



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**ÉPOCA DE COLECTA DE POLEN Y OPORTUNIDAD DE POLINIZACIÓN
SOBRE LA EFECTIVIDAD DE CRUZAMIENTOS DIRIGIDOS
EN UVA DE MESA.**

VALESKA RAMOS VALENZUELA

**Santiago, Chile
2015**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**ÉPOCA DE COLECTA DE POLEN Y OPORTUNIDAD DE POLINIZACIÓN
SOBRE LA EFECTIVIDAD DE CRUZAMIENTOS DIRIGIDOS
EN UVA DE MESA.**

**EFFECT OF POLLEN COLLECTION TIME AND POLLINATION TIMING ON
THE EFFECTIVENESS OF CONTROLLED CROSSINGS IN TABLE GRAPE.**

VALESKA RAMOS VALENZUELA

Santiago, Chile
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**ÉPOCA DE COLECTA DE POLEN Y OPORTUNIDAD DE POLINIZACIÓN SOBRE
LA EFECTIVIDAD DE CRUZAMIENTOS DIRIGIDOS
EN UVA DE MESA.**

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniera Agrónoma.
Mención Fruticultura.

VALESKA RAMOS VALENZUELA

	Calificación
PROFESOR GUÍA Sr. Rodrigo Callejas Rodríguez Ingeniero Agrónomo, Dr. Sc. Agr.	5,8
PROFESORES EVALUADORES Sra. Loreto Canaves Soto Ingeniero Agrónomo, M. S.	4,3
Sra. Cecilia Baginsky Guerrero Ingeniero Agrónomo, Dr.	4,0
COLABORADOR Sra. Carolina Uquillas Herrera Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	

Santiago, Chile
2015

A mi hijo Joaquín

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mi familia pilar fundamental en mi vida, que siempre ha estado cuando la necesito, a mis padres Iván y Alicia humildes personas que con sus pocos recursos pudieron formar una gran familia, a mis queridos hermanos Karen, Pamela, Marjorie, Dania, Iván y Camila, y a todos los integrantes sus familias que me han entregado su cariño y apoyo, y por supuesto agradecer a mi hijo Joaquín quien me motivo a terminar este camino.

Quiero seguir a gradeciendo a todos los que me ayudaron en la etapa de montaje y desarrollo de la investigación en donde conté con el apoyo del personal del Inia La Platina, especialmente de Carolina Uquillas y de Isela Escudero.

También agradecer a mis amigas y compañeras de carrera Valeria, María Paz, Macarena, Liliana y Viviana que con sus manos, y mucha paciencia me ayudaron a emascular las miles de flores de vid que por su tamaño, hicieron una labor muy extenuante.

La última etapa no hubiese sido posible sin la ayuda de mi profesor guía señor Rodrigo Callejas quien me entregó su ayuda y comprensión.

Muchas gracias a todos.

INDICE

RESUMEN	1
Palabras claves	1
ABSTRACT	2
Key words	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis y Objetivos	5
Hipótesis	5
Objetivo ensayo 1	5
Objetivo ensayo 2	5
MATERIALES Y MÉTODO	6
Lugar del estudio	6
Material vegetal	6
Metodología	6
Ensayo 1. Capacidad germinativa del polen	6
- Procedimiento	6
- Obtención de polen	7
- Preparación de la muestra	7
- Evaluaciones	8
Ensayo 2. Receptividad estigmática	8
- Tratamientos y diseño de experimentos	8
- Procedimiento	10
- Emasculación	10
- Recolección de polen	11
- Procesamiento del polen	11
- Polinización	11
- Cosecha	11
- Rescate de semillas	12
- Evaluaciones	13
Análisis estadístico	14
- Covariable	14
- Análisis de varianza	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Ensayo 1. Capacidad germinativa del polen	15
Ensayo 2. Receptividad estigmática	20
Bayas por racimo	20
Semillas por racimo	21

CONCLUSIONES	23
Ensayo 1. Capacidad germinativa del polen	24
Ensayo 2. Receptividad estigmática	24
BIBLIOGRAFÍA	25
ANEXOS Y/O APÉNDICES	29

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Distribución de tratamientos, ensayo 2 receptividad estigmática.	9
Cuadro 2. Efecto de la variedad usada como planta madre en cada día de polinización, en el promedio de bayas por racimo.	20
Cuadro 3. Efecto del día de polinización en cada variedad usada como planta madre, en el promedio de bayas por racimo.	20
Cuadro 4. Efecto de la variedad usada como planta madre en cada día de polinización, en el promedio de semillas por racimo.	21
Cuadro 5. Efecto del día de polinización cada variedad usada como planta madre, de acuerdo al promedio de semillas por racimo.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Flores colectadas en los distintos estados de la floración.	7
Figura 2. Anteras y polen obtenido de flores colectadas según los diferentes estados de la floración.	7
Figura 3. Proceso de emasculación en uva de mesa.	10
Figura 4. Inflorescencia emasculada, con saco cobertor, para protegerla del polen externo.	10
Figura 5. Momento de desgrane y contabilización de bayas, uvillas y flores, obtenidas de la variedad Perlette polinizada con la variedad Superior a los 4 días después de la emasculación.	12
Figura 6. Proceso de rescate de semillas.	13
Figura 7. Siembra de las semillas rescatadas en medio de cultivo y frasco utilizado para el cultivo de tejidos.	13
Figura 8. Observación de los granos de polen de vid luego de ser sometidos a germinación <i>in vitro</i> durante 24 horas a 30°C en cámara de cultivo.	15

RESUMEN

En el mejoramiento genético de uva mesa, es fundamental determinar los momentos apropiados de recolección del polen y de la polinización artificial. Con el propósito de aumentar la eficiencia del proceso se realizaron dos ensayos en campo y en laboratorio en dependencias del Centro Regional de Investigación INIA la Platina.

El objetivo del ensayo 1 fue evaluar la viabilidad del polen in vitro en 10 variedades de uva de mesa, para ello se recolectaron flores a los 7 y 4 días antes de la floración, y en el momento de la floración, con el propósito de determinar el momento oportuno de colecta del polen. Los resultados para este ensayo no fueron concluyentes, dado que no se obtuvo germinación del polen para ninguno de los momentos de colecta, realizándose una revisión descriptiva del proceso, y concluyendo que se hace necesario llevar a cabo más estudios que determinen un protocolo único que permita el control de factores determinantes de la viabilidad del polen.

El objetivo del ensayo 2, consistió determinar el momento oportuno para la polinización artificial, en inflorescencias emasculadas de 3 variedades de uva de mesa (Perlette, Crimson Seedless y Thompson Seedless) utilizadas como planta madre. Estas plantas fueron polinizadas 2, 4, 6 y 8 días después de la emasculación con polen de otras 3 variedades (Superior, Princess y Autumn Royal). Por los resultados se concluye que el momento oportuno para la polinización artificial depende conjuntamente de la variedad utilizada como planta madre y también del día en que se realice la polinización artificial, con lo que se obtuvo un mayor número de bayas por racimo y un mayor número de semillas rescatadas por racimo, permitiendo aumentar el número de plantas finales que posteriormente podrán ser evaluadas como posibles nuevas variedades de uva de mesa.

Palabras claves: mejoramiento genético, emasculación, receptividad estigmática.

ABSTRACT

In table grape breeding it is essential to determine the appropriate timing of pollen collection and artificial pollination. In order to increase the efficiency of these processes, two trials (field and laboratory) were performed at La Platina Regional Research Center belonging to the National Agricultural Research Institute (INIA).

The objective of Trial 1 was to evaluate the *in vitro* pollen viability in 10 grape cultivars, for which flowers were collected seven and four days before flowering, and at flowering to determine timely collection of pollen. The results for this test were inconclusive as no pollen germination was obtained for any of the collection times. After a descriptive review of the process it was concluded that it is necessary to conduct further studies to determine a single protocol that enables the control of determinant factors for pollen viability.

The objective of Trial 2 consisted determining the appropriate timing for artificial pollination in emasculated inflorescences of three cultivars of table grapes (Perlette, Crimson Seedless and Thompson Seedless) used as mother plants. These plants were pollinated 2, 4, 6 and 8 days after emasculation with pollen from three other cultivars (Superior, Princess and Autumn Royal). From the results obtained it is concluded that timely artificial pollination depends on both the cultivar used as mother plant and the day when artificial pollination is performed, with which a greater number of berries and more seeds per bunch were obtained. This allowed to increase the number of final plants to be subsequently evaluated as potential new table grape cultivars.

Key words: genetic improvement, emasculation, stigmatic receptivity.

INTRODUCCIÓN

Chile es líder en producción y exportación de fruta fresca, siendo la uva de mesa la de mayor importancia, pasando a ser el principal exportador a nivel mundial con 856 mil toneladas, con una superficie plantada de 53.727 ha (Odepa, 2013a).

Las principales variedades cultivadas y exportadas por Chile son Thompson Seedless, Red Globe, Crimson Seedless y Flame Seedless, todas ellas de origen extranjero (Odepa, 2013b).

La industria de uva de mesa chilena no cuenta con variedades apirénicas propias, dependiendo completamente de variedades de origen foráneo. El contar con programas nacionales de mejoramiento genético frutal, que lleven a la obtención de variedades adaptadas a las necesidades técnicas y comerciales de Chile, favorecería nuestra capacidad negociadora frente a países competidores, disminuyendo la vulnerabilidad de la industria de exportación, ya que las nuevas variedades frutales en el mundo son cada vez de circulación y acceso más restringido (Infante, 2006).

En programas de mejoramiento genético orientados a obtener nuevas variedades de uva de mesa sin semilla, se realizan cruzamientos controlados utilizando principalmente variedades apirénicas. Aproximadamente 50 días después de la polinización artificial se rescatan semillas cultivándolas *in vitro*, posteriormente también se rescatan y cultivan los embriones inmaduros antes de que aborten, desarrollando técnicas de cultivo *in vitro* (Ramming, 1990).

El Centro Regional de Investigación (CRI) La Platina, cuenta desde el año 1986 con un programa de mejoramiento genético de uva de mesa, orientado a la obtención de nuevas variedades de uva sin semilla, de buen calibre, alta calidad y buena conservación en la postcosecha. Utilizando como planta madre variedades que posean características requeridas por los consumidores, y que puedan ser heredables en los descendientes generados del programa de mejoramiento genético. Por lo tanto, conocer los factores determinantes y el momento oportuno para realizar las diferentes etapas permitirá aumentar la eficiencia del proceso, aumentando el número de plantas finales, y por ende aumentar la posibilidad de obtener nuevas variedades de uva de mesa.

Encontrar el momento oportuno de la floración para coleccionar de polen, con el fin de hacer cruzamientos usando variedades que no se superponen en floración, o variedades que se encuentran en distintos lugares geográficos, para lo cual es necesario recoger y almacenar el polen durante períodos que van desde unos pocos días a unos meses, para que posteriormente pueda ser utilizado en la polinización artificial.

Además un objetivo común entre los mejoradores de uva es contar con una metodología definida para mantener la viabilidad del polen almacenado, ya que el tiempo de floración en

la vid puede variar considerablemente (Boyden y Cousins, 2005). Lo confirman también Khosh-Khui et al. (1976), quienes señalan que la preservación de la viabilidad del polen es de gran valor para cultivadores y genetistas al eliminar los problemas de tiempo y espacio que se presentan al hacer polinización artificial.

En la etapa de la floración, Lillo (2006) menciona que uno de los factores fundamentales para que la fecundación sea exitosa, es la calidad del polen. De ocurrir alteraciones en la calidad, se afectaría principalmente su capacidad germinativa, disminuyendo el cuaje y el buen llenado de frutos.

Dentro de las muchas variables a considerar para aumentar la eficiencia, medida finalmente en la obtención de un mayor número de segregantes, se encuentra la primera fase del proceso que corresponde a los cruzamientos controlados. Luego de realizar la emasculación (extracción de anteras), se procede a la polinización artificial, para lo cual es de vital importancia que el polen utilizado en las inflorescencias emasculadas sea viable (Perl et al., 2000).

La floración es un estado fundamental y el conocimiento con exactitud de este permitirá aumentar la efectividad en el proceso de mejoramiento genético. Combee (1995) indica que la floración en la vid es un estado que ocurre en poco tiempo, proceso que se completa en 10 días en todas las inflorescencias, así por ejemplo en Sultanina, Cabernet y Moscatel alcanza el 50% de floración a los 5, 6 y 8 días, respectivamente. Stephenson y Bertin (1983) mencionan que la viabilidad del polen y la receptividad estigmática son los factores más críticos para la efectiva iniciación de la interacción polen – pistilo.

Para aumentar la eficiencia del proceso, es de suma importancia encontrar el momento oportuno para la polinización, ya que dentro de las etapas de desarrollo de la inflorescencia existe un momento óptimo para depositar el polen colectado. Stone et al. (1995), señalan que en experimentos de polinización, los indicadores más comunes que delatan la receptividad del estigma son la formación del tubo polínico o la formación de frutos. Luego de la polinización artificial contabilizar el número de bayas y semillas obtenidas permitirá inferir el momento oportuno de polinización para cada variedad usada como planta madre.

Encontrar el momento oportuno de receptividad para cada variedad de uva de mesa utilizada como planta madre, es un objetivo importante de descubrir, lo que permitirá para aumentar la eficiencia, lo que se deduce en la obtención de un mayor número de bayas, mayor número de semillas, mayor número de embriones y por lo tanto un mayor número de plantas segregantes, aumentando las posibilidades de obtener nuevas variedades que cumplan con los requisitos que indica el mercado de uva de mesa.

Encontrar el momento óptimo de colecta de polen, para obtener una alta capacidad germinativa, así como el momento de receptividad estigmática para la polinización artificial en variedades de uva de mesa, son factores determinantes en la optimización del proceso de cruzamiento en los programas de mejoramiento genético en vid, ya que el número actual de

segregantes generados no es suficiente. Por lo tanto, se hace necesario evaluar estrategias que aumenten la eficiencia en los cruzamientos, de modo de obtener un mayor número de semillas viables y consecuentemente, ampliar el número de plantas finales.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Existen diferencias varietales respecto del momento óptimo para la recolección de polen y para la receptividad estigmática en la polinización artificial en vid, factores que son fundamentales para aumentar la eficiencia en los cruzamientos dirigidos para los programas de mejoramiento genético.

Objetivo ensayo 1

Determinar la capacidad germinativa del polen de 10 variedades de uva de mesa, colectado en tres estados fenológicos.

Objetivo ensayo 2

Determinar el efecto de utilizar 3 variedades de uva de mesa como planta madre, como polinizante y en distintos momentos de la polinización artificial, sobre la obtención de bayas y semillas.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar del estudio

Los ensayos se realizaron en la temporada 2008-2009, en el Centro Regional de Investigación La Platina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en Santa Rosa, Comuna de la Pintana, Región Metropolitana.

Material vegetal

Plantas de la especie *Vitis vinifera* de las variedades Perlette, Superior Seedless, Flame Seedless, Black Seedless, Ruby Seedless, Thompson Seedless, Crimson Seedless, Red Globe, Princess y Autumn Royal.

Metodología

Ensayo 1. Capacidad germinativa del polen

Procedimiento. Se evaluaron 10 variedades de uva de mesa (Perlette, Superior Seedless, Flame Seedless, Black Seedless, Ruby Seedless, Thompson Seedless, Crimson Seedless, Red Globe, Princess y Autumn Royal). Para cada variedad se eligió una inflorescencia representativa según tamaño y cantidad de flores. A cada inflorescencia se le sacaron flores en tres momentos diferentes: 7 días antes de apertura floral (flor con caliptra, sin elongación del pedúnculo, flores de color verde oscuro), 4 días antes de apertura floral (flor con caliptra y pedúnculo elongado con una longitud de aproximadamente 3 mm.) y en apertura floral (+ de 75% de flores sin caliptra), (Figura 1). Las flores fueron colectadas durante la mañana entre las 8:30 y las 10:30 hr, con el propósito de evitar la deshidratación del material colectado, y puestas en frasco de vidrio, tapado e identificado. A 30 flores se les extrajo las anteras y junto con el polen obtenido se almacenaron en frascos, tapados e identificados durante 7 días a 5°C. Luego al término del almacenamiento se realizó el cultivo *in vitro* del polen realizando 3 germinaciones por cada muestra.



Figura 1. Flores colectadas en los distintos estados de la floración.

Obtención de polen. En laboratorio se realizó la extracción de anteras de 30 de las flores colectadas (Figura 2). Estas fueron secadas con una lámpara durante 5 minutos y luego guardadas en envase plástico introduciendo sílica gel a cada frasco cerrado herméticamente. Los frascos fueron almacenados en refrigerador a 4°C durante 7 días.

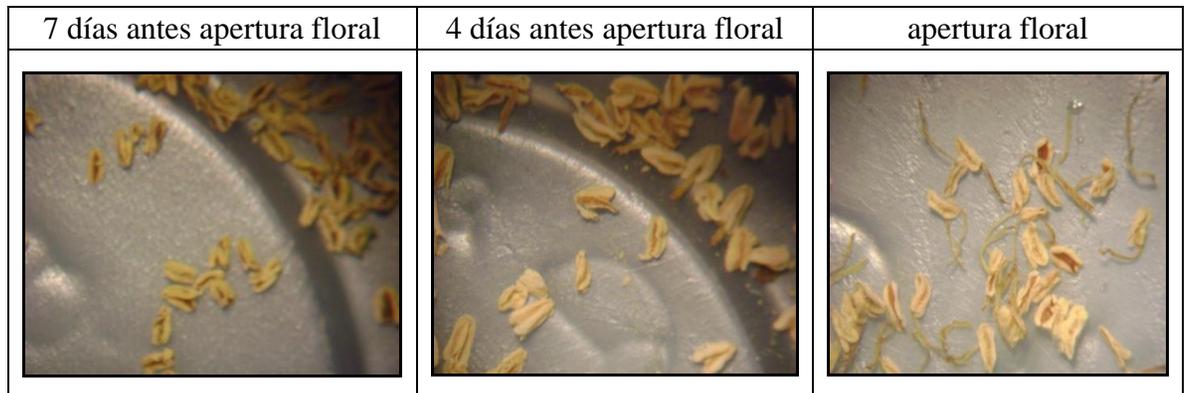


Figura 2. Anteras y polen obtenido de flores colectadas según los diferentes estados de la floración.

Preparación de la muestra. Después de 7 días de almacenaje del polen y anteras, se retiró la sílica gel de cada frasco que contenía el material de las 30 flores, y se realizó la preparación de muestras para la germinación *in vitro*. El polen utilizado se sacó de las paredes del envase con una punta entomológica, realizando 3 germinaciones para cada muestra, proceso que se repitió para las 10 variedades. El medio de cultivo que se usó estuvo compuesto de 10 mg de ácido bórico, 20% sacarosa y 0,6% agar, posteriormente autoclavado.

En un portaobjeto cóncavo se identificó la variedad, se depositó el medio de cultivo en la concavidad señalada y se colocó el polen sobre el medio de cultivo, luego se tapó la muestra fijando el cubreobjetos con vaselina sólida. Dentro de una placa de *Petri* sin tapar, se depositaron los portaobjetos en cámara de cultivo en oscuridad por 24 horas a 30°C (Abreu et al., 2006).

Evaluaciones. El porcentaje de germinación se calculó como el porcentaje de polen con tubo polínico sobre el total de polen observado. La germinación se evaluó mediante la observación de la emergencia del tubo polínico en un microscopio óptico, se consideró polen germinado cuando el largo del tubo polínico superaba en longitud el diámetro del grano de polen.

Ensayo 2. Receptividad estigmática

Tratamientos y diseño de experimentos. El ensayo contempló 36 tratamientos, los que estaban compuestos por inflorescencias emasculadas de 3 variedades de uva de mesa, de cosecha temprana variedad Perlette, media variedad Crimson Seedless y cosecha tardía variedad Thompson Seedless, las que se dividieron en 3 grupos para ser polinizadas con 3 variedades diferentes en 4 momentos distintos.

El diseño estadístico utilizado para este ensayo fue de parcelas divididas al azar con estructura factorial 3x3x4 (36 tratamientos) donde la parcela principal correspondió a plantas de vid dispuestas en la hilera, y la subparcela a plantas de cada variedad ubicadas en la hilera. Los factores corresponden a: Factor 1: planta madre (Perlette, Crimson Seedless y Thompson Seedless), Factor 2: variedad usada como polinizante (Superior, Princess y Autumn Royal), y Factor 3: día de polinización (2, 4, 6 y 8 día de polinización después de la emasculación). Para cada tratamiento se utilizaron 3 inflorescencias las que correspondieron a las repeticiones, la unidad experimental fue una inflorescencia usada como covariable (Cuadro 1). Las variables evaluadas fueron: número de bayas obtenidas por racimo y número de semillas obtenidas por racimo, valores medidos al 95 % de confiabilidad y el análisis de varianza realizado, a través del programa estadístico Infostat.

Cuadro 1. Distribución de tratamientos, ensayo 2 receptividad estigmática.

Tratamiento	Factor 1: planta madre	Factor 2: polinizante	Factor 3: día de polinización	Repeticiones
T1	Perlette	Superior	2	3
T2		Superior	4	3
T3		Superior	6	3
T4		Superior	8	3
T5	Thompson Seedless	Superior	2	3
T6		Superior	4	3
T7		Superior	6	3
T8		Superior	8	3
T9	Crimson Seedless	Superior	2	3
T10		Superior	4	3
T11		Superior	6	3
T12		Superior	8	3
T13	Perlette	Princess	2	3
T14		Princess	4	3
T15		Princess	6	3
T16		Princess	8	3
T17	Thompson Seedless	Princess	2	3
T18		Princess	4	3
T19		Princess	6	3
T20		Princess	8	3
T21	Crimson Seedless	Princess	2	3
T22		Princess	4	3
T23		Princess	6	3
T24		Princess	8	3
T25	Perlette	Autumn Royal	2	3
T26		Autumn Royal	4	3
T27		Autumn Royal	6	3
T28		Autumn Royal	8	3
T29	Thompson Seedless	Autumn Royal	2	3
T30		Autumn Royal	4	3
T31		Autumn Royal	6	3
T32		Autumn Royal	8	3
T33	Crimson Seedless	Autumn Royal	2	3
T34		Autumn Royal	4	3
T35		Autumn Royal	6	3
T36		Autumn Royal	8	3

Procedimiento. Se utilizaron como plantas madres las variedades: Perlette, Thompson Seedless y Crimson Seedless, se seleccionaron plantas con un desarrollo y estructura homogénea. Dentro de la planta se eligieron las inflorescencias homogéneas y representativas para la variedad, según tamaño y estado fenológico.

Emasculación. Con la utilización de pinzas se emascularon todas las flores de la inflorescencia, extrayendo la caliptra y los estambres, dejando el pistilo en condiciones óptimas para la polinización dirigida (Figura 3). Luego, cada inflorescencia se cubrió con un saco de papel kraft (para evitar que se produzca polinización con polen distinto al del estudio). A cada saco se le dejó una ventana transparente para observar el desarrollo de las bayas (Figura 4).



Figura 3. Proceso de emasculación en uva de mesa.



Figura 4. Inflorescencia emasculada, con saco cobertor, para protegerla del polen externo.

Recolección de polen. El polen se recolectó de inflorescencias que presentaron más del 70% de flores sin caliptra. Las variedades usadas como polinizante fueron Superior, Princess y Autumn Royal que corresponden a variedades de cosecha temprana, media y tardía respectivamente. Para la recolección del polen se introdujo la inflorescencia dentro de un saco de papel kraft y se agitó la inflorescencia con el propósito de obtener la mayor cantidad de polen. Esta recolección se realizó en las primeras horas de la mañana con el objeto de evitar deshidratación del material colectado.

Procesamiento del polen. El contenido obtenido del saco de papel (polen, caliptras, raquis, etc.) se depositó en un colador, realizando un barrido con pincel espátula destruyendo flores, para obtener la mayor cantidad de polen. Luego el contenido fue vaciado a un tamizador para suelo sobre una hoja de papel blanco para colectar el polen. En el tamizado se realizó también un barrido con pincel espátula, utilizando en cada variedad artículos limpios y un pincel diferente, para evitar intercambio con otras muestras. Durante el proceso se encendió una lámpara con el propósito de secar el polen, lo obtenido se depositó en un frasco tapado e identificado.

Polinización. Las inflorescencias emasculadas de las variedades usadas como plantas madre se polinizaron con el polen colectado de las variedades usadas como polinizante. La polinización artificial se realizó abriendo el saco de papel que envolvía la inflorescencia emasculada e introduciendo un pincel untado con polen, tratando de espolvorear al máximo sobre las flores y, con ayuda de una pera nasal de 90 mL se inyectó 5 veces una corriente de aire que permitió la distribución de polen por toda la inflorescencia. La polinización se realizó en 4 momentos los 2, 4, 6 y 8 días después de la emasculación, luego se cerró nuevamente el saco de papel. Después de 3 a 4 semanas de la polinización artificial, se retiraron los sacos de papel que envolvían los racimos.

Cosecha. De acuerdo a Cain et al. (1983), el momento óptimo de cosecha de bayas inmaduras para el rescate de semillas debería ser entre 40 - 60 días después de floración. Por lo tanto cincuenta días aproximadamente después de la polinización se cosecharon todos los racimos tratados, se comenzó por la variedad Perlette, luego algunos racimos de Crimson Seedless, Thompson Seedless y luego se terminó con los racimos pendientes de Crimson Seedless. Esto se realizó en función de la tasa de crecimiento característico de cada variedad, iniciándose con la de mayor tasa de crecimiento.

Luego de la cosecha se procedió a desgranar los racimos, cortando el pedúnculo de las bayas, realizando un conteo de las bayas inmaduras, uvillas (bayas de tamaño de hasta 5mm de diámetro), bayas secas, flores secas (Figura 5).

Las bayas inmaduras que se utilizaron en el rescate de semillas, fueron esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% durante 20 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (Hewstone et al., 2006).

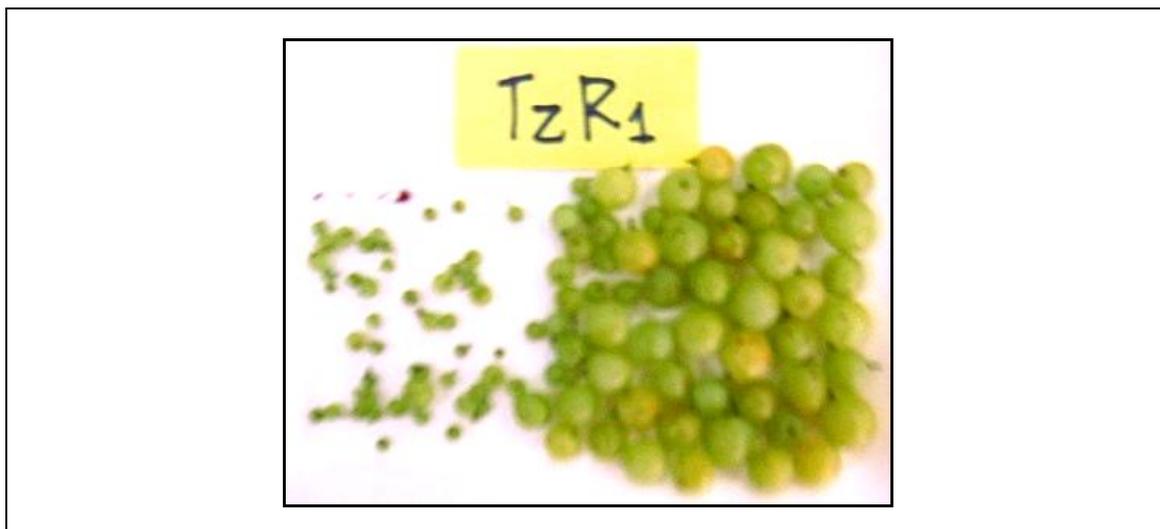


Figura 5. Momento de desgrane y contabilización de bayas, uvillas y flores, obtenidas de la variedad Perlette polinizada con la variedad Superior a los 4 días después de la emasculación.

Recate de semillas. Se procedió a cortar la piel de las bayas con bisturí, abriendo la baya hasta la pulpa con el propósito de dejar libre la semilla. Las semillas obtenidas se contabilizaron y luego fueron sembradas en medio de cultivo MS, para posteriormente dejar los frascos correctamente diferenciados según tratamiento y repetición en cámara de cultivo entre 23 y 25°C de temperatura con 16 horas de luz y 8 horas en oscuridad, por 90 a 180 días dependiendo de la variedad y del estado que presente la semilla (figuras 6 y 7). Todo el proceso de rescate y cultivo de semillas se realizó dentro de una cámara de flujo laminar, con el propósito de evitar contaminaciones.

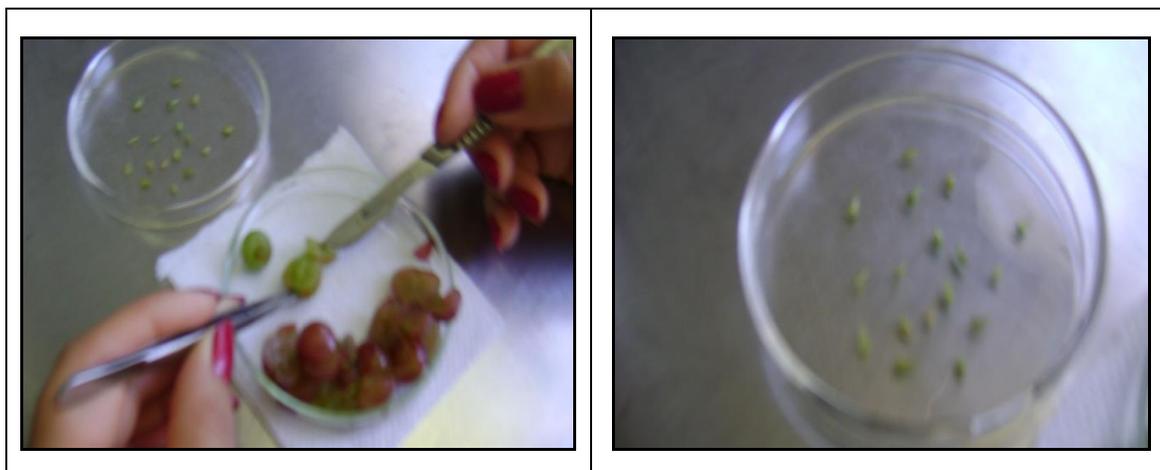


Figura 6. Proceso de rescate de semillas.

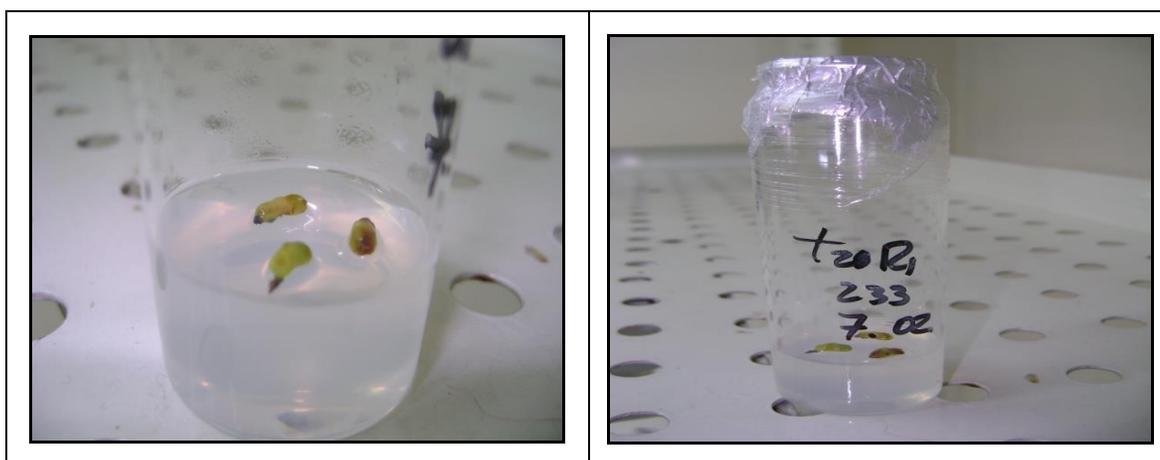


Figura 7. Siembra de las semillas rescatadas en medio de cultivo y frasco utilizado para el cultivo de tejidos.

Evaluaciones. Se evaluó a) número de bayas obtenidas por racimo (bayas inmaduras con diámetro mayor a 4 mm, y b) número de semillas obtenidas por racimo (se rescataron de las bayas obtenidas por racimo). Previamente se contabilizó el número de flores emasculadas por inflorescencia y debido a que el número no fue el mismo en todas las inflorescencias se utilizó este como covariable, con el propósito de inferir el momento más apropiado de la polinización.

Análisis estadístico

Covariable. Se analizó el número de flores emasculadas / inflorescencia, con el objetivo de inferir si la cantidad (número de flores emasculadas por inflorescencia) influyó en el número de bayas y semillas obtenidas. Se determinó que existió una relación lineal significativa de pendiente positiva entre la covariable y las variables respuestas, por lo tanto las medias de los tratamientos fueron ajustadas por la covariable. Se concluye que el número de flores emasculadas influye en el número de bayas y de semillas obtenidas por racimo.

Análisis de varianza. Los datos obtenidos bayas/racimo y semillas/racimo fueron sometidos a los supuestos del análisis de varianza. Los residuos no presentaron distribución normal, por lo tanto los datos se transformaron a raíz el número de bayas y raíz número de semillas, obteniendo normalidad y homogeneidad para los datos (Steel y Torrie, 1988).

Se realizó un análisis de varianza a los datos normalizados evidenciando interacción entre los factores 1 (planta madre) con el factor 3 (día de polinización) tanto para el número de bayas como para el número de semillas obtenidas por racimo, apéndice III y V. Al existir interacción significativa de los factores, las conclusiones respecto a los factores principales no son correctas ya que están confundidas por interacción. Por lo tanto, las pruebas de comparaciones múltiples se realizaron para el factor 1 (planta madre) y para el factor 3 (día de polinización) dentro de cada nivel del factor 1 y en cada nivel del factor 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo 1. Capacidad germinativa del polen

El objetivo principal de este ensayo fue medir el porcentaje de germinación de los granos de polen cultivados *in vitro*, de diferentes variedades de uva de mesa colectados en tres estados de la floración. Sin embargo, este objetivo no pudo cumplirse debido a que no existió germinación del polen (Figura 8), por lo que mediante una revisión descriptiva tanto del polen como de la metodología utilizada, se investigó las probables causas que no permitieron que el polen germinara, dadas las condiciones del presente ensayo.

En este sentido, se puede indicar que existen diversos factores ambientales no controlados como humedad relativa y temperatura, que son determinantes en la viabilidad del polen y que podrían haber afectado la germinación, lo que generó que este perdiera su viabilidad durante el proceso.

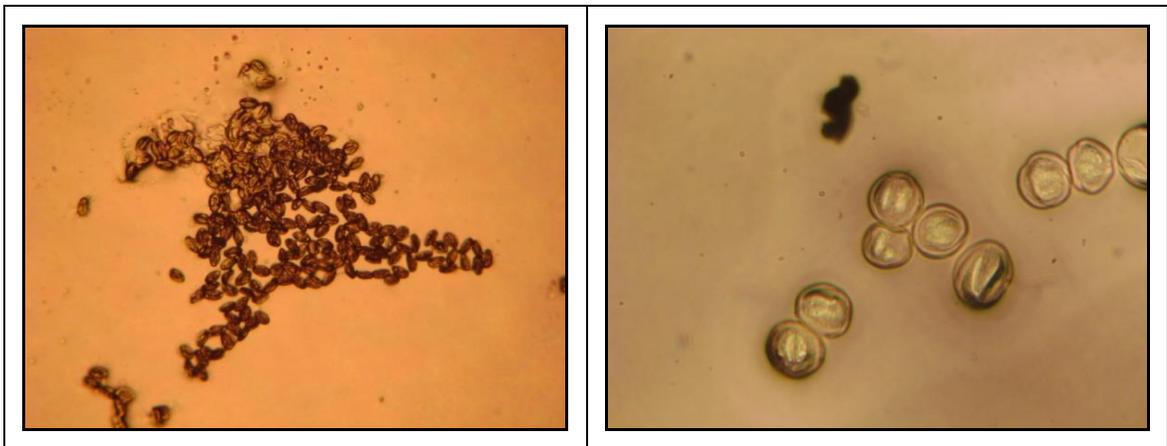


Figura 8. Observación de los granos de polen de vid luego de ser sometidos a germinación *in vitro* durante 24 horas a 30°C en cámara de cultivo.

Por definición el polen es el gameto masculino, generalmente de color amarillo, que en madurez floral o antesis se libera de los estambres. Después de un trayecto más o menos largo en el aire, los granos de polen se adosan a los estigmas, y si existe compatibilidad, estos granos germinan y forman un tubo polínico que se introduce en el pistilo o gineceo (Gourret y Misset, 1989).

En cuanto a la anatomía, el grano de polen normal es tricolporado: con tres surcos, más anchos en el ecuador que en los polos. Cada surco posee un poro redondeado en su parte media. Tiene simetría radial y es isopolar, elíptico alargado en vista ecuatorial, y triangular en vista polar, con los ángulos surcados y los lados cóncavos. Al absorber agua los ángulos se dilatan y su forma se hace hexagonal por dilatación (Roytchev, V. et al. 1994).

Debido a que la colecta del polen se realizó en momentos distintos, incluso antes de la dehiscencia de la caliptra, podría tener relevancia que el grano de polen no contaba con madurez suficiente para germinar *in vitro*. Esto debido a que en estado maduro la pared del grano de polen consiste de una gruesa capa externa (exina) y una delgada capa interna (intina). En el momento de la dehiscencia de la antera, el grano de polen es binucleado y la exina ha desarrollado los tres surcos longitudinales y los tres poros germinativos.

La pared del polen está constituida por esporopolenina (polímeros oxidativos de carotenoides y ésteres carotenoides) notablemente resistente a las altas temperaturas y a los agentes químicos, estructuras que si no estaban totalmente desarrolladas podrían haber perdido la resistencia a las altas temperaturas, que se generaron en el momento de procesamiento del polen, en donde se encendió una lámpara para deshidratar los granos. Lo que pudieran haber afectado los poros germinativos, a través de los cuales emerge el tubo polínico que son áreas delgadas de la exina.

El tipo de polinización en la vid es discutido y sería de tres tipos: anemófila, entomófila y autopolinización (Martínez de Toda, 1991). Un alto porcentaje de vides serían autógamas (pudiendo darse la autopolinización en la yema), el resto entomófilas alógamas y sólo unas pocas anemófilas (Cabello et al. 1994). Por lo anterior se infiere que el polen en la vid y dependiendo las variedades, podría diferir anatómicamente pudiendo poseer diferencias varietales en algunas estructuras, que lo hacen más o menos resistente a cambios ambientales.

Adicionalmente una vez que el polen es liberado por las anteras, se vuelve un organismo frágil y sensible a las condiciones externas, ya que la apertura de las anteras en la maduración se acompaña de una pérdida de agua por parte del grano, lo cual reduce considerablemente su metabolismo. Sin embargo, este proceso favorece su dispersión y le permite sobrevivir durante el transporte hacia el estigma femenino, en el cual se rehidrata para poder germinar. Para ello, el grano de polen debe poseer una gran adaptabilidad morfológica para responder a estos cambios de humedad, siendo la exina lo que permite estos cambios de volumen a nivel de las aperturas (Lillo, 2006).

Lincoln et al. (1982), han definido la viabilidad como "tener la capacidad de vivir, crecer, germinar o desarrollarse". Bots y Mariani (2005), manifiestan que los granos de polen pueden ser considerados viables si son capaces de lograr la fertilización en un entorno natural. Otros autores coinciden en que los granos de polen viables en realidad no pueden germinar (*in vitro* o *in vivo*) si las condiciones no son las adecuadas. El término viabilidad también se ha utilizado para describir los granos de polen capaces de germinar en el estigma (Morse, 1987). Stanley y Linskens (1974), mencionan que la viabilidad del polen

es influenciada por la humedad relativa, temperatura, composición de la atmósfera y por la presión de oxígeno, factores que no fueron medidos en el presente ensayo que sin duda podrían haber afectado la viabilidad de estos.

Existen varias pruebas para medir la viabilidad, al respecto Thomson et al. (1994) plantean que no existe una mejor prueba que otra para examinar la viabilidad del polen *in vitro*, recomendando utilizar varias pruebas simultáneas que reflejen varios componentes de rendimiento de polen, permitiendo su comparación, obteniéndose esa forma resultados más precisos. Este aspecto no se consideró en este ensayo, ya que estaba acotado solo a la prueba de germinación *in vitro*, recomendaciones que deben ser consideradas para futuras germinaciones del polen de vid *in vitro*.

Por otra parte Proctor (1998), sugirió cuatro reglas en experimentos de viabilidad o longevidad del polen: 1. Registrar cuidadosamente las condiciones en la colecta y en el almacenamiento, antes de la prueba (temperatura, HR, cambios en desecación, estado de hidratación, deshidratación). 2. En el polen fresco expuesto en el campo, invernadero, es preferible evitar la influencia de factores no controlados. 3. Realizar una prueba de muestras paralelas de polen muertos (muertos por 80°C, 2 h, o en una gota de etanol al 50%) como control. 4. Prueba de hidratado (1-2 h, 100% HR) v/s (deshidratado) del polen. 5. Procedimientos de ensayo de manera simultánea. Reglas que se deben contemplar para futuros experimentos de viabilidad.

Otros autores también hacen referencia a que las tasas de viabilidad del polen son determinadas por factores tales como el balance hídrico, estrés térmico y de radiación UV-B. El efecto de estos factores sobre la viabilidad varía según la especie, y varias adaptaciones que reducen el daño se pueden encontrar en los granos de polen. Estas adaptaciones pueden incluir el estado de deshidratación de los granos de polen maduros, la presencia de azúcares específicos en el citoplasma del polen o varias adaptaciones estructurales (Bots y Mariani, 2005).

Al igual que el estado del agua, la temperatura también puede afectar a los granos de polen durante el transporte y en la germinación en el estigma, así como también durante el desarrollo de la antera. Estrés térmico en el período anterior a la dehiscencia generó consecuencias más graves para la viabilidad del polen que después de la dehiscencia (Vara et al., 1999; Porch y Jahn, 2001), infiriendo entonces que el estrés generado por la lámpara en el momento de procesamiento del polen inmaduro en este ensayo, puede haber causado inviabilidad de los granos. Por otra parte, el frío y el calor durante el desarrollo del polen pueden afectar negativamente a la viabilidad de este, dependiendo de la especie (Bots y Mariani, 2005).

El efecto de la humedad relativa del ambiente es otro factor que puede interferir directamente sobre la viabilidad del polen. La respuesta a la humedad alta o baja, puede diferir entre las especies y se asocia generalmente con el estado de hidratación intrínseca de la dehiscencia del polen (Nepi et al., 2001). Por lo anterior al requerirse una buena germinación, se necesita conocer el periodo y condiciones de almacenamiento del polen

para mantener o bajar al mínimo la viabilidad de éstos, ya que cuando se almacena a temperatura y humedad ambiente, el polen pierde casi toda la viabilidad durante un período de varios días a cuatro semanas (Moti 1972; Bamzai y Randhawa, 1967).

Liskens (1964) agrega que la viabilidad del polen durante el almacenaje depende del grado en que su actividad vital es reducida, sin disminuir el poder de germinación. El autor también menciona que la longevidad generalmente se incrementa con la reducción de la humedad relativa durante el almacenaje, pero en casos especiales, el contenido de agua no puede ser llevado bajo un nivel crítico. En esos casos, un alto contenido de agua es indispensable para la longevidad.

La longevidad del polen almacenado incrementa cuando disminuye el contenido de humedad. Un alto contenido de humedad permite una gran actividad metabólica y también promueve la actividad destructiva de hongos y bacterias contaminantes. Todo método de almacenaje está diseñado para reducir rápidamente el contenido de humedad del polen fresco (25-35%) y asegurar un mínimo de fluctuación en la humedad durante el período de almacenaje (Franklin, 1981). Si bien en el presente ensayo se realizó un almacenaje, este no tuvo un control de la fluctuación de la humedad ni antes ni durante el almacenaje, otro factor a considerar para futuros ensayos.

Johri y Vasil (1961) señalan que cuando la humedad relativa fluctúa durante el almacenaje, la viabilidad se pierde rápidamente. También plantean que esto puede deberse a que el polen no soporta variaciones extremas en su medio ambiente, lo que indica que puede ser uno de los factores que impidió la germinación de los granos de polen en el cultivo *in vitro*, ya que en la investigación no existió medición ni control de éste factor.

Adicionalmente se debe considerar lo propuesto por Bots y Mariani (2005), quienes llegaron a las siguientes conclusiones: a) la baja humedad durante el almacenamiento del polen suele tener un efecto positivo sobre la viabilidad del polen, b) el almacenamiento a bajas temperaturas por lo general tiene un efecto positivo sobre la viabilidad del polen, c) el aumento de CO₂ tiene un efecto positivo de la viabilidad del polen después de un almacenamiento y d) disminución de oxígeno durante el almacenamiento tiene un efecto positivo sobre la viabilidad del polen.

En el proceso de almacenaje de polen debe existir un exhaustivo control de la humedad de los granos, considerando su contenido de agua en el momento de la cosecha, en el momento del secado y además durante el almacenaje (Hoekstra et al., 1991). Factores que debieran ser considerados para el establecimiento de nuevas pruebas de germinación, lo que conlleva la utilización de recursos adicionales que no fueron considerados en este ensayo. La pérdida no controlada de agua conduce a la muerte del polen, un estado de hidratación parcial permite un tubo de emisión rápido (incluso dentro de 3-5 min).

Especificando más el principal determinante de la viabilidad del polen en el almacenamiento a corto plazo, es el estado de las membranas de las células vegetativas. Se sugiere que en el grano parcialmente deshidratado en el momento de la dispersión, las

membranas son en gran parte disociadas y no forman una barrera osmótica, pero las propiedades normales se recuperan durante la hidratación controlada, que suele tener lugar en el estigma. Según esta opinión, la decadencia de la viabilidad aparente se relaciona con la pérdida progresiva de la capacidad de las membranas celulares vegetales para recuperar una estructura normal de rehidratación (Shivanna y Heslop - Harrison, 1981).

Las condiciones artificiales necesarias para el cultivo *in vitro* de granos de polen son un factor de gran implicancia cuando se quiere establecer la germinación artificial, determinando tanto el medio de cultivo más apropiado para la germinación, como las condiciones atmosféricas ya sea de temperatura, humedad relativa y de luz que debe contener la cámara para la elongación del tubo polínico.

Antes de realizar el presente ensayo se evaluaron tres medios de cultivo distintos los que se utilizaron para cultivar *in vitro* polen fresco, obteniendo resultados satisfactorios y que permitieron elegir el medio de cultivo más adecuado para ser utilizado en el presente ensayo, descartando por lo tanto que el medio de cultivo haya sido el problema de la no germinación.

En resumen, comparando la metodología utilizada y los antecedentes de la literatura, se puede señalar que las posibles causas de la falta de resultados podrían ser, falta de control de:

- La humedad relativa durante el procesamiento y almacenaje del polen.
- La temperatura durante el procesamiento del polen.
- El contenido de agua presente en los granos de polen, los cambios morfológicos producidos en estado de hidratación y deshidratación.

Ensayo 2. Receptividad estigmática

Bayas por racimo

Al realizar el ANDEVA de las bayas obtenidas por racimo entre los 3 factores, solo resultó significativa la interacción entre los factores 1 (planta madre) y el factor 3 (día de polinización). Al realizar comparaciones múltiples del efecto del día de polinización con la variedad usada como planta madre, se determinó que no existe efecto en el día de polinización para las variedades usadas como planta madre (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la variedad usada como planta madre en cada día de polinización, en el promedio de bayas por racimo.

Factor 3 (día de polinización)	Factor 1 (planta madre)		
	Perlette	Thompson Seedless	Crimson Seedless
Emasculación + 2 días	26,4 a	57,5 a	27,4 a
Emasculación + 4 días	28,1 a	56,8 a	41,0 a
Emasculación + 6 días	59,3 a	19,8 a	30,3 a
Emasculación + 8 días	38,4 a	16,6 a	15,3 a

Letras distintas en cada columna muestran diferencias significativas entre los días de polinización dentro de cada variedad según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

En el Cuadro 3 se muestra el efecto de cada variedad usada como planta madre dentro de cada día de polinización, demostrando que hay efecto del factor 1 (planta madre) sólo al polinizar en el día 2 después de la emasculación, presentando la variedad Thompson Seedless mayor promedio en el número de bayas obtenidas por racimo. Se pudo determinar además que no existió efecto de la variedad usada como planta madre al polinizarla en los días 4, 6 y 8 después de la emasculación.

Cuadro 3. Efecto del día de polinización en cada variedad usada como planta madre, en el promedio de bayas por racimo.

Factor 1 (planta madre)	Factor 3 (día de polinización)			
	2	4	6	8
Perlette	26,4 a	28,1 a	59,3 a	38,4 a
Thompson Seedless	57,5 b	56,8 a	19,8 a	16,6 a
Crimson Seedless	27,4 a	41,0 a	30,3 a	15,3 a

Letras distintas en cada columna muestran diferencias significativas entre las variedades dentro de cada día de polinización según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Semillas por racimo

Al realizar el ANDEVA entre los 3 factores de la variable semillas obtenidas por racimo, solo resultó significativa la interacción y se analizó el efecto entre los factores 1 (planta madre) y el factor 3 (día de polinización), como muestra el Cuadro 4 se infiere que existe efecto del factor 3 (día de polinización) que depende del factor 1 (planta madre). Hay efecto del día de polinización en las variedades Perlette y Thompson Seedless, sin embargo en la variedad Crimson Seedless no existió efecto en el aumento de semillas. En la variedad Perlette los días de polinización que obtuvieron mayor número de semillas por racimo fueron a los 6 y 8. Y en la variedad Thompson Seedless el mayor número de semillas por racimo se alcanzó al polinizar el día 2 y 4 después de la emasculación

Como lo muestra el Cuadro 5 existe efecto del factor 1 (planta madre) que depende del factor 3 (día de polinización), sólo hay efecto de la variedad usada como planta madre al polinizar en el día 2 y 4. Al polinizar el día 2 el mayor número de semillas se alcanzó en la variedad Thompson Seedless y al polinizar el día 4 la mayor cantidad se obtuvo en las variedades Thompson Seedless y Crimson Seedless.

Cuadro 4. Efecto de la variedad usada como planta madre en cada día de polinización, en el promedio de semillas por racimo.

Factor 3 (día de polinización)	Factor 1 (planta madre)		
	Perlette	Thompson Seedless	Crimson Seedless
Emasculación + 2 días	8,0 a	93,2 b	18,4 a
Emasculación + 4 días	27,0 ab	101,7 ab	48,5 a
Emasculación + 6 días	72,6 c	22,2 a	37,0 a
Emasculación + 8 días	29,7 bc	20,7 a	14,5 a

Letras distintas en cada columna muestran diferencias significativas entre los días de polinización dentro de cada variedad según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Cuadro 5. Efecto del día de polinización cada variedad usada como planta madre, de acuerdo al promedio de semillas por racimo.

Factor 1 (planta madre)	Factor 3 (día de polinización)			
	2	4	6	8
Perlette	8,0 a	27,0 a	72,6 a	29,7 a
Thompson Seedless	93,2 b	101,7 b	22,2 a	20,7 a
Crimson Seedless	18,4 a	48,5 b	37,0 a	14,5 a

Letras distintas en cada columna muestran diferencias significativas entre las variedades dentro de cada día de polinización según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

El efecto de la variedad usada como polinizante tanto para bayas como semillas obtenidas por racimo, no fue significativo estadísticamente según datos obtenidos del análisis de varianza (Apéndice III y V). Por lo tanto, existió efecto sólo en la variedad usada como planta madre y en el día en que se realiza la polinización artificial dado que serían estos los factores preponderantes, al conocer estos datos para cada variedad que utilicen como planta madre en el programa de mejoramiento genético, permitirá aumentar la eficiencia del proceso.

La etapa de floración en las plantas superiores representa el proceso de la reproducción sexual permitiendo la recombinación genética y por lo tanto la evolución de las plantas (Lebon et al., 2008). Hay un orden de aparición de órganos que es similar a todas las angiospermas, en primer lugar los sépalos que forman el cáliz, a continuación los pétalos que forman la corola, seguido por los estambres y luego los carpelos que forman el pistilo. El cáliz tiene una función de anillo (Gerrath, 1993) y pueden estar protegidos por los órganos internos de las fluctuaciones ambientales en las fases iniciales de la brotación. Los pétalos y estambres se desarrollan a partir primordios inicialmente comunes (Gerrath y Posluszny, 1988).

En cada inflorescencia se forman primordios florales de los cuales se pueden desarrollar de tres a cinco según la función de la variedad. El desarrollo sucesivo de los órganos florales es simultáneo en cada flor de la inflorescencia (Mullins et al., 1992). Durante el crecimiento de los órganos en *vitis vinífera*, los pétalos cubren los sépalos que se degeneran y se unen en su parte superior formando la caliptra para proteger los órganos fértiles, (Srinivasan y Mullins, 1981).

Debido a la complejidad de la inflorescencia y la formación de flores en la vid, se ha descrito las fases sucesivas para proporcionar una escala de desarrollo reproductivo (Apéndice I). Lorenz et al., (1994) y Coombe (1995) resumen el desarrollo reproductivo en 22 etapas sucesivas codificadas por números de 0 a 50 basándose en las características externas de la inflorescencia. Después de la expansión de la hoja (etapa 09), la inflorescencia se desprende de la yema en la etapa 12 y se separa del crecimiento anual en la etapa 15. En esta etapa, las flores son cubiertas como conjunto y progresivamente separadas por elongación del pedúnculo floral (etapa 17). La antesis ocurre en la etapa 19 y se prolonga durante aproximadamente una semana. Las tapas florales después se desprenden siguiendo el crecimiento de los filamentos de estambres (Gerrath, 1993; Boss et al., 2003), la caída de la caliptra marca las siguientes etapas: plena floración (estadio 23) se alcanza cuando el 50% de las tapas de las flores han caído, la etapa 25 se alcanza cuando el 80% de las tapas han caído, y la etapa 27 marca el inicio de desarrollo de la baya de los óvulos fertilizados. Los estambres luego degeneran y la baya joven es ahora visible. Según Combee 1995, en el esquema E-L modificado a comparación con el esquema BBCH se distinguen las etapas de desarrollo de la inflorescencia: (E-L 12) inflorescencia despejada, (E-L 15) flores agrupadas, (E-L 17) flores separadas. Sin embargo se ha añadido una etapa adicional (E-L 18) es cuando el color verde de la tapa desvanece. Etapas significativamente importantes, ya que indican momento oportuno para la emasculación en el programa de mejoramiento genético.

Para la etapa de floración existen pequeñas diferencias en los números de identificación, pero todos los esquemas tienen los mismos criterios, porcentaje de flores con caliptra (10, 30, 50 y 80) (Combee, 1995).

Dentro de la floración se encuentra el proceso de polinización el cual se divide en las siguientes etapas: (1) liberación del polen, (2) transferencia del grano de polen al estigma y (3) la exitosa unión del polen a la superficie del estigma, seguida de la germinación del grano de polen y la penetración del tubo polínico al estilo (Faegri y Van Der Pijl, 1976). La polinización cruzada, Hoopingarner y Waller (1993) la definen como la transferencia de polen entre plantas que no tienen características genéticas idénticas. Su importancia radica en la sobrevivencia de las especies a través de los años ya que proporciona diversidad al pool genético dentro de la población de las plantas, al realizar cruzamientos dirigidos se amplían las posibilidades de obtener ciertas características en la descendencia, encontrar los momentos oportunos para cada proceso es fundamental.

Los resultados generados al analizar el momento oportuno para la polinización artificial demostraron que el factor variedad usada como polinizante no es trascendente para el proceso, en tanto que el factor variedad usada como planta madre, junto con el factor día de polinización tienen importancia en su conjunto, dado la interacción significativa presentada entre esos factores. El momento determinado para la polinización dependerá de la variedad usada como planta madre y para cada variedad usada como planta madre habrá un momento oportuno para realizar la polinización.

En general la literatura existente en relación al tema en estudio es bastante limitada no se registran estudios similares a este, el único estudio que avala en cierta medida es el realizado por Kimura et al. (1998), que demuestra que la polinización manual realizada 0, 2, 4 y 6 días después de anthesis mostraron que los estigmas son más receptivos dos días después de la apertura de flores, datos que permiten inferir que el día de polinización es de importancia significativa para el proceso.

En resumen, se debe tener en consideración la variedad usada como planta madre para el momento en que se realizó la polinización artificial, para las variedades usadas en el presente ensayo se desprende que:

- En la variedad Perlette polinizada a los 6 u 8 días después de la emasculación generó un mayor número de bayas y semillas por racimo.
- En la variedad Crimson Seedless lo óptimo fue polinizarla a los 4 días después de la emasculación, lo que generó un mayor número de semillas por racimo.
- En la variedad Thompson Seedless lo óptimo fue realizar la polinización a los 2 ó 4 días con lo cual se obtuvo un mayor número de semillas por racimo. Al polinizarla 2 días después de la emasculación generó un mayor número de bayas por racimo.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en que se realizó el estudio se concluye:

Ensayo 1. Capacidad germinativa del polen

Para cuantificar la viabilidad de polen se debe contar con un protocolo previamente validado para la especie en estudio, que permita controlar de los factores que afectan la viabilidad durante todo el proceso, desde la recolección, secado, almacenaje y posterior germinación *in vitro*.

Ensayo 2. Receptividad estigmática

Existe efecto significativo en la polinización artificial, al utilizar plantas de diferentes variedades de uva de mesa utilizadas como planta madre, sólo el efecto es significativo en conjunto con el día en que se realizó la polinización artificial, generando mayor número de bayas y semillas por racimo. No existe efecto de la variedad usada como polinizante.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, I.; I. Costa; M. Oliveira; M. Cunha, y R. de Castro. 2006. Ultraestructura y la germinación de *Vitis vinifera* cv. Loureiro polen. *Protoplasma* 228 (1-3):131-5.
- Bamzai, R. and G. Randhawa. 1967. Effects of certain growth substances and boric acid on germination, tube growth and storage of grape pollen (*Vitis* spp.). *Vitis* 6:269-277.
- Boss, P.; E. Buckeridge; A. Poole and M. Thomas. 2003. New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology* 30:593–606.
- Bots, M. and C. Mariani. 2005. Pollen viability in the field. Radboud Universiteit Nijmegen. Commissie Genetische Modificatie, (5 2005). Recuperado en: http://www.cogem.net/ContentFiles/Pollen_viability.pdf. Consultado el: 24 de agosto de 2009.
- Boyden, L. and P. Cousins. 2005. Evaluation of Grape Pollen Viability after Freezing in Liquid Nitrogen and Prolonged Storage at -80°C. In: Annual Meeting of American Society for Enology and Viticulture 54. Reno. Anais...Reno: Asev, 2003. v.1, 65p.
- Cain, D.; R. Emershad and R. Tarailo. 1983. Inovulo embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, Siebeldingen, 22:9-14.
- Cabello Saénz Santa María, F.; P. de Luis Villota and M. E. Tortosa Tórtola. 1994. Palynological study of the pollen grain of *Vitis vinifera* L. cultivars. Some aspects of sculpturing and pollination. *Vitis* 33: 57-614.
- Coombe, B. 1995. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1:104–110.
- Faegri, K. and Van Der Pijl. 1976. The principals of pollination ecology. Oxford, England. Pergamon Press. 291 p.
- Franklin, E. 1981. Pollen management handbook. Washington, DC. USDA. 98p.
- Gerrath, J. 1993. Developmental morphology and anatomy of grape flowers. *Horticultural Review* 13:315–337.
- Gerrath, J. and U. Posluszny. 1988a. Morphological and anatomical development in the Vitaceae. II. Floral development in *Vitis riparia*. *Canadian Journal of Botany* 66:1334–1351.

- Gerrath, J. and U. Posluszny. 1988b. Comparative floral development in some members of the Vitaceae. In P Leins, SC Tucker, PK Endress, eds, Aspects of Floral Development. J Cramer, Berlin, pp 121–131.
- Gourret, J. et M. Misset. 1989. Voir, connaître et utiliser le pollen. Document INRAP 83:3-8.
- Hewstone, N.; J. Valenzuela y C. Muñoz. 2006. Efecto de la variedad en el desarrollo de embriones *in vitro* de vides estenospermocárpicas. Agricultura Técnica 66(2): 124-132.
- Hoekstra, F.; J. Crowe and L. Crowe. 1991. Effect of Sucrose on Phase Behavior of Membranes in Intact Pollen of *Typha-Latifolia* L. As Measured with Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Plant Physiology 97: 1073-1079.
- Hoopingarner, R. and G. Waller. 1993. Crop pollination. In: Graham, J. E. (ed.) The Hive and Honeybee. Michigan. U:S:A: Brokgrafters. Pp:1043-1082.
- Infante, R. 2006. Australis Breeding: Mejoramiento genético frutal en Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile. 34p.
- Johri, B. and I. Vasil. 1961. Physiology of pollen. Bot. Rev. 27: 325-375.
- Khosh-Khui, M.; A. Bassiri and M. Niknejad. 1976. Effects of temperature and humidity on pollen viability of six roses species. Can. J. Plant Sci. 56:517-523.
- Kimura, P.; G. Okamoto and K. Hirano. 1998. The Mode of Pollination and Stigma Receptivity in *Vitis coignetiae* Pulliat, American Journal of Enology and Viticulture 49 (1) 1-5, USA, ISSN 0002-9254.
- Lebon, G.; G. Wojnarowicz; B. Holzappel; F. Fontaine; N. Vaillant-Gaveau and C. Clément. 2008. Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). Journal of Experimental Botany 59(10):2565-2578.
- Lillo, M. 2006. Evaluación de métodos de conservación de polen sometidos a distintos tiempos de almacenaje en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Taller de licenciatura. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Quillota, Chile. 52p.
- Lincoln, R.; G. Boxshall and P. Clark. 1982. A dictionary of ecology, evolution and systematics. Cambridge University Press, New York.
- Liskens, H. 1964. Pollen physiology. Annual Review of Plant Physiology 15:255-270.

- Lorenz, D.; K. Eichhorn; H. Bleiholder; R. Klose; U. Meier et E. Weber. 1994. Stades phénologiques de la vigne (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). *Viticulture Enology Science* 49:66–70.
- Martínez de Toda, F. 1991. *Biología de la Vid*. Mundi-Prensa. Madrid.
- Morse, D. 1987. Roles of pollen and ovary age in follicle production of the common milkweed *Asclepias syriaca*. *Amer. J. Bot.*, 74:851-856.
- Moti. 1972. Studies on the morphology and viability of the grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Punjab Hort. J.* 12(2/3):101-110.
- Mullins, M.; A. Bouquet and L. Williams. 1992. *Biology of the grapevine*—Mullins MG, ed. Cambridge: Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Nepi, M.; G. Franchi and E. Pacini. 2001. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma* 216: 171-180.
- Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). 2013a. Estadísticas de la agricultura chilena, (on line). Recuperado en: <<http://www.odepa.cl/frutales-superficie-y-produccion-2.html>> Consultado el: 29 de Diciembre de 2014.
- Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). 2013b. Uva de Mesa: Se Ratifica el Liderazgo Exportador Mundial de Chile, (on line). Recuperado en: <http://www.odepa.cl/odepaweb/publicaciones/doc/11258.pdf>. Consultado el: 12 de Enero de 2015.
- Perl, A.; N. Sahar; P. Spiegel-Roy; S. Gavish; R. Elyasi; E. Orr et al. 2000. Conventional and biotechnological approaches in breeding seedless table grapes. *Acta Horticultural* 528:607-612.
- Porch, T. and M. Jahn. 2001. Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell and Environment* 24: 723-731.
- Proctor, H. 1998. Effect of pollen age on fruit set, fruit weight, and seed set in three orchid species. *Can. J. Bot.* 76: 420-427.
- Ramming, D. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. *Hortscience* 25:393-398.
- Shivanna, K. and J. Heslop-Harrison. 1981. Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot* 47: 759-770.
- Roytchev, V. et al. 1994. Scanning electron microscopy study of pollen morphology in seedless grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Vitis* 33: 105-108.

- Srinivasan, C. and M. Mullins. 1981. Physiology of flowering in the grapevine. A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 32:47–63.
- Stanley, R. and H. Linskens. 1974. *Pollen: biology, biochemistry and management*. Springer, New York.
- Stephenson, A. and R. Bertin. 1983. Male competition, female choice, and sexual selection in plants. In: Real, I. (ed.). *Pollination biology*. London. Academic Press, pp: 104-149.
- Steel, A. y C. Torrie. 1988. *Bioestadística: principios y procedimientos*. México. McGraw Hill. 622p.
- Stone, J.; J. Thomson and S. Dent-Acosta. 1995. Assessment of pollen viability in handpollination experiments: A review. *American Journal of Botany* 82: 1186 - 1197.
- Thomson, J.; L. Rigney; K. Karoly and B. Thomson. 1994. Polen viability, vigor and competitive ability in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae). *American Journal of Botany* 81: 1257-1266.
- Vara, P.; P. Craufurd and R. Summerfield. 1999. Fruit number in relation to pollen production and viability in groundnut exposed to short episodes of heat stress. *Annals of Botany* 84: 381-386.

ANEXOS Y/O APÉNDICES

ANEXO I. Comparación de las letras o numeración usadas para identificar los estados de crecimiento de la vid en cuatro sistemas.

	Baillod & Baggiolini	Eichhorn & Lorenz	Modified E-L	Extended BBCH
	A	01	1	00
		02	2	01
	B			03
		03	3	05
Budburst	C	05	4	07
	D		5	09
	E	07	7	11
		09	9	12
				13
			11	14
Shoots 10 cm	F	12	12	15, 53
			13	16
			14	
	G	15	15	19 ⁵⁵
			16	
	H	17	17	57
			18	
Flowering begins		19	19	60
			20	61
		21	21	63
Full bloom	I	23	23	65
		25	25	68
		26	26	69
Setting	J	27	27	71
		29	29	73
	K	31	31	75
			32	77
	L	33	33	79
			34	
Veraison	M	35	35	81
			36	
			37	
Harvest	N	38	38	89
			39	
	O	41	41	91
				92
	P	43	43	93
				95
		47	47	97

Apéndice I. Fechas obtenidas en la recolección de flores, temporada 2008.

	Fechas observadas		
	7 días antes apertura floral	4 días antes apertura floral	apertura floral
Perlette	07-11-2008	10-11-2008	14-11-2008
Superior	08-11-2008	11-11-2008	15-11-2008
Flame Seedless	10-11-2008	13-11-2008	17-11-2008
Black Seedless	05-11-2008	08-11-2008	12-11-2008
Ruby Seedless	10-11-2008	13-11-2008	17-11-2008
Thompson Seedless	08-11-2008	11-11-2008	15-11-2008
Crimson Seedless	10-11-2008	13-11-2008	17-11-2008
Red globe	12-11-2008	15-11-2008	19-11-2008
Melissa	08-11-2008	11-11-2008	15-11-2008
Autumn Royal	13-11-2008	17-11-2008	20-11-2008

Apéndice II: Datos obtenidos en la cosecha de racimos por tratamiento.

Tratamiento	Factor 1 (Planta madre)	Factor 2 (Polinizante)	Factor 3 (ddp)	Repetición	N° Bayas	N° Semillas	Flores Emasculadas
1	Perlette	Superior	2	1	120	12	535
1	Perlette	Superior	2	2	22	25	474
1	Perlette	Superior	2	3	34	9	1191
2	Perlette	Superior	4	1	52	58	439
2	Perlette	Superior	4	2	48	59	871
2	Perlette	Superior	4	3	11	9	382
3	Perlette	Superior	6	1	33	7	530
3	Perlette	Superior	6	2	12	12	249
3	Perlette	Superior	6	3	60	66	849
4	Perlette	Superior	8	1	31	26	367
4	Perlette	Superior	8	2	72	115	349
4	Perlette	Superior	8	3	34	36	418
5	Thompson Seedless	Superior	2	1	7	10	398
5	Thompson Seedless	Superior	2	2	64	100	730
5	Thompson Seedless	Superior	2	3	46	71	379
6	Thompson Seedless	Superior	4	1	275	542	842
6	Thompson Seedless	Superior	4	2	46	73	250
6	Thompson Seedless	Superior	4	3	0	0	272
7	Thompson Seedless	Superior	6	1	36	40	263
7	Thompson Seedless	Superior	6	2	32	24	133

(continua)

Tratamiento	Factor 1 (Planta madre)	Factor 2 (Polinizante)	Factor 3 (ddp)	Repetición	N° Bayas	N° Semillas	Flores Emasculadas
7	Thompson Seedless	Superior	6	3	0	0	229
8	Thompson Seedless	Superior	8	1	2	1	213
8	Thompson Seedless	Superior	8	2	18	24	218
8	Thompson Seedless	Superior	8	3	36	56	138
9	Crimson Seedless	Superior	2	1	64	48	357
9	Crimson Seedless	Superior	2	2	4	3	262
9	Crimson Seedless	Superior	2	3	44	20	529
10	Crimson Seedless	Superior	4	1	78	106	359
10	Crimson Seedless	Superior	4	2	20	26	314
10	Crimson Seedless	Superior	4	3	78	90	466
11	Crimson Seedless	Superior	6	1	43	43	219
11	Crimson Seedless	Superior	6	2	5	4	107
11	Crimson Seedless	Superior	6	3	23	35	342
12	Crimson Seedless	Superior	8	1	50	43	664
12	Crimson Seedless	Superior	8	2	7	7	230
12	Crimson Seedless	Superior	8	3	8	7	480
13	Perlette	Princess	2	1	0	12	676
13	Perlette	Princess	2	2	23	2	438
13	Perlette	Princess	2	3	9	0	372
14	Perlette	Princess	4	1	32	14	693
14	Perlette	Princess	4	2	37	43	785
14	Perlette	Princess	4	3	20	20	917
15	Perlette	Princess	6	1	58	67	543
15	Perlette	Princess	6	2	82	114	609
15	Perlette	Princess	6	3	24	24	616
16	Perlette	Princess	8	1	28	22	497
16	Perlette	Princess	8	2	34	12	276
16	Perlette	Princess	8	3	36	19	478
17	Thompson Seedless	Princess	2	1	70	104	268
17	Thompson Seedless	Princess	2	2	56	89	178
17	Thompson Seedless	Princess	2	3	84	167	329
18	Thompson Seedless	Princess	4	1	8	12	422
18	Thompson Seedless	Princess	4	2	102	160	560
18	Thompson Seedless	Princess	4	3	0	0	281
19	Thompson Seedless	Princess	6	1	0	0	254
19	Thompson Seedless	Princess	6	2	8	6	105
19	Thompson Seedless	Princess	6	3	7	10	83
20	Thompson Seedless	Princess	8	1	26	37	238

(continua)

Tratamiento	Factor 1 (Planta madre)	Factor 2 (Polinizante)	Factor 3 (ddp)	Repetición	N° Bayas	N° Semillas	Flores Emasculadas
20	Thompson Seedless	Princess	8	2	18	21	133
20	Thompson Seedless	Princess	8	3	0	0	156
21	Crimson Seedless	Princess	2	1	0	0	183
21	Crimson Seedless	Princess	2	2	18	6	146
21	Crimson Seedless	Princess	2	3	0	0	474
22	Crimson Seedless	Princess	4	1	18	16	258
22	Crimson Seedless	Princess	4	2	44	18	455
22	Crimson Seedless	Princess	4	3	4	1	399
23	Crimson Seedless	Princess	6	1	27	32	423
23	Crimson Seedless	Princess	6	2	25	20	444
23	Crimson Seedless	Princess	6	3	39	63	328
24	Crimson Seedless	Princess	8	1	23	12	238
24	Crimson Seedless	Princess	8	2	14	15	702
24	Crimson Seedless	Princess	8	3	0	0	233
25	Perlette	Autumn Royal	2	1	10	6	780
25	Perlette	Autumn Royal	2	2	14	3	447
25	Perlette	Autumn Royal	2	3	6	3	649
26	Perlette	Autumn Royal	4	1	21	15	844
26	Perlette	Autumn Royal	4	2	0	14	837
26	Perlette	Autumn Royal	4	3	32	11	771
27	Perlette	Autumn Royal	6	1	146	219	629
27	Perlette	Autumn Royal	6	2	83	106	458
27	Perlette	Autumn Royal	6	3	36	39	380
28	Perlette	Autumn Royal	8	1	19	7	373
28	Perlette	Autumn Royal	8	2	56	12	506
28	Perlette	Autumn Royal	8	3	36	19	565
29	Thompson Seedless	Autumn Royal	2	1	89	124	244
29	Thompson Seedless	Autumn Royal	2	2	57	100	279
29	Thompson Seedless	Autumn Royal	2	3	45	74	196
30	Thompson Seedless	Autumn Royal	4	1	65	109	322
30	Thompson Seedless	Autumn Royal	4	2	16	20	206
30	Thompson Seedless	Autumn Royal	4	3	0	0	384
31	Thompson Seedless	Autumn Royal	6	1	0	0	175
31	Thompson Seedless	Autumn Royal	6	2	50	60	246
31	Thompson Seedless	Autumn Royal	6	3	46	60	280
32	Thompson Seedless	Autumn Royal	8	1	0	0	507
32	Thompson Seedless	Autumn Royal	8	2	11	8	331
32	Thompson Seedless	Autumn Royal	8	3	39	40	203

(continua)

Tratamiento	Factor 1 (Planta madre)	Factor 2 (Polinizante)	Factor 3 (ddp)	Repetición	N° Bayas	N° Semillas	Flores Emasculadas
33	Crimson Seedless	Autumn Royal	2	1	25	21	513
33	Crimson Seedless	Autumn Royal	2	2	92	68	460
33	Crimson Seedless	Autumn Royal	2	3	0	0	703
34	Crimson Seedless	Autumn Royal	4	1	0	0	153
34	Crimson Seedless	Autumn Royal	4	2	36	37	254
34	Crimson Seedless	Autumn Royal	4	3	91	143	607
35	Crimson Seedless	Autumn Royal	6	1	53	63	535
35	Crimson Seedless	Autumn Royal	6	2	40	54	331
35	Crimson Seedless	Autumn Royal	6	3	18	19	226
36	Crimson Seedless	Autumn Royal	8	1	31	37	272
36	Crimson Seedless	Autumn Royal	8	2	5	10	253
36	Crimson Seedless	Autumn Royal	8	3	0	0	254

(ddp)= día de polinización.

Apéndice III. Cuadro de análisis de la varianza, bayas/racimo (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	428,04	36	11,89	1,38	0,1214	
Factor 1 (planta madre)	11,46	2	5,73	0,67	0,5162	
Factor 2 (polinizante)	25,46	2	12,73	1,48	0,2340	
Factor 3 (ddp)	16,61	3	5,54	0,64	0,5888	
Flores emasculadas	56,52	1	56,52	6,58	0,0124	0,01
Factor 1 * Factor 2	8,46	4	2,11	0,25	0,9111	
Factor 1 * Factor 3	176,78	6	29,46	3,43	0,0050	
Factor 2 * Factor 3	49,81	6	8,30	0,97	0,4542	
Factor 1 *Factor 2 *Factor 3	78,11	12	6,51	0,76	0,6905	
Error	609,75	71	8,59			
Total	1037,79	107				

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ_Nº Bayas	108	0,41	0,11	58,4

Apéndice IV. Medias ajustadas interacción factor 1 con factor 3, bayas/racimo.

Factor 1 (planta madre)	Factor 3 (ddp)	Medias	n	E.E.
Crimson Seedless	2	3,99	9	0,98
Crimson Seedless	4	5,88	9	0,98
Crimson Seedless	6	5,77	9	0,99
Crimson Seedless	8	3,44	9	0,98
Perlette	4	3,17	9	1,18
Perlette	6	6,60	9	1,01
Perlette	8	6,02	9	0,98
Perlette	2	3,17	9	1,07
Thompson Seedless	2	7,77	9	0,99
Thompson Seedless	4	5,47	9	0,98
Thompson Seedless	6	4,60	9	1,08
Thompson Seedless	8	4,34	9	1,04

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 8,5881 gl: 71

Apéndice V. Cuadro de análisis de la varianza, semillas/racimo (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	844,02	36	23,44	2,19	0,0025	
Factor 1 (planta madre)	130,22	2	65,11	6,07	0,0037	
Factor 2 (polinizante)	25,18	2	12,59	1,17	0,3152	
Factor 3 (ddp)	46,43	3	15,48	1,44	0,2377	
Flores emasculadas	148,23	1	148,23	13,82	0,0004	0,01
Factor 1 * Factor 2	16,03	4	4,01	0,37	0,8268	
Factor 1 * Factor 3	353,66	6	58,94	5,49	0,0001	
Factor 2 * Factor 3	138,31	6	23,05	2,15	0,0582	
Factor 1 *Factor 2 *Factor 3	122,64	12	10,22	0,95	0,5013	
Error	761,75	71	10,73			
Total	1605,77	107				

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ_N° Semillas	108	0,53	0,29	63,87

Apéndice VI. Medias ajustadas interacción factor 1 con factor 3, semillas/racimo.

Factor 1 (planta madre)	Factor 3 (ddp)	Medias	n	E.E.
Crimson Seedless	2	3,23	9	1,09
Crimson Seedless	4	6,22	9	1,10
Crimson Seedless	6	6,52	9	1,11
Crimson Seedless	8	3,52	9	1,10
Perlette	2	0,66	9	1,20
Perlette	4	2,13	9	1,32
Perlette	6	6,57	9	1,13
Perlette	8	4,85	9	1,09
Thompson Seedless	2	10,00	9	1,11
Thompson Seedless	4	7,14	9	1,09
Thompson Seedless	6	5,47	9	1,20
Thompson Seedless	8	5,21	9	1,17

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 10,7289 gl: 71

