

UCH-FC
Biotecnología
M516
C.L



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias

Carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular

**DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES DE
TIPO SCAR ASOCIADOS A APIRENIA EN UVA DE
MESA**

Tesis entregada
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Ingeniero en Biotecnología Molecular



Nilo Mejía

Santiago - Chile

Noviembre de 2002

Director de Tesis: Dr. Patricio Hinrichsen Ramírez



FACULTAD DE CIENCIAS UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE PREGRADO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Pregrado presentada por el candidato:

NILO MEJIA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 07 de Octubre 2002.

Director de Tesis
Dr. Patricio Hinrichsen Ramírez

Patrocinante de Tesis
Dra. Margarita Carú Marambio

LA COMISION

Dr. Francisco Pérez Correa
Presidente

Dra. Lee Ann Meisel

Dr. Herman Silva Ascencio

a mis padres y abuelos.

Agradecimientos.

"A la semana 28, el feto podría sobrevivir en el mundo exterior, aunque bajo la supervisión de expertos. Los pulmones y el sistema digestivo no están completamente formados, pero varios bebés nacidos en esta etapa han sobrevivido."

Después de los 24 años que llevo en el mundo exterior y las 27 semanas *in utero*, esta es una magnífica oportunidad de agradecer. Quiero agradecer a la vida por hacerme parte de ella, sobretodo a los artífices de éste milagro que son mis padres, hermana y abuelos, a quienes agradezco infinitamente por compartir y dedicar gran parte de sus vidas conmigo, por darme aliento para mantenerme caminando por los senderos de la vida. Gracias por el apoyo incondicional en todo sentido. Muchas gracias por confiar en mis instintos y capacidades, gracias por el sacrificio no sólo de estos últimos cinco años, de los otros 18 también, serán inolvidables.

A Patricio Hinrichsen, director de tesis. Gracias por la confianza depositada en mí, gracias no sólo por ser de guía en este periodo académico, gracias por tomarme en cuenta en el MASTER, gracias también por la amistad.

A Maria Herminia Castro, amiga y colega cuya ayuda, consejos y sugerencias fueron muy importantes para la realización de este trabajo.

A Mireya Zerené, gracias por los consejos para mi formación como persona, gracias por la compañía, las esperas y las idas y venidas a La Platina, muchas gracias Mireyita, eres divina!

A Humberto Prieto, agradezco su gentil y profesional ayuda, su buenísima onda, sus tallas, su forma de ser: negativo y pesimista, justo lo que se necesita para alcanzar la perfección. Lo que no le perdono: el haberme rechazado como tesisista por un problema espaciotemporal, se que no es su culpa, pero quiero que quede constancia que me rechazó, a mí que soy el más fanático de su persona y de lo que hace. Además, en este mismo párrafo quiero agradecer a Fernando Reyes ya que ambos forman un buen equipo, Fernando el paletado buena onda, que me ha ayudado en muchas ocasiones, el maestro de los asados. Gracias Fer!

A Víctor Obreque, por tener la paciencia de escuchar mis dudas de novato y por escuchar atentamente los problemas que surgieron a lo largo de esta tesis.

A Marlene Rosales por su simpatía, los papers, y protocolos.

Del laboratorio además quiero agradecer a Claudio Narvárez (aunque tomó otros rumbos) por el desafío de acabar con los partidores Wako, por el desafío de tener un marcador de 2 kb. Además gracias a Yanina por su gestión y ayuda para resolver toda clase de trámites. También a Carlos Aguirre por los cafés de todas las mañanas y por ser un buen vecino de mesón a pesar del caos.

Sin lugar a duda este trabajo no pudo haberse realizado sin la formación que recibí durante cuatro años y medio en la Facultad de Ciencias (Universidad de Chile). Gracias a todos los maestros que contribuyeron en mi formación. Gracias a la comisión del examen de grado: Lee Meisel, Francisco Pérez y Herman Silva, gracias por las correcciones y sugerencias. Herman, muchísimas gracias a por la lectura meticulosa de éste escrito. A Margarita Carú gracias por el patrocinio.

Gracias a l@s amig@s y compañer@s que me han acompañado desde el principio: Pablo, Alex, Jaime, Betsy, Dani F., Dani U., Mirna, y muchos otros quienes han hecho que mi estadía como estudiante sea agradable e inolvidable.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y todo su personal por las facilidades brindadas para la realización de esta Tesis

Quiero agradecer muy especialmente a Diana Vera, la mujer que me inspira, que durante estos 4 últimos años tuvo la paciencia suficiente para apoyarme profundamente, para darme su comprensión, su cariño y su amor, muchas gracias!

Por último gracias a todos los que sonrían y hacen el trajín diario sea más llevadero.

Índice de contenidos	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
Lista de abreviaturas	vi
1.- Resumen	viii
Summary	ix
2.- Introducción	1
2.1.- Información general	1
2.2.- Herencia de la apirenia	4
2.3.- Antecedentes del programa de mejora genética de La Platina	9
2.4.- Marcadores moleculares	10
2.5.- Antecedentes de marcadores moleculares para apirenia	11
3.- Hipótesis	14
4.- Objetivos	15
4.1.- Objetivo general	15
4.2.- Objetivos específicos	15
5.- Materiales y métodos	17
5.1.- Materiales	17
5.1.1.- Reactivos	17
5.1.2.- Material vegetal	18
5.2.- Métodos	18
5.2.1.- Extracción y preparación de ADN para análisis de RAPD	18
5.2.1.1.- Extracción de ADN	18
5.2.1.2.- Cuantificación del ADN extraído	20
5.2.1.3.- Dilución del ADN para reacciones de RAPD	21
5.2.2.- Identificación de fragmentos polimórficos mediante RAPD-BSA	21

5.2.2.1.- Elección de los Individuos para el BSA	21
5.2.2.2.- Formación de los grupos para el análisis de tipo BSA en fenotipos contrastantes	27
5.2.2.3.- Análisis mediante RAPD	28
5.2.2.4.- Visualización de reacciones de RAPD	30
5.2.2.5.- Búsqueda de candidatos y Apertura de grupos	30
5.2.3.- Purificación y clonamiento de fragmentos candidatos	
5.2.3.1.- Purificación de bandas polimórficas de interés	30
5.2.3.2.- Ligación de fragmentos polimórficos en vector de clonamiento para productos de PCR	31
5.2.3.3.- Preparación de células <i>E.coli</i> DH5 α electrocompetentes	31
5.2.3.4.- Transformación mediante electroporación de células DH5 α electrocompetentes	31
5.2.3.5.- Selección de clones recombinantes	32
5.2.3.6.- Mantenimiento de clones recombinantes	32
5.2.4.- Secuenciación y diseño de los partidores para marcador SCAR	33
5.2.4.1.- Minipreparación plasmidial y purificación plasmidial	33
5.2.4.2.- Digestión de plásmidos recombinantes y secuenciación	33
5.2.4.3.- Diseño de partidores de SCARs para fragmentos polimórficos	34
5.2.4.4.- Estandarización de reacción de PCR con partidores específicos	34
5.2.3.- Análisis estadístico	35
6.- RESULTADOS	37
6.1.- Constitución de los grupos de fenotipo opuesto	37
6.2.- Resultados de RAPD-BSA	39
6.2.1.- Análisis de Segregantes en Bloque (BSA)	39
6.3.- Obtención de marcador SCAR	43
6.3.1.- Conversión del marcador de RAPD WF27-2000 en marcador SCAR	43
6.4.- Evaluación del marcador SCAR	45

6.4.1.- Evaluación del SCAR ScabF27ext2 con la población de segregantes del cruzamiento # 33	45
6.4.2.- Evaluación del SCAR ScabF27ext2 con distintas variedades de vides de mesa (semilladas o aprénicas) y cepas viníferas	50
7.- Discusión	54
7.1.- Aplicabilidad del marcador SCAR Scabf27ext2 para la selección de segregantes	56
8.- Conclusiones	60
9.- Bibliografía	62
10.- Anexos	
10.1.- Anexo 1. Secuencia de los extremos del marcador de RAPD WF27-2000	66
10.2.- Anexo 2. Cuadro con propiedades del partidor de RAPD WF27 y de los partidores SCAR ScabF27	67
10.3.- Anexo 3. Evaluación fenotípica de segregantes del cruzamiento #33 que han fructificado.	68

Índice de Figuras.

Figura 1.- Hipótesis para la expresión genética regulada de la apirenia.
(Página 8.)

Figura 2.- Fotografía de cultivares mantenidos en campos del C.R.I La Platina-INIA. (Página 19.)

Figura- 3.- Fotografía de los rudimentos y semillas que se encuentran habitualmente en los segregantes de los cruzamientos entre Ruby Seedless y Sultanina. (Página 23.)

Figura 4.- Esquema de la metodología BSA (Bulk Segregant Analysis) o Análisis de Segregantes en Bloque. (Página 29.)

Figura 5.- Patrón de RAPD generado por el partidor WF27 usando como templado el ADN de los segregantes que forman los grupos para el análisis de tipo BSA y el ADN de ambos progenitores del cruzamiento # 33. (Página 42.)

Figura 6.- Fragmentos amplificados a partir de ADN genómico de los individuos que forman los grupos de BSA con los partidores ScabF27ext2 directo y reverso (A) y ScabF27int1 directo y reverso (B). (Página 46.)

Figura 7.- Gráfico que ilustra la correlación entre la presencia del marcador SCAR ScabF27ext2, y la presencia de semillas en los segregantes que han fructificado del cruzamiento #33. (Página 49.)

Lista de Tablas.

Tabla 1.- Evaluación fenotípica de segregantes del cruzamiento #16 que han fructificado. (Página 24.)

Tabla 2.- Evaluación fenotípica de segregantes del cruzamiento #33 que han fructificado. (Páginas 25 y 26.)

Tabla 3.- Segregantes de los cruzamientos # 16 y # 33, que componen los grupos para el análisis mediante RAPD-BSA. (Página 38.)

Tabla 4.- Fragmentos polimórficos identificados mediante RAPD-BSA candidatos a convertirse en marcadores de tipo SCAR. (Página 41.)

Tabla 5.- Resultado de la evaluación del SCAR ScabF27ext2 usando como templado el ADN de todos los segregantes del cruzamiento #33. (Página 48.)

Tabla 6.- Correlación entre presencia del marcador SCAR (ScabF27ext2) y carácter apirénico de 27 cultivares de uva de mesa. (Página 52.)

Tabla 7.- Correlación entre presencia del marcador SCAR (ScabF27ext2) y carácter apirénico de 24 cultivares de uva de mesa. (Página 53.)

Tabla 8.- Evaluación fenotípica de segregantes del cruzamiento #33 que han fructificado. (Páginas 68 y 69.)

Lista de Abreviaturas.

A	: Adenosina
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
BSA	: Bulk Segregant Analysis
C	: Citidina
Cb	: Carbenicilina
CTAB	: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
dATP	: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
dGTP	: 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
dTTP	: 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
dNTP	: 2'-desoxirribonucleósido-trifosfato
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
G	: Guanosina
IPTG	: Isopropil tio- β -D-galactosido
min	: Minutos
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PVP	: Polivinilpirrolidona
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
Rg	: Rudimentos grandes
Rm	: Rudimentos medianos
RNasa A	: Ribonucleasa A

Rp : Rudimentos pequeños
rpm : Revoluciones Por Minuto
SCAR : Sequence-Characterized Amplified Region
s : Segundos
sdl : seed development Inhibitor
T : Timidina
TE : Tris-EDTA
TBE : Tris-Borato-EDTA
X-Gal : 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galacto-piranosido
Tris-HCl : Hidrocloruro de tris(hidroximetil)-aminometano

1. Resumen

En la vid, la apirenia o ausencia de semilla palatable se verifica por el aborto del embrión o durante el desarrollo temprano de la semilla, dejando trazas o rudimentos casi indetectables. En el Centro Experimental La Platina del INIA se cuenta con un programa de mejoramiento genético de uva de mesa que usa como progenitores variedades comerciales apirénicas y que es asistido por rescate de embriones antes del aborto. Dado que la vid no produce bayas hasta cuatro o cinco años después del cruzamiento, la identificación de marcadores moleculares ligados al carácter apirénico sería de gran interés, pues podrían excluirse segregantes semillados en etapas tempranas de su desarrollo, reduciendo el costo de desarrollo de nuevas líneas. Para la búsqueda de estos marcadores de apirenia se optó por un enfoque genómico denominado BSA (Bulk Segregant Analysis), por el cual se comparan grupos de plantas que presentan o no un carácter, "neutralizando" las diferencias individuales entre cada genotipo. Se seleccionó la progenie F1 del cruzamiento #33 (Ruby x Sultanina) previamente evaluada para las distintas sub-características de la apirenia. Se ensayaron 336 partidores de RAPD, de los cuales seis produjeron un fragmento fenotipo-específico asociado al fenotipo apireno y uno para los segregantes semillados. Estos marcadores de RAPD resultan inadecuados como marcadores debido a que la reacción es muy dependiente de las condiciones de amplificación. El fragmento denominado WF27-2000 fue clonado y secuenciado, y luego convertido en un marcador de tipo SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region). Este SCAR, llamado ScabF27ext2, generó un amplicón específico de 2,0 kb, presente en todos los segregantes con fenotipo apireno. Por su parte, el análisis de 127 plantas del cruzamiento #33 con el marcador ScabF27ext2 mostró una segregación de 3:1, coincidiendo con lo esperado para los padres heterocigotos para el *locus*. El marcador ScabF27ext2 mostró un 83,7% de correlación con apirenia en un conjunto de variedades de mesa, lo que se redujo a un 62,5% en cepas de vino. Al ser evaluado con los segregantes que fructificaron del cruzamiento #33, se obtuvo una correlación de 81%. Este SCAR produce un amplicón mediante una reacción de PCR sencilla y el resultado es fácilmente visualizable en geles de agarosa, lo que hace aplicable en un programa masivo de selección asistida por marcadores. El análisis detallado mostró además que el marcador WF27-2000 está más bien relacionado con la ausencia de semillas que con la ausencia o presencia de algún tipo de rudimentos. Estos resultados refuerzan la idea que existe un gen principal cuya expresión estaría relacionada con la ausencia de semillas, la principal forma de expresión fenotípica asociada a apirenia. El uso del marcador SCAR ScabF27ext2 en una etapa temprana del desarrollo de los segregantes del cruzamiento #33 (plántulas *in vitro*) permitiría reducir hasta en un tercio los costos de operación, por la reducción en el número de plantas manejadas *in vitro*, en invernadero y en campo.

SUMMARY

In grapevines, seedlessness or stenospermocarpy is produced due to the abortion of the embryo or during the early steps of seeds development, leaving traces or rudiments almost non-detectable. At La Platina Experimental Centre (Chilean Agriculture Research Institute), there is a breeding program for table grape that uses apirenic commercial varieties as progenitors and that is based on *in vitro*, pre-abortion embryo rescue. Since the grapevine does not produce berries up to four or five years after the crossing, the identification of molecular markers related to seedlessness would be of great interest, because they could be used to exclude seeded segregants in early stages of their development, reducing the cost of generation of new lines. For the search of these markers we opted for a genomic approach named BSA (Bulk Segregant Analysis), by which group of plants that present or not a trait are compared, in this way "neutralizing" the individual differences and revealing the genetic difference(s) that could be related to the expression of the trait. A F1 progeny, previously evaluated, of the crossing #33 (Ruby x Sultanina) was selected for the different stenospermocarpy sub-traits. Of 336 RAPD primers tested, six produced seedless-specific fragments and one was related to the seeded phenotype. RAPD DNA fragments are inappropriate as selection markers because this type of PCR reaction is highly dependent on the conditions of amplification. The fragment named Wf27-2000 was cloned and sequenced, and then converted into a SCAR marker (Sequence-Characterized Amplified Region). This SCAR, called ScabF27ext2, generated a specific amplicon of 2.0 kb, and present in all the seedless segregants. On the other hand, the analysis of 127 plants of the crossing #33 with the ScabF27ext2 marker showed a 3:1 segregation, in agreement with the genotype of their parents, both heterozygous for this *locus*. The ScabF27ext2 marker showed a correlation of 83,7% with seedlessness in a set of table cultivars, and of 62,5% with a group of wine isolates. When the marker was evaluated on the crossing #3 fruited segregants, a 81% correlation was observed. This SCAR produces an amplicon in a simple PCR reaction, their results being easily interpreted in agarose gels, which makes it usable in a marker assisted selection scheme. The detailed analysis showed also that the Wf27-2000 marker is related to the absence of seeds, more than to absence or presence of some kind of rudiment. These results reinforce the existence of a major gene whose expression would be related to the absence of seeds, the main seedlessness sub-trait. The use of the SCAR marker ScabF27ext2 in an early stage of the development of the segregants of the crossing #33 (in plantlets still maintained *in vitro*) would reduce up to one third the operational costs of the breeding program, due to a reduction in the number of plants handled *in vitro*, in greenhouse and in the field.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.- Información general

La vid es uno de los productos agrícolas de exportación más importantes para Chile, tanto en ingresos como en superficie cultivada. De las 125.000 Ha plantadas, más del 35% corresponden a uva de mesa que es destinada principalmente a Estados Unidos y Europa, siendo Chile además el primer exportador del hemisferio sur y disputando esta primacía mundial con Italia. Como en el resto del mundo, en Chile la mayoría de las variedades de exportación son apirénicas, como Thompson Seedless (en Chile también llamada Sultanina), que representa cerca de un 40% del total de los envíos, y Flame Seedless, entre varias otras. Así mismo, nuevas variedades en el mercado, como Crimson Seedless y Melissa, también presentan esta característica.

Se estima que el número de cultivares de vid existentes en el mundo es cercano a 8.000 (Alleweldt, 1988); una base de datos internacional mantenida en Alemania contiene datos de pasaporte para 16.000 accesiones (Dettweiler y Eibach, 1996), de los cuales probablemente un alto porcentaje son sinonimias. Aun así, es necesario el desarrollo de nuevas variedades que permitan: (i) evitar la dependencia de cultivares protegidos; (ii) disponer de variedades con características más apropiadas a condiciones agroecológicas, fitopatológicas y climáticas locales y sistemas de cultivo; (iii) desarrollar variedades resistentes al

transporte satisfaciendo así a la demanda del mercado; y (iv) tener variedades con mayor amplitud en el período de cosecha.

En uva de mesa, la característica más importante en mercados del hemisferio norte es la ausencia de semilla palatable (Ledbetter y Ramming, 1989). Además de la impalatabilidad de la semilla, el otro carácter de gran interés por su incidencia sobre el costo de producción, es la característica de no requerir ácido giberélico exógeno para inducir el crecimiento de bayas, la cual es propia de variedades como Superior y Ruby Seedless.

En términos agronómicos, apirenia significa ausencia de semilla palatable, lo que puede deberse a dos fenómenos distintos:

- En la partenocarpia la ausencia de semillas es total, se producen bayas en ausencia de fertilización, no se genera un embrión pero se requiere polinización para estimular el cuajo de frutos partenocárpicos (Ledbetter y Ramming, 1989), los que se generan exclusivamente a partir de tejido materno. Este es el caso de la variedad Corinto Negra, la única variedad de vid que presenta este fenotipo. Este fenómeno, también conocido como apomixis, se caracteriza además por la ausencia total de intercambio genético.

- En cambio, en el caso de la estenoespermocarpia Ledbetter y Ramming, (1989), a la cual me referiré en el resto del presente trabajo como apirenia, sí existe fecundación, por lo tanto se heredan características de ambos padres; luego de la fecundación se produce el embrión, pero éste es

abortado durante los estadios tempranos de su desarrollo, dejando trazas de semillas o rudimentos casi indetectables. La variedad representativa de este tipo es Sultanina, aunque existen muchas otras con diferente grado de desarrollo de semilla o apirenia.

Para el desarrollo de nuevas variedades, los programas tradicionales se basan en cruzamientos entre fenotipos semillados y no semillados. La proporción de fenotipos asemillados obtenidos a partir de dichos cruzamientos es bajo (10-30%; Loomis y Weinberger, 1979). Cuando se realizan cruzamientos entre variedades asemilladas, la única forma de obtener individuos viables es mediante el rescate de embriones, pues de otra forma abortarían. Seguido al proceso de rescate de embriones, se realiza el cultivo *in vitro* de los embriones viables. La combinación de estas técnicas permite recuperar una mayor proporción de individuos asemillados (50-80%; Bouquet y Danglot., 1996).

Sin embargo, el cultivo *in vitro* es un proceso laborioso, técnicamente difícil y de costo elevado. Para determinar si el fenotipo de cada segregante obtenido de un cruzamiento es semillado o asemillado, es necesario esperar que la planta produzca frutos (4 a 5 años después del cruzamiento, una vez superada su etapa de juvenil). Por ello, la identificación de marcadores moleculares ligados al carácter estenoespermocárpico (apirénico) sería de gran interés por la posibilidad de excluir los segregantes semillados en etapas tempranas de su desarrollo, e incluso durante el período de cultivo *in vitro* (rescate de embriones y desarrollo de plántulas). En esa etapa, podría usarse un pequeño trozo de

tejido para evaluar la presencia de un determinado marcador basado en PCR, teniendo como resultado un incremento en la eficiencia dentro del proceso de obtención de nuevas líneas apirénicas.

2.2.- Herencia de la apirenia

A pesar del progreso hecho para obtener segregantes a partir de cruzamientos de variedades apirénicas y del trabajo realizado por los fitomejoradores en los últimos 70 años, la herencia de la apirenia es escasamente conocida. El estudio de su herencia es particularmente difícil y poco claro por la dificultad de la clasificación de los fenotipos semillados o apirénicos, siendo la evaluación sensorial demasiado subjetiva. En este sentido, Striem et al. (1992) propusieron separar la apirenia en distintos caracteres, basados en la dureza de la envoltura de la semilla y el desarrollo del endospermo. Métodos químicos también han sido propuestos, como el contenido total de polifenoles en las bayas separadas de su piel (Merin et al., 1983). Cualquier hipótesis que concierna la herencia de la apirenia debe tomar en cuenta el hecho que el carácter semillado o asemillado está sujeto a mutaciones. Existen reportes de racimos con bayas semilladas en cultivares apirénicos ("quimeras"). Estos antecedentes han dado sustento a las hipótesis que proponen la existencia de factores genéticos cuantitativos donde dosis adicionales de genes aumentarían o disminuirían el peso o tamaño de las semillas. La herencia basada en genes recesivos no puede explicar la presencia de fenotipos semillados en progenies

descendientes de variedades asemilladas, ni la ausencia de fenotipos asemillados en progenies obtenidas mediante autopolinizaciones o cruzamientos entre variedades semilladas que no tengan ancestros asemillados. La herencia basada en genes dominantes no explica el bajo porcentaje de individuos asemillados obtenidos a partir de cruzamientos de variedades asemilladas con semilladas, ni la ocurrencia de fenotipos asemillados en progenies obtenidas por autopolinización de variedades semilladas teniendo ancestros asemillados.

A partir de un análisis de la razón fenotípica semillado / asemillado en progenies descendientes de cruzamientos de padres asemillados, se han propuesto varias teorías sobre la herencia del carácter estenoespermocárpico. Para ser más precisos, trece hipótesis han sido propuestas desde 1939, en relación a este problema genético (citadas en Bouquet y Danglot, 1996). Sin embargo, ninguna de las hipótesis propuestas con anterioridad a la de Bouquet y Danglot de 1996 se ajusta a los datos experimentales de forma satisfactoria. El modelo más aceptado actualmente es precisamente el de Bouquet y Danglot (1996), quienes desarrollaron un modelo según el cual la expresión de la apirenia depende de una serie de tres genes recesivos controlados por un gen regulador dominante. Este modelo es capaz de explicar por qué el cruzamiento de dos variedades semilladas puede producir segregantes apirénicos (Loomis y Weinberger, 1979), así como la aparición de plantas semilladas a partir de variedades apirénicas (Krimbas, 1933). En este modelo (ver figura 1), el alelo *sdl+* (*seed development*

Inhibitor) produciría un represor que es activado en presencia de giberelinas (co-represor), el que bloquearía la transcripción de los genes recesivos a1, a2 y a3, que actuarían sobre la región reguladora de los genes estructurales. Se postula que el ácido giberélico (GA) tiene un rol importante en la herencia de la apirenia debido a que aplicaciones exógenas de GA antes y después de desarrollo del embrión inducen el aborto del embrión en vides semilladas (Agüero et al., 2000). Se ha visto también que inhibidores de la transcripción como la estreptomicina producen el mismo efecto en vides semilladas. Por otro lado, tratamientos con inhibidores de la síntesis de GA en vides apirénicas conducen a la formación de semillas palatables (Agüero et al., 2000). Cuando 1, 2 o 3 regiones reguladoras de los genes estructurales son homocigotos, hay una expresión parcial o total del carácter asemillado. Como es sabido, las semillas son una importante fuente endógena de giberelina, por lo que la expresión del gen para el carácter apirénico disminuirá la concentración del co-represor. El represor se inactivaría, llegándose a producir semilla. Este sistema regulado llevaría a la aparición de trazas de semillas con una dureza y tamaño inversamente proporcional al número de alelos homocigotos, al ser estas formas alélicas de las regiones reguladoras de los genes estructurales los receptores del represor activado. Si la concentración del co-represor es disminuida por tratamientos con inhibidores de la síntesis de giberelina se produce un desarrollo de semillas duras y notables en los individuos con

genotipo asemillado A1a1 a2a2 a3a3 (sdl+/sdi-) o A1a1A2a2a3a3 (sdl+/sdi-), como fue observado por Ledbetter y Shonnard, 1990.

A1A2A3 corresponden a formas alélicas de las regiones reguladoras de los genes estructurales que son insensibles al represor incluso en presencia del represor (genotipos sdl+/sdl+ o sdl+/sdi-) y de co-represores (giberelinas). En otras palabras; no habrá expresión del carácter apirénico si los tres genes son homocigotos AA o heterocigotos Aa. El alelo sdi- produce un represor modificado estructuralmente que no podría ser activado por giberelinas endógenas. Las regiones reguladoras de los genes estructurales a1a2a3 no podrían ser reprimidas y se produciría una expresión constitutiva del carácter apirénico cuando el gen regulador es homocigoto (sdi-/sdi-).

Esta hipótesis es altamente especulativa, aunque aparentemente las giberelinas juegan un rol importante en la apirenia, posiblemente en asociación con otros factores de crecimiento como algunas auxinas (Kender y Remaily, 1970).

Si bien este modelo de herencia propuesto es capaz de explicar las distribuciones fenotípicas observadas del carácter asemillado en progenies de distintos cruzamientos entre variedades asemilladas y cruzamientos entre variedades semilladas con asemilladas, es necesario contar con un método de evaluación del carácter asemillado más preciso, que permita disectar el carácter en sus subcaracteres.

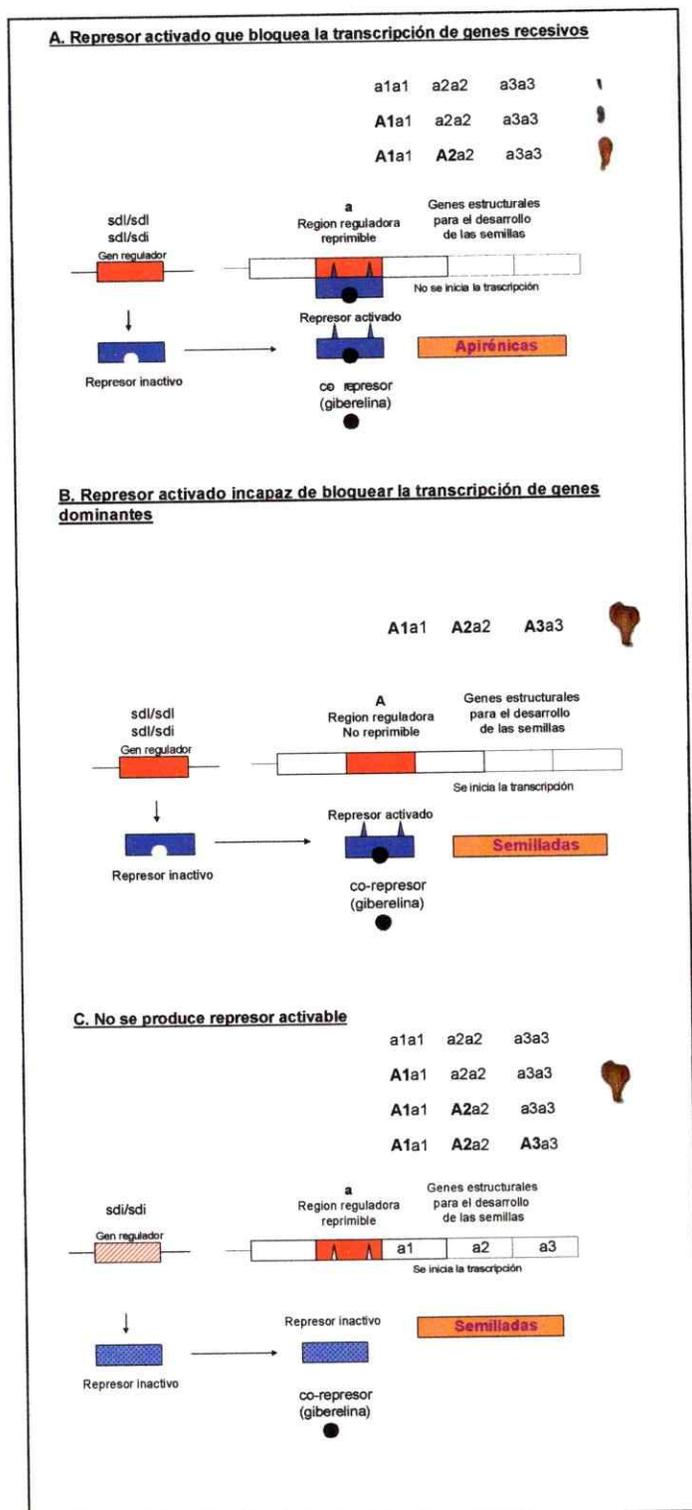


Fig. 1: Hipótesis para la expresión genética regulada de la apirenia en vides. Este modelo se basa en tres genes recesivos heredados independientemente cuya expresión está controlada por sus respectivas regiones reguladoras donde interacciona un represor activado por ácido giberélico (GA). **A.** El alelo *sdi* produciría un represor activable en presencia de giberelinas, y bloquearía la transcripción de genes estructurales a través de tres genes *a1*, *a2* y *a3*. Cuando 1, 2 o 3 genes estructurales son homocigotos, la expresión del carácter asemillado sería parcial o total. **B.** *A1*, *A2* y *A3* corresponden a formas alélicas de los genes estructurales cuya(s) regiones reguladoras serían insensibles al represor (genotipos *sdi/sdi* o *sdi/sdi*). **C.** El alelo *sdi* produciría un represor modificado estructuralmente que no podría ser activable por giberelinas. Los genes operadores *a1*, *a2* y *a3* no podrían ser reprimibles y habría una expresión constitutiva de los genes estructurales para el desarrollo de las semillas (genotipos *sdi/sdi*).

2.3.- Antecedentes del Programa de Mejora Genética de La Platina

Durante los últimos 10 años en el Centro Experimental La Platina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, se lleva a cabo un programa de mejoramiento genético para uva de mesa, el que se basa en el cruzamiento de variedades comerciales apirénicas asistido por rescate de embriones. Este programa recurre a más de 20 progenitores en distintas combinaciones, obteniéndose anualmente entre 1000 a 2000 plantas a partir de bayas polinizadas artificialmente (Barticevic et al., 1998). Dicho programa tiene como objetivos seleccionar los cultivares con características como apirenia, época de maduración temprana, crocancia, etc. Anteriormente se identificaron las familias de referencia o cruzamientos que sirven de base para desarrollar un mapa de ligamiento genético de la especie y para identificar aquellas familias que manifiesten contrastes, tanto a nivel de los progenitores como en la población segregante, para características de interés. El cruzamiento #33 de Ruby Seedless x Sultanina, ambas variedades apirénicas, que generó una progenie F1 con más de 300 segregantes a la fecha, ha sido elegido para el mapeo debido a que para estos experimentos se requiere el mayor número posible de segregantes y por la segregación bastante equilibrada de los distintos sub-componentes característicos de la apirenia.

2.4.- Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares, definidos como segmentos del genoma o secuencias específicas de ADN que le son propios a un individuo o grupo de individuos, se han usado en genética de plantas para diferentes propósitos: estimación de las relaciones genéticas entre individuos de un determinado germoplasma, determinación de parentesco, *fingerprinting* de variedades, preparación de mapas de ligamiento, mapeo de caracteres simples o complejos e identificación de marcadores para ser usados en selección asistida por marcadores (Waugh y Powell, 1992; Rafalski, 1994; Ferreira y Grattapaglia, 1996).

La introducción de diversos métodos de análisis genético en plantas ha aumentado la capacidad de desarrollar marcadores moleculares asociados a caracteres de interés (Beckmann y Soller, 1990). En esta área, el descubrimiento de secuencias de microsatélite en el DNA (Jeffreys et al., 1985), marcó un hito muy importante. Posteriormente, con el advenimiento de la PCR, se desarrollaron nuevos métodos analíticos, tales como RAPD (Welsh y McClelland, 1990; Williams et al., 1990), AFLP (Vos et al., 1995) y Microsatélites (Thomas et al., 1993).

Desde hace algunos años se trabaja en INIA en el desarrollo y optimización de protocolos de identificación de diversos genotipos (Narváez, 1998) basándose en la alta variabilidad alélica identificada con los métodos mencionados más arriba (RAPD, AFLP y microsatélites). Posteriormente, se ha comenzado un

trabajo destinado a preparar un mapa de ligamiento genético de *Vitis vinifera* basado en estos mismos marcadores dominantes (RAPD y AFLP) posicionados en un mapa de consenso preparado en base a marcadores codominantes (Microsatélites).

Por otra parte, la construcción de este mapa genético será la base para la identificación de marcadores estrechamente ligados a caracteres de interés, como la apirenia. Estos marcadores permitirán apoyar procesos de selección temprana de segregantes que presenten este carácter, reduciendo el costo general del programa de mejoramiento genético.

2.5.- Antecedentes de Marcadores Moleculares para Apirenia

Striem et al. (1996) identificaron 12 marcadores moleculares de tipo RAPD que tenían alguna correlación con varios sub-caracteres de la apirenia. Sin embargo, la utilidad de dichos marcadores necesita aún ser investigada, así como la distancia entre los marcadores y las distintas subcaracterísticas de la apirenia. Ese estudio también sugirió que la apirenia se debe a la expresión regulada de varios genes, lo que coincide con la hipótesis propuesta por Bouquet y Danglot (1996). De acuerdo a esta hipótesis, la apirenia es cuantitativa, es decir se expresa fenotípicamente en todos los grados de variación entre un extremo indefinido y otro por lo que además sería poligenética, y se esperaría que cada par de alelos ejerciese un efecto aditivo.

Más recientemente, un grupo de INRA-Montpellier ha identificado un marcador *SCAR* codominante, derivado de RAPD (Lahogue et al., 1998). Para ello, se usó la progenie Mtp3140 proveniente del cruzamiento entre las líneas MTP2223-27 (Dattier de Beyrouth x Pirovano 75) y Mtp2121-30 (Alphonse La Vallée x Sultanina). La población resultante, que segregó para apirenia (genes aportados supuestamente por Sultanina), fue estudiada mediante RAPD usando grupos contrastantes (aproximación denominada BSA, Michelmore et al., 1991), encontrándose un fragmento fenotipo-específico para los individuos apirénicos. Esta banda fue clonada y secuenciada, a partir de la cual se desarrolló un marcador de tipo *SCAR* (Sequence-Characterized Amplified Region; Paran et al., 1993) denominado SCC8 y ubicado a 0,7 cM del hipotético gen *sdl*. SCC8 genera mediante una reacción de PCR un fragmento único tanto en los individuos semillados como en los apirénicos. Para revelar el polimorfismo, es necesario utilizar una técnica llamada CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence; Glazebrook et al., 1998), en la que al producto de la PCR es sometido a una digestión con la enzima de restricción *Bgl*II. En los individuos *sdl*⁺, esta enzima reconoce un sitio de restricción ausente en los *sdl*⁻, lo que se asoció a segregantes apirénicos. Esta restricción, que genera de 1 a 3 bandas, permite también distinguir entre individuos homocigotos y heterocigotos para este *locus*, lo que genera un marcador codominante que muestra un 75% de correlación con apirenia al ser evaluado en la progenie Mtp3140.

Posteriormente, Adam-Blondon et al. (2001) desarrollaron el marcador SCAR SCP18, también en la progenie Mtp3140, a partir de un marcador de RAPD ligado al mencionado *locus* *sdl*, asociado al fenotipo apirénico. En un ensayo preliminar, se evaluaron la utilidad de este nuevo marcador además del mencionado SCC8, como herramientas de selección asistida, estudiando su comportamiento sobre segregantes de varios cruzamientos. Cuando el marcador SCC8 fue ensayado con la progenie MtpDMV2 (Danuta x Madina), en el 18% de los segregantes no se generó la banda esperada. Por su parte, el nuevo marcador SCP18 resultó informativo sólo en la población de segregantes Mtp3140.

Considerando que uno de los progenitores usados en el programa de mejoramiento genético de INIA La Platina es Sultanina, se evaluó la capacidad predictiva de SCC8 en el cruzamiento de Ruby x Sultanina (cruzamiento # 33). Los resultados indicaron que solo un 42% de los segregantes presentaron la banda de amplificación del tamaño esperado (ca. 1 kb), haciéndose imposible el posterior análisis de tipo CAPS. Estos resultados sugirieron que el marcador SCC8 no es de utilidad en el cruzamiento # 33, lo cual ha sido también verificado por otros grupos de mejoramiento (J.M. Martinez-Zapater, CNB, Madrid-España y del Instituto Agrario de San Michele, Italia; ambos no publicados). Por esta razón, se consideró necesario el desarrollo de nuevos marcadores ligados a apirenia que tengan una aplicabilidad más amplia en el

contexto de un programa de mejoramiento que usa diferentes progenitores apirénicos, como sucede en La Platina.

Considerando estos antecedentes, esta tesis se orienta a la búsqueda de marcadores moleculares de tipo RAPD asociados al carácter apirenia en uva de mesa y el desarrollo posterior de un marcador molecular de tipo "SCAR" que tenga aplicabilidad en un esquema de mejoramiento genético asistido por este tipo de marcadores. Este trabajo constituye parte del proyecto FONDECYT 1990204, además de un proyecto de la Comunidad Europea (INCO-DEV ICA4-CT-2001-10065), a ejecutarse durante los próximos dos años.

3.- HIPOTESIS

El modelo para la expresión genética regulada de la apirenia en vides propuesta por Bouquet y Danglot (1996), se basa en tres genes recesivos heredados independientemente cuya expresión está controlada por un gen regulador dominante. Si bien es sólo una hipótesis más para explicar la herencia de la apirenia, es la que mejor explica las proporciones fenotípicas que se observan en campo al realizarse cruzamientos entre distintas variedades semilladas o apirénicas. La apirenia es un carácter cuantitativo y poligenético pero cuya expresión estaría gobernada por un gen mayor (sdl), por lo que resulta factible estudiar esta herencia siguiendo las leyes mendelianas, haciéndose además posible la búsqueda de marcadores moleculares que segreguen junto al mencionado locus sdl. Si no se tratase de una característica

gobernada por un gen principal, es decir, que estuviese gobernada por muchos genes con pequeños efectos aditivos, estos no podrían ser identificables mendelianamente, y habría que recurrir a técnicas estadísticas y a estudios de QTL (Quantitative Trait Loci) (Doliguez et al.,2000).

La hipótesis para abordar este trabajo es que si la apirenia es un carácter poligenético determinado por un gen mayor y varios otros determinantes genéticos con efectos menores, entonces es posible asociar un marcador que esté estrechamente relacionado al gen mayor del tipo *sdl*. Esto reforzaría la teoría sobre la herencia de la apirenia regulada principalmente por un gen mayor.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general

Identificar marcadores moleculares que estén estrechamente relacionados con apirenia en uva de mesa, para selección asistida por marcadores de segregantes en un programa de mejoramiento genético.

4.2.- Objetivos específicos

1. Identificar marcadores moleculares de tipo RAPD o AFLP que se puedan correlacionar con segregantes que muestren el fenotipo-carácter apirénico. Para este propósito, se empleará una estrategia de tipo BSA (Bulk Segregant

Analysis, Michelmore et al., 1991) en la que se compararán los patrones de dos grupos de plantas segregantes que presentan caracteres contrastantes (con o sin semilla), seleccionados fenotípicamente dentro de una familia de referencia, en este caso la progenie # 33 proveniente del cruzamiento de Ruby Seedless x Sultanina. Con esta aproximación, se neutralizan las diferencias individuales, resaltando las posibles bandas asociadas a apirenia.

2. Desarrollar un marcador del tipo SCAR a partir de fragmentos polimórficos entre segregantes apirénicos y semillados. Cuando existan bandas polimórficas candidatas, se clonará el fragmento y a partir de su secuencia nucleotídica se diseñarán partidores de PCR; éstos serán evaluados en los mismos segregantes que sirvieron para su desarrollo, para determinar si aún reflejan la diferencia asociada al carácter fenotipo-específico.

3. Ensayar los marcadores de tipo SCAR en todos los segregantes del cruzamiento #33 y en distintos fondos genéticos. Se estudiará la aplicabilidad del marcador en diferentes cruzamientos (con diferentes progenitores) evaluando la correlación entre la presencia de cada marcador y la expresión del fenotipo de interés.

4. Estandarización de la reacción de PCR para cada uno de las SCAR desarrolladas. Se debe optimizar las condiciones de uso del marcador aplicado en diferentes cruzamientos.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Materiales

5.1.1.- Reactivos

De Merck (KGaA, Darmstadt, Alemania), se obtuvo cloroformo, alcohol isoamílico, cloruro de sodio, etanol absoluto, 2-mercaptoetanol, ácido bórico, acetato de amonio, cloruro de potasio, y glicerol todos p.a., glucosa monohidrato D(+), azul de bromofenol y xilencianol.

De Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), ribonucleasa, CTAB, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, bromuro de etidio, X-Gal, cloruro de magnesio, dATP, dGTP, dTTP, dCTP, ioduro de sodio, aceite mineral y dióxido de silicio.

De GIBCO Life Technologies (Carlsbad, California, USA), CONCERT Rapid Gel Extraction System, Concert Rapid Plasmid Miniprep System, IPTG, carbenicilina, agar, peptona 140, extracto de levadura y la cepa *E. coli* DH5 α .

De Winkler LTDA, tris base, EDTA sal disódica 2-hidrato, fenol:cloroformo básico y agarosa.

De Wako Pure Chemical Industries, LTD. (Tokio, Japón), PVP, oligonucleótidos de 12 mer kits A, B, E, F, G y H y marcador de peso molecular M2 (λ Hind III-*EcoR* I).

De Promega Corporation (Madisson, WI, USA), pGEM-T Easy Vector System y *Taq* polimerasa.

De Amresco (Ohio, USA), Tris-HCl.

De Fluka Biochemika (Alemania), D(+) Sacarosa.

De Stratagene (La Jolla, CA, USA), Opti-Prime; PCR Optimization Kit.

De Hoefer Pharmacia Biotech Inc el reactivo fluorogénico H-33258

5.1.2.- Material vegetal

Los segregantes con los que se trabajó son provenientes del cruzamiento entre Ruby Seedless (madre) y Thompson Seedless (padre) y su recíproco. Dentro del Programa de Mejoramiento Genético del INIA, estos cruzamientos tienen los números de registro 33 y 16, respectivamente. Estos segregantes analizados corresponden a plantas únicas, mantenidas en terrenos del INIA La Platina (figura 2). Por tratarse de una especie leñosa las muestras corresponden a hojas de plantas en activo desarrollo obtenidas después de la dormancia invernal (es decir, entre septiembre y diciembre) las hojas son conservadas a -80°C hasta la extracción del ADN genómico.

5.2.- Métodos

5.2.1.- Extracción y preparación de ADN para análisis de RAPD

5.2.1.1.- Extracción de ADN

Se ha adaptado una metodología de extracción de ADN basada en lo descrito por Lodhi et al. (1994). Se pesaron 0,1 g de tejido fresco o conservado en

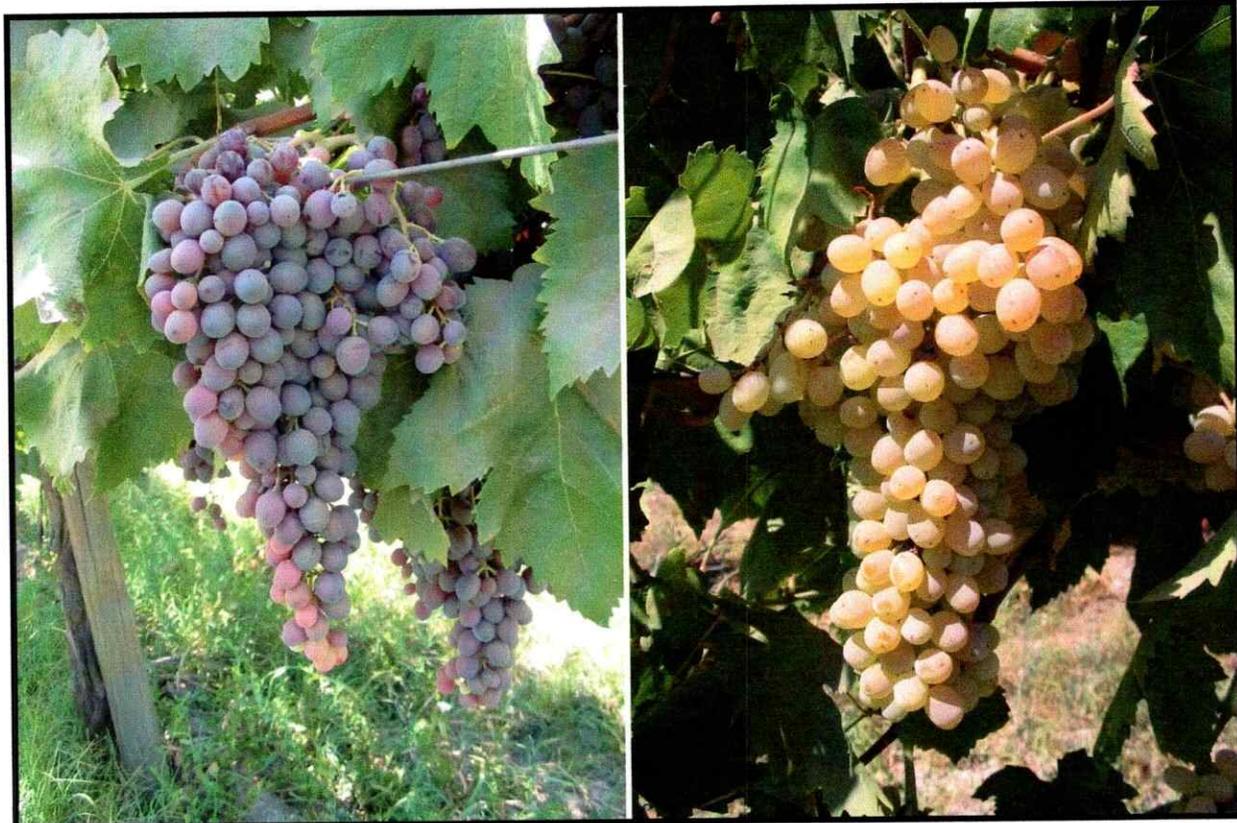


Figura 2. Fotografía de cultivares mantenidos en campos del C.R.I La Platina-INIA. En el marco izquierdo, Ruby Seedless, en el derecho, Thompson Seedless.

ultrafreezer (-80°C) que se molió en mortero en presencia de N₂, se agregó 0,7 mL de solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M; CTAB 2%[p/v]); 2-mercaptoetanol a 0,2%, 10 mg de PVP por cada 0,7 mL de solución amortiguadora de extracción y se homogenizó; el extracto se transfirió a tubos de 2 mL.

Se incubó a 60° C por 25 min y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se adicionó 0,7 mL de cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló suavemente por inversión, se centrifugó a 8.000 rpm por 15 min y se transfirió el sobrenadante (450 µL) a otro tubo, se adicionó medio volumen de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto a - 20 °C y se mezcló por inversión. Se dejó en reposo por 30 min para precipitar el DNA y se centrifugó a 3.000 rpm por 3 min, y luego a 6.000 rpm por 3 min. Se descartó el sobrenadante y el ADN precipitado se lavó con etanol 75% y luego se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente, después de secar por 15 a 30 min, se resuspendió en 100 µL de TE, incluyendo RNasa A (0,01 mg/ml) y se incubó por 15 min a 37°C. El ADN así preparado se guardó a -20°C por períodos prolongados.

5.2.1.2.- Cuantificación del ADN extraído

La concentración del ADN fue medida usando un fluorímetro Hoefer DyNa Quant 200 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.) y el reactivo H-33258 como tinción específica del DNA (forman un complejo que emite fluorescencia a 480 nm) de acuerdo a instrucciones del fabricante. El rendimiento promedio obtenido fue

de 150 µg/µL. Rutinariamente se revisó el estado de pureza e integridad del DNA, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en TBE 1X (Tris-Borato 45 mM, 1 mM de EDTA).

5.2.1.3.- Dilución del ADN para las reacciones de RAPD

Las reacciones de RAPD requieren poco ADN templado por lo que se probaron distintas diluciones de ADN. De esta manera, se determinó que usando 2 ng de ADN por reacción eran suficientes para producir reacciones de PCR con bandas consistentes de 200 a 2000 pares de bases, por lo que alícuotas del ADN stock fueron diluidas hasta tener una concentración de 1 ng/µL

5.2.2.- Identificación de fragmentos polimórficos mediante RAPD-BSA

5.2.2.1.- Elección de los individuos para el B.S.A.

En las progenies de los cruzamientos # 16 y # 33 sólo 23 y 53 plantas han fructificado, respectivamente. Para la formación de los bloques (o Bulks) contrastantes se seleccionaron los individuos fenotípicamente más contrastantes para la apirenia del cruzamiento # 33. Como no se alcanzó a formar 2 grupos de 10 individuos cada uno (uno apirénico y otro semillado), se utilizaron individuos del cruzamiento # 16. Para la elección de los individuos, se utilizó la información de la evaluación de las semillas en distintas temporadas (1998, 1999, 2000, 2001 y 2002). Esta evaluación toma en cuenta la presencia de semillas o tipo de rudimentos (pequeño, mediano o grande), peso total de

las bayas y el peso total de semillas o rudimentos. Esta información se detalla en las tablas 1 y 2, el tipo de rudimentos o semillas que presentan los segregantes se puede apreciar en la Figura 3.

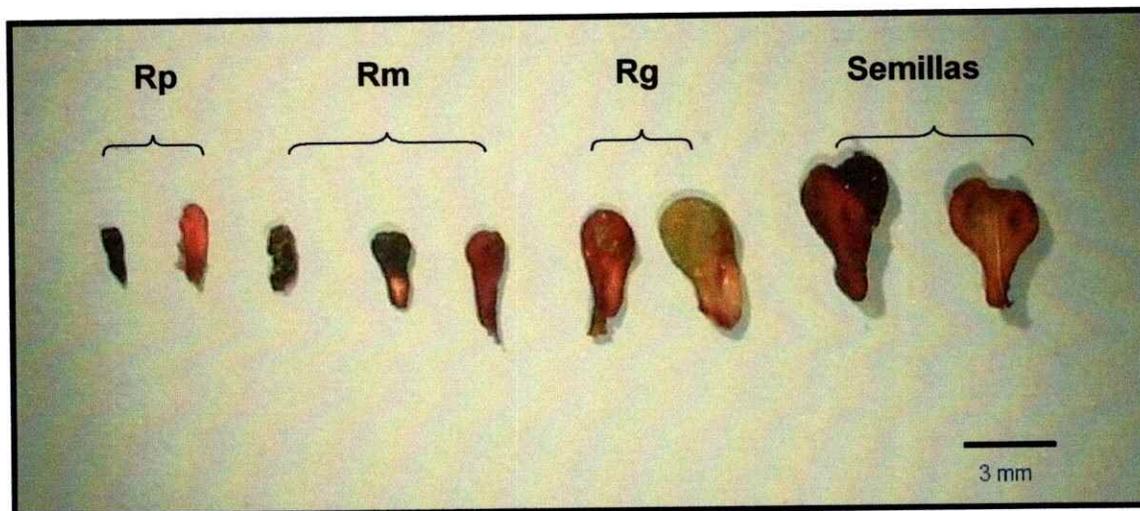


Figura 3. Fotografía de los rudimentos y semillas que se encuentran habitualmente en los segregantes de los cruzamientos entre Ruby Seedless y Sultanina. Los 2 primeros, de izquierda a derecha, corresponden a rudimentos pequeños (Rp), los 3 siguientes corresponden a rudimentos medianos (Rm), los 2 siguientes corresponden a rudimentos grandes (Rg) y los 2 últimos corresponden a semillas normales. Cada semilla proviene de un segregante diferente.

Tabla 1. Evaluación fenotípica de segregantes del cruzamiento #16 que han fructificado

Segregante #	Tamaño rudimento o presencia de semillas	Temporada de evaluación	N° Semillas / baya	Peso promedio por baya (g)	Peso total semillas o rudimentos (g)	Color baya
9	Rg, Rm y Rp	2000/01	0,0	1,8	1,2	ND
68	Rg, Rm y Rp	2001/02	0,0	1,3	0,3	ros
85	Rg, Rm y Rp	2001/02	0,0	1,4	0,6	ros
7	Rm y Rp	2000/01	0,0	1,2	0,1	ND
20	Rm y Rp	2000/01	0,0	1,8	0,1	ND
23	Rm y Rp	2000/01	0,0	2,1	0,2	ND
25	Rp	2000/01	0,0	0,7	0,1	ND
25	Rp	2001/02	0,0	0,5	0,0	ros
33	Rp	2001/02	0,0	0,8	0,1	ros
37	Rp	2001/02	0,0	0,7	0,0	ros
43	Rp	2001/02	0,0	1,8	0,1	ros
48	Rp	2000/01	0,0	1,4	0,0	ND
65	Rp	2001/02	0,0	0,8	0,0	ros
103	Rp	2001/02	0,0	1,7	0,0	ros
1	Semilla	1998/99	1,8	3,6	2,3	bca
2	Semilla	1998/99	2,2	4,8	4,0	bca
3	Semilla	1998/99	2,3	4,9	4,1	bca
4	Semilla	1998/99	2,0	3,6	1,9	bca
5	Semilla	1998/99	2,2	3,6	4,2	bca
15	Semilla	2000/01	2,0	2,9	2,6	ND
27	Semilla	2000/01	1,4	3,8	1,9	ND
58	Semilla	2000/01	1,6	2,8	1,7	ND
62	Semilla	2001/02	0,3	1,4	0,4	ND
115	Semilla	2001/02	1,6	2,3	1,9	bca

Los segregantes se ordenaron en la tabla de acuerdo al tipo de rudimentos o semillas que presentan (Rp, Rm, Rg o "semillas", según se indica en la Fig. 2). Se indica además la temporada de evaluación, el número de semillas por baya, el peso promedio por baya, el peso de los rudimentos o semillas, considerando el promedio de 20 bayas, y el color de las bayas (ND: sin información; ros: rosada; bca: blanca)

Tabla 2. Evaluación fenotípica de segregantes del cruzamiento #33 que han fructificado.

Individuo	Tamaño rudimento o presencia de semillas	Temporada de evaluación	N° Semillas / baya	Peso promedio por baya (g)	Peso total semillas o rudimentos (g)	Color baya
1	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	1,7	0,6	ros
2	Rg, Rm y Rp	2000/01	0,0	0,6	0,5	ND
8	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	1,8	0,6	bca
25	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	1,6	0,3	ros
25	Rg, Rm y Rp	2000/01	0,0	1,9	0,3	ND
29	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	1,8	0,9	ros
29	Rg, Rm y Rp	2001/02	0,0	2,6	0,9	ros
31	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	2,3	0,3	ros
37	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	1,5	0,6	ros
41	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	2,4	0,6	ros
50	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	1,7	1,1	bca
56	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	3,4	0,2	ros
61	Rg, Rm y Rp	2001/02	0,0	1,4	0,1	bca
63	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	3,6	1,5	bca
67	Rg, Rm y Rp	1998/99	0,0	2,2	2,2	ros
19	Rm y Rp	1998/99	0,0	2,5	0,4	bca
28	Rm y Rp	2000/01	0,0	0,8	0,1	ND
40	Rm y Rp	1998/99	0,0	1,5	0,1	ros
45	Rm y Rp	1998/99	0,0	1,7	0,7	ros
51	Rm y Rp	1998/99	0,0	1,9	0,7	bca
100	Rm y Rp	2001/02	0,0	1,2	0,1	ros
106	Rm y Rp	2001/02	0,0	0,9	0,2	bca
34	Rp	1998/99	0,0	1,3	0,0	ros
53	Rp	1998/99	0,0	3,4	0,1	ros
55	Rp	2001/02	0,0	2,2	0,1	ros
69	Rp	1998/99	0,0	1,1	0,1	ros
73	Rp	1998/99	0,0	2,3	0,3	ros
80	Rp	2000/01	0,0	2,3	0,4	ND
81	Rp	2001/02	0,0	1,6	0,0	ros
157	Rp	2001/02	0,0	0,5	0,0	bca
160	Rp	2001/02	0,0	1,0	0,0	bca
160	Rp	2001/02	0,0	1,4	0,1	bca
3	Semilla	1998/99	1,0	1,8	1,4	bca
27	Semilla	1998/99	2,1	2,8	3,5	bca
35	Semilla	1999/00	1,7	4,8	2,8	bca
43	Semilla	1998/99	1,5	4,4	3,1	bca
44	Semilla	1998/99	1,6	2,8	3,1	ros
47	Semilla	2000/01	1,2	2,1	1,9	ND

Continuación Tabla 2.

Individuo	Tamaño rudimento o presencia de semillas	Temporada de evaluación	N° Semillas / baya	Peso promedio por baya (g)	Peso total semillas o rudimentos (g)	Color baya
49	Semilla	1998/99	2,3	3,4	3,0	bca
52	Semilla	2000/01	2,4	4,0	3,8	ND
54	Semilla	2000/01	1,3	2,8	1,5	ND
57	Semilla	1998/99	1,8	3,5	3,2	ros
59	Semilla	2000/01	1,6	1,4	2,5	ND
64	Semilla	1998/99	1,1	3,5	1,8	ros
68	Semilla	1998/99	1,5	3,0	3,2	bca
70	Semilla	1998/99	2,1	3,4	2,9	ros
71	Semilla	1998/99	1,2	4,0	1,5	ros
76	Semilla	1998/99	1,6	3,1	ros	1,5
77	Semilla	1998/99	2,0	6,6	ros	5,9
78	Semilla	1998/99	0,1	1,3	ros	3,1
82	Semilla	2000/01	1,3	2,1	ND	3,2
125	Semilla	2001/02	1,8	2,3	bca	2,5
136	Semilla	2001/02	1,3	1,7	bca	2,3
144	Semilla	2001/02	1,9	2,5	ND	2,2
191	Semilla	2001/02	1,2	1,6	bca	1,7
322	Semilla	2001/02	2,4	2,0	ND	2,7

Los segregantes se ordenaron en la tabla de acuerdo al tipo de rudimentos o semillas que presentan (Rp, Rm, Rg o "semillas", según se indica en la Fig. 3). Se indica además la temporada de evaluación, el número de semillas por baya, el peso promedio por baya, el peso de los rudimentos o semillas, considerando el promedio de 20 bayas, y el color de las bayas (ND: sin información; ros: rosada; bca: blanca)

5.2.2.2.- Formación de los grupos para el análisis tipo BSA en fenotipos contrastantes

Considerando la evaluación fenotípica para apirenia descrita previamente en las tablas 1 y 2, se agruparon los segregantes de los cruzamientos # 16 y # 33 en cuatro grupos, juntando individuos semillados o parcialmente semillados, vs. individuos apirénicos:

Grupo a-1: Bayas apirénicas, sólo presentan rudimentos seminales pequeños con peso total de semillas (de 20 bayas) inferior a 0,1 g.

Grupo a-2: Bayas apirénicas, con rudimentos seminales medianos pero con peso total de rudimentos (de 20 bayas) inferior a 1 g.

Grupo b-1: Bayas semilladas, peso total de semillas y rudimentos seminales (de 20 bayas) mayor a 3 g.

Grupo b-2: Bayas semilladas, peso total de semillas y rudimentos seminales (de 20 bayas) entre 1,5 y 3 g.

Para identificar marcadores de tipo RAPD asociados a apirenia mediante BSA, se preparó y juntó ADN de 10 individuos seleccionados fenotípicamente los grupos más contrastantes: a-1 y b-1. Con esta aproximación, se espera neutralizar las diferencias individuales resaltando las posibles bandas asociadas a apirenia. A su vez, se "armaron" dos grupos para cada fenotipo, compuesto de cinco individuos cada uno, para hacer en total cuatro grupos o bulks (Bk. Ap 1.1 y Bk. Ap1.2, apirénicos; Bk. Sm 2.1 y Bk. Sm 2.2, semillados), usando

cantidades iguales de ADN de cada genotipo, esta metodología se describe en la figura 4.

5.2.2.3.- Análisis mediante RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

En este procedimiento se usaron partidores de diseño aleatorio, de 12 mer, que no contienen secuencias palindrómicas y con un contenido de G+C de 50 a 80%. Cada PCR es iniciado por la adición de un solo partidor, por lo que el mismo partidor se une a las hebras opuestas en el ADN blanco. Los patrones de RAPD son complejos, compuestos usualmente de varias bandas de entre 100 y 3000 pb. Mediante este procedimiento usualmente se espera identificar una gran cantidad de *loci* en poco tiempo.

Las reacciones de RAPD fueron llevadas a cabo en un volumen final de 15 μ L conteniendo 0,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa, 1x solución amortiguadora de PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl), 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, y 0,4 μ M de partidor Wako y 2 ng de ADN templado. A la mezcla de reacción se le añadió una gota de aceite mineral. La reacción de PCR fue llevada a cabo en termociclador PTC-100 de MJ Research, Inc. (Watertown,MA,USA) programado de la siguiente manera: una preamplificación de 3 ciclos con 1 min a 95°C, 1 min a 37°C y 1min 20 seg a 72°C, y la amplificación de 37 ciclos con 35 seg a 94°C, 40 seg a 40°C y 1min 20 seg a 70°C, finalmente una extensión a 72°C por 7 min.

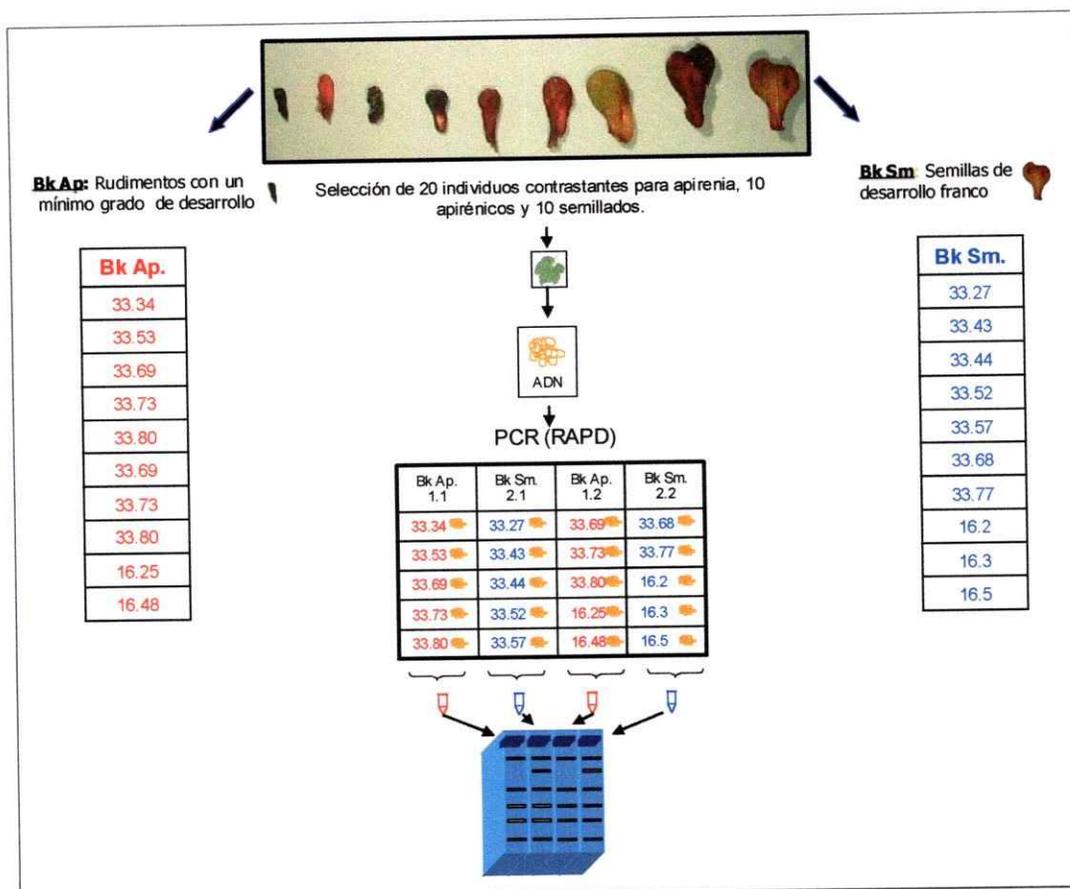


Figura 4. Esquema de la metodología BSA (Bulk Segregant Analysis) o Análisis de Segregantes en Bloque. Iguales cantidades de ADN de 5 individuos fenotípicamente apirénicos (con un mínimo grado de desarrollo de rudimentos) y semillados (con semillas de desarrollo franco) fueron colectados y mezclados para formar los grupos Bk Ap 1.1 o 1.2 (apirénicos) y Bk Sm 2.1 o 2.2 (semillados). Con estos grupos se realizaron reacciones de PCR con partidores de RAPD de 12 mer.

5.2.2.4.- Visualización de reacciones de RAPD

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % preparada en TBE 1X, se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 250 µg/mL. Se corrieron los geles por 2 horas a 100 V. Para el registro fotográfico se usó un sistema de captura de imagen digital Kodak EDAS 1200.

5.2.2.5.- Búsqueda de fragmentos de amplificación candidatos y apertura de grupos.

Cuando se encontraron bandas polimórficas fenotipo-específicas para los grupos de individuos semillados o apirénicos, se procedió a verificar si el marcador candidato estaba presente en todos los individuos que forman los grupos donde fue detectado el polimorfismo.

5.2.3.- Purificación y clonamiento de fragmentos candidatos

5.2.3.1.- Purificación de bandas polimórficas de interés.

El fragmento de RAPD de interés fue purificado con el kit CONCERT Rapid Gel Extraction System desde un gel de agarosa usando el producto de amplificación de un solo individuo.

5.2.3.2.- Ligación de fragmentos polimórficos en vector de clonamiento para productos de PCR

El fragmento purificado fue ligado en el vector pGEM-T Easy Vector System. Se siguieron las instrucciones del fabricante, con leves modificaciones; se utilizaron 0,5 μ L de pGEM-T Easy, 7,5 μ L de inserto purificado y 1 μ L de solución amortiguadora de ligación 10x distribuido por separado (Promega). La mezcla de ligación fue incubada a 15°C por 16 horas y guardada a -20°C hasta su uso.

5.2.3.3.- Preparación de células *E.Coli* DH5 α electrocompetentes.

Se prepararon células de *Escherichia coli* cepa DH5 α basándose en un protocolo descrito por Inoue et al. (1990), las que fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

5.2.3.4.- Transformación mediante electroporación de células DH5 α electrocompetentes

Las células electrocompetentes fueron transformadas usando el electroporador GENE PULSER Bio-Rad Laboratories Inc (CA, USA), para lo cual se mezclaron 40 μ L de células electrocompetentes con 2 μ L de mezcla de ligación, se incubó en hielo por 5 min y se electroporó a 2.500 V, 200 Ohmios, y 125 μ F; las células fueron resuspendidas en 960 μ L de medio SOC y se incubaron por una hora a 37°C con agitación constante. Se plaquearon 100 μ L del cultivo de células transformadas en placas LB/Cb/IPTG/X-gal a 50 μ g/mL Cb, 0,5 mM IPTG y 50 mg/mL X-gal. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C.

5.2.3.5.- Selección de clones recombinantes

La clonación exitosa de un inserto en el vector pGEM-T Easy interrumpe la secuencia codificante para la β -galactosidasa, por lo que los clones recombinantes son identificados mediante una selección por color. Sin embargo, no todas las colonias blancas poseen vectores recombinantes, por lo que se hace necesaria una segunda selección de clones positivos mediante un procedimiento de selección por tamaño de plásmido.

Las colonias blancas obtenidas (14) fueron repicadas en placas LB/Cb/IPTG/X-gal y crecidas a 37°C por toda la noche, adicionalmente se repicó un par de colonias azules como control. Se repicaron las colonias y se las resuspendió en solución amortiguadora de carga (0,1% azul de bromofenol, 6% sacarosa), se adicionó 14 μ L de una mezcla fenol: cloroformo 1:1, se agitó con vórtex entre 5 y 10 s. para lisar las células. Las muestras fueron subsecuentemente centrifugadas a 12.000 g. por 3 min para separar la fase acuosa de la orgánica. Quince μ L de la fase acuosa fueron cargados directamente en geles de agarosa al 1,2 % junto con la muestra de colonia azul como referencia y corridos por 1 hora a 100 V.

5.2.3.6.- Mantención de clones recombinantes

Los clones que dieron positivo a la segunda selección fueron crecidos en 4 mL de LB con Cb a 50 μ g/mL por toda la noche; de ellos, se tomaron 1700 μ L y se mezclaron con 300 μ L de glicerol 87%, para luego mantener a - 80°C.

5.2.4.- Secuenciación y diseño de los partidores para marcador SCAR

5.2.4.1.- Minipreparación plasmidial y purificación.

La minipreparación plasmidial se realizó por lisis alcalina de acuerdo a Sambrook et al. (1989) con algunas modificaciones. Luego de la purificación con fenol:cloroformo, el sobrenadante fue transferido a otro tubo, se adicionó 0,1 volumen de acetato de amonio 10 M, se mezcló por inversión 2 veces, y se añadió 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C para precipitar el ADN centrifugando a 14.000 g. por 10 min. El pellet fue lavado con etanol al 70 %; y posteriormente secado. Una vez seco se resuspendió el pellet en 50 μL de solución amortiguadora TE con RNasa A (0,01 mg/ml).

La concentración del ADN plasmidial fue medida tal como se describió en el paso 5.2.1.2

5.2.4.2.- Digestión de plásmidos recombinantes y secuenciación

Para verificar si el fragmento clonado correspondía efectivamente al fragmento polimórfico fenotipo-específico, se realizó la digestión del vector recombinante con la enzima *EcoRI* de acuerdo a instrucciones del fabricante. El producto de la digestión fue comparado con la reacción de RAPD que generó el fragmento polimórfico cargando tanto la digestión como la reacción de RAPD. Una vez comparados el tamaño del fragmento clonado con el fragmento polimórfico fenotipo-específico, se realizó una nueva preparación plasmidial con

el kit Concert Rapid Plasmid Miniprep System de acuerdo a instrucciones del fabricante y se escogieron cinco clones para secuenciar.

Se secuenciaron los clones recombinantes en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biotecnología del C.R.I. Carillanca-INIA usando los partidores M13 universales directo y reverso (sitios presentes en el vector de clonamiento) y un secuenciador automático ABI-310, acoplado al programa de análisis de secuencias ABI Prism 1.0.3.

5.2.4.3.- Diseño de partidores de SCAR para fragmentos polimórficos

Los partidores para ser usados como SCAR fueron diseñados usando el programa OMIGA Versión 2.0 (Oxford Molecular Ltd. USA), usando fragmentos cercanos a la secuencia propia del partidador de RAPD, ya que el polimorfismo pudiese estar limitado a regiones cercanas a la zona de apareamiento de este partidador. Además, se consideró que los partidores no tuviesen regiones palindrómicas y que el contenido de G+C fuera en lo posible superior al 50% para amplificar específicamente ADN eucarionte y no de organismos procariontes.

5.2.4.4.- Estandarización de reacción de PCR con partidores específicos.

La reacción de PCR con los partidores fue estandarizada usando como ADN templado plásmidos recombinantes que contenían el fragmento polimórfico.

Se realizó una reacción de PCR con gradiente para determinar la temperatura de alineamiento óptima con el termociclador Mastercycler gradient 5331 de

Eppendorf (Hamburg, Germany). Para ello se realizó una denaturación inicial de 2 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 90 seg a $54 \pm 10^\circ\text{C}$ (es decir, la gradiente fue , entre 44°C y 64°C) y 1 min a 72°C.

Para estandarizar la reacción con el ADN genómico de los segregantes, primeramente se extrajo el ADN desde hojas congeladas a -80°C mediante protocolo descrito anteriormente, y para evitar inhibiciones de la reacción de PCR por derivados de flavonoides presentes en las hojas de vides se re-purificó el ADN mediante el protocolo descrito por Boyle y Lew (1995) y se probaron los partidores en los 20 individuos que forman los bloques del análisis tipo BSA para ver si se mantenía la amplificación del fragmento fenotipo-específico.

Finalmente se optimizó la reacción de PCR con el kit Opti-Prime™ PCR Optimization Kit de acuerdo a instrucciones del fabricante. Las condiciones determinadas como óptimas fueron usadas para la evaluación de los partidores SCAR con toda la población de segregantes del cruzamiento #33, así como con diferentes variedades de vides de mesa (apirénicas y semilladas) y de vino (semilladas) que se encuentran en el jardín de variedades del CRI La Platina.

5.2.3.- Análisis estadístico

Luego de probar el marcador SCAR ligado a apirenia (experimento en triplicado) en toda la población #33, la presencia del marcador fue registrada con un 1 y la ausencia con un 0. Dado que el fragmento polimórfico fenotipo-específico se encuentra en

ambos padres y dada su segregación en la progenie se puede inferir que ambos padres son heterocigotos para este *locus* por lo que lo esperado en la segregación debiera ser 3:1, con predominio de fenotipos apirénicos.

Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba de χ^2 . Esta prueba informa con qué frecuencia las observaciones se desvían del patrón de segregación esperado. La fórmula para calcular el valor de χ^2 es la siguiente:

$$\chi^2 = \frac{\sum (O - E)^2}{E}$$

donde, "O" corresponde al número observado en cada clase y "E" al número esperado según la hipótesis nula que establecería que la ausencia de ligamiento conduciría a una razón 3:1, que fija la frecuencia de recombinación en un 75%. Para el análisis se consideró un valor de ρ de 0.05, esto significa que si la hipótesis nula es correcta, una desviación al menos tan grande como la observada, se produciría en algo más del 5% de las veces. Así mismo, cualquier valor de ρ menor del 5% lleva a rechazar la hipótesis y por lo tanto, podrán ser incluidos en el análisis de mapeo. Con este valor de ρ y para la razón 3:1, el valor máximo aceptable para χ^2 es de 3,84. Los resultados pueden ser incluidos en un mapa de ligamiento hecho en base a los segregantes del cruzamiento #33 para saber si tiene alguna relación con otros marcadores ya posicionados físicamente en otros mapas de *Vitis vinifera*.

Para evaluar la posible correlación entre la presencia del marcador SCAR diseñado y la presencia de semillas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, que se utiliza cuando se quiere medir la solidez de la asociación entre pares de variables sin

importar cual de las variables es dependiente o independiente, o si se quiere determinar si la relación entre variables es lineal. Este coeficiente fue calculado mediante el programa SigmaStat versión 2.03.de SPSS Inc., cuando se encontró alguna correlación, se realizó la prueba de t student con el valor de correlación obtenido para evaluar si el valor obtenido es estadísticamente significativo.

6.- RESULTADOS

6.1.- Constitución de los grupos de fenotipo opuesto.

Para desarrollar la búsqueda de marcadores ligados al gen o genes que determinan el carácter apirénico, se optó por un enfoque de tipo BSA (Michelmore et al., 1991), metodología que permite identificar marcadores moleculares ligados genéticamente a caracteres de interés. Para ello, se seleccionaron plantas del cruzamiento de Ruby Seedless x Sultanina (correspondientes a los cruzamientos #33 y #16) que presentaran semillas de desarrollo franco (peso total de semillas de 20 bayas > 3 gr) o tuvieran un mínimo grado de desarrollo de rudimentos (idem < 0,1 gr), identificadas de acuerdo a la caracterización morfológica de los segregantes. Los segregantes que componen estos grupos están descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Segregantes de los cruzamientos # 16 y # 33, que componen los grupos para el análisis mediante RAPD-BSA.

Bk Ap.1.1	Bk Sm. 2.1	Bk Ap. 1.2	Bk Sm. 2.2
33.34	33.27	33.69	33.68
33.53	33.43	33.73	33.77
33.69	33.44	33.80	16.2
33.73	33.52	16.25	16.3
33.80	33.57	16.48	16.5

En las columnas aparecen el número de identificación de los segregantes. Bk Ap (Bulks Apirénicos) son aquellos con un mínimo grado de desarrollo de rudimentos, y los Bk Sm (Bulks Semillados), aquellos con un franco desarrollo de semillas.

6.2.- Resultados RAPD-BSA

6.2.1.- Análisis de segregantes en bloque (BSA)

Se ensayaron 336 partidores de RAPD, de los cuales sólo 12 no generaron ningún producto de amplificación. De los restantes 324, 14 partidores (WA41, WE23, WE92, WF01, WF11, WF21, WF27, WF65, WF72, WF81, WG07, WG11, WH44 y WH82) mostraron un producto de amplificación que diferenció los fenotipos apirénicos de los grupos de fenotipos semillados.

Estos 14 partidores fueron probados en cada uno de los 20 individuos que integraban los cuatro grupos de fenotipos semillados y apirénicos, lo que se denomina "apertura de grupos". Siete de los partidores fueron descartados como futuros marcadores de apirenia, al ver que el fragmento polimórfico detectado en el o en los grupos se debía a amplicones presentes sólo en uno o unos pocos individuos de cada grupo. Seis partidores produjeron un fragmento fenotipo-específico asociado a apirenia: WA41, WE23, WF01, WF27, WG07 y WG11, en cambio WF81 produjo un fragmento fenotipo-específico asociado a los individuos semillados, mayores detalles sobre estos fragmentos polimórficos pueden verse en la tabla 4. De éstos se consideró como mejor candidato a convertirse en SCAR aquellos marcadores presentes en ambos padres, dado que ambos padres (Ruby Seedless y Sultanina) son apirénicos.

Para diseñar el primer marcador de tipo *SCAR* se decidió utilizar el fragmento de RAPD de 2,0 kb denominado WF27-2000 (generado con el partidor WF27) ya que al realizar la apertura de grupos no se detectaron excepciones en los individuos de los grupos apirénicos ni en los semillados, por otro lado, es el único fragmento que no tiene en su cercanía otros fragmentos de RAPD que pudiesen dificultar su purificación desde geles de agarosa (Figura 5), además que se podría hacer un mejor análisis de homología con secuencias publicadas en diversas bases de datos.

El fragmento fue aislado desde el segregante 33.73 y clonado en el vector pGEM-T Easy. De las 14 colonias blancas analizadas para el inserto se obtuvieron 11 vectores recombinantes.

TABLA 4. Fragmentos polimórficos identificados mediante RAPD-BSA considerados candidatos a convertirse en marcadores de tipo SCAR

Nombre del partididor	Especificidad (apirénico/semillado)	Tamaño del fragmento polimórfico	Presencia en progenitores	Estado de análisis
WA41	apirénico	234 pb aprox.	si	candidato a clonar
WE23 *	apirénico	1500 y 975 pb aprox.	Sólo Ruby	candidato a clonar
WF01 *	apirénico	1200 pb aprox.	si	candidato a clonar
WF27	apirénico	2000 pb aprox.	si	clonado, secuenciado y SCAR desarrollado
WF81 **	semillado	1200 pb aprox.	ND	candidato a clonar
WG07	apirénico	1150 pb aprox.	si	candidato a clonar
WG11	apirénico	976 pb.	si	clonado y secuenciado

*: Presencia de fragmento polimórfico en algunos individuos semillados o ausencia del fragmento polimórfico en algunos individuos apirénicos

** : Presencia del fragmento polimórfico en algunos individuos apirénicos

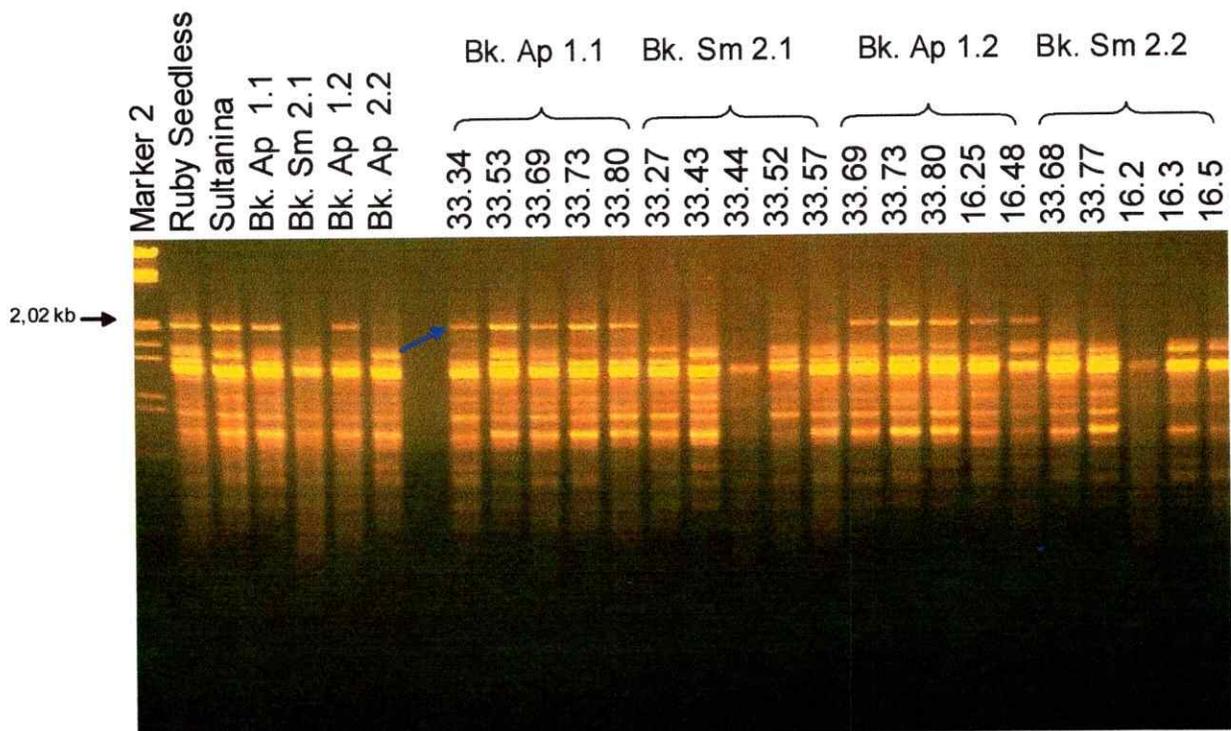


Figura 5. Patrón de RAPD generado por el partidor WF27 usando como templado el ADN de los segregantes que forman los grupos para el análisis de tipo BSA y el ADN de ambos progenitores del cruzamiento # 33. Con una flecha negra el fragmento correspondiente a las 2 kb del estándar Marker 2, con una flecha azul el fragmento polimórfico presente en ambos progenitores, en los grupos apirénicos (Bk. Ap 1.1 y 1.2), en todos los individuos apirénicos, y ausente en todos los individuos semillados (Bk. Sm 2.1 y 2.2).

6.3.- Obtención del marcador SCAR

6.3.1.- Conversión del marcador de RAPD WF27-2000 en marcador SCAR

Para obtener un marcador de tipo SCAR a partir del patrón polimórfico de RAPD (que resulta inadecuado como marcador de selección por ser muy dependiente de las condiciones de amplificación), se secuenció el fragmento WF27-2000 en sus dos extremos (ver anexo I), y se diseñaron los partidores ScabF27ext2 y ScabF27int1, derivados de la secuencia extrema e interna respectivamente de dicho fragmento. Los partidores diseñados fueron los siguientes:

- ScabF27ext2F, que contiene las 12 bases del partidor de RAPD WF27 más 8 bases río abajo (5' CAGGTGGGAGTAGTGGAAATG 3') y el correspondiente partidor reverso ScabF27ext2R que también contiene las doce bases del partidor RAPD WF27 mas 8 bases río abajo (5' CAGGTGGGAGTAAGATTTGT 3').
- el partidor directo de 20 bases SCAbF27int1F (5'TGGGTGAGAAAAGGCTGAAG3'), ubicado a 33 bases del extremo 5' del fragmento polimórfico y el partidor SCAbF27int1R (5' GGGTTTGCTACATGAGGTGA 3'), también de 20 bases, ubicado a 67 bases del extremo 3' del fragmento polimórfico, mayores detalles sobre estos partidores pueden verse en el anexo II.

La temperatura óptima de alineamiento, definida por ensayo de PCR, para el par de partidores ScabF27ext2 fue de 62°C y para el par ScabF27int fue de 57°C.

También se determinó que 1,5 mM de ión magnesio era óptimo para ambas reacciones.

Tanto a temperaturas más altas como más bajas que le indicado se obtuvo menor cantidad de producto amplificado; a menor concentración de ión magnesio (1,0 mM) no se obtuvo producto, y a mayor concentración se observó inespecificidad de la reacción. Se probaron los partidores sobre el ADN genómico del individuo 33.73 para estandarizar la concentración óptima de ADN templado. Los ensayos para determinar el perfil óptimo de reacción fueron hechos con el kit Opti-Primer de Stratagene. Se determinó que la reacción óptima de PCR era aquella llevada a cabo en un volumen final de 50 μ L, conteniendo 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq*, 1x solución amortiguadora de PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,3 mM de cada dNTP, 0,5 μ M de cada partidor y 50 ng de ADN templado. Se probaron otras concentraciones de ADN templado (2, 10, 20, 50 y 100 ng) para una reacción con un volumen final de 50 μ L. Pese a que en las reacciones de RAPD se usan 2 ng de DNA, se determinó que un mínimo de 50 ng de ADN eran necesarios para asegurar la reproducibilidad de la reacción. Con 2 y 10 ng no se obtuvo producto.

Las mejores condiciones térmicas para las reacciones de PCR con los partidores *ScabF27ext2* y *ScabF27int* son las que se describen a continuación:

2 min a 95°C, 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min. 30 seg. a 62°C para

ScabF27ext2 o 1 min. 30 seg. a 57°C para ScabF27int1, 1 min a 72°C y finalmente una extensión final de 7 min. a 72°C.

Cuando los partidores fueron probados con los individuos que forman los grupos, se constató que el polimorfismo fenotipo-específico de los apirénicos se mantenía con el SCAR ScabF27ext2, en cambio con el SCAR ScabF27int se perdió la especificidad asociada al fenotipo apirénico, encontrándose un producto de amplificación común a todos los individuos, aunque de menor intensidad en los segregantes semillados (Figura 6). Por esta razón, los ensayos posteriores se realizaron sólo con el SCAR ScabF27ext2. Con el SCAR ScabF27ext2 se generó un amplificado específico de aproximadamente 2000 pares de bases en todos los segregantes de fenotipo apirénico.

6.4.- Evaluación del marcador SCAR

6.4.1.- Evaluación del SCAR Scabf27ext2 con la población de segregantes del cruzamiento #33

La evaluación del SCAR ScabF27ext2 con la población de segregantes del cruzamiento #33 dio un patrón de segregación que se resume en la tabla 5. La presencia de un amplificado de 2000 pb se denotó con un 1 y la ausencia con un 0.

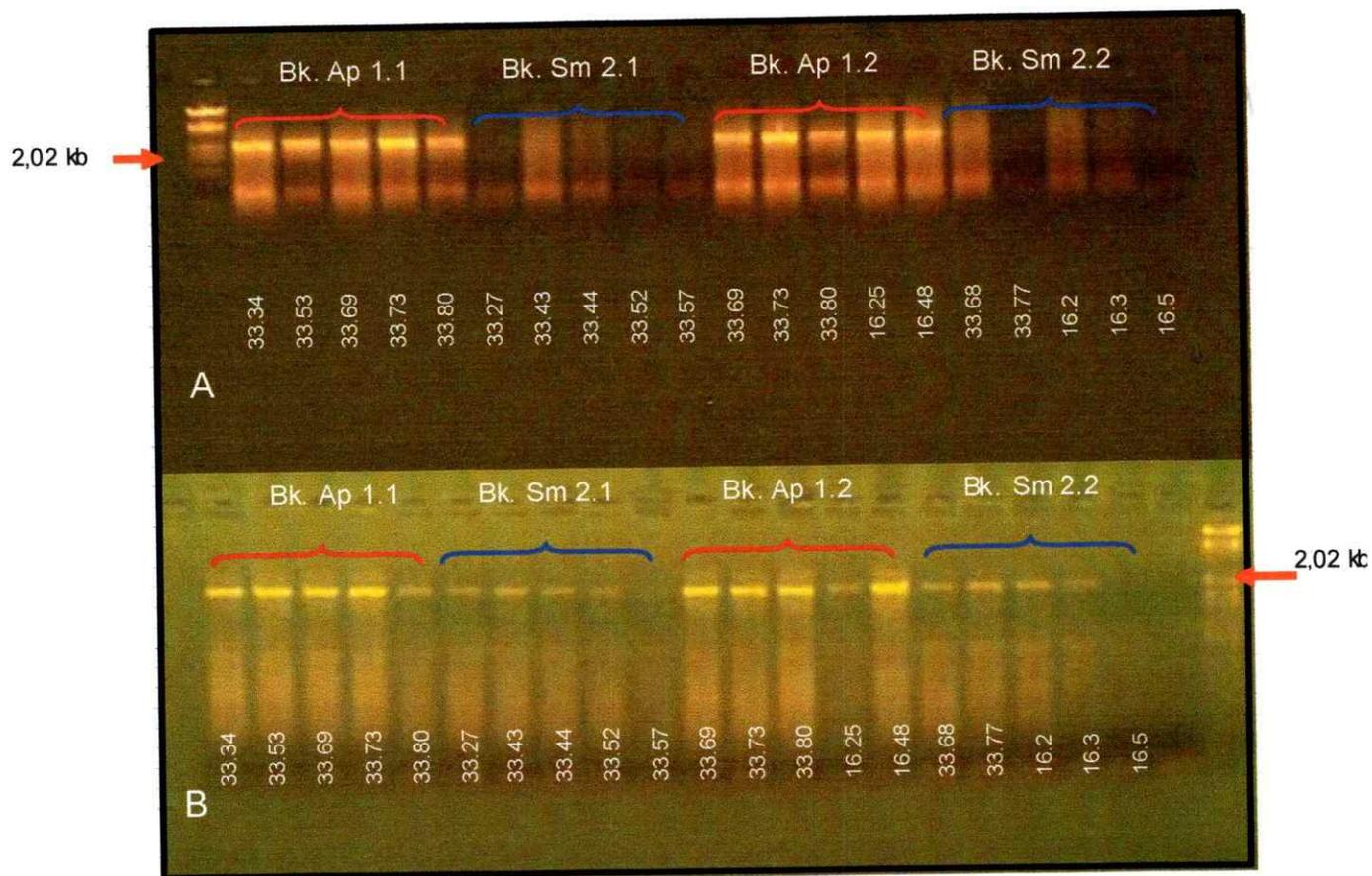


Figura 6. Fragmentos amplificados a partir de ADN genómico de los individuos que forman los grupos de BSA con los partidores *ScabF27ext2* directo y reverso (A) y *ScabF27int1* directo y reverso (B). En A, carril 1, marcador de peso molecular Marker 2; carriles 33.34 al 33.80, Bk. Ap1.1; 33.27 al 33.57, Bk. Sm 2.1; 33.69 al 16.8, Bk. Ap1.2; y del 33.68 al 16.5, Bk. Sm.2.2. En B, carriles 33.34 al 33.80, Bk. Ap1.1; 33.27 al 33.57, Bk. Sm 2.1; 33.69 al 16.8, Bk. Ap1.2; y del 33.68 al 16.5, Bk. Sm.2.2 y en el último carril marcador de peso molecular Marker 2. Con una flecha roja el fragmento de 2.02 kb del Marker 2.

El análisis de las 127 plantas que componen la población de mapeo con el marcador ScabF27ext2, reveló presencia del fragmento específico en 88 individuos, estando ausente en los restantes 39 segregantes. Aplicando el test de χ^2 para una segregación 3:1, se obtuvo un valor de 2,95, lo que nos permite decir que este *locus* es heterocigoto en ambos padres. La Figura 7 ilustra la correlación entre la presencia de semillas normales y la presencia del marcador SCAR de 2 kb generado por los partidores ScabF27ext. El análisis de correlación fue hecho con los segregantes que fructificaron del cruzamiento #33, y se tomó en cuenta el número de semillas por baya (Figura 6), el número de rudimentos pequeños, rudimentos medianos y rudimentos grandes (gráficos no mostrados, datos de segregantes en anexo III). Se puede apreciar una buena asociación entre la ausencia de semillas y la presencia del marcador, salvo escasas excepciones. No se encontró correlación alguna entre la presencia o ausencia del marcador y la presencia o ausencia de algún tipo de rudimentos (datos no mostrados). El valor del coeficiente de correlación de Pearson (R^2) encontrado fue de -0,657. El signo negativo significa que mientras una variable se hace positiva, la otra tiende a ser negativa, en este caso, significa que cuando hay presencia del marcador, hay ausencia de semillas.

El porcentaje de correlación r fue de 0.81. Para ver si este valor es estadísticamente significativo se realizó el test de t student con $n-2$ grados de libertad y con un α de 0,01. El valor calculado de α fue de 16,02, superior al

Tabla 5. Resultado de la evaluación del SCAR ScabF27ext2 usando como templado el ADN de todos los segregantes del cruzamiento #33.

Segregante	RU	SU	33.1	33.2	33.3	33.4	33.7	33.8
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	1	1	1	0	1	1	1
Segregante	33.16	33.19	33.20	33.21	33.25	33.26	33.27	33.28
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	1	1	1	0	0	0	0
Segregante	33.29	33.30	33.31	33.32	33.33	33.34	33.35	33.36
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	1	1	1	1	1	0	1
Segregante	33.37	33.40	33.41	33.43	33.44	33.45	33.46	33.47
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	0	1	1	0	0	1	1	1
Segregante	33.48	33.49	33.50	33.51	33.52	33.53	33.54	33.55
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	0	1	1	0	1	1	0
Segregante	33.56	33.57	33.59	33.61	33.62	33.63	33.64	33.66
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	9	0	1	1	1	1	0	1
Segregante	33.67	33.68	33.69	33.70	33.71	33.73	33.74	33.76
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	0	1	0	0	1	1	1
Segregante	33.77	33.78	33.79	33.80	33.81	33.82	33.84	33.85
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	0	1	0	1	1	0	1	1
Segregante	33.86	33.92	33.93	33.94	33.95	33.96	33.98	33.99
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	0	1	1	1	1	0	0	0
Segregante	33.101	33.102	33.103	33.106	33.107	33.108	33.109	33.111
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	1	1	1	1	0	9	1
Segregante	33.112	33.114	33.115	33.117	33.118	33.122	33.125	33.127
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	0	1	1	0	1	0	1
Segregante	33.128	33.129	33.130	33.131	33.132	33.133	33.134	33.135
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	1	1	1	1	0	1	1
Segregante	33.136	33.137	33.138	33.139	33.140	33.141	33.142	33.143
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	0	1	0	1	0	1	1	1
Segregante	33.144	33.145	33.146	33.150	33.151	33.152	33.153	33.154
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	0	1	0	1	1	1	1	0
Segregante	33.157	33.159	33.160	33.161	33.162	33.163	33.164	33.167
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	1	1	0	1	1	1	1
Segregante	33.168	33.169	33.170	33.172	33.173	33.174	33.175	33.177
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	1	1	1	1	1	0	1	1
Segregante	33.181	33.183	33.184					
<i>Ev. ScabF27 ext2</i>	0	1	0					

Con un 1 se indican los individuos que presentaron el fragmento característico de 2 kb, y con 0 aquellos que no lo presentaron. El número 9 indica que no se tienen datos (segregantes 33.56 y 33.109). Además se incluyeron los padres en el ensayo (Ru: Ruby Seedless y Su: Sultanina)

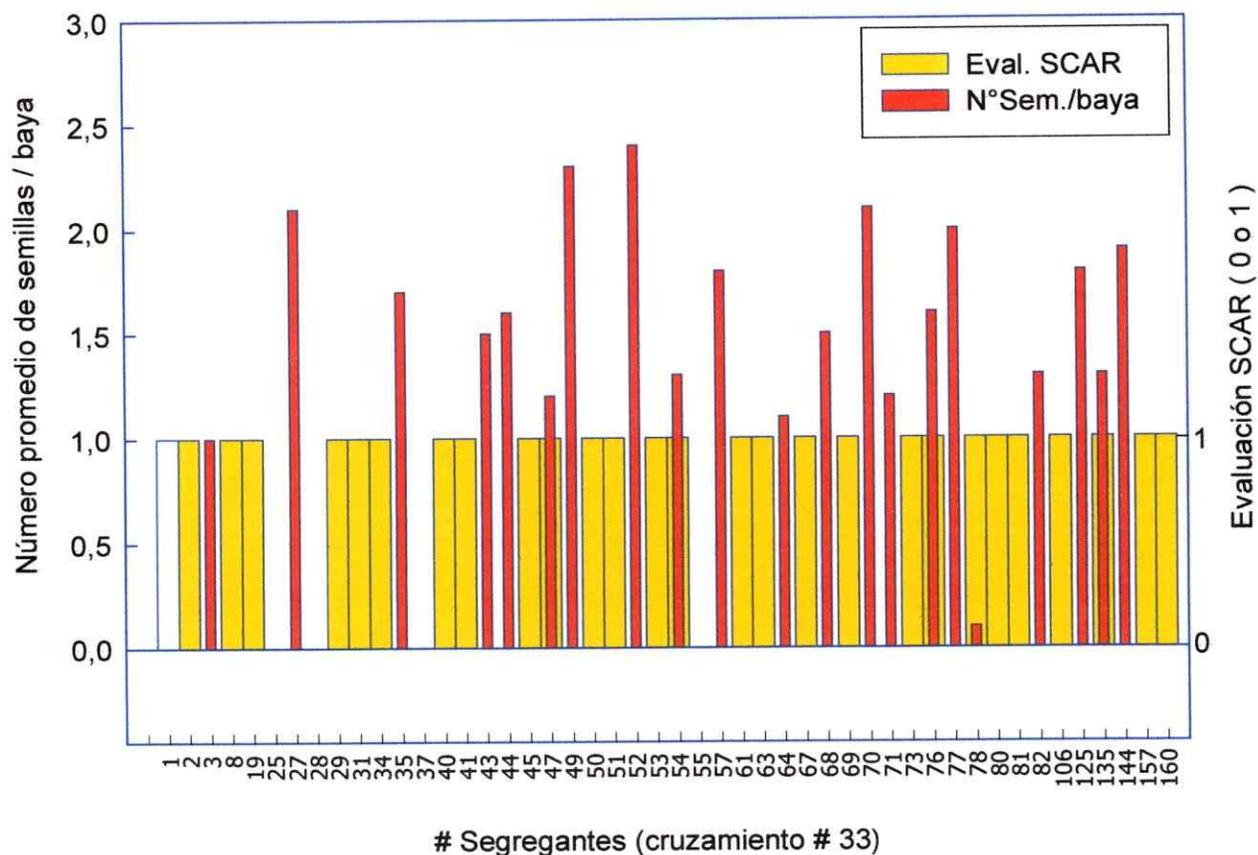


Figura 7. Gráfico que ilustra la correlación entre la presencia del marcador SCAR ScabF27ext2, y la presencia de semillas en los segregantes que han fructificado del cruzamiento #33. Las barras rojas ilustran el número de semillas por baya (entre 0 y 2,4), las barras amarillas ilustran la presencia o ausencia del marcador de 2 kb. generado por los partidores ScabF27ext2 (con un 0 la ausencia del marcador, con 1 la presencia). En general los individuos que presentan el marcador SCAR, no presentan semillas, se observan excepciones como con los individuos 25 y 28 (ausencia de barras) que no generan el fragmento característico y que sin embargo no tienen semillas, y excepciones como la de los individuos 47 y 54 (presencia de ambas barras) en los que se genera el fragmento característico y son individuos que presentan un desarrollo normal de semillas.

valor crítico de 2,411, por lo que se concluye que el porcentaje de correlación es estadísticamente significativo. Veinte de los 28 individuos apirénicos generaron el fragmento específico de 2kb, es decir un 85,7%, mientras que 16 de los 20 individuos semillados no generaron el fragmento específico para el fenotipo apirénico, es decir un 80%. De manera general se puede decir que el marcador SCAR generado tiene un 85,7% de asociación positiva con los individuos apirénicos, y una asociación negativa del 80% con los individuos semillados.

Este resultado convierte a este marcador en una buena opción para ser usado masivamente en el proceso de selección de segregantes, pero antes es menester probar su efectividad en otros fondos genéticos, ya sea directamente en cultivares que son usados como progenitores, o en los propios segregantes de diferentes cruzamientos.

6.4.2.- Evaluación del SCAR Scabf27ext2 con distintos cultivares de mesa (semilladas o apirénicas) y cepas viníferas

Las tablas 6 y 7 muestran el resultado de la evaluación de la colección de cultivares de INIA La Platina, que incluye tanto cultivares de uva de mesa como cepas de vino, con el marcador SCAR ScabF27ext2. Se encontró que con las variedades de mesa el partidor tuvo una correlación del 83,7%. Con las cepas viníferas, si se toman en cuenta todas las cepas indicadas, se obtiene una correlación del 62,5%. Sin embargo, en este grupo se incluyen algunas cepas que sufren de millerandaje o corrimiento, fenómeno en el cual algunas bayas de

un racimo son apirénicas mientras que otras no, afectando proporcionalmente el tamaño de ellas. Por ello, si dejamos fuera del análisis cepas como Moscatel Rosada, Moscatel Negra y Carmenère (en las cuales se ha descrito el millerandaje), el porcentaje de correlación asciende a 71,4%.

Tabla 6. Correlación entre presencia del marcador SCAR (ScabF27ext2) y carácter apirénico de 27 cultivares de uva de mesa.

Accesión nº	Cultivar	semillada	apirenica	scabf27ex2	Eval.
1	Centennial		*	1	ok
2	Red Seedless		*	1	ok
4	Thompson Seedless		*	1	ok
5	Blush		*	1	ok
7	Ruby Seedless		*	1	ok
9	Down		*	1	ok
10	Kalji		*	0	no
14	Beauty		*	1	ok
16	Superior		*	0	no
29	Big Red		*	1	ok
47	Flame Seedless		*	0	no
48	Black Seedless		*	1	ok
49	Crimson		*	1	ok
24	Perlette		*	1	ok
30	Perlón		*	1	ok
6	Emperor	*		0	ok
8	San Francisco	*		1	no
11	Pizutello	*		0	ok
12	Exótica	*		0	ok
13	Calmeria	*		0	ok
15	Patagonia	*		0	ok
25	Queen	*		0	ok
27	Plina	*		0	ok
32	Italia Pirovano	*		0	ok
44	Red Globe	*		0	ok
45	Ribier	*		0	ok

Se evaluó el marcador SCAR en 15 variedades de uva de mesa apirénicas y en 11 variedades de uva de mesa semilladas, con un 1 se anotó la presencia del marcador y con un 0 su ausencia.

Tabla 7. Correlación entre presencia del marcador SCAR (ScabF27ext2) y carácter apirénico de 24 cultivares de uva de mesa.

Accesión nº	Cepa	semillada	apirénica	scabf27ex2	Eval.
3	Cabernet Sauvignon	*		1	no
18	Sauvignon Gris	*		0	ok
19	Maravilla de Málaga	*		0	ok
21	Verdot	*		1	no
22	Gewurztraminer	*		1	no
23	Sauvignon Blanc	*		0	ok
26	Ruby Cabernet	*		0	ok
28	Flora	*		1	no
31	Aurora	*		0	ok
33	Silvaner	*		0	ok
34	Portugais Bleu	*		0	ok
35	Pinot Noir	*		0	ok
36	Sauvignonasse	*		0	ok
37	Zinfandel	*		0	ok
38	Semillón	*		0	ok
39	White Riesling	*		0	ok
40	Chardonnay	*		0	ok
41	Petit Syrah	*		1	no
42	Cabernet Franc	*		1	no
45	Ribier	*		0	ok
46	Concord	*		0	ok
x	Carmenere	*		1	no
x	Moscatel Negra	*		1	no
x	Moscatel Rosada	*		1	no

Se evaluó el marcador SCAR en 24 cepas de vino todas semilladas, con un 1 se anotó la presencia del marcador y con un 0 su ausencia.

7.- DISCUSIÓN

El interés central de este trabajo se enmarca en la caracterización genética del fenómeno de la apirenia o estenoespermocarpia, de tal manera que se puedan identificar marcadores moleculares ligados estrechamente a este fenómeno cuantitativo y que sean de utilidad dentro de un programa de mejoramiento genético de uva de mesa.

Para realizar este trabajo fue adoptada la hipótesis presentada por Bouquet y Danglot (1996) que propone la existencia de un gen dominante *sdl*, el que regularía la expresión de otros "genes menores" de apirenia. Para este estudio se usó una progenie F1 obtenida del cruzamiento entre dos variedades asemilladas (Ruby x Sultanina, cruzamiento 33 y su recíproco 16), cuya variabilidad fenotípica permitió identificar segregantes con y sin semillas, o con diversos grados de desarrollo de rudimentos. La población completa tiene más de 300 plantas en campo, aunque de ellas sólo unas 50 han fructificado. Mediante la metodología del BSA (Michelmore et al., 1991), usando grupos derivados de las poblaciones # 16 y # 33, se identificaron siete fragmentos de RAPD ligados al fenotipo apirénico o semillado, seis de ellos presentes solamente en los individuos asemillados. Para lograr este resultado se evaluaron más de 300 partidores con cada uno de los grupos del análisis de BSA. Esto significa un rendimiento de un polimorfismo útil por cada 43 marcadores de RAPD ensayados, lo que es similar a otros estudios de esta naturaleza, destinados a la búsqueda de *loci* o genes dominantes, como los de

resistencia a enfermedades en plantas (Michelmore et al., 1991; Poulsen et al., 1995).

Un problema de un marcador de tipo RAPD es que las reacciones de RAPD tienden a ser más sensibles a cambios en las condiciones de la reacción que otros marcadores del tipo STMS (Sequenced Tagged Microsatellite Site, Davierwala et al., 2000). Esto incluye el uso de diferentes reactivos (*Taq* polimerasa) y equipos (termocicladores que difieren en sus perfiles técnicos efectivos), haciendo las reacciones de PCR poco reproducibles entre distintos laboratorios. Además, los productos de amplificación son de difícil análisis e interpretación, lo que no lo hace un buen método para ser aplicado en un programa de selección asistida por marcadores genéticos. Para mejorar la eficiencia de estos marcadores y simplificar el análisis de PCR, se desarrollaron dos marcadores de tipo SCAR, el ScabF27ext2 y el ScabF27int1, obtenidos a partir de la secuencia de los extremos del marcador de RAPD WF27-2000.

La amplificación con los partidores SCAR ScabF27ext2 produjo una única banda, específica para los individuos apirénicos de la progenie estudiada, mientras que la amplificación con los partidores ScabF27int1 produjo una banda del tamaño esperado, pero que se encontraba en todos los individuos de la progenie. Esto sugeriría que el polimorfismo generado mediante PCR con el partidador de RAPD WF27 se debe a una diferencia en al menos uno de los sitios de unión del partidador de RAPD en el genoma, y no a la presencia de un fragmento genómico completamente diferente entre ambos tipos de segregantes (semillados y

apirénicos), que podría deberse a un fenómeno de delección, inserción o recombinación. Este resultado, sin embargo, debe ser confirmado mediante un análisis de hibridación (Southern Blot), o bien comparando las secuencias de los amplicones obtenidos con el partidor ScabF27ext2 usando como templado ADN de individuos apirénicos y con el partidor ScabF27int1 usando como templado el ADN de individuos semillados.

7.1.- Aplicabilidad del marcador SCAR Scabf27ext2 para la selección de segregantes

Existen dos reportes anteriores de marcadores moleculares de tipo SCAR ligados a apirenia en *Vitis vinifera*, del grupo dirigido por P. This del INRA Montpellier-Francia (Lahogue et al., 1998 y Adam-Blondon et al., 2001).

El marcador SCAR co-dominante SCC8 obtenido por Lahogue et al. (1998), aplicado como herramienta de selección en la progenie Mtp3140, donde se identificó originalmente (un cruzamiento, que tiene a Sultanina entre los ancestros de uno de sus progenitores, que está compuesto de 136 segregantes), excluiría el 100% de los individuos semillados, lo que es muy promisorio, pero a la vez llevaría a descartar un 25% de los individuos apirénicos. Luego, la principal ventaja de ese marcador co-dominante sería su aplicabilidad para poder seleccionar potenciales padres asemillados homocigotos, para ser usados en nuevos cruzamientos.

De acuerdo a los datos de asociación positiva (figura 7) se puede inferir que si el SCAR ScabF27ext2 hubiese sido aplicado como herramienta de selección en los

48 individuos del cruzamiento #33 que han fructificado a la fecha, se habrían excluido 20 individuos, de los cuales cuatro son de fenotipo asemillado (33.25 , 33.28, 33.37 y 33.55). Al mismo tiempo, se habrían seleccionado 28 individuos como apirénicos, de los cuales cuatro son de fenotipo semillado (33.47, 33.54, 33.76 y 33.135). Es decir que el 85,7% de los individuos seleccionados genéticamente como apirénicos serían fenotípicamente apirénicos, y el 80% de los individuos descartados genéticamente como semillados serían efectivamente semillados.

Desde otra perspectiva se puede decir que la aplicación de este marcador en este grupo de segregantes habría excluido 16 potenciales individuos semillados, disminuyendo en un tercio el número de genotipos manejados *in vitro* y en campo, con un 85,7% de los individuos seleccionados apirénicos, aumentando así la eficiencia en el proceso de selección de individuos apirénicos. Además de su elevada correlación, este SCAR produce un amplicón mediante una reacción de PCR sencilla y el resultado es fácilmente visualizable en geles de agarosa, en cambio los SCAR SCC8 y SCP18, desarrollados por Lahogue et al. (1998) y Adam-Blondon et al. (2001), respectivamente, requieren de un análisis de restricción del producto de PCR (SCC8) y de la separación del producto de PCR en geles de acrilamida de alta resolución (SCP18), lo que hace que su aplicabilidad en un programa masivo de selección asistida por marcadores se vea restringida, por el alto costo y dificultad técnica propios de estos análisis.

Estos resultados muestran que el marcador, o la zona reconocida por alguno de los partidores del SCAR diseñado, estaría segregando junto con algún gen mayor del tipo sdl y cuya expresión estaría relacionada con el fenotipo apirénico, sin embargo, dado que hay excepciones (individuos apirénicos que no presentan el marcador e individuos semillados que presentan el marcador), se puede pensar que este marcador no está lo suficientemente cerca al gen mayor responsable de la apirenia, y dada cierta distancia existente entre el marcador y el gen de tipo sdl, se producirían recombinaciones. Si este marcador está lo suficientemente cerca al gen responsable de la apirenia de modo tal que no se puedan producir recombinaciones cromosómicas entre el gen mayor y el marcador, las excepciones en el caso de los individuos semillados que presentan el marcador se deberían a la combinación de los alelos tipo $a_1 a_2 a_3$, que serían en este caso $A_1 A_2 A_3$, o que tuviesen otras formas alélicas, por lo que se producirían semillas. Sin embargo esta hipótesis no explicaría la presencia de individuos que no presentan el marcador y que no tienen semillas. Esta hipótesis podría ser evaluada en mayor profundidad y tener una mayor sustentación si se realizara un análisis de tipo QTL que permitiría detectar los genes menores involucrados en la expresión de este carácter, lo que será posible en la medida que se cuente con poblaciones con un mayor número de segregantes que hayan fructificado. Además, este tipo de análisis podría aumentar la probabilidad de identificar eficientemente la o las regiones cromosómicas donde se encuentren estos genes. Esto se espera lograr

en los próximos años, dado que hay 300 plantas del cruzamiento # 33 de dos o más años de edad en campo.

La evaluación del *SCAR ScabF27ext2* con todos los segregantes del cruzamiento # 33 mostró una segregación de 3:1, lo que por un lado, nos confirma que este marcador está en estado de heterocigosis en ambos padres, y por otro lado, ésta segregación mendeliana nos permitirá incluir, con mayor precisión, el marcador desarrollado dentro de un mapa de ligamiento; lo que más adelante servirá para estimar en que cromosoma se encuentra el gen putativo de tipo *sdl*. La distancia genética entre el *locus* de tipo *sdl* y el marcador *SCAR ScabF27ext2* podrá ser determinada cuando se tenga la evaluación fenotípica de todos los segregantes. Antes de ser aplicado en un programa de selección asistida por marcadores sería también deseable saber si este *SCAR* tiene el mismo comportamiento y capacidad selectiva en segregantes derivados de cruzamientos de distintos fondos genéticos. Esto le daría un valor analítico y tecnológico aún mayor al que actualmente tiene. En este sentido, se tienen resultados preliminares en un cruzamiento de Ruby x Perlette (ambos progenitores apirénicos), encontrándose un grado de correlación cercano al 85%, similar a lo descrito aquí para el cruzamiento de Ruby x Sultanina. Cabe destacar que sobre el 50% de los más de 2000 segregantes manejados actualmente en el Programa de mejoramiento Genético del INIA tienen a Ruby Seedless como uno de sus progenitores, por lo cual de todas maneras este marcador tiene una alta probabilidad de ser de gran utilidad dentro del programa de

mejoramiento genético del INIA y de ser además aplicable globalmente por otros programas de mejora genética de vides.

8.- CONCLUSIONES

De un total de más de 300 marcadores de RAPD ensayados, se detectaron siete fragmentos polimórficos asociados a apirenia en uva de mesa. Si bien estos marcadores podrían estar ligados a la ausencia de semillas o a distintas subcaracterísticas del carácter asemillado, su uso para selección asistida por marcadores en un programa de mejoramiento genético como el que tiene La Platina, se vería dificultado mientras no se transformen en marcadores de tipo *SCAR*.

En relación a esto, se desarrolló un marcador molecular de *SCAR* estrechamente ligado a apirenia a partir del fragmento de RAPD WF27-2000. Este marcador, denominado ScabF27ext2, tuvo una correlación del 83,7% con las vides apirénicas, considerando distintas variedades de uva de mesa, mientras que esta correlación fue de un 62,5% al ser evaluado con distintas cepas de vides para vino.

El marcador *SCAR* ScabF27ext2 presentó un 81 % de correlación con el fenotipo de los segregantes del cruzamiento #33. Esto se puede considerar como un buen marcador que ya es aplicable para la selección de nuevos segregantes provenientes del cruzamiento de Ruby Seedless x Sultanina o viceversa, mientras

que su aplicabilidad en otros cruzamientos esta siendo actualmente evaluada, con auspiciosos resultados preliminares.

El uso del marcador SCAR Scabf27ext2 en una etapa temprana del desarrollo de los segregantes del cruzamiento #33 (plántulas mantenidas *in vitro*) hubiese permitido reducir el número de individuos manejados *in vitro*, en invernadero y en campo hasta en un tercio, lo que significa hacer el sistema de obtención de variedades apirénicas un tercio más eficiente, además de poder realizar manipulaciones genéticas con fines productivos en nuevas variedades apirénicas.

Se hace necesario un análisis de QTL para detectar los genes menores involucrados apirenia e incluir estos datos en un mapa de ligamiento hecho a partir del cruzamiento #33 para poder localizar físicamente los genes que podrían estar involucrados en la apirenia.

9.- BIBLIOGRAFÍA

Adam-Blondon, A-F., Lahogue-Esnault, F., Bouquet, A., Bourquisot, J.M., and This, P. Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars. *Vitis*. **40**:147-155.

Agüero, C., Viglioco, A., Abdala, G. y Tizio, R.(2000) Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. *Plant Growth Regulation* **30**:9-16.

Alleweldt, G. (1988). *The genetic resources of Vitis*. Report. Federal Research Centre for Grape Breeding, Geilweilerhof, Alemania.

Barticevic, M., Valenzuela, J. y Muñoz, C. (1998). Uva de mesa. Mejoramiento genético en Chile. *Tierra Adentro*, **21**: 12-14.

Beckmann, J.S. and Soller, M. (1990). Toward a unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. *Bio/Technology* **8**:930-932.

Bouquet, A. and Danglot, Y. (1996). Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, **35**: 35-42.

Boyle, J.S., and Lew, A.M., (1995) An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *TIG* **11**: 8

Davierwala A.P., Chowdari K.V., Kumar S., Reddy A.P., Ranjekar P.K., and Gupta V.S., (2000). Use of three different marker systems to estimate genetic diversity of Indian elite rice varieties. *Genetica*, **108**(3):269-84

Dettweiler, E. and Eibach, R. (1996). *The international Vitis database*. <http://www.genres.de/ldb/vitis/>

Doliguez, A., Adam-Blondon, A.F., Ballaquestr, J.F., Bouquet, A., Roux, C. and This, P. (2000). Construction of a *Vitis vinifera* linkage map for detection of QTLs of several bunch quality traits. *Plant and Animal Genome Conference VIII*, San Diego, USA.

Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D. (1996). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN. Brasil.

Glazebrook J., Drenkard E., Preuss D. and Ausubel F.M., (1998) Use of cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) as genetic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol Biol.* **82**:173-82)

Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.

Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. (1985) Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* **314**:67-73.

Kender, W.J. and Remailly, G. (1970). Regulation of sex expression and seed development in grapes with 2-chloroethylphosphonic acid. *HortSci.* **5**:491-492

Krimbas, B.; 1933: Origine et mutations de la Sultanine. Extrait des Praktica de l'Académie d'Athènes.

Lahogue, F., This, P. and Bouquet, A. (1998). Identification of a codominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**: 950-959.

Lahogue, F., This, P., Adam-Blondon, A.-F. y Bouquet, A. (1998). Identification of markers linked to seedlessness character in grapevine. PAG Meeting VI. Libro de resúmenes, p. 149.

Ledbetter, C.A. and Ramming, D.W., (1989). Seedlessness in grapes. *Hort. Rev.* **11**:159-184.

Ledbetter, C.A., Shonnard, C.B.(1990). Improved seed development and germination of stenospermocarpic grapes by plant growth regulators. *J.Hort. Sci.* **65**:269-274.

Lodhi, M.A., Ye, G.-N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molec. Biol. Rep.*, **12**: 6-13.

Loomis NHand Weinberger JH (1979) Inheritance studies of seedlessness in grapes. *J. Am. Soc. Hort.* **104**:181-184.

Michelmore, R.W., Paran, I., and Kesseli, R.V. (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:9828-9832.

Michelmore, R.W. and Paran, I. (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*. **85**:985-993.

Merin, U., Rosenthal, I. and Lavi U. (1983) A chemical method for the assessment of grapes according to their seed content. *Vitis* **22**:306-310.

Narvaez, C. (1998). Uso de marcadores moleculares para identificación de variedades de vid. Tesis de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago. Chile.

Paran, I. y Michelmore, R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* **85**:985-993.

Poulsen, D.M.E., Henry, R.J., Johnston, R.P., Irwin, J.A.G. and Rees, R.G. (1995) The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.*, **91**:270-273

Rafalski, A. (1994). Choosing technologies for DNA profiling of plants. En: Robertson Symposium, Canberra. Morell, M. and Gibbs, A., Eds. pp. 1-12.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. 2^{da} Ed.

Striem, M.J., Spiegel-Roy, P., Barón, I. and Sahar, N. (1992). The degree of development of the seed coat and the endosperm as separate subtraits of stenospemocarpic seedlessness in grapes. *Vitis* **31**:149-155.

Striem, M.J., Ben-Hayyim, G. and Spiegel-Roy, P. (1996). Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **121**:758-763.

Thomas, M.R. and Scott, N.S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSS). *Theor. Appl. Genet.*, **86**: 985-990.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **23**: 4407-4414.

Waugh, R. and Powell, W. (1992). Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTech.*, **10**: 186-191.

Welsh, J. and McClelland, M (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**:7213-7218

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalsky, A. and Tingey S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**:6531-6535.

Anexo 2

Cuadro con propiedades del partidor de RAPD WF27 y de los partidores SCAR

ScabF27

Partidor	secuencia (5'--3')	Largo (mer)	%GC	Tm °C	1 µg de partidor	Temperatura alineamiento
WF27	CAGgTgggAgTA	12	58.3	32.5	267.421 pMol	40.0
ScabF27ext2 Fwd	CAGgTgggAgTAgTggAATg	20	55.0	58.0	159.159 pMol	62.0
ScabF27ext2 Rev	CAGGTGGGAGTAAGATTGT	20	45.0	54.2	160.437 pMol	62.0
ScabF27Int1 Fwd	TgggTgAgAAAAGgCTGAAG	20	50.0	60.4	159.336 pMol	57.0
ScabF27Int1 Rev	gggTTTgCTACATgAgTgA	20	50.0	58.6	161.058 pMol	57.0

Se indica el nombre y las propiedades de los partidores directo (Fwd) y reverso (Rev) de los partidores SCAR diseñados, además del nombre y las propiedades del partidor de RAPD WF27.

Anexo 3

Tabla 8. Evaluación fenotípica de segregantes del cruzamiento #33 que han fructificado.

Planta	Peso total de semillas calculado a 20 bayas (g)	N° Sem/baya	N° Rg/baya	N° Rm/baya	N° Rp/baya
33.1	0,6	0,0	0,6	1,0	1,6
33.2	0,5	0,0	1,0	0,1	0,4
33.3	1,4	1,0	0,1	0,3	1,2
33.8	0,6	0,0	0,7	0,7	1,6
33.19	0,4	0,0	0,0	1,9	1,3
33.25	0,3	0,0	0,2	1,1	0,1
33.27	3,5	2,1	0,1	0,1	0,4
33.28	0,1	0,0	0,0	0,9	0,6
33.29	0,9	0,0	1,1	1,8	0,3
33.31	0,3	0,0	0,6	0,2	3,0
33.34	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9
33.35	2,8	1,7	0,0	0,0	0,1
33.37	0,6	0,0	1,0	1,1	0,4
33.40	0,1	0,0	0,0	0,1	2,5
33.41	0,6	0,0	0,1	0,7	2,9
33.43	3,1	1,5	0,1	0,3	0,4
33.44	3,1	1,6	0,3	0,5	0,4
33.45	0,7	0,0	0,0	1,0	2,1
33.47	1,9	1,2	0,0	0,0	0,8
33.49	3,0	2,3	0,1	0,0	0,6
30.50	1,1	0,0	0,5	2,9	0,1
33.51	0,7	0,0	0,0	2,3	0,8
33.52	3,8	2,4	0,0	0,0	0,6
33.53	0,1	0,0	0,0	0,0	2,5
33.54	2	1,3	0,0	0,4	0,7
33.55	0,1	0,0	0,0	0,0	1,1

Continuación tabla 8

Planta	Peso total de semillas calculado a 20 bayas (g)	N° Sem/baya	N° Rg/baya	N° Rm/baya	N° Rp/baya
33.56	0,2	0,0	0,3	0,8	1,5
33.57	3,2	1,8	0,0	0,1	1,0
33.61	0,1	0,0	0,2	0,3	1,8
33.63	1,5	0,0	2,4	0,5	0,0
33.64	1,8	1,1	0,0	0,1	0,9
33.67	2,2	0,0	2,2	0,1	0,9
33.68	3,2	1,5	0,0	0,1	0,4
33.69	0,1	0,0	0,0	0,0	4,3
33.70	2,9	2,1	0,3	0,2	0,6
33.71	1,5	1,2	0,0	0,0	0,3
33.73	0,3	0,0	0,0	0,0	2,3
33.76	1,5	1,6	0,9	0,0	0,1
33.77	6,6	2,0	0,0	0,2	0,2
33.78	1,3	0,1	1,9	0,0	0,9
33.80	0,4	0,0	0,0	0,0	1,3
33.81	0	0,0	0,0	0,0	0,8
33.82	2,1	1,3	0,0	0,2	1,5
33.100	0,1	0,0	0,0	0,2	2,0
33.106	0,2	0,0	0,0	0,4	2,1
33.125	2,3	1,8	0,1	0,3	0,4
33.135	1,7	1,3	0,2	0,2	1,2
33.144	2,5	1,9	0,0	0,1	0,0
33.157	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
33.160	0	0,0	0,0	0,0	0,7

Se analizaron 20 bayas de cada segregante se indica el del peso (en gramos) de las semillas o de los rudimentos en 20 bayas, además del número promedio de semillas por baya o el número promedio de los diversos tipos de rudimentos.