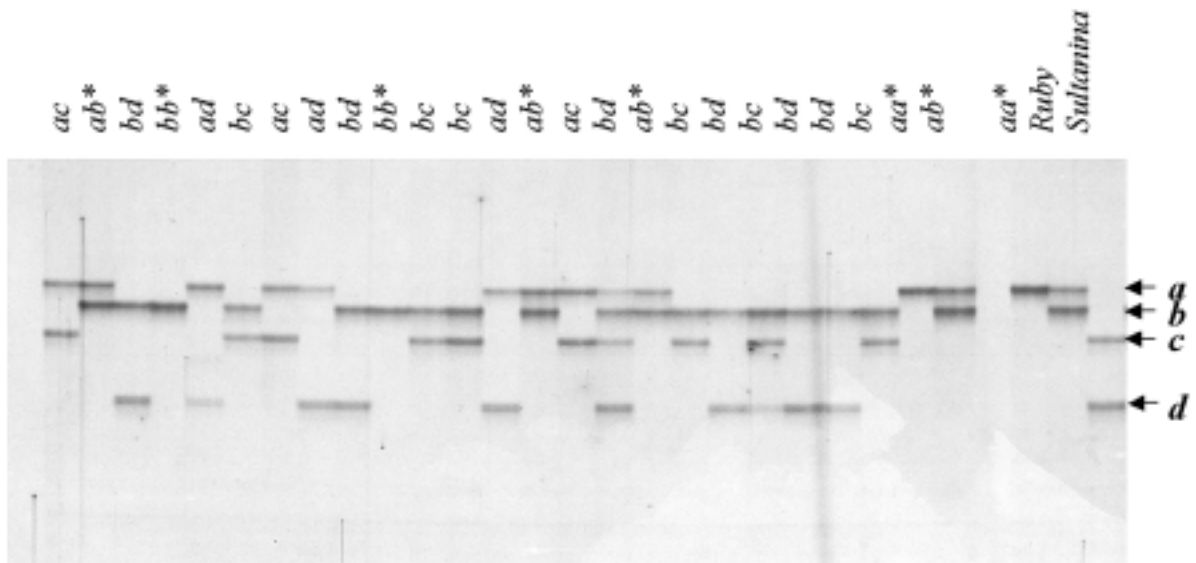


Figura 2. Separación electroforética de los patrones alélicos de segregantes del cruzamiento #33 usando el marcador de microsátelites VVMD-28. Cada carril corresponde a uno de los segregantes del cruzamiento #33, mientras que los dos últimos carriles de la derecha corresponden a los progenitores Ruby y Sultanina. A la derecha se indican los alelos correspondientes a los progenitores (a, b, Ruby, c, d, Sultanina). Arriba se indican las combinaciones alélicas de cada genotipo, destacándose con un asterisco aquellos que corresponden a eventos de autofertilización de Ruby.

Figure 2. Electrophoretic separation of allelic patterns of segregants of cross #33, using the microsatellite marker VVMD-28. Each lane corresponds to one of the segregants of cross #33, while the last two lanes to the right correspond to the progenitors Ruby and Sultanina. To the right the alleles of each progenitor (a, b, Ruby, c, d, Sultanina) are indicated. At the top the allelic patterns of each genotype are shown; those labeled with an asterisk were confirmed as Ruby self-fertilization events.

han hecho una evaluación de este tipo, por lo que no es posible comparar estos resultados. Sólo en un análisis de una población obtenida por autopolinización del cv. Sangiovese se usaron marcadores de microsátélites, pero en ese caso el propósito fue exactamente el opuesto, es decir, cuantificar el porcentaje de plantas que efectivamente calzaban con los alelos del progenitor único (Filippetti *et al.*, 1999). No es extraño que los antecedentes sobre este tipo de análisis sean escasos, puesto que la metodología empleada en este trabajo sólo ha estado disponible en años recientes. De hecho, se tiene conocimiento de escasas especies en que se ha realizado este análisis basado en microsátélites, como en programas de fitomejoramiento de cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Spunarova y Kraus, 2000), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (McIntyre y Jackson, 2001) y cítricos (Ruiz *et al.*, 2000). Más comúnmente se ha recurrido al uso de microsátélites u otros tipos de marcadores moleculares para determinar el comportamiento reproductivo de especies vegetales silvestres (Dje *et al.*, 1999; Collevatti *et al.*, 2001; Neaylon *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista del mejoramiento genético de la vid, la autofecundación es un tema que genera controversias. Por una parte parece inconveniente, puesto que se pierde la capacidad de sumar genes de ambos padres, y se produce un aumento concomitante del nivel de homocigosis, lo que es indeseable para una especie como la vid que sufre depresión por autofecundación (Pospisilova, 1973). Sin embargo, también puede tener aspectos positivos, puesto que se expresarían caracteres recesivos como apirenia o resistencia a estrés biótico o abiótico (Todorov, 2000).

Apirenia

Las tres progenies estudiadas presentaron similar porcentaje de segregantes con bayas apirenas, con un valor cercano al 60% (Cuadros 4 y 5). Este resultado es similar a lo descrito previamente para otros cruzamientos en que se usaron progenitores apirenos. Bouquet y Danglot (1996) encontraron 70,6% de segregantes con algún grado de estenospermocarpia para una progenie proveniente de padres sin semilla. Por el contrario, cuando se realizan cruzamientos entre variedades semilladas, el porcentaje de segregantes apirenos es muy bajo, entre 0 y 11% (Loomis y Weinberger, 1979), mientras que cuando las progenies provienen de padre semillado y madre apirena, el porcentaje de individuos apirenos en la progenie es muy variable, alcanzando un máximo de 40%, el que puede llegar hasta algo más de 50% cuando entre las líneas parentales del progenitor semillado existe apirenia.

Roytchev (1998) estudió 23 progenies producidas por cruzamiento entre plantas semilladas y apirenas, obteniendo en promedio 32% de segregantes apirenos. La proporción de individuos apirenos varió ampliamente entre las progenies, entre 8 y 49%. Striem *et al.* (1992) también estudiaron progenies originadas de genotipos que presentan semilla normal cruzados con el cv. Flame, y encontraron que más de 53% de los segregantes presentaron semillas normales. El fenotipo de cada segregante de los cruzamientos estudiados en este trabajo y sus respectivos padres se muestra en las Figuras 3, 4 y 5, ilustrando la distribución continua de los caracteres diámetro de bayas y peso de semillas o rudimentos. La correlación entre ambos factores fue de 0,48 para Black x Flame, 0,57 para Ruby x Perlette y 0,70 para Ruby x Sultanina.

Cuadro 4. Número y proporción de segregantes de uva de mesa de acuerdo al tipo de apirenia que presentan.
Table 4. Frequency and proportion of table grape seedlings according to different seedlessness categories.

Cruzamientos	Segregantes semillados	Segregantes apirenos			Total
		Rg	Rm	Rp	
Flame x Black (#5)	14	8	2	8	32
%	43,8	25,0	6,2	25,0	100
Ruby x Sultanina (#33 y #16)	34	16	10	16	76
%	44,7	21,1	13,1	21,1	100
Ruby x Perlette (#29 y #26)	20	17	17	2	56
%	35,7	30,4	30,4	3,5	100
Promedio	41,4	25,5	16,6	16,5	100

Cuadro 5. Apirenia en segregantes de uva de mesa evaluada sensorialmente.**Table 5. Seedlessness in table grape seedlings evaluated sensorially.**

Cruzamiento	Semilla normal	Rudimentos detectables	Sin semilla	Total
Flame x Black (#5)	12	4	28	44
%	27,3	9,1	63,6	
Ruby x Sultanina (#33)	22	12	26	60
%	36,7	20,0	43,3	
Sultanina x Ruby (#16)	13	0	19	32
%	40,6	-	59,4	
Ruby x Perlette (#29)	17	7	45	69
%	24,6	10,1	65,2	
Perlette x Ruby (#26)	3	1	3	7
%	42,9	14,3	42,9	
Otras progenies (ambos padres apirenos)	288	122	346	756
%	38,1	16,1	45,8	
Promedio progenies de este trabajo, %	34,4	10,7	54,9	100

Al comparar cada cruzamiento con su recíproco se encontraron porcentajes de segregantes sin semilla muy similares, 55% para el cruzamiento #33, y 56% para su recíproco #16 (con 53 y 23 plantas en total, respectivamente). Por otra parte, aunque sólo se observó el fenotipo de seis plantas del cruzamiento #26, éste y su recíproco #29 (que cuenta con 50 segregantes evaluados) coincidie-

ron en mostrar similar proporción de apirenia, con 64 y 67%, respectivamente. Estos datos sugieren que no existe efecto materno para el carácter apirenia en los cruzamientos estudiados, aunque esto es de difícil sustentación, puesto que los progenitores son de fenotipo muy similar (Figuras 4 y 5), y no se conoce el número de genes involucrados, así como el grado de homocigosis

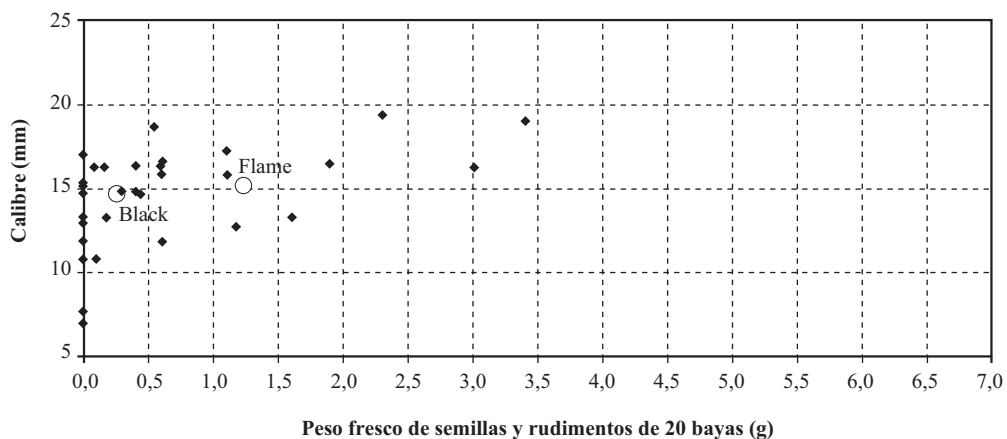


Figura 3. Relación entre tamaño de baya y peso fresco de rudimentos y semillas de los segregantes del cruzamiento #5 (Flame x Black). Los círculos vacíos representan a los progenitores y los rombos llenos a cada segregante. Determinaciones hechas en 20 bayas de cada genotipo.

Figure 3. Ratio among berry size and rudiments and seeds weight for the crossing #5 (Flame x Black). Empty circles are the progenitors and filled squares correspond to each segregant. Measurements based on the evaluation of 20 berries per genotype.

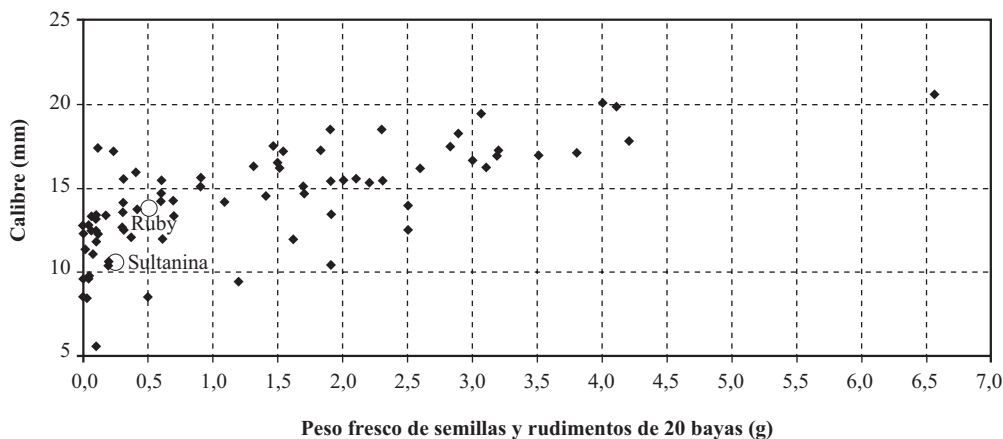


Figura 4. Relación entre tamaño de baya y peso fresco de rudimentos y semillas de los segregantes del cruceamiento #33 y su recíproco #16 (Ruby x Sultanina). Los círculos vacíos representan a los progenitores y los rombos llenos a cada segregante. Determinaciones hechas en 20 bayas de cada genotipo.

Figure 4. Ratio among berry size and rudiments and seeds weight for the crossing #33 and its reciprocal #16 (Ruby x Thompson Seedless). Empty circles are the progenitors and filled squares correspond to each segregant. Measurements based on the evaluation of 20 berries per genotype.

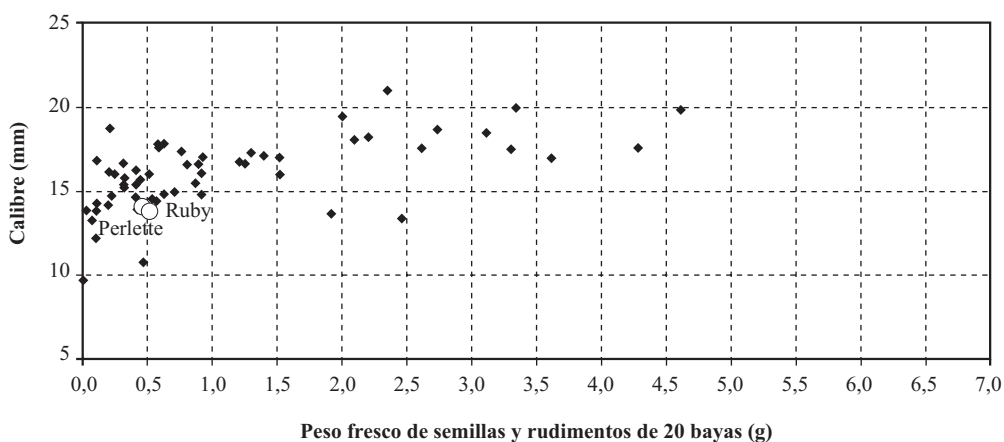


Figura 5. Relación entre tamaño de baya y peso fresco de rudimentos y semillas de los segregantes del cruceamiento #29 y su recíproco #26 (Ruby x Perlette). Los círculos vacíos representan a los progenitores y los rombos llenos a cada segregante. Determinaciones hechas en 20 bayas de cada genotipo. En este cruceamiento ambos progenitores son muy similares.

Figure 5. Ratio among berry size and rudiments and seeds weight for the crossing #29 and its reciprocal #26 (Ruby x Perlette). Empty circles are the progenitors and filled squares correspond to each segregant. Measurements based on the evaluation of 20 berries per genotype. In this crossing, both parents are very similar.

de cada uno de ellos. Sólo se tiene el antecedente de un estudio realizado por Sandhu *et al.* (1984) que se relaciona con este aspecto, en el cual se estudiaron tres progenies producidas por el cruceamiento de la variedad Karachi Gulabi con las variedades apirenas Sultanina Himrod y Perlette.

Ese trabajo indicó que la mayoría de los segregantes presentaron semillas de tamaño similar al cultivar madre; este hecho era esperable dado que la herencia de apirenia es del tipo transgresivo, por lo tanto, la tendencia es que los segregantes tengan mayor peso de semillas.

Por otra parte, estos mismos autores encontraron diferencias en la proporción de semillas de bajo peso al comparar las progenies en que Sultanina Himrod y Perlette participaron como progenitores masculinos, con frecuencias de 58 y 40%, respectivamente. Esta diferencia no se detectó en este trabajo, al cruzar Ruby con Sultanina o con Perlette (cruzamientos #33 y #29, respectivamente). En estas progenies las frecuencias de segregantes apirenos (considerados aquellos con un peso de rudimentos seminales de hasta 0,5 g en 20 bayas) fueron de 34,7 y 36,7%, respectivamente.

Algunos segregantes clasificados como “semillados” no presentaron semillas en la totalidad de sus bayas. Respecto del total de plantas semilladas, la proporción de este tipo de plantas alcanzó el 50% en el cruzamiento #5, 6% en el cruzamiento #33 más su recíproco #16, y 25% en el cruzamiento #29 más su recíproco #26. Estos porcentajes son muy variables, aunque se debe considerar que el número de plantas que presentan esta condición es reducido. No es clara la causa de este problema, que se asemeja al millerandaje.

En todas las progenies estudiadas se encontró segregación continua en el peso total de semillas y rudimentos seminales por baya (promedio de 20 bayas). Además, todas las progenies presentaron transgresión positiva, es decir, se observaron descendientes cuyos valores de peso de semillas y rudimentos superó al valor más alto de sus respectivos progenitores (Figuras 3, 4 y 5). El porcentaje de segregantes transgresivos fue de 19,4% para el cruzamiento #5; 47,5% para las progenies #33 y #16; y 44,1% para las progenies #29 y #26. Un fenómeno similar se observó en el número de semillas y el número de rudimentos seminales por baya, con un 55,7% de los individuos con rudimentos seminales de mayor tamaño y/o en mayor cantidad que ambos padres. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Todorov (2000). Por otra parte, Sandhu *et al.* (1984) observaron variación continua y segregación transgresiva para largo, ancho y peso de semillas.

Estos resultados en características de las semillas o rudimentos fueron consistentes en dos evaluaciones, realizadas para una fracción de los genotipos entre las temporadas 1998/99 y 2001/

02. Sólo hubo un 12,5% de irreproducibilidad, algo inferior al 19% reportado por Lorenzoni *et al.* (2000). Esto implica que el carácter apirenia es estable para cada genotipo y bastaría evaluarlo sólo una vez para obtener datos confiables.

El calibre de las bayas mostró también una segregación de tipo continuo, con una dispersión en cada cruzamiento que fue en los siguientes rangos: cruzamiento #5, entre 7 y 20 mm; #29, entre 10 y 21 mm; #26, entre 14 y 19 mm; #33, entre 6 y 21 mm; y #16, entre 6 y 20 mm. El calibre promedio de los padres fue de 14,9 mm para el cruzamiento #5; 12,3 mm para los cruzamientos #16 y #33 y 14,1 mm para los cruzamientos #29 y #26 (Figuras 3, 4 y 5). También en el caso del calibre de las bayas se observó herencia transgresiva, ya que el 65% de los segregantes del cruzamiento #5 superó el calibre del mayor de sus padres. A su vez, estos valores fueron de 56 y 84% para los cruzamientos #33 y su recíproco #16, y #29 y su recíproco #26, respectivamente. Además de existir antecedentes que coinciden con estas observaciones (Dudnik y Shlapakova, 1976, Todorov y Pirgozliev, 1995), el mayor calibre promedio que presentaron los descendientes en comparación con sus padres era esperable, dado que entre los descendientes existe alta proporción de individuos con mayor tamaño y cantidad de rudimentos seminales que sus respectivos padres, y son estas estructuras las que determinan la producción de giberelinas, que finalmente tendrán efecto en el tamaño de las bayas. El mayor tamaño y cantidad de semillas y/o rudimentos seminales que presentan las bayas de mayor calibre confirman lo expuesto anteriormente.

Respuesta al ácido giberélico (GA3) en el crecimiento de bayas

La respuesta al GA3 en el crecimiento de las bayas de los segregantes ha sido evaluada entre una y tres temporadas, entre 1999/2000 y 2001/02, dependiendo del segregante que se trate. Los resultados de respuesta al GA3 no han sido consistentes (Cuadro 6), ya que sólo el 69% de los segregantes evaluados en dos temporadas han mantenido su respuesta, mientras que en el caso de los evaluados en tres temporadas esta proporción ha sido aun más baja, alcanzando un 30% de los segregantes que mostraron la misma respuesta.

Parte de esta variación puede explicarse porque durante la primera temporada de evaluación no se incluyó un producto coadyuvante en la solución de GA3 aplicada a los racimos, por lo que la absorción del regulador de crecimiento se vio restringida, debido a la menor permanencia sobre la piel de las bayas por ausencia del coadyuvante.

A pesar de estas dificultades, se identificó un número de genotipos que respondió siempre al GA3 con crecimiento de las bayas, con una respuesta de tipo 1 a 3 (Figura 1 y Cuadro 7). Por otra parte, se encontraron genotipos que, tal como está descrito para Ruby y otros cultivares usados en el

bloque de progenitores del INIA La Platina, aunque son apirenos presentan un tamaño de bayas apreciable (Cuadro 8). Esto es interesante, puesto que (i) desde un punto de vista productivo hay una serie de cultivares (incluido Sultanina) que dependen de GA3 para tener calibre comercial, y tanto el producto como su aplicación representan un alto costo, y (ii) el uso de GA3 (o cualquier otro factor de crecimiento vegetal agregado exógenamente) puede tener efectos colaterales indeseables, por lo que se esperaría que la tendencia en el desarrollo de nuevas variedades apunte a genotipos que no requieran de la aplicación externa de este tipo de químicos.

Cuadro 6. Reproducibilidad de la respuesta a ácido giberélico (GA3) de segregantes del programa de uva de mesa de INIA Estación Experimental La Platina.

Table 6. Reproducibility of gibberelic acid (GA3) response of segregants of the table grape program of the INIA La Platina Experimental Station.

Cruzamiento	Nº de segregantes evaluados	Nº de segregantes que	Nº de segregantes que	Porcentaje de
	2 ó 3 temporadas	mantienen respuesta	no mantienen respuesta	
Flame x Black (#5)	29	19	10	65,5
Sultanina x Ruby (#16)	12	9	3	75,0
Perlette x Ruby (#26)	1	0	1	0
Ruby x Perlette (#29)	37	15	22	40,5
Ruby x Sultanina (#33)	31	10	21	32,3
Total	110	53	57	48,2

Cuadro 7. Respuesta a ácido giberélico (GA3) de los segregantes de uva de mesa que presentaron comportamiento reproducible.

Table 7. Response to gibberelic acid (GA3) of the table grape seedlings exhibiting stable phenotype.

Cruzamiento	Nº de segregantes respuesta 1, 2 ó 3	Nº de segregantes con respuesta 0	Porcentaje de segregantes con respuesta 1, 2 ó 3
Flame x Black (#5)	19	0	100
Sultanina x Ruby (#16)	3	6	33,3
Perlette x Ruby (#26)	0	0	----
Ruby x Perlette (#29)	8	7	53,3
Ruby x Sultanina (#33)	8	2	80
Total	38	15	71,7

Cuadro 8. Número de segregantes de uva de mesa apirenos con calibre superior a 15 mm.

Table 8. Number of seedless table grape seedlings with berry size larger than 15 mm.

Cruzamiento	Nº de segregantes apirenos con calibre > 15mm	Nº de segregantes evaluados	Porcentaje
Flame x Black (#5)	6	31	19,4
Sultanina x Ruby (#16)	0	22	0
Perlette x Ruby (#26)	2	4	50,0
Ruby x Perlette (#29)	19	49	38,8
Ruby x Sultanina (#33)	7	49	14,3
Total	34	155	18

CONCLUSIONES

- Se encontró entre 18 y 21% de plantas originadas por autofertilización, aunque la tendencia en los segregantes originados en años más recientes fue a bajar este porcentaje (al menos en el cruzamiento estudiado, #33).
- En los cruzamientos analizados entre padres apirenos se determinó cerca de 40% de individuos semillados, lo que es similar a lo descrito por otros programas de mejoramiento genético de uva de mesa.
- Tanto el peso total de semillas y rudimentos seminales como el tamaño de las bayas fueron estables en distintas temporadas y presentaron transgresión positiva; el tamaño de las bayas

estaría influenciado precisamente por la presencia de semillas y/o rudimentos.

- La respuesta a GA3 no ha tenido una adecuada reproducibilidad durante tres años de evaluación. Las causas de ello son desconocidas, siendo posiblemente multifactoriales tal cual sería el carácter en sí, pudiendo influir la posología del producto y el estado fisiológico irregular de cada segregante al momento de la aplicación, entre otros factores.

RECONOCIMIENTOS

Especiales agradecimientos por el apoyo técnico prestado para el desarrollo de este trabajo a Ruth Aguiar, Manuel Contreras y María Herminia Castro.

LITERATURA CITADA

- Bouquet, A., and Y. Danglot. 1996. Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 35:35-42.
- Bowers, J., J.-M. Boursiquot, P. This, K. Chu, H. Johansson, and C.P. Meredith. 1999. Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of Northeastern France. *Science* 285:1562-1565.
- Bowers, J.E., G.S. Dangl, R. Vignani, and C.P. Meredith. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat *loci* in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39:628-633
- Bowers, J.E., and C.P. Meredith. 1997. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genetics* 16:84-87.
- Bozhinova-Boneva, I. 1978. Inheritance of seedlessness in grape. *Genetika i Seleksiya* 11:99-405.
- Collevatti, R.G., D. Grattapaglia, and J.D. Hay. 2001. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity* 86:60-67.
- Constantinescu, G., A. Pena, and A. Indreas. 1972. Inheritance of some qualitative characters in the progeny of crosses between functionally female (gynodynamic) and apyrene (androdynamic) varieties. *Probleme de Genetica Teoretica si Aplicata* 7:213-241.
- Dje, Y., D. Forcioli, M. Ater, C. Lefebvre, and X. Vekemans. 1999. Assessing population genetic structure of sorghum landraces from North-Western Morocco using allozyme and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:157-163.
- Donzella, G., A. Spena, and G.L. Rotino. 2000. Transgenic parthenocarpic eggplants: superior germplasm for increased winter production. *Mol. Breed.* 6:79-86.
- Dudnik, N.A., and N.P. Shlapakova. 1976. Characteristics of the potential of the Hybrid Caus rozovyi x Kishmish chernyi in the F1. *Vinogradartsvo* 1976:126-135.
- Filippetti, I., O. Silvestroni, M.R. Thomas, and C. Intriari. 1999. Diversity assessment of seedlings from self-pollinated Sangiovese grapevines by ampelography and microsatellite DNA analysis. *Vitis* 38:67-71.
- Golodriga, P., L.P. Troshin, and L.I. Frovolia. 1986. Inheritance of the seedlessness character in hybrid progeny of the grape *Vitis vinifera* L. *Cytol. Genet.* 19:56-60.
- Grando, M.S., C. Frisinghelli, and M. Stefanini. 2000. Polymorphism and distribution of molecular markers in a segregating population derived from the cross 'Moscato bianco' X *Vitis riparia*. *Acta Hort.* 528:209-213.
- Kachatryan, S.S., and E.L. Martirosyan. 1971. Nature of the inheritance of large fruit and size and number of seeds per fruit in hybrid progenies of *vinifera*. *Ref. Zhurnal* 7.55.119.

- Lahogue, F., P. This, and A. Bouquet. 1998. Identification of a codominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 97:950-959.
- Ledbetter, C.A., and L. Burgos. 1994. Inheritance of stenospermocarpic seedlessness in *Vitis vinifera* L. *J. Hered.* 85:157-160.
- Loomis, N.H., and J.H. Weinberger. 1979. Inheritance studies of seedlessness in grapes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104:181-184.
- Lorenzoni, C., S. Cancellier, A. Costacurta, and A. Calo. 2000. Inheritance of seedlessness in some crossbred families in *Vitis vinifera* L. and practical results of a breeding programme. 7th Int. Symposium on Grapevine Genetics and Breeding. *Acta Hortic.* 528:631-639.
- McIntyre, C.L., and P.A. Jackson. 2001. Low level of selfing found in a sample of crosses in Australian sugarcane breeding programs. *Euphytica* 117:245-249.
- Narváez, C., M.H. Castro, J. Valenzuela, y P. Hinrichsen. 2001. Patrones genéticos de los cultivares de vides de vinificación más comúnmente usados en Chile basados en marcadores de microsatélites. *Agric. Téc. (Chile)* 61:249-26.
- Neaylon, K., K.L. Delaporte, M. Sedgley, G.G. Collins, and J.G. Conran. 2001. Molecular analysis of hybrids among the ornamental eucalypts *Eucalyptus macrocarpa*, *E. pyriformis*, and *E. youngiana*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126:336-339.
- Pérez, F.J., C. Viani, and J. Retamales. 2000. Bioactive gibberellins in seeded and seedless grapes: identification and changes in content during berry development. *Am. J. Enol. Vitic.* 51:315-318.
- Perl, A., and Y. Eshdat. 1998. DNA transfer and gene expression in transgenic grapes. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 15:365-386.
- Pospisilova, D. 1973. Inheritance of characters in self-pollinated populations of the varieties Tramin cerveny and Veltlinske cerveno-viele and the hybrid population Tramin cerveny x Veltlinske cerveno-viele. *Pol'nohos podarstvo* 19:587-597.
- Pospisilova, D., and V. Palenik. 1988. Heredity of seedlessness in grapes. *Genet. Slechteni* 24:325-332.
- Roytchev, V. 1998. Inheritance of grape seedlessness in seeded and seedless hybrid combinations of grape cultivars with complex genealogy. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:302-305.
- Ruiz, C., M. Paz-Breto, and M.J. Asins. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112:89-94.
- Sandhu, A.S., J.S. Jawanda, and D.K. Uppal. 1984. Inheritance of seed characters in hybrid populations of intercultural crosses of grapes (*Vitis vinifera* L.). *J. Res. Punjab Agric. Univ.* 21:39-44.
- Sato, A., H. Yamane, M. Yamada, and K. Yoshinaga. 1994. Inheritance of seedlessness in grapes. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63:1-7.
- Spiegel-Roy, P., Y. Baron, and N. Sahar. 1990. Inheritance of seedlessness in seeded x seedless progeny of *Vitis vinifera* L. *Vitis* 29: 79-83.
- Spunarova, M., and I. Kraus. 2000. Evaluation of hybridization success in spring barley by means of a genetic marker. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 36:5-9.
- Stout, A.B. 1936. Seedlessness in grapes. *Tech. Bulletin* N° 238. New York State Agric. Exp. Stn, Geneva, New York, USA.
- Striem, M.J., P. Spiegel-Roy, I. Baron, and N. Sahar. 1992. The degree of development of the seed coat and the endosperm as separate subtraits of stenospermocarpic seedlessness in grapes. *Vitis* 31:149-155
- Todorov, I. 2000. The inbreeding in grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic improvement. 7th Int. Symposium on Grapevine Genetics and Breeding. *Acta Hortic.* 528:631-639.
- Todorov, I., and S. Pirgozliev. 1995. Transgression in the inheritance of bunch and berry size in grape vine (*Vitis vinifera* L.). *Rasteniev"dni-Nauki.* 32: 118-119.
- Valenzuela, J., y A. Lobato. 2000. Reguladores de crecimiento: Giberelinas. p. 179-193. *In* J. Valenzuela (ed.), *Uva de mesa en Chile*. Colección Libros INIA N° 5. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.
- Weinberger, J.H., and F.N. Harmon. 1964. Seedlessness in *vinifera* grapes. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 85:270-274.