



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

TOLERANCIA A *BOTRYTIS CINEREA* Y
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA POBLACIÓN
DE LÍNEAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS DE VID
‘THOMPSON SEEDLESS’

Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Agropecuarias,
Mención Producción Frutícola

JULIA RUBIO ASTUDILLO

Director de Tesis

HUMBERTO PRIETO ENCALADA

Profesores consejeros

RODRIGO CALLEJAS RODRIGUEZ

JAIME MONTEALEGRE ANDRADE

SANTIAGO - CHILE

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

TOLERANCIA A *BOTRYTIS CINEREA* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
UNA POBLACIÓN DE LÍNEAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS DE VID
'THOMPSON SEEDLESS'

Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Agropecuarias,
Mención Producción Frutícola

JULIA RUBIO ASTUDILLO

Calificaciones

DIRECTOR DE TESIS

Humberto Prieto Encalada

Aprobado

Bioquímico, PhD.

PROFESORES CONSEJEROS

Rodrigo Callejas Rodríguez

Aprobado

Ingeniero Agrónomo, Dr. sc. agr.

Jaime Montealegre Andrade

Aprobado

Ingeniero Agrónomo, Fitopatólogo.

Santiago, Chile
2015

*Dedicado a cada uno de los estudiantes de pregrado, técnicos y profesionales
cuya participación contribuyó a la construcción de este trabajo.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a todos quienes participaron durante el desarrollo de este proyecto, que por años fue el estandarte y mayor orgullo de avance tecnológico en el área transformación genética y cultivo in vitro del laboratorio de Biotecnología de INIA – La Platina, a cargo del Dr. Humberto Prieto, y que ha marcado precedentes en el desarrollo de nuevas estrategias de mejoramiento genético no convencional en Chile.

Este trabajo fue financiado FONDEF CHILE D0111064, por consorcio BIOFRUTALES y por el proyecto INNOVA CHILE 09PMG-7229.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA	6
Introducción.....	7
Importancia económica del cultivo de la vid.....	8
Información general sobre algunas plagas y enfermedades que afectan al cultivo de la vid	10
Programas de mejoramiento genético y colecciones de germoplasma.....	13
Mejoramiento genético convencional	13
Mejoramiento genético no convencional.....	18
Vides tolerantes a <i>Botrytis cinerea</i>	20
Conclusión	22
Bibliografía.....	23
CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO	32

CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA

Introducción

El género *Vitis*, es el único de los más de 15 géneros que componen la familia *Vitaceae* que tiene frutos comestibles, convirtiéndose en el género de mayor importancia económica dentro de esta familia (Einset y Pratt, 1975; Riaz et al., 2010). Este género está dividido en dos subgéneros, *Muscadinea* Planch., cuyos miembros tienen un número de cromosomas somáticos de 40 ($2n=40$) y *Euvitis* Planch., que tiene un número de cromosomas somáticos de 38 ($2n=38$). A este último subgénero pertenece la mayor parte de las especies de *Vitis*, incluyendo la uva de mesa y de vino (*Vitis vinifera* L.) y las especies americanas (*Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, *Vitislabrusca*, *Vitis aestivalis*, *Vitis cinerea*) utilizadas como portainjertos y como fuente de resistencia a enfermedades. En el mundo existen alrededor de 60 especies de *Vitis*, concentrándose principalmente en Asia y América del Norte (Mullins et al., 1992; Riaz et al., 2007a).

Vitis vinifera (L.) es una planta perenne de hoja caediza, de hábito trepador que bajo cultivo requiere ser formada sobre alguna estructura de soporte (parrón o espaldera) para potenciar su productividad, optimizar su crecimiento y calidad. Es una especie altamente heterogénea, razón por la cual es necesario propagarla mediante la generación de “clones” para mantener sus características distintivas y significancia económica (Riaz et al., 2007a). La mayoría de los cultivares comerciales de vides (*V. vinifera*) presentan flores hermafroditas que contienen estambres y pistilos funcionales; estas flores se ubican en inflorescencias que originan un racimo de uvas cuyo fruto se clasifica como baya. Muchas uvas presentan frutos con semillas, pero también varios cultivares producen frutos sin semilla (estenoespermocarpia), siendo este uno de los atributos más importantes en uvas de mesa y para pasas. El fruto es no climatérico, por lo que la baya no continúa madurando una vez removida del raquis (Mullins et al., 1992).

Como la mayoría de las especies frutales de importancia comercial para el país, el cultivo de la vid está basado íntegramente en variedades desarrolladas en el extranjero, con la subsecuente dependencia estratégica y comercial que esto implica. De este modo, las variedades importadas responden generalmente a rasgos agronómicos derivados de los requerimientos suscitados fuera de la región y de gran interés económico como la calidad de la fruta hasta la resistencia a fitopatógenos. En este sentido, los programas de mejoramiento frutícola orientados a la solución y demanda de problemas más locales deben recorrer un gran camino antes de generar nuevas variedades con valor agregado.

Importancia económica del cultivo de la vid

La vid es cultivada en más de 80 países en el mundo y al año 2012 la superficie mundial plantada con vides era de 6.969.363 hectáreas cuya mayor parte está destinada a vinificación. Los países con las mayores superficies plantadas son España, Francia, Italia, China, Turquía y EUA (FAOSTAT, 2014) . Los viñedos de América del Norte y Sur se mantuvieron en expansión alcanzando los 1.002 Mha. Esta evolución se atribuye principalmente a las variaciones positivas manifiestas desde 2006 en tres países productores preponderantes: Brasil, Chile y Estados Unidos (OIV, 2014).

En Chile, la producción de vides se concentra entre los 27° y los 35° de latitud sur (III a la VII región) siendo el frutal de mayor importancia para el país, tanto en superficie plantada como en ingresos por las exportaciones. De acuerdo a los datos informados por ODEPA (2014) las vides que producen uvas para vinificación, pisco, de mesa y pasas representan en conjunto el 60% del total de la superficie frutal del país. La uvade mesa representa el 20% del total de la superficie frutal con 52.234 ha plantadas. Al año 2013, de las 2.706.201 toneladas de frutas exportadas, 856.355 toneladas corresponden a uva de mesa representando el 32% del volumen exportado siendo la principal fruta de exportación del país originando un ingreso FOB de US\$ 912.557.000 y posicionando a Chile como el líder mundial en la exportación de uva de mesa (Cuadro 1)(OIV, 2014). Los principales mercados de destinos de la uva chilena son EUA, Europa y Asia , cerca del 50% de la fruta se exporta a EUA y entre el 20-25% a Europa (ODEPA, 2014). Si bien el mercado Asiático ha adquirido importancia los últimos 10 años los volúmenes enviados son variables (10-23%) debido principalmente a la condición de la fruta producida en la temporada ya que ésta debe soportar cerca de 45 días de viaje antes de alcanzar su destino final (ODEPA, 2014).

Cuadro 1.- Resumen de superficie, producción y exportación de Vid de mesa producida en Chile y su relación (en porcentaje) con la superficie, producción y exportación a nivel mundial.

2011	MUNDIAL	Chile	%
Superficie	7.517 (1000 ha)	200 (1000 ha)	3%
Producción de Uva de mesa	212.640 (100 t)	8.670 (100 t)	4%
Exportación de Uva de mesa	39.096 (100 t)	8.300 (100 t)	21%

Última actualización : 18/07/2014 ©

Las principales variedades exportadas por Chile son ‘Red Globe’ (33,9%), ‘Crimson Seedless’ (21,7%), ‘Thompson Seedless’ (20,8%) y ‘Flame Seedless’ (11,2%), concentrándose en estas cuatro variedades foráneas el 87% de las exportaciones del país (ODEPA, 2014). El mercado mundial está siendo cada vez más exigente en cuanto a la diversidad de productos, las nuevas variedades desarrolladas en el extranjero ya no son de dominio público y sus obtentores pueden limitar el acceso a ellas o restringirlo a través de licencias de exclusividad u otros mecanismos, ya sea por razones comerciales o simplemente por estrategia de competitividad de los países. Un claro ejemplo de lo anterior

lo constituye la situación de ‘Midnight Beauty’, desarrollada en California por la empresa “SunWorld”, cuyo uso está sujeto a una serie de restricciones, como la exclusividad de comercialización por ciertos viveros y la regulación de las hectáreas posibles de plantar porque las plantas no se venden, sino que se entregan en comodato a los productores.

Por estas razones casi todos los competidores de Chile en el hemisferio sur como Perú, Brasil, Nueva Zelanda, Australia y Sudáfrica poseen programas de mejoramiento genético para esta especie. Lo anterior implica que en el actual sistema competitivo mundial los países que no cuenten con germoplasma, programas de mejoramiento genético y variedades propias, perderán competitividad porque no contarán con moneda de cambio para facilitar el acceso a nuevas variedades producidas por otros programas del mundo (FIA, 2014). El cultivo de vides en Chile está basado íntegramente en variedades desarrolladas en el extranjero con la subsecuente dependencia estratégica y comercial que esto implica. De este modo, las variedades importadas responden generalmente a características agronómicas derivadas de los requerimientos suscitados en el Hemisferio Norte, yendo desde la calidad de la fruta hasta la resistencia a fitopatógenos propias de ese entorno.

Las cifras del mercado son alentadoras, por lo tanto para mantener el producto nacional vigente dentro del mercado internacional, es necesario invertir en tecnologías que permitan mantener la fruta en el mejor estado, considerando la selección de las variedades a cultivar y un manejo en campo que permitan finalmente generar condiciones óptimas de producción y sanidad vegetal. Los cultivos chilenos no son inmunes frente al ataque de fitopatógenos virales, bacterianos, insectos, nematodos y en especial fúngicos; debido a esto, para el control en campo se invierten grandes sumas de dinero con la finalidad de acotar la propagación de los fitopatógenos. Las vides deben cumplir con parámetros de carga infectiva y de no ser tratadas a tiempo los efectos negativos producen pérdidas en post-cosecha y durante el periodo de traslado de la fruta hacia los grandes mercados consumidores perjudicando directamente a todo el comercio asociado a la vid.

Información general sobre algunas plagas y enfermedades que afectan al cultivo de la vid

A nivel mundial, la vid es planta hospedera de una gran diversidad de plagas y enfermedades que pueden llegar a provocar graves daños mecánicos y/o fisiológicos afectando tanto la calidad de los racimos como la producción. En Chile, los cultivos vitivinícolas y pisqueros no forman parte de ninguna excepción, por lo que también se ven afectados por fitopatógenos que pueden traer consigo pérdidas económicas, si no se toman las medidas adecuadas de prevención y/o control. Es así como debido a la incidencia de diversas enfermedades es posible identificar un grupo de fitopatógenos que se encuentran distribuidos en gran parte de país y que son los agentes causales enfermedades conocidas como oídio y pudrición gris; pudrición ácida; falsa arañita roja de la vid, chanchito blanco, virus y nematodos. A continuación, se detallaran las enfermedades de mayor impacto dentro del cultivo por su amplio rango de extensión por todo el territorio nacional describiendo para cada una sus características, síntomas y alternativas biotecnológicas enfocadas al control de las enfermedades.

Las enfermedades producidas por virus están presentes desde hace tiempo en los viñedos. Actualmente ha sido posible identificar a más de 60 virus que infectan a la vid, aunque solo algunas especies son importantes por el daño económico que generan, tanto por su intrínseca agresividad como por su amplia diseminación en los cultivos (Engel et al., 2010). Dos de los principales virus que influyen negativamente en el desarrollo de las plantas y por lo tanto, en la calidad de la producción de las plantas de vid son GFLV (“Grapevine fanleaf virus”) o Virus de la hoja en abanico de la vid y GLRV (“Grapevine Leafroll virus”) o Virus del enrollamiento de la hoja de la vid.

GFLV es un nepovirus que puede ser transmitido de manera no persistente por el nematodo *Xiphinema index* (Cotten et al., 1971; Das y Raski, 1968; Mayo y Robinson, 1996) y mediante la injertación de material infectado. Las principales sintomatologías corresponden a la formación de mosaico amarillo y aclaramiento de venas de la lámina foliar en conjunto con la malformación en forma de abanico. Este virus causa un rápido decaimiento en los cultivares afectando la cuaja, maduración de la fruta, disminuyendo el rendimiento y la calidad de esta (Andret-Link et al., 2004). Durante décadas se han desarrollado variedades resistentes al nematodo vector, como el cv. ‘Harmony’, ‘Schwarzmann’ o ‘Freedom’, encontrando una solución parcial a la propagación del virus dentro del viñedo (Christensen et al., 2003; Ferris et al., 2012).

Otro agente viral altamente infectivo es GLRV, un closterovirus que se propaga principalmente mediante la injertación sobre material infectado, aunque también se ha descrito que puede ser diseminado por insectos de la familia de los *Planococcus sp.* y *Pseudococcus sp.* (Engelbrecht y Kasdorf, 1984; Engelbrecht et al., 1994; Petersen y Charles, 1997). Una sintomatología característica es que en períodos estivales las hojas se enrollan hacia el haz, exponiendo las áreas intervenales que adquieren una coloración amarillo brillante o rojizo, permaneciendo aún verde la vena principal. Las bayas son de menor tamaño a la cosecha e incluso en variedades coloreadas las bayas pueden

permanecen verdes. No se han reportado especies resistentes a la infección del vector o del virus, por lo tanto, el uso del mejoramiento convencional no es una opción viable para desarrollar, apuntando directamente hacia la generación de variedades resistentes al virus utilizando la ingeniería genética (Fuchs, 2007).

Con respecto a las enfermedades producidas por bacterias, una de las más comunes es la Agalla de la corona, producida por bacterias de la familia *Agrobacterium spp.*, y caracterizada por la formación de tumores en la parte baja del tronco, sobre y bajo el suelo. Estos tumores presionan los vasos conductores, obstruyendo e interfiriendo en el flujo de agua y nutrientes. Esta bacteria puede estar presente en la planta sin que se observen síntomas, por lo que la propagación de la enfermedad es principalmente mediante material infectado usado como fuente de injerto. La generación de vides resistentes a esta enfermedad se realizó transfiriendo a una serie de embriones somáticos de diferentes porta-injertos, un plasmidio con la forma truncada de *virE2* que codifica a la proteína de unión al T-DNA de hebra simple y que puede asociarse de forma no covalente a lo largo de la longitud de esta y protegerlo de la degradación (Citovsky et al., 1988; Christie et al., 1988). La expresión de este plasmidio confiere resistencia a la agalla de la corona, observándose una substancial reducción del porcentaje de sitios inoculados con la bacteria y que fueron capaces de producir la enfermedad con respecto a plantas silvestres (Krastanova et al., 2010).

Otro problema fitosanitario de origen bacteriano es la Pudrición ácida, provocada por diversos géneros de bacteria pertenecientes principalmente al grupo *Acetobacter*. Estas bacterias viven en restos orgánicos de hojas, yemas o frutos momificados y son transmitidos principalmente por las patas de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). La pudrición ácida se caracteriza por la descomposición de las bayas maduras, produciendo la pérdida de cualidades organolépticas de las bayas y racimos utilizados para la vinificación debido al incremento de la acidez de los restos de fruta infectados (Duncan y Stapleton, 1994; Pinilla y Álvarez, 2002).

La pudrición gris y el oídio son las principales enfermedades fungosas que afectan el cultivo de la vid en Chile. El control químico de estas enfermedades, suele perder eficiencia sistemáticamente debido al desarrollo de resistencia por parte del fitopatógeno (Jones et al., 2014; Leroy et al., 2011). Además del alto costo de producción, la aplicación de fungicidas tiene un significativo efecto sobre la contaminación del medio ambiente y sobre la salud de los trabajadores agrícolas.

El agente causal de la pudrición gris, es *Botrytis cinerea* (Pers.), [tel. *Botryotinia fuckeliana* (de Bary)], un hongo necrotrófico, de organización filamentosa y que pertenece al orden de los Helotiales. Es capaz de producir estructuras llamadas esclerocios como forma de resistencia en invierno y que en ambientes favorables, se caracteriza por generar un abundante micelio gris que da el nombre a la infección. Ambas formas germinan en primavera para producir conidióforos, en cuyos extremos terminales se generan los conidios (estructuras reproductivas asexuales) que serán dispersados por el viento y lluvia causando nuevas infecciones (Canessa et al., 2013; Giraud et al., 1997). La pudrición gris afecta a una serie de cultivos, por lo que se indica que el agente fúngico posee un amplio rango de hospederos produciendo daños severos a nivel económico en la agricultura mundial (Elad et al., 2004; Keller et al., 2003). El control de la pudrición gris se ve

dificultado por la capacidad del hongo de infectar varios órganos de la planta durante su desarrollo y por su rápido ciclo de vida de germinación, colonización y esporulación en campo. Se han descrito un amplio rango de condiciones, incluyendo las bajas temperaturas, altos porcentajes de humedad en conjunto con condiciones de oscuridad, las que permiten la activación de la enfermedad causando significativas pérdidas en pre y post-cosecha (Fernandez-Baldo et al., 2011). En uvas, las inflorescencias pueden llegar a ser infectadas durante el período de cuaja sin presentar síntomas evidentes. Durante este proceso, el patógeno permanece latente hasta una muy temprana etapa de desarrollo (Choquer et al., 2007; Powelson, 1960). El largo periodo de latencia que existe desde la infección hasta que aparecen los primeros síntomas en los frutos maduros dificulta el control del patógeno por fungicidas y también aumenta la susceptibilidad a la selección de cepas resistentes a estos (De Kock y Holz, 1992; Jarvis, 1994).

Los cultivos de vid también son afectados en una gran proporción por patógenos biotróficos fúngicos representados principalmente por el Oídio (*Erysiphe necator* sin. *Uncinula necator* Burr). Este patógeno afecta a todos los tejidos suculentos de la vid, incluyendo tallos, fruta y principalmente hojas en las cuales es posible observar la sintomatología característica de la enfermedad: la generación de una cubierta de micelio gris-blanquecino en forma de estrella en el lado axial de las hojas (Feechan et al., 2011; Gadoury et al., 2012). Esa capa de micelio genera retraso en el desarrollo de la baya, afectando la tasa fotosintética, que se traduce en la reducción del contenido de azúcar de las bayas y pérdida del sabor en variedades viníferas (Campbell et al., 2007).

Aunque se han descrito fuentes naturales de resistencia a hongos en *Vitis spp.*, su transferencia a cultivares de *Vitis vinifera* ha sido parcial, principalmente debido a que la fruta obtenida en estas cruza no cumple con los estándares requeridos para su comercialización (Alleweldt y Dettweiler, 1994; Peterlunger et al., 2003; Vidal et al., 2006a), por lo que aún queda mucho por desarrollar para lograr integrar genes de resistencia a hongos en variedades de interés comercial. De forma alternativa, se ha desarrollado la tecnología de transformación genética o transgenia de vides. Ésta tecnología permite la transferencia específica de genes conocidos desde una especie no relacionada hacia una especie vegetal específica de interés, de forma que ésta incorpore los rasgos determinados por ese gen. En este campo, uno de los aspectos de mayor desarrollo es precisamente la introducción de resistencia a fitopatógenos fúngicos.

Programas de mejoramiento genético y colecciones de germoplasma

Mejoramiento genético convencional

Para que una nueva variedad sea exitosa debe presentar características superiores para producción y/o calidad. La productividad define la cantidad de producto mientras que la calidad generalmente decide el precio obtenido. La calidad es un parámetro importante en la comercialización de la uva de mesa y define que una variedad se inserte en el mercado. Los atributos de calidad incorporados dentro de los objetivos de la mayoría de los programas de mejoramiento de uva de mesa son apirenia, firmeza, uniformidad del tamaño de la baya, buen color y apariencia, buena estructura de racis, buena capacidad de almacenaje y transporte, estructura de racimo y compactación, resistencia a enfermedades y épocas de maduración (Einset y Pratt, 1975; Riaz et al., 2007a). La mayoría de los países productores de uva poseen programas de mejoramiento genético. Entre ellos se cuenta a los EUA, Francia, Italia, España, Australia, Israel, China, Alemania, Japón, Rusia, Hungría, Argentina, Brasil, Chile, Turquía, Irán, Grecia, Sudáfrica, Portugal y países del norte de África (Hinrichsen *et al.*, 2006).

En EUA, el USDA (“United States Department of Agriculture”) trabaja constantemente en mejoramiento de uva de mesa y pasas, tanto en atributos de calidad como en resistencia a enfermedades. Los primeros cruzamientos se realizaron en 1923 y la primera variedad de uva de mesa, ‘Cardinal’, fue liberada en 1946. A la fecha han liberado 18 nuevas variedades, donde se incluyen variedades tan conocidas como ‘Flame Seedless’, mejorada por John Weinberger y liberada en 1973, la que se ha convertido en la principal variedad rosada a nivel mundial. Posteriormente, D. Ramming (USDA-Fresno) ha presentado muchas selecciones promisorias, algunas de las cuales se han convertido en importantes variedades como es el caso de ‘Crimson Seedless’, liberando en los últimos cuatro años las variedades ‘Autumn King’, ‘Sweet Scarlet’ y ‘Scarlet Royal’. Los principales objetivos del programa son obtener variedades sin semilla, de gran calibre, con buena aptitud de transporte y almacenaje, de colores blancos, negros y rojos que maduren en diferentes épocas; dando énfasis al desarrollo de uvas blancas tempranas con gran calibre, bajo requerimiento de mano de obra para arreglos de racimos, buen desarrollo de azúcar y una apariencia atractiva. También están enfocados en obtener variedades con excelente calidad de fruta que incorporen además resistencia a enfermedades como el oídio, causada por el y la enfermedad de Pierce, causada por la bacteria *Xylella fastidiosa*. El programa también desarrolla marcadores moleculares para ambas fuentes de resistencia (Ramming et al., 2011; Ramming et al., 2012).

Además, USDA posee dos grandes colecciones públicas de germoplasma de uva, una se encuentra en Geneva, Nueva York y la otra en Davis, California. La colección de Geneva opera en conjunto con la Universidad de Cornell y se especializa en uvas adaptadas a climas fríos. El repositorio de Davis contiene una gran colección de material proveniente de todo el mundo. El listado de materiales disponibles de ambos sitios incluye variedades comerciales de uva de uso actual, especies nativas y materiales provenientes de programas

de mejoramiento que pueden ser interesantes para los mejoradores, investigadores e incluso académicos.

En el Departamento de Viticultura y Enología de UC-Davis, que data desde 1931, el Dr. Andrew Walker trabaja en mejoramiento genético de portainjertos con resistencia a nematodos, resistencia GFLV (Hwang et al., 2010), filoxera y salinidad (Ferris et al., 2012; Grzegorzczak y Walker, 1998; Jin y Walker, 1999), mejoramiento para incorporar resistencia a oídio y enfermedad de Pierce principalmente en uva vinífera (Ferris et al., 2012), estudiando además la genética de la resistencia a estas enfermedades, su heredabilidad, mapeo de genes y desarrollo de marcadores moleculares asociados (Riaz et al., 2009; Riaz et al., 2007b). En la Universidad de Cornell, el Dr. Bruce Reisch trabaja en mejoramiento genético de uva de mesa, para vino, jugo y climas fríos. También desarrolla portainjertos con resistencia a filoxera, nematodos, tolerancia a calcio, desarrollo radicular que potencie tolerancia a sequía, frío y transgenia (Cheng y Reisch, 1989; Kikkert et al., 2009; Lodhi y Reisch, 1995; Vidal et al., 2006b).

El programa de mejoramiento de la Universidad de Arkansas es el mayor programa de mejoramiento de uva de mesa de los EUA fuera de California (Clark, 1997). Esta zona es de mucho frío invernal y gran pluviometría en verano, por lo que en la región existe una alta incidencia de enfermedades fungosas, lo que no permite el uso de variedades tradicionales de *V. vinifera*. Por esta razón, han desarrollado variedades híbridas con *V. labrusca*, especie más adaptada a las condiciones climáticas de la zona. Algunas características de calidad buscadas son la resistencia al frío invernal, variedades sin semilla de mejor calidad, resistencia a la partidura (“cracking”) y resistencia a enfermedades. Las principales variedades liberadas por este programa han sido ‘Sunbelt’ (para jugo), ‘Venus’, ‘Reliance’, ‘Mars’, ‘Saturn’, ‘Júpiter’ y ‘Neptune’. Todas ellas son híbridos *V. vinifera* x *V. labrusca* sin semilla, con sabor moscatel a “foxy”, característico de *V. labrusca*. Una de las características de calidad buscada en este programa es el tipo de piel de la baya. Las variedades de *V. labrusca* tienen un tipo de piel muy suelta, la cual se desprende con facilidad al apretar la baya (“slipskin”). Esta característica se transmite fácilmente a los híbridos con *V. vinifera*, se asocia a baja calidad por los consumidores y presenta problemas de post-cosecha (Clark, 1997; Stafne y Clark, 2013).

El aporte de los capitales privados también se ha canalizado hacia la búsqueda de nuevas variedades de vides. En California empresas comerciales como “Sunworld” (Dr. Michael Striem) e “International Fruit Genetic” (Dr. David Cain) tienen potentes programas de mejoramiento genético de uva de mesa. Los objetivos principales son sabor, calibre, firmeza, apirenia, uniformidad del tamaño de la baya, buen color y apariencia, buena estructura de raquis, buena aptitud de transporte y almacenaje, mejorar la estructura del racimo para reducir costos de producción, resistencia a enfermedades y madurez para nichos específicos de mercado (Cain et al., 1984; Klein et al., 2000). El segundo programa mencionado, además de los objetivos mencionados, incluye obtención de sabores exóticos y moscatel, alta productividad, bajo desgrane y tolerancia a la sequía (patentes US20070163017A1, US20070163018P1).

Los países europeos han desarrollado programas de mejoramiento que implican la generación de grandes colecciones de germoplasmas como producto final. En Italia, uno de estos programas pertenece a la Universidad de Udine que es parte importante del grupo de investigación de uva y cuenta con un banco de germoplasma que además de especies nativas incluye cultivares locales e internacionales y líneas mejoradas que incorporaron genes de resistencia a enfermedades (Riaz et al., 2007a). Las principales variedades de uva mesa usadas son ‘Regina’ e ‘Italia’. ‘Regina’ es una de las variedades de mesa más antigua, apreciada por su sabor y apariencia, blanca, grande y elíptica. ‘Italia’, obtenida por el Prof. Pirovano en 1911 mediante la cruce de las especies ‘Bicane’ con ‘Moscatto d’Ambrogio’. Esta es una de las uvas de mesa mayormente comercializada en el mundo y muy apreciada por su sabor levemente moscatel, su apariencia y su firmeza (ZIPMEC, 2013). Existen 343 variedades registradas, una vasta lista de variedades nativas que han sido colectadas y analizadas (Gay-eynard y Mannini, 1998).

En Francia, el INRA (“Institut national de la recherche agronomique”) de Montpellier, mantiene la mayor colección de recursos genéticos de vid, con 2.262 genotipos únicos de 38 países diferentes, los que representan la mitad del total de cultivares de uva existentes. Esta colección ha sido genotipada mediante microsatélites (SSR) y fenotipada para 50 atributos morfológicos (Le Cunff et al., 2008; This et al., 2006). El INRA ha trabajado durante décadas en mejoramiento genético de vides por métodos convencionales, apoyados en años recientes por métodos biotecnológicos. Este trabajo ha considerado vides para vino, mesa, portainjertos y ha estado orientado hacia mejorar la resistencia al oídio y el mildiú, resistencia al nematodo *Xiphinema index* y a la transmisión del virus GFLV, a la obtención de variedades apirenas, de buen calibre, color, textura, y que soporten el frío invernal (-25°C) (Bouquet et al., 2006). La primera variedad aceptada en el registro de variedades de Francia fue ‘Danuta’, blanca, apirena, sin requerimientos de GA₃ para crecimiento de bayas, obtenida en 1964. Otras variedades liberadas han sido ‘Madina’, ‘Ora’, ‘Carla’, ‘Alvina’ y ‘Prima’, entre otras (Hinrichsen et al., 2006).

El Instituto de Mejoramiento de la Vid de Alemania (Geilweilerhof), concentra sus investigaciones en variedades resistentes a enfermedades, variedades resistentes a estrés abiótico como sequía y frío, estudio de compuestos determinantes de sabor y aromas (Riaz et al., 2007a; Riaz et al., 2007b). El Instituto mantiene colecciones de germoplasma de la especie, incluyendo uva de mesa y maneja la base de datos *Vitis* (<http://www.eu-vitis.de>), donde se describen las principales características de unas 18.000 accesiones, incluyendo datos ampelográficos, sinonimias, origen, parentesco, existencias en los bancos y usos (Hinrichsen et al., 2006).

En España, el IMIDA (Instituto murciano de investigación y desarrollo agrario y alimentario) de Murcia, tiene un programa de mejora genética de uva de mesa dirigido por el Dr. Juan Carreño, cuyo objetivo es la obtención de variedades apirenas de alta calidad productiva y organoléptica, que se cosechen en diferentes épocas del año, de modo de ampliar el calendario productivo, que sean poco exigentes en técnicas de cultivo y de buena calidad de racimos y bayas (Carreño et al., 2005; López-Pérez et al., 2005). El programa está apoyado por el uso de marcadores genéticos moleculares que permiten la evaluación precoz de los caracteres más importantes de calidad y productividad. Para ello se trabaja en la construcción de un mapa genético utilizando marcadores moleculares (microsatélites y

otros), para el mapeo de los loci responsables de caracteres poli-génicos como la apirenia, precocidad, tamaño de baya, fertilidad de yemas, el sabor y firmeza de la baya (Hinrichsen et al., 2006).

En Israel, la Organización de Investigación Agronómica (ARO) en el centro Volcani, desarrolla el programa de mejoramiento genético, donde se han considerado aspectos como la época de madurez, firmeza y naturaleza crocante del fruto, alto contenido de azúcar, aromas especiales, racimos sueltos y uniformes, bayas naturalmente grandes, buena post-cosecha y bajos costos de manejo, especialmente dirigido a bajo requerimiento de GA₃ para crecimiento. Las principales variedades liberadas por este programa son ‘Prime’, ‘Vered’, ‘Mystery’, ‘Spring Blush’, ‘Green-finger’, ‘Red-finger’ y ‘Black-finger’. Otro de los aspectos de calidad enfocados por este programa es la obtención de variedades sin semilla. En este sentido han trabajado en la eliminación de las semillas de plantas transgénicas de ‘Red Globe’ y selecciones locales mediante la incorporación de genes que producen ablandamiento de la cubierta seminal o la incorporación de un gen para la expresión de estreptavidina, proteína obtenida de *Streptomyces avidinii* que se une fuertemente a la biotina en los estados embriogénicos tempranos, impidiendo la formación de la semilla (Ginzberg et al., 2004; Hanania et al., 2009; Perl et al., 1996).

En Australia, el CSIRO tiene un programa de mejoramiento genético en vides de mesa, apoyado por estudios genómicos, orientados al color y aroma, calidad de fruta, en aspectos como genes reguladores de floración y desarrollo de frutos, resistencia a enfermedades, y cómo afecta el manejo agronómico la actividad y expresión de estos genes. La post-cosecha también es un área de fuerte estudio, para ayudar a los exportadores a llegar con productos de calidad a los mercados distantes. El programa de mejoramiento de uva de mesa ha liberado la variedad ‘Maroo Seedless’, negra, grande, sin semilla y ‘Millennium Muscat’, temprana con semilla y de sabor moscatel. Además del programa de uva de mesa, desde 1960 han desarrollado un programa de mejoramiento de vino y portainjertos. La producción en Australia se ha basado en clones seleccionados por CSIRO o variedades entregadas por ellos (Wei et al., 2002).

En Sudáfrica, el Centro Tecnológico de Investigación de Frutas y Alimentos en Stellenbosch el mejoramiento en uva de mesa ha estado orientado a la obtención de variedades sin semilla, tardías o rosadas de media estación, de fácil manejo agronómico y de buena aptitud de post-cosecha tales como ‘Regent’, ‘Sun-Red Seedless’, ‘Sundance’, ‘Muscat Seedless’, ‘Regal Seedless’ y ‘Lady Ann’ (Burger y Botha, 2004).

En Chile, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) inició el año 1986 en el Centro Regional de Investigación La Platina, un programa de mejoramiento, con el objetivo de desarrollar variedades de calidad y prolongada vida de post-cosecha. El énfasis del programa de mejoramiento chileno está en la obtención de variedades apirenas, para lo cual se recurre principalmente al cruzamiento de padres no semillados y al posterior rescate de embriones con el objeto de optimizar la obtención de progenies sin semilla (Hewstone et al., 2006; Pommer et al., 1995). A la fecha se han realizado más de 550 cruzamientos entre variedades comerciales de diferentes colores y épocas de maduración (‘Beauty’, ‘Superior Seedless’, ‘Flame Seedless’, ‘Perlette’, ‘Thompson Seedless’, ‘Centennial’, ‘Red Seedless’, ‘Black Seedless’, ‘Ruby Seedless’, etc.), incorporándose durante los últimos años

segregantes promisorios obtenidos en el propio programa. Hasta el año 2006, se generaban anualmente entre 500-850 segregantes, logrando registrar el año 2006 las primeras dos variedades: ‘Ilusión’, que se caracteriza por producir racimos cónicos de 750 a 1.000 g con bayas esféricas, parcialmente semilladas y de color ámbar a verde, con calibres de unos 20 mm y de sabor moscatel; e ‘Isela’, con racimos cónicos de 750 a 1.000 g y bayas de 20 mm sin semilla, de color verde y forma esférica, que se alargan cuando se les aplica GA₃ (Hewstone et al., 2006, 2007). A partir del año 2007 con el financiamiento del Consorcio de Biotecnología Frutícola S.A. el número anual de segregantes, obtenidos a partir del rescate de embriones desde semillas o rudimentos obtenidos de bayas polinizadas artificialmente, ha aumentado a 2.500 segregantes. Como producto de este trabajo, se han generado segregantes promisorios que reúnen diversas características de interés, evaluándose actualmente unas 20 selecciones a nivel pre-comercial en cinco o más sitios agroecológicos.

Actualmente, los principales objetivos de mejoramiento son apirenia, calibre, firmeza, uniformidad del tamaño de la baya, buena apariencia, buena aptitud de almacenaje y transporte, en uvas de diferentes colores y diferentes épocas de madurez. En los últimos años se ha incorporado la estructura de racimo, de modo de privilegiar la producción natural de racimos sueltos que permitan reducir costos de producción. La más reciente variedad presentada por INIA corresponde a “Iniagrape-one” (Uquillas et al., 2013), correspondiente a una variedad apirena, de color negro y de media estación, presenta una buena respuesta a la aplicación de GA₃, generando racimos cónicos, de tamaño medio-grande que pesan 600 a 800 g, lo que permite un fácil arreglo de racimos y cosecha. Con respecto a sus cualidades organolépticas, posee un excelente balance de sabor azúcar/acidez y bayas firmes no crocantes. Además de estas características, es óptima para su transporte y comercialización a largas distancias, su vida de post cosecha es por sobre los 90 días, los racimos mantienen excelente apariencia y sabor, el raquis se mantiene verde, las bayas no desgranar y es muy tolerante al desarrollo de hongos en el almacenaje. El programa de mejoramiento genético de uva cuenta con una colección de germoplasma, establecida en La Platina, que incluye unos 70 genotipos de vides de los cuales 41 corresponden a uva de mesa.

Mejoramiento genético no convencional

El uso de la mutagénesis inducida a través de radiaciones ionizantes o de productos químicos es una técnica que ha resultado en la obtención de un sin número de variedades de diferentes especies, mejoradas para caracteres de interés que no siempre están presentes en la especie. Variabilidad somaclonal y mutagénesis inducida con rayos gamma fueron descritos en el cv. 'Podarok Magaracha', en el que se indujo un 7% de tetraploidía (Kuksova et al., 1997). Por otro lado, en el trabajo de Khawale et al. (2004), fue generada una población de mutantes que fueron analizados mediante RAPD. El 36,6% de estos presentaron polimorfismos estables, por lo que fueron clonados in vitro y posteriormente transferidos a un invernadero, generando una de las primeras selecciones de mutantes seleccionados de manera específica mediante técnicas moleculares (Khawale et al., 2006).

Con la finalidad de inducir variabilidad genética mediante mutagénesis, fueron aplicadas diferentes dosis de etilmetanosulfonato (EMS), dietilsulfato y azida sódica (Acanda et al., 2014; Wallace et al., 2006). Los descendientes evaluados en terreno mostraron variabilidad en forma de bayas y racimos, fertilidad de flores (millerandaje), presencia y tamaño de rudimentos y semillas, color y época de madurez. En general, las mutaciones resultaron en fenotipos de inferior calidad que las variedades originales, exceptuando algunos casos, como una mutación de forma y color de baya del cv. 'Ruby Seedless'.

Un rasgo de gran interés a desarrollar es la resistencia a hongos. La introducción de esta resistencia mediante mejoramiento no convencional, utilizando prototipos identificados, podría incrementar la producción y a la vez, reduciría los costos derivados de la aplicación de fungicidas, con la subsecuente reducción en la contaminación ambiental y en los riesgos que la aplicación de estos productos ejerce sobre los trabajadores. En las especies del género *Vitis*, se han encontrado fuentes genéticas de resistencia a muchas enfermedades fúngicas y su transferencia a cultivares de *Vitis vinifera* ha sido parcialmente exitosa, ya que no han sido generadas variedades comerciales mediante transformación genética, pero sí se han desarrollado varios híbridos interespecíficos de gran interés (Balík et al., 2013; Li et al., 2011; Thimothe et al., 2007), los que podrían posibilitar la introgresión de sus genes de tolerancia a enfermedades fúngicas hacia cultivares de interés. Por lo tanto, el uso de procedimientos alternativos tales como la transformación genética de vid ha llegado a ser de especial interés a partir del año 1996 (Kikkert et al., 1996), principalmente apoyada por el uso de los sistemas de embriogénesis somáticas, los cuales están en continuo desarrollo y optimización (Li et al., 2008; Tapia et al., 2009).

Es posible generar, mediante la transformación genética de *Vitis*, la transferencia de genes que sobre-expresan proteínas o sustancias antifúngicas producidas por plantas (Coutos-Thevenot et al., 2001; Hain et al., 1993), incrementando la reacción de hipersensibilidad por la expresión de algunos genes de sus rutas (Chen et al., 1996; Punja, 2006; Rommens et al., 1995), o por la transferencia de genes que codifican péptidos antimicrobiales (Li et al., 2001; Vidal et al., 2006a; Vidal et al., 2006b) o enzimas antifúngicas como quitinasas o glucanasas de plantas (Chye et al., 2005; Vellicce et al., 2006; Yamamoto et al., 2000), levaduras (Carstens et al., 2003), hongos microparásitos (Bolar et al., 2001; Carsolio et al., 1999; Emani et al., 2003; Esposito et al., 2000; Liu et al., 2004), entre otros.

Una alternativa para reducir la incidencia de *Botrytis* es la introducción de genes que exacerben los sistemas de defensa de las plantas. El primer trabajo en esta línea lo constituye la introducción del gen que codifica para la enzima estilbeno sintetasa (STS, EC 2.3.1.146) de vid en plantas de tabaco. En las plantas transformadas con este gen se incrementaron los niveles endógenos de la fitoalexina resveratrol concomitantemente a una mayor resistencia a la infección por *Botrytis* (Hain et al., 1993). Una segunda aproximación corresponde al uso de una endoquitinasa extracelular de 42kDa (*ech42*, EC 3.2.14) de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens*. Se ha descrito que esta quitinasa cumple un papel importante en el control biológico de *Botrytis cinerea* y otros patógenos (Woo et al., 2002; Woo et al., 2006).

El uso de estos genes ha permitido la generación de líneas transgénicas tolerantes en muchas especies de papa y tabaco (Lorito et al., 1998), manzana (Bolar et al., 2000); petunia (Esposito et al., 2000), brocoli (Mora-Avilés y Earle, 2004), algodón (Emani et al., 2003) y uva (Kikkert et al., 1996). Existen otras endoquitinasas identificadas en *Trichoderma* como *chi33*, proteína similar a las quitinasas tipo III de plantas (Limón et al., 1995), que han mostrado inducir fenotipos tolerantes en tabaco tanto para estrés biótico (*Rhizoctonia solani* y *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) como estrés abiótico (metales pesados) (Dana et al., 2006). Por otro lado, una quitinasa de mayor peso molecular aislada de *T. harzianum* P1, la N-acetyl- β -D-hexosaminidasa (*nag70*, EC 3.2.1.52) también ha sido usada en la generación de manzanas ‘Marshall McIntosh’ para generar líneas transgénicas tolerantes a *Venturia inaequalis* (Bolar et al., 2001). La actividad sinérgica obtenida utilizando la combinación de estos genes de enzimas quitinolíticas de *Trichoderma spp.* ha sido ampliamente usada permitiendo la generación de altos niveles de tolerancia cuando están juntos (Bolar et al., 2001; Dana et al., 2006; Liu et al., 2004)

Gracias a dos grandes programas de mejoramiento no convencional de vitis, en territorio nacional se ha desarrollado la plataforma de transformación genética y cultivo *in vitro* de material generado mediante embriogénesis somática, utilizado principalmente en la obtención de plantas de vid transgénicas resistentes a fitopatógenos (Tapia et al., 2009). Las vides transgénicas desarrolladas como productos finales de estos proyectos, expresan genes de quitinasas de *Trichoderma spp.* en niveles que permiten reducir el impacto de la infección de la pudrición gris y oídio sobre la planta, resultados detallados en profundidad en la próxima sección.

Vides tolerantes a *Botrytis cinerea*

En Chile, desde el año 2000 se han llevado a cabo dos proyectos FONDEF, de los cuales se derivó la plataforma de transformación genética de vid cultivar ‘Thompson Seedless’ (Reyes et al., 2005). En el marco del proyecto FONDEF D99I1001, fue iniciada una línea de investigación y desarrollo para lograr el mejoramiento genético de la vid mediante transgenia. En dicho proyecto, se logró optimizar la metodología de transformación genética para introducir en vides genes relacionados con la resistencia al ataque de hongos fitopatógenos. Como producto final de esta primera etapa, se obtuvieron plantas transformadas, las que fueron evaluadas durante la ejecución del segundo proyecto FONDEF D01I1064. Ambos proyectos posicionaron a Chile en la frontera de la biotecnología aplicada a vides, la especie frutal de mayor relevancia para el país.

Estos proyectos, desarrollados íntegramente por INIA-La Platina, permitieron la implementación de sistemas de embriogénesis somática y transformación genética de la variedad ‘Thompson Seedless’ utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (sin. *Rhizobium radiobacter*) como aproximación técnica, para generar fuente de resistencia en el uso de genes estudiados ampliamente y que codifican para enzimas quitinolíticas o quitinasas (EC 3.2.1.14) o que emplean la tecnología de péptidos antimicrobianos (Vidal et al., 2006b; Vidal et al., 2003) (Cuadro 2).

En la generación de las líneas genéticamente modificadas (GM), se utilizaron dos clones de la variedad ‘Thompson Seedless’: el clon TS, (procedente de Agrícola Brown) y el clon GI (procedente de la Universidad de Cornell). La mayoría de las líneas obtenidas a partir de este programa se desarrollaron utilizando los genes *chi42* y *nag70* de *Trichoderma harzianum* P1, y el gen *chi33* proveniente de un aislado local de *Trichoderma virens*. Alrededor de 3.000 líneas fueron establecidas exitosamente en invernadero, de las cuales 103 líneas representadas en 568 plantas GM se liberaron a un campo de bioseguridad en Septiembre de 2004. Durante los periodos comprendidos entre 2006 y 2009, fueron evaluadas *ex vivo* las 568 líneas, mediante ensayos de infección utilizando *Botrytis cinerea* y analizando la capacidad de tolerar o resistir a nivel foliar, el daño producido por el hongo (Hinrichsen et al., 2004).

Cuadro 2.- Genes utilizados en el programa de transformación genética de INIA-La Platina (Proyectos FONDEF D99I1001 y D01I1064).

Genes	Fuente
Endoquitinasas	<i>Trichoderma atroviride</i>
Exoquitinasa	<i>Staphylococcus aureus</i>
N-acetilglucosamina	<i>Trichoderma atroviride</i>
Glucanasas	<i>Trichoderma atroviride</i>
Indolicina Reversa	Péptido sintético
Magainina	Péptido sintético

En forma adicional, en la temporada 2007-9 se realizó en el total de la población, la primera evaluación de campo para determinar su grado de infección por oídio bajo la presión natural a esta enfermedad que se registra durante la temporada estival en el sector de La Platina. Esta evaluación también fue ampliada a la determinación de algunas de las características agronómicas básicas que presentaba la población, como la presencia de frutos, forma de hojas, número de frutos por planta, entre otras.

Posterior a estos, fueron desarrollados dos proyectos focalizados en la aplicación de las plataformas implementadas. Es así como para el desarrollo de los proyectos FONDEF G02P1002 y G07I1003, fue necesario establecer un consorcio para la investigación en genómica de vegetales, incluyendo el modelo de *Vitis vinifera*. El desarrollo de estos programas involucró la participación de Universidades estatales y privadas, Institutos de investigación agropecuaria y a representantes del sector productivo privado, lo que constituyó una red de investigación con la masa crítica requerida para un programa de genómica funcional de vid que apunta a características de alto valor productivo y de calidad y que a la vez, establece los fundamentos para otros proyectos futuros. Inicialmente, fue desarrollado el estudio genómico de una progenie experimental diseñada *ad hoc* y que permita el desarrollo de un mapa genético de la vid; seguidamente, este trabajo permitió la identificación, generación y validación de marcadores moleculares que permiten la selección temprana de ciertos caracteres de interés. Además, al contar con aporte de privados, fue indispensable generar una serie de productos como la generación de nuevas líneas transgénicas de vid y nuevas variedades producidas utilizando las nuevas técnicas genómicas que fueron desarrolladas e instrumentos de propiedad intelectual, derivada de los productos anteriores, bajo un contexto de administración y promoción por parte de BioFrutales S.A. (FONDEF G09I1007).

En el presente trabajo, publicado recientemente en la revista *Transgenic Research* se describe, de manera sistematizada, los primeros resultados generados a partir de la evaluación de estas líneas contra infección fúngica durante tres temporadas consecutivas. Se definieron las mejores líneas tolerantes en esta población de plantas GM, utilizando para ellos los niveles de infección obtenidos en sistemas de laboratorio diseñados específicamente para *B. cinerea*, más los niveles de infección determinados en campo para la presión natural de oídio en el mencionado campo de bioseguridad. Se utilizaron diversos análisis estadísticos para determinar un grupo de plantas GM y se realizó la caracterización molecular de las líneas tolerantes a la infección fúngica para definir el mejor prototipo dentro de esta población.

Conclusión

Con la intención de obtener características deseables en vides que poseen un alto impacto económico, se han desarrollado programas de mejoramiento genético enfocados al desarrollo de nuevas variedades. Debido a que la aproximación desde el mejoramiento convencional ha sido parcialmente exitosa en la obtención de variedades con mejores cualidades organolépticas pero deficientes en su respuesta a uno o más tipos de estrés biótico y/o abiótico, el mejoramiento genético no convencional se ha presentado como una solución frente a este problema por tratarse de una herramienta biotecnológica que a la fecha ha entregado resultados promisorios frente al desarrollo de nuevos cultivares comerciales en otras especies.

El Consorcio Biofrutales S.A. mediante un proyecto INNOVA-Chile, generó una propuesta con la cual se aumentó significativamente el impacto del actual Programa de Mejoramiento Genético de Vides de Mesa desarrollado por INIA. La investigación y desarrollo de tecnologías de mejoramiento genético incluyeron el establecimiento de una plataforma de transformación genética al mismo tiempo que el acceso a la base de datos que contiene el genoma de la vid permitió explorar los recursos genéticos, genómicos y moleculares para ofrecer soluciones mediante el uso de mejoramiento genético no convencional.

Los productos resultantes de la integración del programa de mejoramiento, la plataforma de transformación genética y los estudios genómicos descritos, se resumen en la generación de nuevas variedades producidas utilizando las técnicas desarrolladas en cultivo y propagación de tejido *in vitro*, permitiendo enfrentar el desafío de obtener variedades tolerantes tanto a enfermedades fúngicas (Rubio et al., 2015) como al estrés salino (Aguirre, 2015)

Finalmente, la participación del sector privado formando parte activa de esta iniciativa, requiere que los productos obtenidos se consoliden comercialmente mediante la obtención de propiedad intelectual de las tecnologías y variedades que se han desarrollado, por lo que nos encontramos en la parte final del proceso, donde es hora de exhibir los productos e incorporarlos a un sistema agrícola productivo.

Bibliografía

Acanda, Y., O. Martínez, M. Prado, M. González y M. Rey. 2014. EMS mutagenesis and qPCR-HRM prescreening for point mutations in an embryogenic cell suspension of grapevine. *Plant Cell Rep* 33, 471-481.

Aguirre, C. 2015. Estrés salino en vides: genes de respuesta y desarrollo de estrategias biotecnológicas para su uso en la generación de variedades tolerantes. INIA-La Platina, Comunicación personal, Universidad de Chile.

Alleweldt, G. y E. Dettweiler, 1994. The genetic resources of *Vitis*: World list of grapevine collections. BAZ IRZ Geilweilerhof.

Andret-Link, P., C. Schmitt-Keichinger, G. Demangeat, V. Komar y M. Fuchs. 2004. The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology* 320, 12-22.

Balík, J., M. Kumšta y O. Rop. 2013. Comparison of anthocyanins present in grapes of *Vitis vinifera* L. varieties and interspecific hybrids grown in the Czech Republic. *Chemical Papers* 67, 1285-1292.

Bolar, J.P., J.L. Norelli, G.E. Harman, S.K. Brown y H.S. Aldwinckle. 2001. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res* 10, 533-543.

Bolar, J.P., J.L. Norelli, K.W. Wong, C.K. Hayes, G.E. Harman y H.S. Aldwinckle. 2000. Expression of Endochitinase from *Trichoderma harzianum* in Transgenic Apple Increases Resistance to Apple Scab and Reduces Vigor. *Phytopathology* 90, 72-77.

Bouquet, A., L. Torregrosa, P. Iocco y M.R. Thomas. 2006. Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Methods Mol Biol* 344, 273-285.

Burger, A. y F. Botha. 2004. Ripening-related gene expression during fruit ripening in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and Clairette blanche. *Vitis* 43, 59-64

Cain, D.W., M.V. McKenry y R.E. Tarailo. 1984. A New Pathotype of Root-knot Nematode on Grape Rootstocks. *J Nematol* 16, 207-208.

Campbell, P., C. Bendek y B. Latorre. 2007. Riesgo de oídio (*Erysiphe necator*) de la vid en relación con el desarrollo de los racimos. *Ciencia e investigación agraria* 34, 5-11.

- Canessa, P., J. Schumacher, M. Hevia, P. Tudzynski y L. Larrondo. 2013. Assessing the effects of light on differentiation and virulence of the plant pathogen *Botrytis cinerea*: Characterization of the white collar complex. PLoS ONE 8, e84223.
- Carreño, J., R. Oncina, M. Tornel y I. Carreño. 2005. Obtención de nuevas variedades de uva de mesa mediante el cultivo in vitro de embriones. Agrícola Vergel. 283, 332-338.
- Carsolio, C., N. Benhamou, S. Haran, C. Cortes, A. Gutierrez, I. Chet y A. Herrera-Estrella. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Appl Environ Microbiol 65, 929-935.
- Carstens, M., M.A. Vivier y I.S. Pretorius. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the CTS1-2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to Transgenic tobacco. Transgenic Res 12, 497-508.
- Citovsky, V., G. Vos y P. Zambryski. 1988. Single-Stranded DNA Binding Protein Encoded by the virE Locus of *Agrobacterium tumefaciens*. Science 240, 501-504.
- Clark, J.R., 1997. Grapes, Brooks and Olmo register of fruit and nut varieties 3rd ed. ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 248-299.
- Cotten, J., J. Flegg y A. Popham. 1971. Population studies with *Xiphinema diversicaudatum* and *X. index* maintained under two temperature regimes Nematologica 16, 584-590.
- Coutos-Thevenot, P., B. Poinssot, A. Bonomelli, H. Yean, C. Breda, D. Buffard, R. Esnault, R. Hain y M. Boulay. 2001. In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. J Exp Bot 52, 901-910.
- Chen, G., Y. Zhang, J. Li, G.B. Dunphy, Z.K. Punja y J.M. Webster. 1996. Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. J Invertebr Pathol 68, 101-108.
- Cheng, Z. y B. Reisch. 1989. Shoot regeneration from petioles and leaves of *Vitis X labruscana* 'Catawba'. Plant Cell Rep 8, 403-406.
- Choquer, M., E. Fournier, C. Kunz, C. Levis, J.M. Pradier, A. Simon y M. Viaud. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. FEMS Microbiol Lett 277, 1-10.
- Christensen, P., N. Olsen, K. Krogh, T. Bacher y S. Laurberg. 2003. Scintigraphic assessment of retrograde colonic washout in fecal incontinence and constipation. Dis Colon Rectum 46, 68-76.
- Christie, P.J., J.E. Ward, S.C. Winans y E.W. Nester. 1988. The *Agrobacterium tumefaciens* virE2 gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. J Bacteriol 170, 2659-2667.

- Chye, M.L., K.J. Zhao, Z.M. He, S. Ramalingam y K.L. Fung. 2005. An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. *Planta* 220, 717-730.
- Dana, M., T. Pintor-Toro y B. Cubero. 2006. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol* 142, 722-730.
- Das, S. y D. Raski. 1968. Vector efficiency of *Xiphinema index* in the transmission of grapevine fanleaf virus. *Nematologica* 14, 55-62.
- De Kock, S. y G. Holz. 1992. Blossom-end rot of pears: systemic infection of flowers and immature fruit by *Botrytis cinerea*. *J Phytopathol* 135, 317 - 327.
- Duncan, R. y J. Stapleton. 1994. Seasonal dynamics of epiphytic mycoflora and insect vectors associated with the summer bunch rot complex of table grapes. . Cooperative extensión, University of California. 4, 1-3.
- Einset, J. y C. Pratt, 1975. Grapes, In: Janick J, M.N. (Ed.), *Advances in fruit breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, IN, pp. 130-153.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski y N. Delen, 2004. *Botrytis: biology, pathology and control*, Kluwer, Dodrecht.
- Emani, C., J. García, E. Lopata-Finch y M. Pozo. 2003. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Plant Biotechnol* 1, 321-326.
- Engel, E.A., P.F. Escobar, L.A. Rojas, P.A. Rivera, N. Fiore y P.D. Valenzuela. 2010. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. *J Virol Methods* 163, 445-451.
- Engelbrecht, D. y G. Kasdorf. 1984. Association of a closterovirus with grapevines indexing positive for grapevine leafroll disease and evidence for its natural spread in grapevine, Proceedings of the 8th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine.
- Engelbrecht, S., G.J. de Jager y E.J. van Rensburg. 1994. Evaluation of commercially available assays for antibodies to HIV-1 in serum obtained from South African patients infected with HIV-1 subtypes B, C, and D. *J Med Virol* 44, 223-228.
- Esposito, S., M. Colucci, L. Frusciante, E. Filippone, M. Lorito y R. Bresan. 2000. Antifungal transgenes expression in *Petunia hybrida*. . *Acta Hortic* 508, 157-161.
- FAOSTAT. 2014. Descriptors for grapevine (*Vitis* spp.). 2012 ed. Food And Agriculture Organization Of The United Nations, USA.

Feechan, A., S. Kabbara y I.B. Dry. 2011. Mechanisms of powdery mildew resistance in the Vitaceae family. *Mol Plant Pathol* 12, 263-274.

Fernandez-Baldo, M., J. Fernandez, S. Pereira, G. Messina, E. Salinas, J. Raba y M. Sanz-Ferramola. 2011. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay applied to the *Botrytis cinerea* quantification in tissues of postharvest fruits. *BMC Microbiology* 11, 220-228.

Ferris, H., L. Zheng y M.A. Walker. 2012. Resistance of Grape Rootstocks to Plant-parasitic Nematodes. *J Nematol* 44, 377-386.

FIA. 2014. Criterios para Priorizar Proyectos de Desarrollo de Variedades, In: Unidad de Investigación, D.e.I., Subsecretaría de Agricultura (Ed.). Ministerio de Agricultura, <http://www.minagri.gob.cl/wp-content/uploads/2014/03/Criterios-para-Priorizar-Proyectos-de-Desarrollo-de-Variedades-3.pdf>.

Fuchs, M.F. 2007. Grape leafroll disease, In: Program Factsheet, C.U. (Ed.), www.nysipm.cornell.edu/factsheets/grapes/diseases/grape_leafroll.pdf

Gadoury, D.M., L. Cadle-Davidson, W.F. Wilcox, I.B. Dry, R.C. Seem y M.G. Milgroom. 2012. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Mol Plant Pathol* 13, 1-16.

Gay-eynard, G. y F. Mannini. 1998. Italian grapevine germoplasm. *Bulletin de l'OIV* 7, 738-755.

Ginzberg, I., A. Perl, M. Genser, S. Wininger, C. Nemas y Y. Kapulnik. 2004. Expression of streptavidin in tomato resulted in abnormal plant development that could be restored by biotin application. *Journal of Plant Physiology* 161, 611-620.

Giraud, T., D. Fortini, C. Levis, P. Leroux y Y. Brygoo. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Mol Biol Evol* 14, 1177-1185.

Grzegorzczak, W. y M. Walker. 1998. Evaluating resistance to grape phylloxera in *Vitis* species with an in vitro dual culture assay. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 17-22.

Hain, R., H.J. Reif, E. Krause, R. Langebartels, H. Kindl, B. Vornam, W. Wiese, E. Schmelzer, P.H. Schreier, R.H. Stocker y et al. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153-156.

Hanania, U., M. Velcheva, N. Sahar, M. Flaishman, E. Or, O. Degani y A. Perl. 2009. The ubiquitin extension protein S27a is differentially expressed in developing flower organs of Thompson seedless versus Thompson seeded grape isogenic clones. *Plant Cell Rep* 28, 1033-1042.

- 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, 124-132.
- Hewstone, N., J. Valenzuela y C. Muñoz. 2007. ISELA-INIA, Nueva Variedad de Uva de Mesa. *Agricultura Técnica* 67, 201-204.
- Hinrichsen, P., N. Hewstone, J. Valenzuela, H. Prieto y C. Muñoz, 2006. Mejora de la calidad de la uva de mesa, In: Llácer, G., Díez, M.J., Carrillo, J.M. & Badenes, M.L., ed (Ed.), *Mejora genética de la calidad en plantas*. Soc. Española de Ciencias Hortícolas, Soc. Española de Genética and Univ. Politécnica de Valencia. Valencia, Spain, September 2006., Valencia, España, pp. 497-522.
- Hinrichsen, P., M.A. Reyes, A. Castro, E. Blanchard, S. Araya, M. Garnier, F. Reyes, P. Dell'Orto, M. Moynihan, H. Prieto y C. Muñoz. 2004. Genetic transformation of grapevines with *Trichoderma harzianum* and antimicrobial peptide genes for improvement of fungal tolerance. *Acta Hort.* 689, 469-474.
- Hwang, C.-F., K. Xu, R. Hu, R. Zhou, S. Riaz y M.A. Walker. 2010. Cloning and characterization of XiR1, a locus responsible for dagger nematode resistance in grape. *Theor Appl Genet* 121, 789-799.
- Jarvis, W.D. 1994. Latent infections in the pre- and postharvest environment. *Hort Science* 29, 749 - 751.
- Jin, Y. y M.A. Walker. 1999. Breeding *Vitis rupestris* x *Muscadinia rotundifolia* rootstocks to control *Xiphinema index* and fanleaf degeneration. *Acta Horticulturae* 528, 511-515.
- Jones, L., S. Riaz, A. Morales-Cruz, K. Amrine, B. McGuire, W. Gubler, M. Walker y D. Cantu. 2014. Adaptive genomic structural variation in the grape powdery mildew pathogen, *Erysiphe necator*. *BMC Genomics* 15, 1081.
- Keller, M., O. Viret y F.M. Cole. 2003. *Botrytis cinerea* Infection in Grape Flowers: Defense Reaction, Latency, and Disease Expression. *Phytopathology* 93, 316-322.
- Khawale, R.N., S.K. Singh, Y. Vimala y G. Minakshi. 2006. Assessment of clonal fidelity of micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plants by RAPD analysis. *Physiol Mol Biol Plants* 12, 189-192.
- Kikkert, J.R., D. Hebert-Soule, P.G. Wallace, M.J. Striem y B.I. Reisch. 1996. Transgenic plantlets of 'Chancellor' grapevine (*Vitis* sp.) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Rep* 15, 311-316.
- Kikkert, J.R., J.R. Vidal, P.G. Wallace, S. Garcia-Zitter, W.F. Wilcox, D.M. Gadoury, R.C. Seem, T.J. Burr, C. Rosenfield, S. Samuelian y B.I. Reisch. 2009. Disease resistance analyses of transgenic grapevines that contain endochitinase or antimicrobial peptide genes. *Acta Hort.* 827, 379-384

- Klein, I., M. Striem, L. Fienberstein y Y. Mani. 2000. Irrigation and fertigation effects on phosphorus and potassium nutrition of wine grapes. *Vitis* 39, 55.
- Krastanova, S.V., V. Balaji, M.R. Holden, M. Sekiya, B. Xue, E.A. Momol y T.J. Burr. 2010. Resistance to crown gall disease in transgenic grapevine rootstocks containing truncated virE2 of *Agrobacterium*. *Transgenic Res* 19, 949-958.
- Kuksova, V., N. Piven y Y. Gleba. 1997. Somaclonal variation and in vitro induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49, 17-27.
- Le Cunff, L., A. Fournier-Level, V. Laucou, S. Vezzulli, T. Lacombe, A.-F. Adam-Blondon, J.-M. Boursiquot y P. This. 2008. Construction of nested genetic core collections to optimize the exploitation of natural diversity in *Vitis vinifera* L. subsp. *sativa*. *BMC Plant Biol* 8, 31.
- Leroch, M., M. Kretschmer y M.P. Hahn. 2011. Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology* 159, 63–65. .
- Li, Z., S.A. Dhekney, M. Dutt y D.J. Gray. 2008. An improved protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93, 311-321.
- Li, Z.T., S.A. Dhekney y D.J. Gray. 2011. PR-1 gene family of grapevine: a uniquely duplicated PR-1 gene from a *Vitis* interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* 30, 1-11.
- Li, Z.T., S. Jayasankar y D.J. Gray. 2001. Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*). *Plant Science* 160, 877-887.
- Limón, M.C., J. Lora, I. García, J. de la Cruz, A. Llobell, T. Benítez y J. Pintor-Toro. 1995. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 28, 478-483.
- Liu, M., Z. Sun, J. Zhu, T. Xu, G. Harman y M. Lorito. 2004. Enhancing rice resistance to pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. *J. Zhejiang Univ Sci* 5, 133–136.
- Lodhi, M.A. y B.I. Reisch. 1995. Nuclear DNA content of *Vitis* species, cultivars, and other genera of the Vitaceae. *Theor Appl Genet* 90, 11-16.
- López-Pérez, A.J., J. Carreño, A. Martínez-Cutillas y M. Dabauza. 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis* 44, 79-85.
- Lorito, M., S.L. Woo, I.G. Fernandez, G. Colucci, G.E. Harman, J.A. Pintor-Toro, E. Filippone, S. Muccifora, C.B. Lawrence, A. Zoina, S. Tuzun y F. Scala. 1998. Genes from

mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 7860-7865.

Mayo, M.A. y D.J. Robinson, 1996. Nepoviruses : molecular biology and replication. , In: Murant, B.D.H.A.F. (Ed.), The Plant Viruses. Plenum Press.

Mora-Avilés, M. y E. Earle. 2004. Expression of pathogenesis-related genes in transgenic broccoli and canola plants expressing the *Trichoderma harzianum*-endochitinase gene. Chapingo Serie Horticultura 10, 141-146.

Mullins, M.G., A. Bouquet y L.E. Williams. 1992. Biology of grapevine. , Cambridge University Press, Cambridge, Gran Bretaña p. 239.

ODEPA. 2014. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Chile., 2008 - 2013 ed.

OIV. 2014. Descriptors for grapevine (*Vitis* spp.). Office International de la Vigne et du Vin, Paris, 2010 ed.

Perl, A., O. Lotan, M. Abu-Abied y D. Holland. 1996. Establishment of an Agrobacterium-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-Agrobacterium interactions. Nat Biotechnol 14, 624-628.

Peterlunger, E., G. Di Gaspero, G. Cipriani, P. Sivilotti, T. Marrazzo, D. Andreetta y R. Testolin. 2003. Breeding strategy for the introgression of disease resistance genes in European grapevine., VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding, Kecskemét, Hungary.

Petersen, C.L. y J.G. Charles. 1997. Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. Plant Pathology 46, 509-515.

Pinilla, A. y C. Álvarez. 2002. Situación de la pudrición ácida en uvas de mesa en Chile. . XII Congreso nacional de fitopatología.

Pommer, C.V., D.W. Ramming y R.L. Emershad. 1995. Influence of grape genotype, ripening season, seed trace size, and culture date on in ovule embryo development and plant formation. Bragantia 54, 237-249.

Powelson, R.L. 1960. Initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea* in vitro. Phytopathology 50, 491-494.

Punja, Z.K. 2006. Recent developments toward achieving fungal disease resistance in transgenic plants. Canadian Journal of Plant Pathology 28, S298-S308.

Ramming, D.W., F. Gabler, J. Smilanick, M. Cadle-Davidson, P. Barba, S. Mahanil y L. Cadle-Davidson. 2011. A single dominant locus, *ren4*, confers rapid non-race-specific resistance to grapevine powdery mildew. Phytopathology 101, 502-508.

- Ramming, D.W., F. Gabler, J.L. Smilanick, D.A. Margosan, M. Cadle-Davidson, P. Barba, S. Mahanil, O. Frenkel, M.G. Milgroom y L. Cadle-Davidson. 2012. Identification of race-specific resistance in North American *Vitis* spp. limiting *Erysiphe necator* hyphal growth. *Phytopathology* 102, 83-93.
- Reyes, F., M.A. Reyes, A. Castro, S. Araya, P. Dell'Orto, M.R. Moynihan, C. Muñoz, H. Prieto y P. Hinrichsen. 2005. A mid-scale platform for genetic transformation of different grapevine varieties: use of 'Thompson Seedless' as a model, International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species. , Daytona Beach, FL, USA.
- Riaz, A., S.K. Gardezi y M. O'Reilly. 2010. Pseudo ventricular tachycardia: a case report. *Ir J Med Sci* 179, 295-296.
- Riaz, S., A. Doligez, R.J. Henry y M.A. Walker, 2007a. Grape, In: Kole, C. (Ed.), *Genome mapping and molecular breeding in plants*, pp. 63-101.
- Riaz, S., A.C. Tenschler, R. Graziani, A.F. Krivanek, D.W. Ramming y M.A. Walker. 2009. Using Marker-Assisted Selection to Breed Pierce's Disease-Resistant Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 60, 199-207.
- Riaz, S., S. Vezzulli, E.S. Harbertson y M.A. Walker. 2007b. Use of Molecular Markers to Correct Grape Breeding Errors and Determine the Identity of Novel Sources of Resistance to *Xiphinema index* and Pierce's Disease. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 494-498.
- Rommens, C.M., J.M. Salmeron, G.E. Oldroyd y B.J. Staskawicz. 1995. Intergenic transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. *Plant Cell* 7, 1537-1544.
- Stafne, E.T. y J.R. Clark. 2013. Arkansas Table Grape Cultivars. Mississippi State University, University of Arkansas, <http://www.extension.org/pages/67872/arkansas-table-grape-cultivars#.VMUV2f7F-fU>.
- Tapia, E., Á. Sequeida, Á. Castro, C. Montes, P. Zamora, R. López, F. Acevedo y H. Prieto. 2009. Development of grapevine somatic embryogenesis using an air-lift bioreactor as an efficient tool in the generation of transgenic plants. *Journal of Biotechnology* 139, 95-101.
- Thimothe, J., I.A. Bonsi, O.I. Padilla-Zakour y H. Koo. 2007. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* interspecific hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *J Agric Food Chem* 55, 10200-10207.
- This, P., T. Lacombe y M.R. Thomas. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* 22, 511-519.
- Uquillas, C., E. Torres, A. Ibacache y B. Defilippi. 2013. 'Iniagrape-one', a New Chilean Table Grape Cultivar. *HortScience* 48, 501-503.

- Vellicce, G., J.D. Ricci, L. Hernández y A. Castagnaro. 2006. Enhanced Resistance to *Botrytis cinerea* Mediated by the Transgenic Expression of the Chitinase Gene ch5B in Strawberry. *Transgenic Res* 15, 57-68.
- Vidal, J.R., J.R. Kikkert, B.D. Donzelli, P.G. Wallace y B.I. Reisch. 2006a. Biolistic transformation of grapevine using minimal gene cassette technology. *Plant Cell Rep* 25, 807-814.
- Vidal, J.R., J.R. Kikkert, M.A. Malnoy, P.G. Wallace, J. Barnard y B.I. Reisch. 2006b. Evaluation of transgenic 'Chardonnay' (*Vitis vinifera*) containing magainin genes for resistance to crown gall and powdery mildew. *Transgenic Res* 15, 69-82.
- Vidal, J.R., J.R. Kikkert, P.G. Wallace y B.I. Reisch. 2003. High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) containing npt-II and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep* 22, 252-260.
- Wallace, C.H., I. Baczko, L. Jones, M. Fercho y P.E. Light. 2006. Inhibition of cardiac voltage-gated sodium channels by grape polyphenols. *Br J Pharmacol* 149, 657-665.
- Wei, X., S. Sykes y P. Clingeleffer. 2002. An investigation to estimate genetic parameters in CSIRO's table grape breeding program. *Euphytica* 128, 343-351.
- Woo, S., V. Fogliano, F. Scala y M. Lorito. 2002. Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 353-356.
- Woo, S.L., F. Scala, M. Ruocco y M. Lorito. 2006. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology* 96, 181-185.
- Yamamoto, T., H. Iketani, H. Ieki, Y. Nishizawa, K. Notsuka, T. Hibi, T. Hayashi y N. Matsuta. 2000. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports.*, 639-646.
- ZIPMEC. 2013. Uva - historia, producción, comercio, In: S.r.l., E.A.d.I. (Ed.). ZIPMEC, Bologna, Italia.

CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO

Genetically engineered Thompson Seedless grapevine plants designed for fungal tolerance: selection and characterization of the best performing individuals in a field trial

Julia Rubio · Christian Montes · Álvaro Castro · Catalina Álvarez · Blanca Olmedo · Marisol Muñoz · Eduardo Tapia · Fernando Reyes · Marcelo Ortega · Evelyn Sánchez · María Miccono · Lorenza Dalla Costa · Lucia Martinelli · Mickael Malnoy · Humberto Prieto

Received: 17 January 2014 / Accepted: 12 June 2014
© Springer International Publishing Switzerland 2014

Abstract The fungi *Botrytis cinerea* and *Erysiphe necator* are responsible for gray mold and powdery mildew diseases, respectively, which are among the most devastating diseases of grapes. Two endochitinase (*ech42* and *ech33*) genes and one *N*-acetyl- β -D-hexosaminidase (*nag70*) gene from biocontrol agents related to *Trichoderma* spp. were used to develop a set of 103 genetically modified (GM) ‘Thompson Seedless’ lines (568 plants) that were established in open field in 2004 and evaluated for fungal tolerance starting in 2006. Statistical analyses were carried out considering transgene, explant origin, and plant response to both fungi in the field and in detached leaf assays. The results allowed for the selection of the 19 consistently most tolerant lines through two consecutive years (2007–2008 and 2008–2009 seasons). Plants from these lines were grafted onto the rootstock Harmony and established in the field in 2009

for further characterization. Transgene status was shown in most of these lines by Southern blot, real-time PCR, ELISA, and immunostrips; the most tolerant candidates expressed the *ech42–nag70* double gene construct and the *ech33* gene from a local *Hypocrea virens* isolate. *B. cinerea* growth assays in Petri dishes supplemented with berry juices extracted from the most tolerant individuals of the selected population was inhibited. These results demonstrate that improved fungal tolerance can be attributed to transgene expression and support the iterative molecular and physiological phenotyping in order to define selected individuals from a population of GM grapevines.

Keywords Botrytis tolerance · Transgenic grapevine · Field trial · Chitinase · ‘Thompson Seedless’

J. Rubio
Plant Sciences Master Program, Agricultural Sciences
Department, Universidad de Chile, Santiago, Chile

C. Montes · C. Álvarez · B. Olmedo · M. Muñoz ·
F. Reyes · E. Sánchez · M. Miccono · H. Prieto (✉)
Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Platina
Research Station, Santiago, Chile
e-mail: hprieto@inia.cl

Á. Castro · M. Ortega
Biotechnology Doctoral Program, Universidad de
Santiago de Chile, Santiago, Chile

E. Tapia
Biotechnology Doctoral Program, Universidad Técnica
Federico Santa María-Pontificia-Universidad Católica de
Valparaíso, Valparaíso, Chile

L. Dalla Costa · L. Martinelli · M. Malnoy
Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund
Mach, San Michele all’Adige, Italy

L. Martinelli
MUSE - Science Museum, Trento, Italy

b **Embryogenic callus induction** The buds of *C. glaberrima* (CVs) were cut from the apical and axillary buds with 2–4 leaves were cut from in vitro grown IS and GI plants. Buds were excised using a stereoscopic lens and incubated for callus induction in NB2 medium following the general procedures introduced by Li et al. (2001) by cultivation in darkness for 30 days at 24 ± 2 °C to form embryogenic callus. Pro-embryogenic masses were transferred to X6 medium (Li et al. 2001) and kept at the same temperature under a 16 h light/8 h darkness photoperiod for up to 90 days. Somatic embryos were harvested from the masses according to their developmental stage and maintained on the same medium. To induce development embryos at cotyledonary stage were transferred to C2D medium supplemented with 0.4 μM BA, 0.25 μM indolylacetic acid (IBA), 2 g/L glycine, and 0.5 g/L activated charcoal, and kept under the same conditions of temperature and photoperiod for 20 days. The total time involved in the entire induction and development process of the embryos was 140 days. Somatic embryos were used for the gene transfer experiments scored for the presence of the transgene.

Embryogenic callus induction The buds of *C. glaberrima* (CVs) were cut from the apical and axillary buds with 2–4 leaves were cut from in vitro grown IS and GI plants. Buds were excised using a stereoscopic lens and incubated for callus induction in NB2 medium following the general procedures introduced by Li et al. (2001) by cultivation in darkness for 30 days at 24 ± 2 °C to form embryogenic callus. Pro-embryogenic masses were transferred to X6 medium (Li et al. 2001) and kept at the same temperature under a 16 h light/8 h darkness photoperiod for up to 90 days. Somatic embryos were harvested from the masses according to their developmental stage and maintained on the same medium. To induce development embryos at cotyledonary stage were transferred to C2D medium supplemented with 0.4 μM BA, 0.25 μM indolylacetic acid (IBA), 2 g/L glycine, and 0.5 g/L activated charcoal, and kept under the same conditions of temperature and photoperiod for 20 days. The total time involved in the entire induction and development process of the embryos was 140 days. Somatic embryos were used for the gene transfer experiments scored for the presence of the transgene.

Embryogenic callus induction The buds of *C. glaberrima* (CVs) were cut from the apical and axillary buds with 2–4 leaves were cut from in vitro grown IS and GI plants. Buds were excised using a stereoscopic lens and incubated for callus induction in NB2 medium following the general procedures introduced by Li et al. (2001) by cultivation in darkness for 30 days at 24 ± 2 °C to form embryogenic callus. Pro-embryogenic masses were transferred to X6 medium (Li et al. 2001) and kept at the same temperature under a 16 h light/8 h darkness photoperiod for up to 90 days. Somatic embryos were harvested from the masses according to their developmental stage and maintained on the same medium. To induce development embryos at cotyledonary stage were transferred to C2D medium supplemented with 0.4 μM BA, 0.25 μM indolylacetic acid (IBA), 2 g/L glycine, and 0.5 g/L activated charcoal, and kept under the same conditions of temperature and photoperiod for 20 days. The total time involved in the entire induction and development process of the embryos was 140 days. Somatic embryos were used for the gene transfer experiments scored for the presence of the transgene.

b **Embryogenic callus induction** The buds of *C. glaberrima* (CV **AG 102**) were cut from the apical and axillary buds with 2–4 leaves were cut from in vitro grown IS and GS plants. Buds were excised using a stereoscopic lens and incubated for callus induction in NB2 medium following the general procedures introduced by Li et al. (2001) by cultivation in darkness for 30 days at 24 ± 2 °C to form embryogenic callus. Pro-embryogenic masses were transferred to X6 medium (Li et al. 2001) and kept at the same temperature under a 16 h light/8 h darkness photoperiod for up to 90 days. Somatic embryos were harvested from the masses according to their developmental stage and maintained on the same medium. To induce development embryos at cotyledonary stage were transferred to C2D medium supplemented with 0.4 μM BA, 0.25 μM indolbutyric acid (IBA), 2 g/L glycine, and 0.5 g/L activated charcoal, and kept under the same conditions of temperature and photoperiod for 20 days. The total time involved in the entire induction and development process of the embryos was 140 days. Somatic embryos were used for the gene transfer experiments scored for the presence of the transgene.

Embryogenic callus induction The buds of *C. glaberrima* (CV **AG 102**) were cut from the apical and axillary buds with 2–4 leaves were cut from in vitro grown IS and GS plants. Buds were excised using a stereoscopic lens and incubated for callus induction in NB2 medium following the general procedures introduced by Li et al. (2001) by cultivation in darkness for 30 days at 24 ± 2 °C to form embryogenic callus. Pro-embryogenic masses were transferred to X6 medium (Li et al. 2001) and kept at the same temperature under a 16 h light/8 h darkness photoperiod for up to 90 days. Somatic embryos were harvested from the masses according to their developmental stage and maintained on the same medium. To induce development embryos at cotyledonary stage were transferred to C2D medium supplemented with 0.4 μM BA, 0.25 μM indolbutyric acid (IBA), 2 g/L glycine, and 0.5 g/L activated charcoal, and kept under the same conditions of temperature and photoperiod for 20 days. The total time involved in the entire induction and development process of the embryos was 140 days. Somatic embryos were used for the gene transfer experiments scored for the presence of the transgene.

Embryogenic callus induction The buds of *C. glaberrima* (CV **AG 102**) were cut from the apical and axillary buds with 2–4 leaves were cut from in vitro grown IS and GS plants. Buds were excised using a stereoscopic lens and incubated for callus induction in NB2 medium following the general procedures introduced by Li et al. (2001) by cultivation in darkness for 30 days at 24 ± 2 °C to form embryogenic callus. Pro-embryogenic masses were transferred to X6 medium (Li et al. 2001) and kept at the same temperature under a 16 h light/8 h darkness photoperiod for up to 90 days. Somatic embryos were harvested from the masses according to their developmental stage and maintained on the same medium. To induce development embryos at cotyledonary stage were transferred to C2D medium supplemented with 0.4 μM BA, 0.25 μM indolbutyric acid (IBA), 2 g/L glycine, and 0.5 g/L activated charcoal, and kept under the same conditions of temperature and photoperiod for 20 days. The total time involved in the entire induction and development process of the embryos was 140 days. Somatic embryos were used for the gene transfer experiments scored for the presence of the transgene.

b **Embryogenic callus induction and somatic embryogenesis**
 The apical and axillary buds of 2-4 leaves were cut from in vitro grown IS and GS plants. Buds were excised using a stereoscopic lens and incubated for callus induction in NB2 medium following the general procedures introduced by Li et al. (2001) by cultivation in darkness for 30 days at 24 ± 2 °C to form pro-embryogenic calli. Pro-embryogenic masses were transferred to X6 medium (Li et al. 2001) and kept at the same temperature under a 16 h light/8 h darkness photoperiod for up to 90 days. Somatic embryos were harvested from the masses according to their developmental stage and maintained on the same medium. To induce development embryos at cotyledonary stage were transferred to C2D medium supplemented with 0.4 μM BA, 0.25 μM indolbutyric acid (IBA), 2 g/L glycine, and 0.5 g/L activated charcoal, and kept under the same conditions of temperature and photoperiod for 20 days. The total time involved in the entire induction and development process of the somatic embryos was 140 days. Somatic embryos were used for the gene transfer experiments scored for the expression of the transgene.

The apical and axillary buds of 2-4 leaves were cut from in vitro grown IS and GS plants. Buds were excised using a stereoscopic lens and incubated for callus induction in NB2 medium following the general procedures introduced by Li et al. (2001) by cultivation in darkness for 30 days at 24 ± 2 °C to form pro-embryogenic calli. Pro-embryogenic masses were transferred to X6 medium (Li et al. 2001) and kept at the same temperature under a 16 h light/8 h darkness photoperiod for up to 90 days. Somatic embryos were harvested from the masses according to their developmental stage and maintained on the same medium. To induce development embryos at cotyledonary stage were transferred to C2D medium supplemented with 0.4 μM BA, 0.25 μM indolbutyric acid (IBA), 2 g/L glycine, and 0.5 g/L activated charcoal, and kept under the same conditions of temperature and photoperiod for 20 days. The total time involved in the entire induction and development process of the somatic embryos was 140 days. Somatic embryos were used for the gene transfer experiments scored for the expression of the transgene.