

UCH-FC
Biotecnología
3934
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias
Escuela de Pregrado

MAPEO INTEGRATIVO FISICO Y GENETICO DE GENES CANDIDATOS
RELACIONADOS AL DESARROLLO DE LA BAYA Y LA SEMILLA EN *VITIS*
VINIFERA L.

Seminario de Título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Marcos Andrés Guerrero Agüero

Director de Tesis: Dr. Patricio Hinrichsen Ramírez.

Profesor Patrocinante: Dr. Carlos Jerez.

SANTIAGO-CHILE
2008

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“MAPEO INTEGRATIVO FISICO Y GENETICO DE GENES CANDIDATOS
RELACIONADOS AL DESARROLLO DE LA BAYA Y LA SEMILLA EN *VITIS
VINIFERA L*”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MARCOS ANDRÉS GUERRERO AGÜERO

Dr. Patricio Hinrichsen Ramírez
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión

Dra. Claudia Stange
Corrector

Santiago de Chile, Marzo de 2008



“Por muy larga que sea la tormenta, el sol siempre vuelve a brillar entre las nubes”.

Khalil Gibran

Dedico este trabajo a mis padres y hermanos, quienes me apoyaron en este largo camino de aprendizaje y me enseñaron que sólo trabajando con humildad y convicción es posible lograr las metas que uno se propone en la vida.

AGRADECIMIENTOS

Al poner fin a esta etapa de mi vida, quiero agradecer a quienes me han ayudado y me han dado energía para enfrentar cada una de las situaciones que se presentaron en ella:

A mis padres, Alfredo y María (Mela), mis queridos viejos, ellos han sido el pilar fundamental durante mi vida, no sólo en lo material, sino también en lo espiritual, mi fuente de ánimo en los momentos difíciles y mi cable a tierra para esforzarme día a día.

A Rosita y Cristhian, la familia Guerrero Almonacid, hermanos y grandes amigos, que me han apoyado siempre, en las buenas y en las malas, con la mejor disposición. Junto a sus cuatro retoños (Lucky, Bianca, Troño y Coco), agradezco el cariño y la alegría entregada.

A Ángela (Chica), Ignacio (Nacho) y su hermoso bebé Ángel (Nachito), agradezco su comprensión y ayuda, en especial en los momentos más difíciles, además nachito ha sido una luz en nuestra familia.

A Jennifer (Oshin) y Daniel (Pepo) por su gran apoyo, aunque la distancia nos ha separado, los lazos siguen siendo fuertes y siempre están presentes para brindar una palabra de aliento.

A mis primos, Nancho, Pupi, Pato, Maka, Chirry, Chuchy, por sólo nombrar a algunos, con quienes me ha tocado compartir gratos momentos, y obviamente, a más de alguno le ha tocado soportarme en mis instantes de idiotez.

A mis compañeros y amigos de la carrera de Biotecnología (Lucho, Gonzalo, Freddy, Dunner, y otros), con quienes compartí la tortura de ser alumno de pregrado en la Facultad de Ciencias, agradezco la valiosa ayuda entregada en la lucha por aprobar los ramos.

A las personas que trabajan en el laboratorio de biotecnología en INIA, en especial a mis compañeros y amigos, con quienes me tocó compartir el martirio de ser tesista (Braulio, Rodrigo, Gonzalo, Eli, Lulú, Xime, Pablo y Nilo). A ellos agradezco la ayuda y la paciencia.

Por último y no menos importantes, a mis mascotas: Akeem, Nona, Chichi y Tuta, los cuales me soportan cada día y llenan de alegría el hogar.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Desarrollo de la baya.....	2
1.2 Desarrollo de la semilla	4
1.3 Mapa de Ligamiento y QTLs	5
1.4 Planteamiento del problema	10
1.5 Hipótesis.....	11
1.6 Objetivo General	11
1.7 Objetivos Específicos.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1 Muestras vegetales	12
2.2 Evaluación Fenotípica.....	12
2.3 Extracción de ADN	13
2.4 Selección de genes candidatos (GCs).....	13
2.4.1 Genes candidatos para el desarrollo de la semilla (lista preliminar).....	14
2.4.2 Genes candidatos para el desarrollo de la baya identificados a partir de la forma mutante <i>flb</i> (<i>fleshless berry</i>).....	14
2.4.3 Genes candidatos identificados en el GL2 y GL18	15
2.5 Diseño de Partidores	16
2.6 Mapeo Físico de GCs.....	17

2.7 Genotipado y detección de SNPs e INDELS (Mapeo genético).....	17
2.8 Detección de QTLs	19
3. RESULTADOS	20
3.1 Evaluación Fenotípica	20
3.2 Selección de genes candidatos (GCs).....	23
3.3 GCs identificados en la secuencia del genoma de <i>Vitis vinifera</i> (GL2 y GL18).....	23
3.4 Mapeo Físico de GCs	24
3.5 Mapeo Genético.....	25
3.6 Detección de QTLs	33
3.7 Integración de Genes Candidatos y QTLs	35
4. DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución de la población de mapeo según clases de peso de bayas.	21
Figura 2. Distribución de la población de mapeo según clases de peso de Semilla.	22
Figura 3. Relación entre el peso promedio de las semillas (PS) y peso promedio de las bayas (PB) de cada individuos de la población.	22
Figura 4. Prueba de polimorfismos para dos partidores diseñados para gen <i>VvVPE1</i> .	27
Figura 5. Genotipado de la Población RxS con partidor <i>VvAGL11-10</i> .	27
Figura 6. Mapa de ligamiento genético de <i>Vitis vinifera</i> L.	28 – 32
Figura 7. Perfil de LOD para los QTLs detectados en el mapa Integrado para el peso promedio de baya (PB) y peso promedio de semillas (PS) en los GL2, GL8, GL14 y GL18.	36 - 37

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Lista de Partidores para genes candidatos mapeados genéticamente (Anexo).	51
Tabla II. Genes candidatos para desarrollo de la baya y de semillas seleccionados de Lista Preliminar (Anexo).	52- 55
Tabla III. Genes candidatos para desarrollo de la baya identificados por FERNANDEZ <i>et al</i> (Anexo).	56 -59
Tabla IV. Genes candidatos para desarrollo de la baya y de semillas en GL2 y GL18 (Anexo).	60
Tabla V. QTLs detectados para el peso promedio de la baya (PB).	34
Tabla VI. QTLs detectados para el peso promedio de las semillas (PS).	34

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAC	Cromosoma Artificial Bacteriano
BES	Secuencias de los extremos del BAC
CS	Cabernet Sauvignon
°C	Grados Centígrados
<i>flb</i>	Mutante carente de pulpa
GCs	Genes candidatos
GL	Grupo de Ligamiento
INDELs	Inserciones y deleciones
IM	Mapeo por Intervalos
LOD	Logaritmo en base 10 de las probabilidades
MAS	Selección Asistida por Marcadores
mg	Miligramos
nm	Nanómetros
QTL	Loci de carácter cuantitativo
PB	Peso de la Baya
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PS	Peso de la Semilla
RxS	Cruzamiento entre variedades 'Ruby Seedless' y 'Sultanina'
RU	'Ruby Seedless'
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido
SSCP	Polimorfismos conformacionales de simple hebra
SSR	Repetidos de secuencia simple (llamados Microsatélites)
SU	'Sultanina'
Vv	<i>Vitis vinifera</i>
<i>VvAGL11</i>	Gen Agamous tipo 11
<i>VvPMEI2</i>	Gen Inhibidor de pectina metilesterasa e invertasa 2 en plantas
<i>VvSPY</i>	Gen SPINDLY
<i>VvTNP-SR</i>	Gen Transportina SR

RESUMEN

La uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) es el principal frutal de exportación para Chile. Las variedades más aceptadas en el mercado son aquellas que presentan semillas en reducido número o peso (apirénicas). A su vez, el desarrollo de la semilla y de la baya en la vid son procesos estrechamente relacionados. El fruto (baya) se origina del ovario fertilizado y las semillas son el resultado de la fertilización de los óvulos, por lo que es importante estudiar ambos procesos de manera holística. Los caracteres “peso de la baya” y “peso de la semilla” son de tipo cuantitativo y pueden estudiarse genéticamente mediante aproximaciones cuantitativas como el análisis de QTLs (*loci* de caracteres cuantitativos). Estudios recientes sugieren que la apirenia es un carácter cuantitativo complejo, que dependería principalmente de un *locus* mayor identificado en el grupo de ligamiento 18 (GL18). En el presente trabajo, además de confirmar la existencia de este QTL para apirenia, que coincide con un QTL para peso de la baya, se reportan otros QTLs menores para ambos caracteres. En el GL2 se identificó un QTL para apirenia, de efecto pleiotrópico sobre el desarrollo de la baya, mientras que en los GLs 8 y 14 se ubicaron otros dos QTLs menores adicionales que afectan sólo el desarrollo de la baya.

Este estudio se enfocó en identificar genes involucrados en el desarrollo de la baya y de la semilla. Para establecer la relación entre los posibles genes y la expresión de determinados fenotipos apirénicos, se recurrió a la estrategia del Gen Candidato (GC), que consiste en asociar GCs a QTLs usando un enfoque de tipo mapeo integrativo (genético, físico e *in silico*). El mapeo genético de los GCs se desarrolló mediante marcadores de tipo SNPs (*single nucleotide polymorphism*) e INDELs (*insertions & deletions*) detectados por SSCP (*single-strand conformational polymorphism*) en una población F1 derivada del cruzamiento de ‘Ruby Seedless’ x ‘Sultanina’. En tanto, para el mapeo físico se utilizó un mapa físico de ‘Cabernet Sauvignon’ (6X). El mapeo *in silico* se realizó a partir de la información disponible de la secuenciación parcial (8X) del genoma de la vid. En base a esta metodología se mapearon genéticamente 17 GCs y físicamente 32 GCs. Identificándose el gen *VvAGL11* como el más relacionado al QTL mayor de apirenia (GL18) y tres genes asociados a los QTLs del GL2 (el gen *VvPMEI2*), GL8 (el gen *VvSPY*) y GL14 (el gen *VvTNP-SR*). El gen *VvAGL11* explicó el 74,8 % de la varianza fenotípica del peso de la semilla, lo que lo convierte en un buen candidato a ser responsable del control de la herencia de la apirenia en uva de mesa.

ABSTRACT

Table grapes (*Vitis vinifera* L.) are the most important product of exportation of Chile. The most accepted varieties in the market are those which have reduced number and weight of seeds, a character known as seedlessness. The development of seed and berry in grapevines constitute closely related processes and for this reason it is important to study both processes together. Seed and berry weight are quantitative traits that can be studied genetically. Recent studies suggest that seedlessness is a complex quantitative trait loci (QTL), located on a major *locus* identified in the linkage group 18 (LG18) which has a pleiotropic effect on seed and berry weight. This work confirms the existence of this QTL and also identifies a minor QTL for seed development and berry weight on LG2. Other QTLs were found on LG8 and LG14, which are only involved in berry development.

The aim of this work was to identify genes involved in the development of the berry and the seed. To establish the relationships between these genes and the expression of seedless phenotypes, the candidate gene (CG) approach was used. CG consists in the association of genes with QTLs using integrative mapping (genetic, physical and *in silico*). Genetic mapping of CGs was developed with SNPs markers (single nucleotide polymorphism) and INDELs (insertions & deletions) detected by SSCP (single-strand conformational polymorphism) in an F1 population derived from the crossing between 'Ruby Seedless' x 'Thompson seedless'. For the physical mapping, a 'Cabernet Sauvignon' (6X) map was used. *In silico* mapping was made from the available information of partial sequencing (8X) of the grapevine genome. The results consist in 17 CGs mapped genetically and 32 CGs mapped physically. *VvAGL11* gene marker was identified as tightly related to the major QTL of seedlessness (LG18), and another three QTL-associated genes were found: *VvPMEI2* (located on LG2), *VvSPY* (on LG8) and *VvTNP-SR* (on LG14). *VvAGL11* gene explained 74.8 % of the phenotypic variance of seed weight, which makes this gene a good candidate responsible for the control of the inheritance of seedlessness in table grape.

1. INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una planta trepadora de la familia *Vitacea*, es de tronco retorcido, vástagos nudosos y flexibles, hojas alternas, grandes y partidas en cinco lóbulos puntiagudos. Es originaria de la zona mediterránea y de Asia menor, y es actualmente cultivada en casi todo el mundo. En nuestro país fue introducida por los españoles durante los periodos de descubrimiento y conquista.

El fruto de la vid es la uva, que crece formando racimos. Su carne es dulce, jugosa y translúcida. La calidad de la uva es determinada por el componente genotípico del cultivar, así como por el ambiente y el manejo de las condiciones del cultivo.

La uva de mesa es una especie diploide ($2n = 38$) cuyo genoma tiene un tamaño de 487 Mb, en el cual se han identificado 30.434 genes, de acuerdo a la información generada por el Consorcio Franco-italiano encargado de la secuenciación de un genotipo cuasi-homocigoto [JAILLON *et al*, 2007]. Si bien de manera natural es de reproducción alógama, y por ende de una elevada heterocigosidad, se reproduce vegetativamente para mantener genotipos con características únicas establecidas por la industria del vino y de uva de mesa. Eventualmente se promueve la reproducción sexual controlada para generar nuevas variedades en el contexto de programas de mejoramiento genético.

En Chile, la uva de mesa es el principal frutal de exportación en fresco, por delante de otros frutales como manzanos o peras. De acuerdo a las estadísticas comerciales, durante la temporada 2005/2006 se exportaron 809.714 toneladas de uva de mesa, lo cual representa un 36,93% del total (2.192.764 toneladas) de exportaciones de fruta fresca [ASOEX, 2007]. Su superficie actual es de más de 60.000 ha (Censo Agrícola 2007).

En la actualidad, uno de los principales objetivos de la biología molecular en plantas es determinar qué genes participan y regulan los distintos procesos en las etapas de desarrollo y reproducción de las plantas. Entre estos procesos el desarrollo floral, el desarrollo de la semilla y

fruto post fertilización han adquirido gran relevancia en muchos estudios [EBADI *et al*, 1996. GOES DA SILVA *et al*, 2005. CABEZAS *et al*, 2006. PENG *et al*, 2007]. Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, aún no se ha identificado ningún gen involucrado en el desarrollo de la semilla o del fruto en estadios tempranos de desarrollo.

1.1 Desarrollo de la baya.

La uva es un fruto no climatérico simple, que presenta una pared externa constituida por 6 a 8 capas celulares (hollejo o pericarpio) que delimita la baya. En su interior se encuentran 2 lóculos o cavidades en las cuales se encuentra distribuida la pulpa (mesocarpio constituido por 25 a 30 capas de células) y que rodean las semillas, y el pincel que corresponde a la prolongación de los vasos del pedicelo que nutren a la baya (encargado del transporte de solutos y agua hacia la baya).

El incremento en el peso, volumen y diámetro de la baya durante el proceso de desarrollo, está normalmente caracterizado por una doble curva sigmoidea [KENNEDY, 2002], que resulta de dos etapas consecutivas de crecimiento separadas por una etapa de crecimiento más lento (fase lag):

Etapas I. Primera etapa de crecimiento rápido de la baya.

Inmediatamente tras la floración, se da comienzo a la formación de la baya y se desarrollan los embriones en la semilla, tras lo cual se presenta un período de crecimiento rápido de la baya. Este periodo de crecimiento es el resultado de dos eventos, un aumento en la división celular y la expansión celular. El contenido de azúcar presente en la baya durante este periodo es bajo, mientras que se produce una acumulación de ácidos orgánicos, en especial, ácido tartárico, ácido málico y ácido hidroxicinámico, este último precursor de fenoles. Esta etapa tiene una duración promedio de 50 días en variedades semilladas.

Etapas II. Fase *lag* del crecimiento de la baya.

Durante este periodo, el crecimiento de la baya es claramente más lento, mientras que la concentración de ácidos orgánicos de las bayas llega a su nivel más alto. Esta etapa dura normalmente entre 2 y 3 semanas.

Etapa III. Segunda etapa de crecimiento rápido de la baya.

El comienzo de la segunda fase de crecimiento de bayas o maduración de los frutos (envero o *véraison*) se caracteriza por el ablandamiento y la pigmentación de las bayas. En general, las bayas se duplican en tamaño entre el comienzo de este segundo período de crecimiento y la cosecha, producto de un fenómeno de expansión celular (aumento de volumen) que a su vez es altamente dependiente de la expansión de la pared celular y de la incorporación de agua y azúcares. Muchos de los solutos que son acumulados en la baya durante el primer período de desarrollo siguen estando presentes hasta la cosecha, sin embargo, debido al aumento en el volumen de las bayas, su concentración se reduce considerablemente.

En este periodo se produce la acumulación de pigmentos en la piel, los cuales entregarán la coloración característica a la baya. También comienza la acumulación de azúcares, en que la sacarosa producida a partir de la fotosíntesis es importada a la baya durante la maduración de la uva. Una vez transportada a las bayas, la sacarosa es hidrolizada en sus azúcares, glucosa y fructosa.

De esta forma, el tamaño potencial de la baya está controlado por tres factores principales: el número de células, el volumen celular y la concentración de solutos orgánicos. El número de células en la uva se establece durante la primera etapa de desarrollo de la baya (etapa I), donde también se produce un aumento significativo del volumen celular. En tanto, el aumento en la concentración de solutos, en especial de azúcares se produce en la etapa III, donde aumenta hasta cuatro veces la concentración con respecto al inicio de la misma etapa, y se produce junto a ello un aumento del volumen celular. Estos factores determinan en gran medida el tamaño de la baya, por lo que para entender este proceso y tratar de intervenir en el desarrollo de la baya es fundamental conocer los genes que participen en los procesos asociados.

FERNANDEZ *et al* (2006) identificaron una forma mutante del cv. Ugni blanc denominada *flb* (*fleshless berry* o *baya carente de pulpa*), la cual presenta una reducción de más de 20 veces en el peso del pericarpio en estado maduro de la baya, sin presentar variaciones en el desarrollo de la semilla ni en su fertilidad. La comparación de esta mutante con la forma silvestre de la misma variedad permitió identificar una lista de 87 genes que presentaron cambios en su nivel de expresión [FERNANDEZ *et al*, 2007] constituyéndose en posibles responsables de los cambios de volumen de la baya, o bien relacionados con su desarrollo.

1.2 Desarrollo de la semilla.

Entre los consumidores, las variedades de uva de mesa que presentan mayor aceptación, son aquellas cuyas bayas no presentan semillas (apirenas) o que éstas son imperceptibles al paladar (rudimentos). Se estima que en la actualidad el 80% de la producción mundial es de este tipo. Por esta razón, la apirenia es uno de los caracteres más buscados en los programas de mejoramiento genético de uva de mesa [HINRICHSEN *et al*, 2006. HEWSTONE *et al*, 2007]. En los frutos se distinguen en general dos tipos de fenotipos apirénicos, dependiendo del estado en el cual se detiene el desarrollo de la semilla, llamados partenocárpico y estenoespermocárpico. En el primero ocurre la polinización sin fertilización, siendo el estímulo de la polinización suficiente para gatillar el desarrollo del fruto a partir de tejido materno [VIVIAN-SMITH & KOLTUNOW, 1999]. Este es el único caso verdadero en el que no se producen semillas del todo y es característica en la variedad corinto negra utilizada para la producción de pasas. En el segundo (estenoespermocarpia), se verifica la polinización y la fertilización del óvulo, sin embargo la semilla detiene su crecimiento en diferentes estadios del desarrollo, generando toda clase de tamaños de rudimentos. Tanto en la partenocarpia como en la estenoespermocarpia, las bayas tienen un desarrollo menor que el de las bayas con semillas normales, debido a que en gran parte el desarrollo del fruto está controlado en gran medida por un balance de hormonas que son producidas por el óvulo y por la semilla en desarrollo [EBADI *et al*, 1996]. Es por este motivo que las variedades de uva de mesa apirénicas requieren de la aplicación exógena de hormonas de crecimiento como giberelinas y citoquininas [NAVARRO *et al*, 2001].

En las angiospermas, la fertilización da comienzo a la formación de la semilla a partir del óvulo. Esta transformación del óvulo involucra la activación y coordinación de las distintas vías que dirigen la formación y el desarrollo del embrión, del endospermo y de los tegumentos. Durante el desarrollo de la semilla, se presentan una serie de eventos que son influenciados por procesos epigenéticos, tales como metilación del ADN y remodelamiento de la cromatina, en los cuales actúan un número de genes cuya identidad permanece aún en el anonimato.

Para entender el proceso de desarrollo de la semilla, se ha utilizado como modelo a la especie *Arabidopsis thaliana*, en especial a través del estudio de diversas mutantes. En base a ellas, se

han identificado genes implicados en diversos procesos y etapas de su desarrollo, incluyendo a genes relacionados al control de la embriogénesis, como *LEC* (*LEAFY COTILEDON*), *PKL* (*PICKLE*) y *FIS2* (*FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2*), que codifican para proteínas que participarían en la transducción de señales en estados tardíos del desarrollo. También se han descrito genes involucrados en la formación de la cubierta seminal, entre los que se destacan: *TT1* (*TRANSPARENT TESTA 1*), *TT2* (*TRANSPARENT TESTA 2*), *TT8* (*TRANSPARENT TESTA 8*), *TT12* (*TRANSPARENT TESTA 12*), *TTG2* (*TRANSPARENT TESTA GLABRA 2*), *ATS* (*ABERRANT TESTA SHAPE*), *dVPE* (*DELTA VACUOLAR PROCESSING ENZYME*), *AP2* (*APETALA2*), entre otros [TAMARA *et al*, 2004]. Existen también factores de transcripción involucrados en una serie de procesos como el desarrollo de órganos tales como flores, raíces y frutos, denominados MADS [BOSS *et al*, 2002], cuya función estaría en etapas tempranas del desarrollo.

Además, se han identificado genes asociados con la vía de respuesta a varias hormonas que controlan el desarrollo de la semilla en *Arabidopsis* como auxinas [*ARF2* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 2*)], giberelinas [*GAI* (*GA INSENSITIVE*), *SPY* (*SPINDLY*)] y citoquininas (*SPY*).

El control genético del desarrollo de la semilla en vid ha sido explicado por varias teorías, de las cuales la propuesta por BOUQUET y DANGLLOT (1996) presenta la mayor aceptación en la actualidad por adecuarse a las características de diversas poblaciones segregantes. Ellos estudiaron la segregación del carácter en numerosos cruzamientos entre variedades semilladas y apirénicas, logrando establecer un modelo que permitía explicar las poblaciones obtenidas. En base a estos estudios, propusieron que la herencia del rasgo “apirenia” estaría basada en un complejo sistema de control genético en donde participarían tres genes recesivos, heredados de manera independiente, controlados por un gen regulador dominante. Este *locus* fue denominado posteriormente *SdI*, la abreviatura en inglés para inhibidor del desarrollo de la semilla [LAHOOGUE *et al*, 1998].

1.3 Mapa de Ligamiento y QTLs.

El mejoramiento genético clásico de la vid está basado principalmente en la selección de aquellas variedades o parentales que presentan las mejores características agronómicas,

usualmente circunscrito a caracteres de fácil categorización. Sin embargo, las nuevas exigencias que presenta el mercado se enfocan a caracteres complejos (tamaño de la baya, tamaño de la semilla, acidez, entre otros), en los cuales la selección de parentales se hace difícil. Esto ha llevado a la necesidad de complementar esta selección empírica basada en las características fenotípicas con nuevas técnicas basadas en la identificación de los genes relacionados a dichos caracteres [YIN *et al*, 2003].

La identificación de los genes responsables de un determinado fenotipo puede ser abordada mediante distintas estrategias. En función de la metodología a utilizar, se distinguen dos aproximaciones principales: la genética directa y la genética reversa. La genética directa o clásica implica localizar el o los genes responsables de un fenotipo, a través de la definición *a priori* del problema, se generan mutantes (o colectan mutantes naturales) para estudios de caracterización celular, bioquímica, fisiológica, y genética en base a las cuales se determinan los genes que están involucrados en la función estudiada. Esta metodología de genética directa no es fácilmente aplicable a especies leñosas como la vid, debido a su elevada heterocigosidad y su alargada juvenilidad (aproximadamente 5 años). Por otro lado, la genética reversa busca explicar un fenotipo a partir de la variación alélica de genes candidatos, una de las estrategias que se puede utilizar, es posicionar los genes candidatos en mapas de ligamiento genéticos y asociarlos a QTLs (*Quantitative Trait Loci*).

Al respecto, muchos caracteres de importancia agronómica tales como rendimiento, calidad y algunas formas de resistencia a enfermedades son controlados por varios genes que tienen un efecto pequeño y se conocen como ‘caracteres cuantitativos’ (también llamados poligénicos, multifactoriales o rasgos complejos). Las regiones del genoma que contienen genes asociados con un particular carácter cuantitativo son conocidas como loci de carácter cuantitativo (QTLs). Los estudios llevados a cabo durante la primera mitad del siglo XX [SAX, 1923. THODAY, 1961], mostraron que los genes con un gran efecto sobre los caracteres cuantitativos existen y pueden ser experimentalmente mapeados en los cromosomas, mediante la evaluación de la correlación entre el valor del rasgo cuantitativo y los estados alélicos vinculados a los marcadores genéticos. Esto condujo a la definición de QTL como un lugar genético donde funcionalmente diferentes marcadores o genes segregan y causan un efecto significativo sobre un carácter cuantitativo. La identificación de los QTLs se basa en la integración de la

información procedente del análisis fenotípico convencional y del análisis de marcadores genéticos.

Los marcadores genéticos representan diferencias entre organismos individuales o entre especies. En general, ellos no representan por sí solos a los genes blancos, pero sí actúan como “signos” o “banderas”. Existen tres tipos principales de marcadores genéticos: marcadores morfológicos o visibles, los cuales sí son marcadores de rasgos fenotípicos, como color, forma de la semilla, hábitos de crecimiento, etc.; marcadores bioquímicos, los que incluyen variantes alélicas de enzimas llamadas isoenzimas; y marcadores de ADN (marcadores moleculares), los cuales revelan sitios de variación en el ADN.

Los marcadores de ADN son prácticamente ilimitados en número y no son afectados por factores ambientales y/o etapas del desarrollo de la planta. Son herramientas útiles para revelar diferencias entre individuos de una misma o de distinta especie. Los marcadores pueden ser clasificados como codominantes o dominantes, lo que está basado en si el marcador es capaz de discriminar entre homocigotos y heterocigotos. Los marcadores codominantes indican diferencias en tamaño o forma del amplicón, en cambio, los marcadores dominantes indican presencia o ausencia. Estrictamente hablando, las diferentes formas de un marcador de ADN (diferentes bandas en un gel) son llamadas ‘alelos’ del marcador. Los marcadores codominantes pueden tener muchos alelos, en cambio, el marcador dominante sólo puede tener dos alelos [COLLARD & JAHUFER, 2005], que corresponden a la presencia o ausencia de un fragmento de ADN. Entre los marcadores moleculares más utilizados en la construcción de mapas de ligamiento genético, destacan el AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) y SNP (*single nucleotide polymorphism*) [SEMAGN *et al*, 2006].

En este estudio se pretende utilizar los genes candidatos como marcadores, para lo que se deben encontrar zonas (secuencias) dentro del gen que presenten diferencias entre los progenitores y que tales diferencias sean heredables a la descendencia (segreguen de forma mendeliana). Los marcadores moleculares identificados con mayor frecuencia dentro de un gen son del tipo *INDELS* (*insertions & deletions*) y SNPs. La primera corresponde a una secuencia

de nucleótidos que pueden ser agregados o removidos del gen, cuyo tamaño puede variar de uno a cientos de pares de bases. En tanto, los SNPs corresponden a variaciones en la secuencia del ADN, donde sólo un nucleótido es reemplazado por otro; ambos marcadores pueden ser detectados en secuencias codificantes o no codificantes en el gen de interés.

Los marcadores moleculares han sido un importante avance para la construcción de mapas de ligamiento para diversas especies cultivadas. Los mapas de ligamiento han sido utilizados para identificar regiones cromosómicas que contienen genes que controlan caracteres simples (en estas regiones se pueden ubicar muchos genes, pero sólo uno o unos pocos son responsables del fenotipo estudiado) y caracteres cuantitativos usando análisis de QTL [MOHAN *et al*, 1997]). El proceso de construcción de un mapa de ligamiento y que conduce el análisis de QTL (regiones genómicas asociadas al carácter) se denomina mapeo de QTL (también llamado mapeo genético). La capacidad de detectar la presencia de uno o más QTLs dentro de una región genómica o “poder de detección”, depende de varios factores, entre ellos el tipo de cruzamiento empleado en el estudio, el efecto del o de los QTLs sobre otros, la densidad de los marcadores en la región del QTL y la estrictez de los parámetros, el número de individuos analizados, el número de muestras analizadas, entre otros [BROMAN, 2001]. Se ha determinado que mayor será el poder de detección de QTLs, cuando mayor sea el tamaño de la población genotipada y fenotipada, y mayor sea la densidad de los marcadores.

El mapa de ligamiento indica la posición y distancias genéticas relativas entre marcadores o genes a lo largo de los cromosomas. El uso más importante del mapa de ligamiento es para identificar regiones de los cromosomas que contienen genes y QTLs asociados al carácter de interés. El mapeo genético está basado en el principio de que los genes y marcadores segregan vía recombinación cromosómica (crossing-over) durante la meiosis, lo cual permite su análisis en la progenie. Los genes o marcadores que están muy cercanos o estrechamente ligados podrían ser traspasados juntos desde los padres a la progenie más frecuentemente que otros genes o marcadores que se encuentran muy separados. En la población de segregantes se presenta una mezcla de genotipos parentales y recombinantes. La frecuencia de los genotipos recombinantes puede ser usada para calcular las fracciones de recombinación, la cual se utiliza para inferir las distancias genéticas entre marcadores o genes. A partir del análisis de la segregación de los marcadores, se determina el orden relativo y las distancias entre marcadores (cuanto más baja

sea la frecuencia de recombinación entre dos marcadores, ellos se encontrarán más próximos en un cromosoma, y viceversa). Marcadores que presentan una frecuencia de recombinación del 50% o más son descritos como “no ligados” y se presume que están localizados muy separados en el mismo cromosoma o en cromosomas distintos.

La construcción de un mapa de ligamiento presenta tres pasos principales: (1) producción de una población de mapeo, cuyo número de individuos mínimo supere los 50, y cuyo máximo sea el mayor posible para aumentar la resolución; (2) identificación de polimorfismos, en base a la detección de marcadores moleculares que revelen diferencias entre los progenitores; (3) análisis de ligamiento de los marcadores, involucra la codificación de datos (análisis fenotípico y genético) de cada individuo de la población, a partir de programas computacionales para dirigir el análisis de ligamiento.

En uva de mesa, se han identificado diversos QTLs relacionados con el fenotipo apirénico. El más importante es un QTL de efecto mayor (que explica más del 50% de la variación del carácter) para peso y número de semillas [DOLIGEZ *et al*, 2002. FANIZZA *et al*, 2005. CABEZAS *et al*, 2006. MEJIA *et al*, 2007]. También se ha reportado que este QTL mayor tiene un efecto pleiotrópico sobre el peso de la baya e incluso sobre la maduración.

En INIA la Platina se inició hace más de 15 años un programa de mejoramiento genético de uva de mesa, contando con numerosos cruzamientos entre muy diversos progenitores. Entre éstos, se cuenta con un cruzamiento entre las variedades ‘Ruby Seedless’ y ‘Sultanina’ que ha generado una población que presenta herencia transgresiva para dos rasgos de gran interés agronómico: el peso de la baya y el peso de la semilla. En base a esta población, desde hace algunos años se ha trabajado en el mapeo primario de QTLs en base a mapas de ligamiento contruidos con marcadores dominantes y co-dominantes [MEJIA *et al*, 2007]. En este mapa se ha logrado identificar la presencia de QTLs para el fenotipo estenoespermocárpico, específicamente para los caracteres tamaño de baya (GL8, GL14 y GL18), y el peso fresco de semillas (GL18), además de QTLs para tiempo de maduración, fertilidad y color, posicionados en diversos grupos de ligamientos. Sin embargo, al no existir un grado de saturación adecuada, no es posible validar y acotar la localización de los QTLs descritos, llegando a abarcar regiones genómicas cercanas a los 25 cM en cada caso, lo que podría representar decenas de Mb a

secuenciar y analizar molecularmente. Para solucionar este problema y lograr un correcto anclaje de genes candidatos, en el presente estudio, en colaboración con SOTO (2007) y MEJIA *et al* (en preparación), se aumentó el nivel de saturación de este mapa de ligamiento reduciendo el intervalo de confianza que contiene el QTL mayor para apirenia. Esta saturación permitió acotar las regiones del genoma que contienen los genes responsables de caracteres cuantitativos como la apirenia o el tamaño de la baya. Esta acotación es fundamental para co-posicionar genes candidatos con QTLs o para identificarlos mediante clonamiento posicional de QTLs.

Los marcadores moleculares que están estrechamente ligados a genes candidatos de importancia agronómica (llamados genes “etiquetados”) pueden ser utilizados como herramientas moleculares para la selección asistida por marcadores (MAS) en el mejoramiento genético de plantas. MAS implica el uso de la presencia/ausencia de un marcador como un sustituto para asistir la selección fenotípica, la que a través de esta vía puede ser eficiente, efectiva, fiable y eficaz en función del costo, en comparación con la metodología del mejoramiento genético clásico.

1.4 Planteamiento del problema.

El fenotipo de apirenia y el tamaño de la baya en uva de mesa son dos caracteres de gran interés productivo. Identificar los genes que estén involucrados en procesos que determinen ambos rasgos, e identificar marcadores genético-moleculares que permitan diferenciar las diferentes versiones alélicas de esos genes, permitiría no sólo caracterizar a nivel molecular los genes responsables del carácter de interés sino que además generar una herramienta para dirigir la selección de parentales y/o segregantes con el fenotipo de interés. El gen o los genes identificados, así como los marcadores asociados a estos pueden ser utilizados en el marco de un programa de desarrollo de nuevas variedades por transformación genética o fitomejoramiento, respectivamente.

Dado que:

- El tamaño de la semilla y el tamaño de la baya en la uva de mesa se han establecido como fenotipos estrechamente asociados a través de estudios cuantitativos, se plantea la siguiente hipótesis para este trabajo:

1.5 Hipótesis.

“La asociación entre el tamaño de la semilla y el de la baya es en gran medida el resultado de la participación de genes comunes que actúan tanto en el desarrollo de la semilla como en el crecimiento de la baya”.

1.6 Objetivo General.

Mapear de forma integrada (físicamente, genéticamente, e *in silico*) genes candidatos y asociarlos con QTLs para el desarrollo de la semilla y de la baya en uva de mesa.

1.7 Objetivos Específicos

- Identificar genes candidatos asociados al fenotipo apirenia (n=10, aproximadamente).
- Validar QTLs primarios detectados en temporadas pasadas (2004 y 2005) para los rasgos peso promedio de semillas (PS) y peso promedio de la baya (PB).
- Mapear físicamente genes candidatos en mapa físico de cv. ‘Cabernet Sauvignon’ (6X).
- Mapear genéticamente genes candidatos en población, que segrega para ambos caracteres, derivada del cruzamiento entre ‘Ruby Seedless’ y ‘Sultanina’.
- Asociar GCs a QTLs para peso de semillas y peso de la baya.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras vegetales.

Este estudio se realizó en base a la población de segregantes F1 derivada del cruzamiento entre las variedades ‘Ruby Seedless’ y ‘Sultanina’ (cruzamiento N°33 en el catálogo de INIA La Platina, abreviado RxS). De este cruzamiento se tiene un total de 139 individuos segregantes plantados en campo.

2.2 Evaluación Fenotípica.

De los 139 individuos sólo 116 produjeron frutos, de los cuales se colectaron bayas durante febrero de 2007 y se midieron dos parámetros estrechamente relacionados: peso promedio de las bayas (PB) y peso fresco de las semillas (PS). Ambas mediciones se utilizaron para el análisis de QTLs. El procedimiento para llevar a cabo las mediciones se detalla a continuación:

- *Peso promedio de bayas*: Se seleccionaron tres racimos en forma aleatoria para cada individuo, y de cada uno de los racimos se eligieron también en forma aleatoria 100 bayas, completando un total por planta de 300 bayas. Este procedimiento se realizó para las 116 plantas que produjeron frutos. Posteriormente se registró el peso promedio de las bayas por cada individuo estudiado.

- *Peso fresco de semillas*: Se tomaron 50 bayas por racimo de forma aleatoria, completando un total de 150 bayas por planta. De cada una de las bayas se recolectaron las semillas separándolas de los restos de pulpa y se pesaron en forma individual. Este procedimiento se realizó para las 116 plantas que produjeron frutos. Luego se calculó el peso promedio de semillas (peso fresco) por baya.

Los datos fenotípicos fueron sometidos a análisis estadísticos básicos y de normalidad. El análisis de QTLs requiere de datos cuantitativos con distribución normal, la que fue evaluada



mediante la técnica gráfica de probabilidad normal [CHAMBERS *et al*, 1983]. La normalización de los datos se realizó mediante la transformación de Johnson [FARNUM, 1993] incluida en el programa estadístico Minitab 15 (Minitab Inc).

2.3 Extracción de ADN.

Desde los 139 individuos segregantes adultos se procedió a coleccionar hojas en estado juvenil (tamaño inferior a 3 cm); las muestras fueron almacenadas en tubos de micro-centrífuga y mantenidas en frío durante su traslado al laboratorio, donde posteriormente se mantuvieron en un ultra-freezer (-80 °C) hasta su utilización.

La maceración de las muestras se realizó en series de 24 muestras usando el robot Biospec modelo Mini-Beadbeater. Luego, la extracción de ADN se llevó a cabo de acuerdo al método de LODHI *et al* (1994). Éste se basa en la utilización de un buffer de extracción que contiene 20 mM EDTA, pH 8. 2% CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio), 0,2% 2-mercaptoetanol y 100 mg de PVP (Polivinilpirrolidona - 40000) por cada gramo de tejido de hoja. El EDTA inhibe la actividad de las enzimas DNAsas (rompen el ADN), el CTAB solubiliza las membranas celulares y permite precipitar selectivamente el ADN, el PVP extrae los polifenoles especialmente de las muestras dañadas y el 2-mercaptoetanol protege el ADN de las actividades de enzimas peroxidasas y polifenoloxidasas. Luego el ADN es precipitado de la fase acuosa con 1 volumen isopropanol y 2 volúmenes de etanol absoluto en presencia de 5 M NaCl, y es separado de la solución vía centrifugación. Las extracciones se realizaron en duplicado para cada muestra, aunque para el genotipado de la población se utilizó sólo uno de los duplicados, eligiéndose aquel que presentara la mayor concentración de ADN medida por absorbancia a 260 nm (espectrofotómetro Shimadzu UV-160) y una adecuada integridad del ADN, lo que se evaluó a partir de su perfil electroforético (gel de agarosa al 0,8 %, tinción con bromuro de etidio).

2.4 Selección de genes candidatos (GCs).

La selección de genes candidatos para desarrollo de la semilla y de la baya durante este trabajo presentó adaptaciones de acuerdo a la disponibilidad de información (recursos genéticos) en la literatura y en bases de datos. Se comenzó este trabajo en base a una lista preliminar de 60

genes candidatos, identificados para el desarrollo de la semilla en *Arabidopsis thaliana*. Posteriormente, se estudiaron los genes identificados en la forma mutante *fleshless berry* [FERNANDEZ *et al*, 2007], y a partir de la información parcial liberada en el transcurso del proyecto de secuenciación de la vid, se identificaron genes en los *contigs* que co-localizan con los QTLs de interés en el GL2 y GL18.

2.4.1 Genes candidatos para el desarrollo de la semilla (lista preliminar).

El conocimiento generado para el desarrollo de la semilla en las así llamadas “especies modelo” (*Arabidopsis thaliana*, entre otras) permitió enfocar la búsqueda y dar prioridad a genes candidatos involucrados en el desarrollo del óvulo, integumento y endospermo, además de genes claves involucrados en la síntesis y transducción de señales de hormonas tales como giberelina, auxina y ácido absícico (ABA). Por otro lado, utilizando como referencia un trabajo previo realizado en el laboratorio de Biotecnología de INIA La Platina, se tenía una lista preliminar de 60 genes candidatos que fueron identificados a partir de las secuencias de cDNA de *Arabidopsis thaliana*. A partir de estas secuencias se realizó la búsqueda de ortólogos en *Vitis*. Los genes ortólogos de *Vitis vinifera* (Vv) fueron identificados mediante la realización de tBlastN contra la base de datos pública de los transcritos ensamblados de TIGR (The Institute for Genomic Research) para genes de plantas (<http://plantta.tigr.org/>), o contra las secuencias generadas por el consorcio DEGECHIVID (proyecto de genómica funcional del cual INIA forma parte) (<http://www.genomicafrutos.cl/>), y con el propósito de trabajar con regiones codificantes y evitar la presencia de intrones, se realizó un BlastN contra el genoma parcial ensamblado 6X de *Vitis vinifera* durante el avance del proyecto de secuenciación franco-italiano.

2.4.2 Genes candidatos para el desarrollo de la baya identificados a partir de la forma mutante *flb* (*fleshless berry*).

Estos genes fueron identificados en base a ensayos de expresión diferencial, a partir de ensayos de microarreglos y ensayos de hibridaciones sustractivas (SSH) entre la forma silvestre del cv. ‘Ugni Blanc’ y la mutante denominada *flb*, que presenta severa reducción del desarrollo de la pulpa y consecuentemente del tamaño de la baya [FERNANDEZ *et al*, 2007]. Esto permitió identificar genes relacionados a distintas vías metabólicas y que participarían en

procesos importantes para el desarrollo del fruto, tales como metabolismo de ABA, morfogénesis y desarrollo, estrés y defensa, metabolismo secundario y reguladores transcripcionales. Todos estos genes se pueden considerar como posibles responsables de los caracteres que interesa estudiar en torno al desarrollo y crecimiento del fruto. Del total de GCs identificados (87) se han seleccionado 45 GCs para el mapeo físico, en base a la función descrita para cada uno de ellos.

2.4.3 Genes candidatos identificados en el GL2 y GL18.

A partir de un estudio anterior realizado por nuestro grupo de INIA Platina (MEJIA *et al*, 2007) se disponía de información referente a la presencia de QTLs de interés para el desarrollo de la baya y semilla en varios GL, QTLs ubicados en el GL8, en el GL14 y en el GL18. De estos, el QTL del GL8 y GL14 se asocian exclusivamente con el peso de la baya, en tanto que el GL18 contiene QTLs para el peso de la baya y para el peso de la semilla, identificándose el QTL principal para el desarrollo de la semilla en el GL18; ambos QTLs del GL18 se encuentran estrechamente ligados y co-localizan. Con este conocimiento previo y el aumento de precisión en la localización del QTL del GL18 [SOTO, 2007], se utilizó una estrategia de clonamiento posicional [MEJIA *et al*, en preparación], en la cual se buscaron genes candidatos en el *contig* del mapa físico de Cabernet Sauvignon. (*contig* 1821) que contiene anclados marcadores estrechamente ligados al QTL identificado por Mejía *et al*, 2007.

Durante el análisis de QTLs en esta temporada, se encontraron dos QTLs (uno para PS y otro para PB) en el GL2 que no habían sido detectados en temporadas pasadas, para los cuales se dirigió también una estrategia de clonamiento posicional. Se identificaron dos marcadores de tipo microsatélite (abreviados SSR, o Secuencias Simples Repetidas) estrechamente ligados a cada uno de estos QTLs: VMC7F2 para el GL18 y VVIB23 en el GL2. Estos marcadores SSR fueron usados para identificar los *contigs* que contendrían los respectivos QTLs, a partir del mapa físico construido para la especie usando el cv. 'Cabernet Sauvignon', trabajo efectuado en el INRA de Francia [ADAM-BLONDON *et al*, 2005]. Un *contig* es un grupo de clones de tipo BAC, cada uno conteniendo un fragmento del genoma de la especie en estudio, usualmente de ca. 100 kb, y que representan regiones superpuestas del genoma. Este mapa físico, compuesto por numerosos *contigs*, tiene una cobertura que representa el equivalente a 12 veces (12X) el

tamaño del genoma de la vid. Conocidos tales *contigs*, se identificaron los respectivos clones BAC que los componen, y en base al número de identificación de cada clon BAC se llevó a cabo la recuperación, desde la base de datos *Genome Survey Sequence* del NCBI, de las secuencias de los extremos de los BACs (*BAC End Sequences*, BES).

Estos BES se usaron como templatado en alineamientos del tipo blastN contra la base de datos de ensamblados parciales de proyecto de secuenciación, donde se identificaron *contigs* de secuencia genómica. Estos últimos *contigs* fueron analizados mediante algoritmos disponibles en la herramienta GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>), a partir del cual se obtuvieron las secuencias CDS (secuencias codificantes) y las secuencias aminoacídicas de todos los posibles genes predeterminados. Para identificar la función tentativa de los genes y sus respectivas proteínas, las secuencias del CDS fueron analizadas secuencialmente mediante la herramienta Blastp en el sitio NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). En base a la función probable de estos genes, se seleccionaron aquellos que podrían estar relacionados con los caracteres de interés.

La base de datos derivada del proyecto de secuenciación Franco-italiano para el genoma de la vid (8X) [JAILLON *et al*, 2007] fue usada para la comprobación *in silico* de la ubicación de los GCs mapeados genética o físicamente para los GCs preliminares del desarrollo de la semilla (23 GCs), los 87 GCs del desarrollo de la baya y los genes identificados en el GL2 y GL18, para corroborar los resultados del mapeo físico y genético (http://www.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_ML/projet.html#constitution).

2.5 Diseño de Partidores.

El diseño de los partidores se realizó usando la herramienta computacional PRIMER3 [ROZEN *et al*, 2000] disponible en la red y de libre acceso (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Los partidores cumplieron al menos con 5 condiciones: el fragmento amplificado tuviera un rango de tamaño entre 150 y 350 pares de bases (pb), la temperatura de alineamiento de la reacción de PCR estuviese en torno a 58 °C, porcentaje GC sobre 30%, largo del partidor entre 18 y 24 nucleótidos, y descartando los posibles partidores complementarios. Los partidores diseñados que permiten realizar el mapeo genético son presentados en la Tabla I (Anexo).

2.6 Mapeo Físico de GCs.

De los genes candidatos, identificados en la literatura, para el desarrollo de la baya se seleccionaron 45 de acuerdo al proceso descrito en el cual participan. Los partidores generados para estos genes se ensayaron en la librería BAC de referencia de Cabernet Sauvignon, de acuerdo a LAMOUREUX *et al* (2006), a través de una reacción de PCR estandarizada para un termociclador Thermo modelo Px2, partiendo con una desnaturación inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, con una extensión final a 72 °C por 4 minutos; esta librería BAC de Cabernet Sauvignon, que representa 6 equivalentes del genoma (6X), se compone de 18.432 clones BAC que contienen fragmentos del genoma de la vid, organizados de forma tridimensional (3D) para que puedan ser analizados en una placa de 384 pocillos. El producto de las reacciones de PCR fue evaluado por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en buffer SB 1X (NaOH 0,05 M) con tinción de bromuro de etidio, después de una corrida electroforética de 350 Volts por 30 minutos. Posteriormente, las coordenadas identificadas como positivas (presencia de amplicón) fueron ingresadas al programa FPC versión 8.5.3 [SODERLUND *et al*, 1997], en el cual se puede visualizar el mapa físico e identificar los contigs que contienen los GCs. Dado que el mapa físico contiene SSRs que están integrados en mapas genéticos de referencias, es posible posicionar los GCs a través de los SSRs ya identificados en los diferentes grupos de ligamiento.

2.7 Genotipado y detección de SNPs e INDELS (Mapeo genético).

Mapear genéticamente un gen consiste en determinar su posición, relativa a otros marcadores o genes, dentro de los cromosomas. Para ello, se determinó la frecuencia de recombinación entre marcadores o genes cercanos, analizando la segregación de polimorfismos (SNPs, INDELS) en la progenie derivada del cruzamiento RxS ('Ruby Seedless' y 'Sultanina').

Para llevar a cabo esta etapa del estudio, los partidores generados tanto para GCs del desarrollo de la baya como para GCs del desarrollo de la semilla, se sometieron a una evaluación inicial de polimorfismo en la que cada partidior fue ensayado con nueve individuos, que incluyeron a los parentales de la población de mapeo RxS, dos variedades usadas como control ('Red Globe' y 'Cabernet Sauvignon'), cinco segregantes de la población de mapeo

seleccionados en forma aleatoria (individuos nº 46, 86, 99, 191 y 200) y un control negativo (agua). A partir de esta prueba se seleccionaron sólo los partidores identificados como polimórficos, es decir, aquellos en los cuales los individuos segregantes presentan 2 o más formas alélicas, las que se evaluaron mediante cambios conformacionales identificados en geles de MDE o acrilamida nativa.

Para evaluar los posibles polimorfismos (SNPs e INDELS) se utilizó SSCP (*single-strand conformational polymorphism*) una aproximación electroforética basada en geles no denaturantes de poliacrilamida, técnica en la cual se separa la doble hebra de ADN a hebra simple mediante denaturación, y durante la electroforesis la migración de las hebras separadas (hebras simples) se produce en base a 2 factores: conformación (estructura secundaria) de las hebras y tamaño del fragmento amplificado en la PCR.

Cada uno de los pares de partidores establecido como polimórfico para los GCs fue evaluado de la misma manera (SSCP) en cada uno de los individuos de la progenie. El genotipado de la población de mapeo para los partidores generados para los GCs se realizó bajo las mismas condiciones de PCR (PCR estándar descrito en el mapeo físico) para todos los amplicones polimórficos identificados para los GCs. La eficiencia de las reacciones fue comprobada en geles de agarosa al 2 % con tinción de bromuro de etidio. Esta electroforesis se corrió a 350 Volts por 30 minutos en buffer SB 1X (NaOH 0,05 M).

Los productos de las reacciones de PCR para el genotipado fueron separados en geles no denaturantes de poliacrilamida nativa (MDE™), los cuales se prepararon en base a la metodología descrita por MARTINS-LOPES *et al* (2001), y sometidos a electroforesis, para finalmente ser teñidos de acuerdo al protocolo descrito por CAETANO-ANOLLÉS y GRESSHOFF (1994).

2.8 Detección de QTLs.

Los datos fenotípicos fueron sometidos a análisis estadísticos básicos (media, varianza, etc.) y pruebas de normalidad con el programa Minitab 15 (Minitab Inc). Los datos se normalizaron con la transformación Johnson incluidas en el Minitab 15. La detección y análisis de QTL se realizó por separado para el mapa de los parentales (Ruby y Sultanina) y el mapa consenso, utilizando las funciones incluidas en el programa MapQTL 4.0 [VAN OOIJEN *et al*, 2002]. Una población derivada de polinización cruzada fue utilizada para todos los análisis. El mapeo por Intervalos (IM) [LANDER & BOSTEIN, 1989] se realizó sobre la base de los mapas de los parentales y el mapa consenso, en combinación con los datos normalizados de PB y PS. Para los QTLs probables, se seleccionó el marcador más cercano al *peak* del perfil LOD (*Logarithm (base 10) of odds*, logaritmo en base 10 de las probabilidades) como ‘Cofactor’ para la prueba de Selección Automática del Cofactor (ACS o *Automatic Cofactor Selection*), los marcadores que fueron aceptados como cofactores se seleccionaron para realizar la prueba de Mapeo Múltiple de QTLs (MQM o *Multiple QTL Mapping*) [JANSEN & STAM, 1994]. Para establecer la confianza de un QTL supuesto, se utilizó un test de permutación, en el que se estableció el nivel umbral, a partir del cual un QTL es declarado significativo o subjetivo [CHURCHILL & DOERGE, 1994]. El nivel umbral fue determinado después de 1000 permutaciones de los datos, en un análisis cromosómico y en un análisis genómico, con un nivel de significancia de 0,05. Un QTL fue considerado estadísticamente significativo o subjetivo si el LOD detectado por MQM tiene un valor mayor que los valores de LOD determinados después de 1000 permutaciones para el error de tipo cromosómico o genómico, respectivamente. Cada LOD se apoya en un intervalo de confianza construido para cada QTL [LANDER & BOSTEIN, 1989]. La asociación de cada marcador o Gen Candidato Posicional (PCG o *Positional Candidate Gene*) se validó con la prueba no paramétrica de suma de rangos KRUSKAL-WALLIS (KW) [LOWRY, 1999], usando los datos fenotípicos no normalizados.

3. RESULTADOS

3.1 Evaluación fenotípica.

La población F1 (RXS), está integrada por 139 individuos plantados en campo, de los cuales 116 han llegado a producir frutos. Estas 116 plantas son las que se utilizaron para las evaluaciones fenotípicas. Los dos caracteres de interés estudiados fueron el peso promedio por baya (PB) y el peso promedio de semillas por baya (PS). Para el estudio de ambos caracteres se realizaron mediciones fenotípicas, datos que fueron sometidos a un análisis estadístico para determinar los valores promedio (χ), la varianza (σ), el índice de Kurtosis (indica la agudeza del pico de la curva de distribución) y el índice de *skewness* (indica la oblicuidad de la curva). Por un lado, el análisis estadístico del carácter peso promedio por baya (figura 1) demostró una desviación de la distribución hacia la izquierda (índice de *skewness* de PB = 1,31, e índice de Kurtosis de PB = 2,7). Tal desviación fue leve y no tan marcada como la desviación que presentó el carácter peso promedio de semillas por baya (figura 2), el cual presentó una fuerte inclinación hacia las clases de menor tamaño de semilla (índice de *skewness* de PS = 1,58 e índice de Kurtosis de PS = 1,54). En base a tales resultados y a la correlación presente entre el PS y el PB de cada individuo (figura 3), se concluyó que la población F1 analizada tenía una mayor proporción de individuos con bajo peso promedio de semillas (apirénicos) y una mayor proporción de individuos con bajo peso promedio de baya. El test de normalidad aplicado como se describe en Materiales y Métodos, indicó que ninguno de los dos caracteres tiene una distribución normal; las figuras 1 y 2 reflejan esta ausencia de normalidad. Sin embargo, la detección de QTLs se basa en datos con distribución normal, por tal motivo, estos fueron normalizados.

Los datos fenotípicos obtenidos se normalizaron mediante la transformación de Johnson (ver Materiales y Métodos). Para PB se utilizó la ecuación de normalización $Y = -1,06594 + 1,68388 * \text{Asinh}[(X - 120,812) / 201,486]$ y para PS se utilizó $Y = 1,01475 + 0,373729 * \text{Ln}[(X + 0,0000141508) / (0,121352 - X)]$.

Para relacionar el desarrollo de la baya al peso fresco de ésta, se midieron los diámetros de las bayas. A partir de estos resultados, se determinó la existencia de una correlación positiva entre tamaño de la baya y peso de la baya (datos no mostrados).

Figura 1. Distribución de la población de mapeo según clases de peso de bayas. Se presenta la distribución del peso de bayas en función del número de individuos de cada clase. Cada clase cubre un intervalo de 0,2 g.

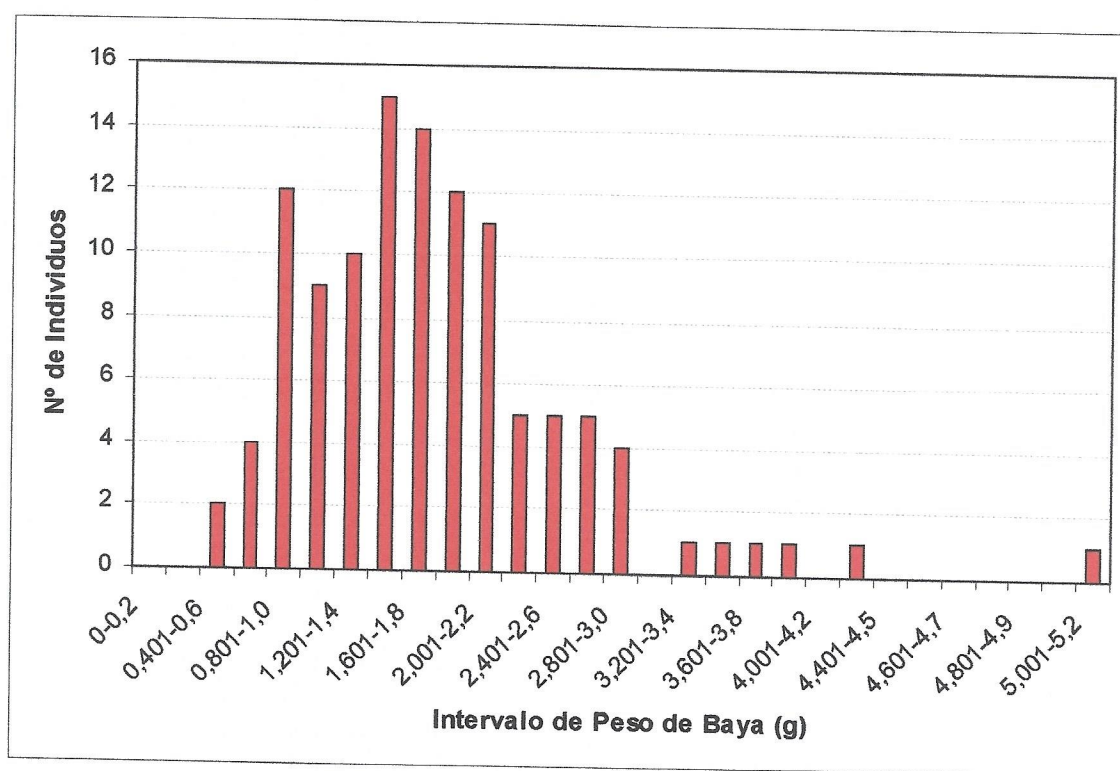


Figura 2. Distribución de la población de mapeo según clases de peso de Semilla. La distribución del peso de las semillas, se graficó en función del número de individuos de cada clase; cada clase cubre un intervalo de 1 mg.

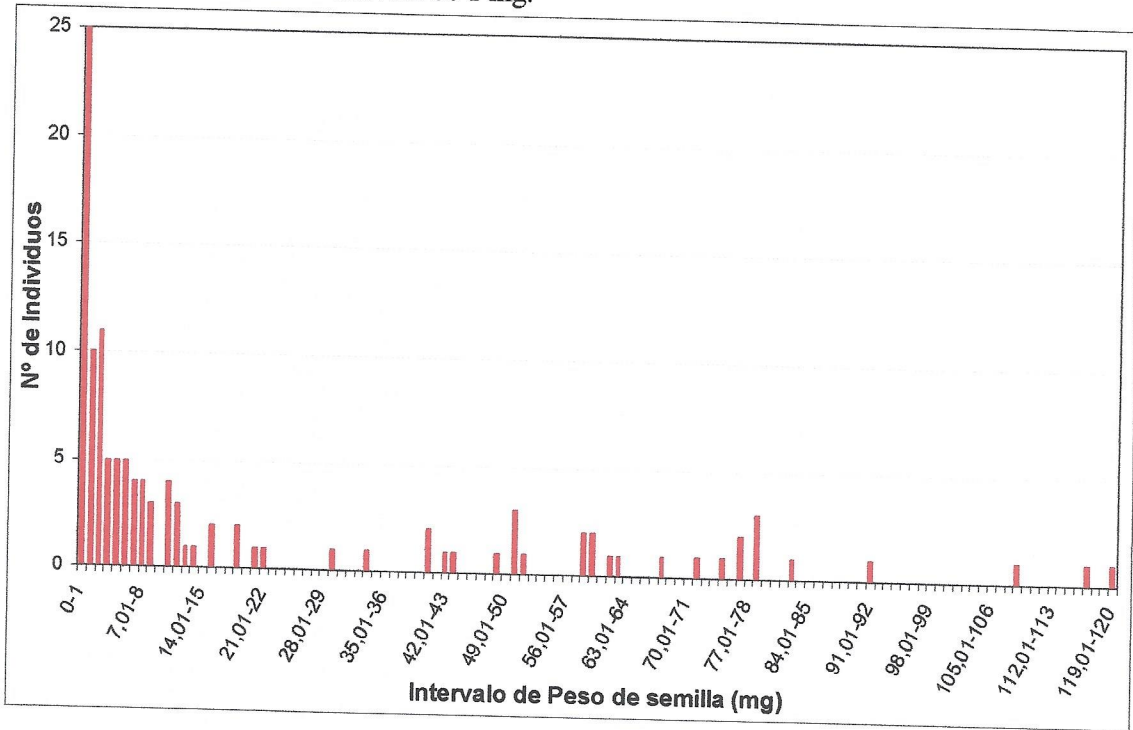
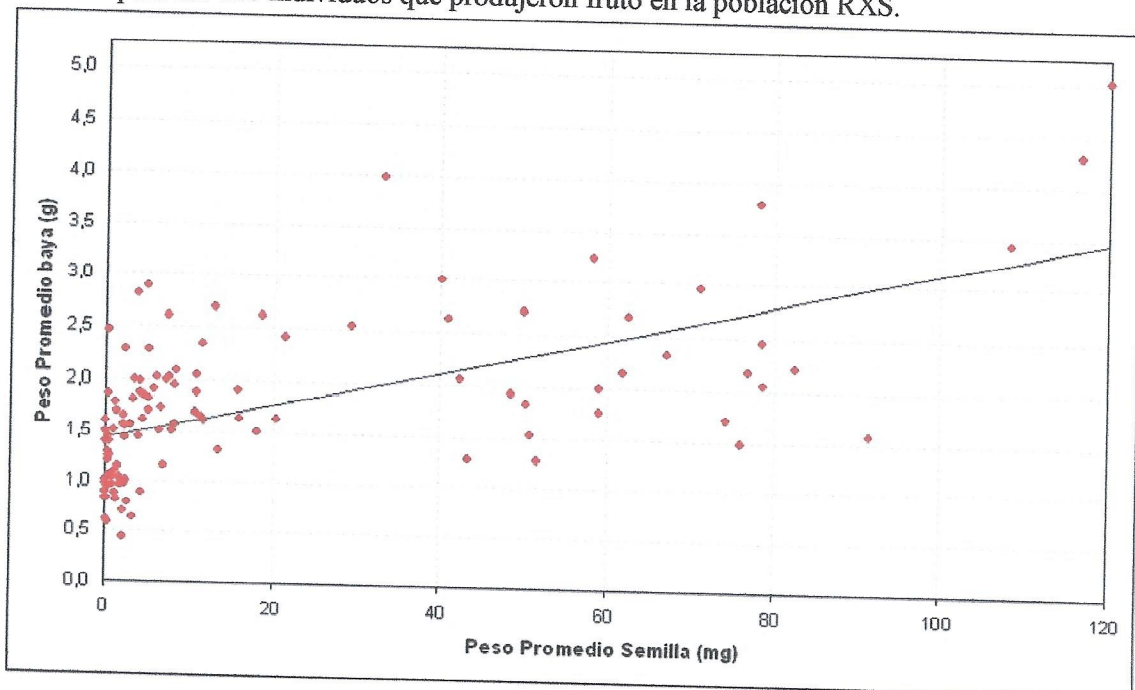


Figura 3. Relación entre el peso promedio de las semillas (PS) y peso promedio de las bayas (PB) de cada individuos de la población. Se grafica el PS versus el PB, ambos parámetros medidos para los 116 individuos que produjeron fruto en la población RXS.



3.2 Selección de genes candidatos (GCs).

Se seleccionaron genes candidatos a partir de la información disponible de algunas especies modelos, tales como *Arabidopsis* y tomate, además de la información de la vid. De esta manera, se realizó la identificación preliminar de un grupo de 60 GCs para el desarrollo de la semilla, de los cuales 23 genes candidatos fueron finalmente seleccionados (Tabla II, Anexo), de acuerdo a la función designada para cada uno de ellos y a su posicionamiento en el mapa físico, y su relación con los QTLs preliminares existentes.

Para el desarrollo de la baya se identificó un grupo de 87 GCs a partir de la mutante *flb* (*fleshless berry*) de cv. 'Ugni Blanc' [FERNANDEZ *et al*, 2007]. De éstos, se seleccionaron 45 para llevar a cabo el mapeo físico (Tabla III, Anexo). Basándose en el criterio de la función asignada a cada uno de ellos, se seleccionaron dos genes relacionados al metabolismo del ácido abscísico (ABA), 12 genes relacionados al desarrollo y morfogénesis, 10 genes identificados como reguladores transcripcionales, cinco genes relacionados al metabolismo secundario y 16 genes involucrados en respuesta a estrés y defensa.

3.3 GCs identificados en la secuencia del genoma de *Vitis vinifera* (GL2 y GL18).

Para dirigir la búsqueda de GCs a regiones específicas de los grupos de ligamiento 2 y 18, se utilizaron dos marcadores moleculares VMC7F2 y VVIB23 que co-localizan con los QTLs de interés. A partir de ellos se identificó el *contig* donde mapeaban físicamente, y se exploró el entorno de sus secuencias genómicas en busca de todos los posibles genes. En el GL18 se identificó el *contig* 1821, y en el GL2 el *contig* 175.

A todos los posibles genes encontrados en el *contig* 1821 (identificados en base a la herramienta GENESCAN) se les asoció una probable función biológica, de acuerdo a la descripción en la literatura (BLAST), descartando los casos de aquellos genes que no presentan una buena homología con genes de las bases de datos, y otros donde se presentan como genes desconocidos. De ellos se seleccionó el gen *VvAGL11* para el estudio, debido a que ha sido descrito en *Arabidopsis* como un gen que participa en las primeras etapas del desarrollo floral, etapas en las que se forma el óvulo. De forma homóloga, en el *contig* 175 y en torno al marcador

de VVIB23, se encontraron 85 genes. Una importante proporción de ellos (cerca al 16,5%) estaba relacionado con elementos móviles (proteínas virales asociadas a retrotransposones). De estos genes, 71 codificaban para proteínas de diversas funciones: unión a metales (Cu, Zn), reparación de ADN (fotoliasas), relacionadas a fotosíntesis, etc. De todos ellos un grupo de 6 GCs fueron seleccionados por su función (*VvFbox2*, *VvPAR2*, *VvPMEI1*, *VvPMEI2*, *VvPMEI4* y *VvVPE*) (Tabla IV, Anexo).

3.4 Mapeo Físico de GCs.

A partir de los 45 genes candidatos seleccionados para el desarrollo de la baya (Tabla III, Anexo) se diseñaron partidores y se realizaron reacciones de PCR para cada uno de ellos contra la librería de clones BAC ordenados en una matriz tridimensional como se indicó en materiales y métodos (PCR 3D). Los productos de cada una de las reacciones fueron evaluados en geles de agarosa y como resultado se obtuvieron las coordenadas de cada uno de ellos. Estos datos se ingresaron al programa FPC que maneja la base de datos del mapa físico parcial (6X) de Cabernet Sauvignon, mediante el cual se identificaron *contigs*. En estos *contigs* y a través del mismo programa, fue posible identificar los marcadores de tipo SSR. De los 45 GCs seleccionados, sólo 32 genes se asociaron a marcadores con una posición conocida en el mapa de ligamiento de referencia, ya sea porque estos marcadores habían sido previamente mapeados por nuestro grupo, o porque los marcadores encontrados en esos *contigs* están descritos en bases de datos públicas o en referencias. Posteriormente, a medida que apareció el borrador del genoma de la vid, la posición de estos GCs fue verificada *in silico* (Tabla III, Anexo).

Se presentaron 13 genes candidatos que no pudieron ser mapeados físicamente debido a diferentes circunstancias. Por ejemplo, se encontraron 2 genes (*VvTF* y *VvDNAJ-1*) que aunque se encontraron asociados a marcadores, su ubicación no coincide con la posición determinada a través del mapeo *in silico* (Tabla III, Anexo). Otro caso se dio para *VvPAL1* y *VvPPOa*, que presentaron coordenadas en el PCR 3D, pero no fue posible establecer un *contig* porque las reacciones que fueron positivas en el PCR no son coordenadas válidas para el programa que carga los datos del mapa físico. Finalmente, no fue posible establecer las coordenadas 3D para el gen *VvDOF*, porque no se presentaron reacciones de PCR positivas (no hay amplificado). Estos casos pueden ser explicados por las propiedades intrínsecas de la genoteca utilizada para el

mapeo físico, que sólo tiene una representación parcial del genoma de la vid, aún cuando equivale a seis copias del genoma (6X) y existe un porcentaje, aunque muy bajo, de regiones del genoma que no están representadas, lo que explicaría el caso del gen *VvDOF*. Además puede contener clones que hayan sido anclados de forma errónea en algunos *contigs*, lo que genera falsos positivos y explicando también los casos de los genes *VvTF*, *VvDNAJ-1*, *VvPAL1* y *VvPPOa*. Errores de esta naturaleza no son aislados tomando en cuenta que el mapa físico esta generado en base a marcadores anclados por PCR y en base a perfiles de fingerprinting cuyo análisis pueden contener errores experimentales y errores estadísticos. Para el gen *VvPPOa* tampoco fue posible determinar una posición a través del mapeo *in silico*, debido a que no se ha establecido a qué cromosoma corresponde la zona del genoma en la que se encuentra localizado. Otros cuatro genes, uno de ellos correspondiente a un GC seleccionado (*VvZNF*) y otros tres genes (*VvPPOb*, *VvDNAJ* y *VvCHIB1*) que no se seleccionaron para el mapeo físico presentaron igual condición.

3.5 Mapeo Genético.

El mapeo genético para establecer en qué grupo de ligamiento (GL) se posiciona cada uno de los GCs, se realizó en la población F1 (RXS) mediante SSCP, cuyo fundamento es la migración diferencial de las hebras separadas del ADN (ssDNA) provocado por el cambio en el plegamiento de la estructura secundaria debido a la presencia de sitios con polimorfismos (SNPs e INDELS). La totalidad de partidores diseñados para los GCs del desarrollo de la semilla y de la baya se analizaron en busca de polimorfismos, usando los progenitores y algunos segregantes (ver materiales y métodos). Un ejemplo se demuestra en la figura 4, en la que se presenta dos partidores diseñados para el gen *VvVPE1* (a y b), uno que presenta polimorfismos (*VvVPE1-a*) y otro que es monoalélico (*VvVPE1-b*). Sólo aquellos que se identificaron como polimórficos se evaluaron en toda la población de mapeo, por ejemplo el caso del partidor *VvAGL11-10* (Figura5).

La evaluación preliminar de polimorfismos permitió establecer que de los 23 GCs relacionados al desarrollo de la semilla (Tabla II, Anexo), sólo 10 presentaron diferencias en la distribución alélica de los segregantes (*VvAP2*, *VvARF2*, *VvAPI5*, *VvBAN*, *VvFIS2*, *VvPKL*, *VvTT1*, *VvTT12*, *VvTNP-SR* y *VvSPY*).

Por otro lado, en la búsqueda de GCs de los grupos de ligamiento 2 y 18 se lograron identificar 6 GCs, cuya función estaría relacionada al desarrollo de la baya (*VvFbox2*, *VvPAR2*, *VvPMEI1*, *VvPMEI2*, *VvPMEI4* y *VvVPE1*) y un gen cuya función estaría asociada al desarrollo de la semilla (*VvAGL11*).

Considerando los GCs para el desarrollo de la semilla y de la baya se mapearon genéticamente un total de 17 genes en los siguientes grupos de ligamiento (GL): *VvPMEI1*, *VvPMEI2*, *VvPMEI4*, *VvPAR2* y *VvVPE1* se localizan en el GL2; *VvARF2* en el GL3; *VvAP2* en el GL7; *VvSPY* en el GL8; *VvAPI5* y *VvFbox2* en el GL10; *VvTTI2* en el GL12; *VvTNP-SR* en el GL14; *VvBAN* en el GL15; *VvFIS2* en el GL16; *VvAGL11* y *VvTTI* en el GL18 y finalmente *VvPKL* en el GL19 (Figura 6).

La mayor parte de los GCs mapeados genéticamente (15 GCs) coincidió con la posición determinada en el genoma a través del mapeo *in silico*. La excepción fue el gen *VvPKL*, que se posicionó genéticamente en el GL19 y su ubicación *in silico* fue en el cromosoma 4. Por otro lado, *VvARF2*, cuya posición mediante el mapeo genético se determinó en el GL3, no tuvo una posición definitiva en el mapeo *in silico*.

Otra evidencia de la representación parcial del mapa preliminar (6X) del genoma de la vid, es que el gen *VvFbox2* ha sido identificado como GC en el análisis del contig 175 en el GL2, sin embargo, los resultados entregados en el mapeo genético y mapeo *in silico* lo ubicaron en el GL10, lo que podría ser consecuencia de un clon ubicado incorrectamente en el *contig* 175, sin descartar que existe una alta redundancia de genes del tipo Fbox, lo cual podría afectar el diseño de partidores específicos o podría afectar los resultados de los alineamientos.

Figura 4. Prueba de polimorfismos para dos partidores diseñados para gen *VvVPE1*. Los partidores a y b, fueron ensayados con los parentales (Ruby: RU y Sultanina: SU), dos variedades controles (Red Globe: RG y Cabernet Sauvignon: CS), un control negativo (agua) y cinco individuos segregantes de la población (43, 86, 99, 191 y 200).

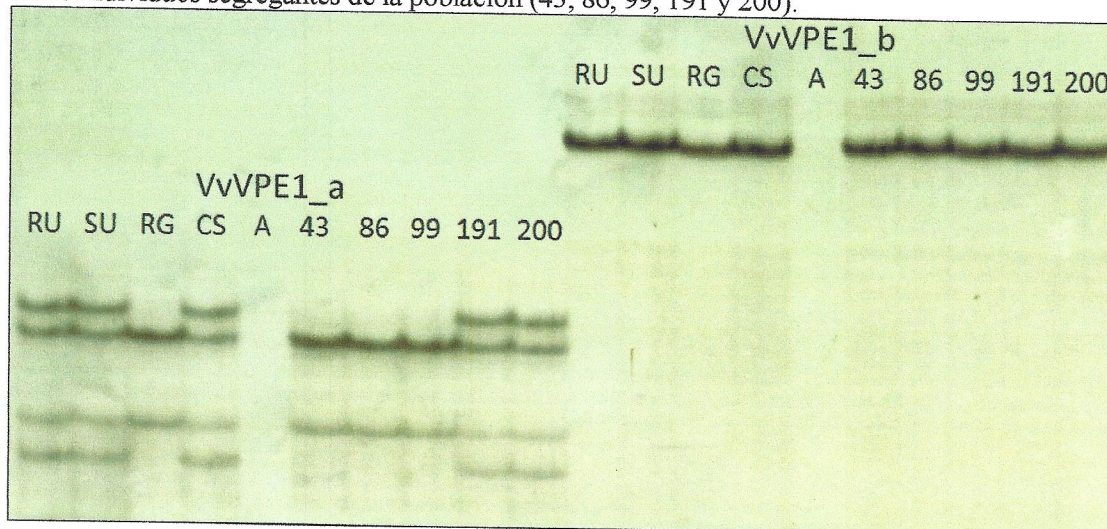


Figura 5. Genotipado de la Población RxS con partidor *VvAGLII-10*. Se ensayó el partidor *VvAGLII-10* con la población de segregantes (cada individuo se presenta con un número), los dos parentales (Ruby: RU y Sultanina: SU) y la variedad control (Cabernet Sauvignon: CS), estos tres últimos presentados con un asterisco (*). En base a la migración de las bandas en el SSCP para la población, se determinó la frecuencia alélica.

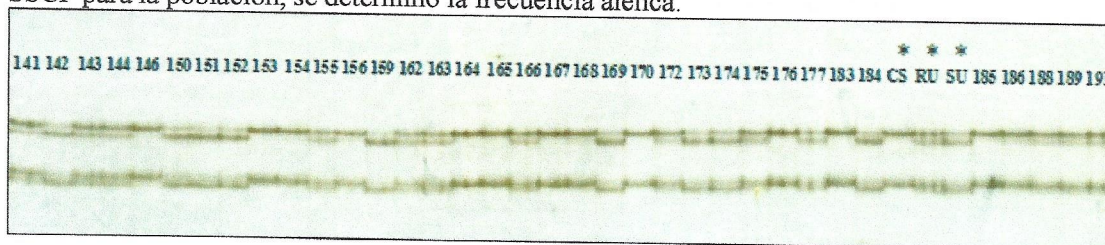
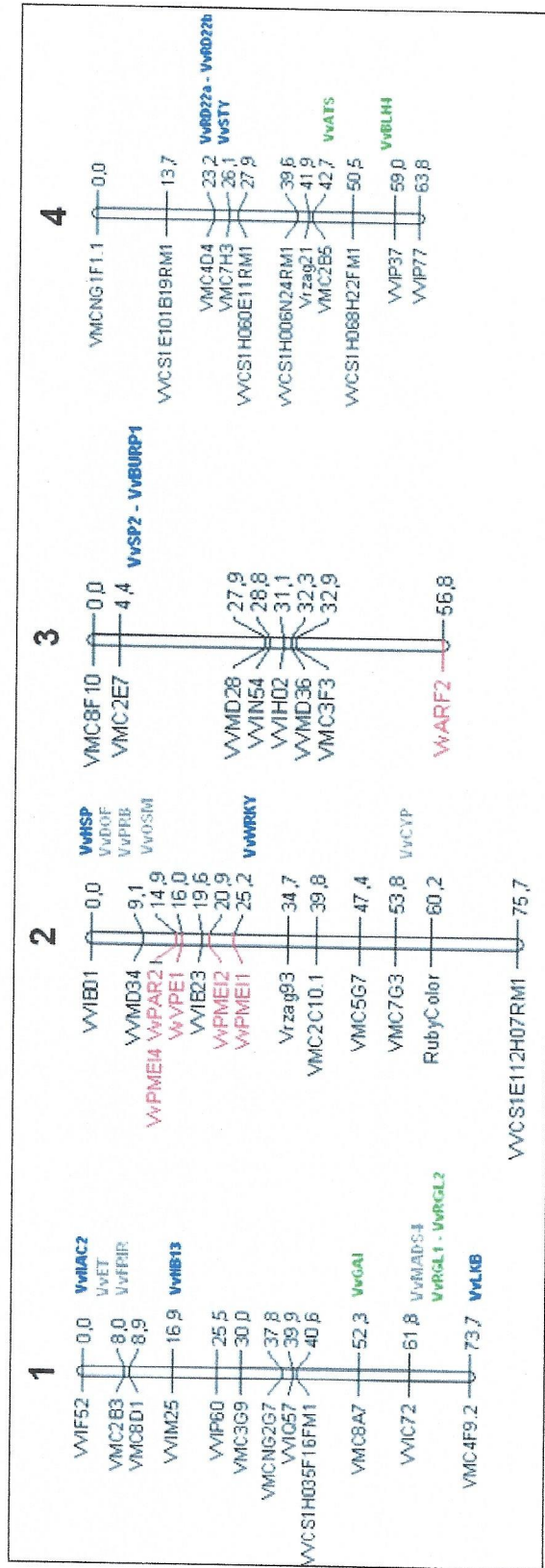
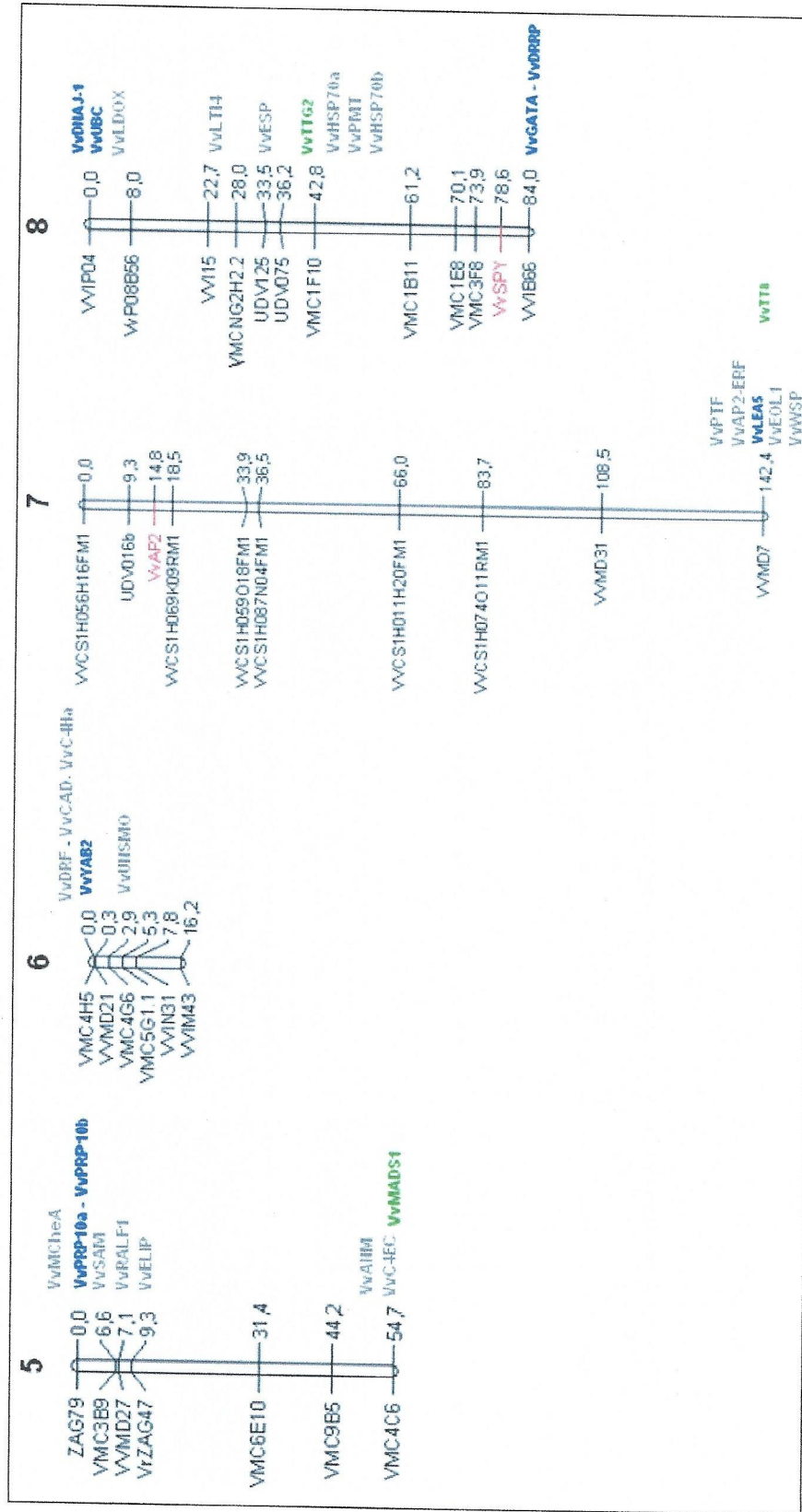


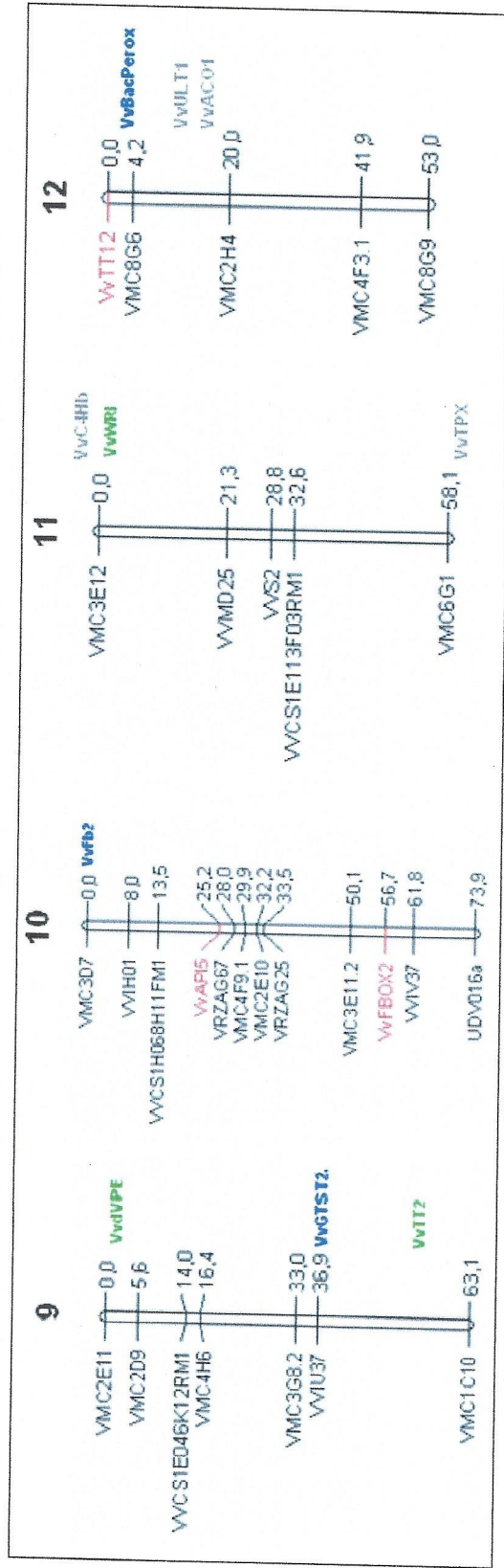
Figura 6. Mapa de ligamiento genético de *Vitis vinifera* L. Se muestran los 19 grupos de ligamiento correspondientes al genoma de vid (mapa Integrado). En rojo se indican los GCs mapeados genéticamente e *in silico* en cada GL de las Tablas II y IV, en verde los GCs mapeados físicamente e *in silico* presentados en la Tabla II, en azul los GCs mapeados físicamente e *in silico* presentados en la Tabla III y en gris los GCs sólo mapeados *in silico* de la Tabla III.



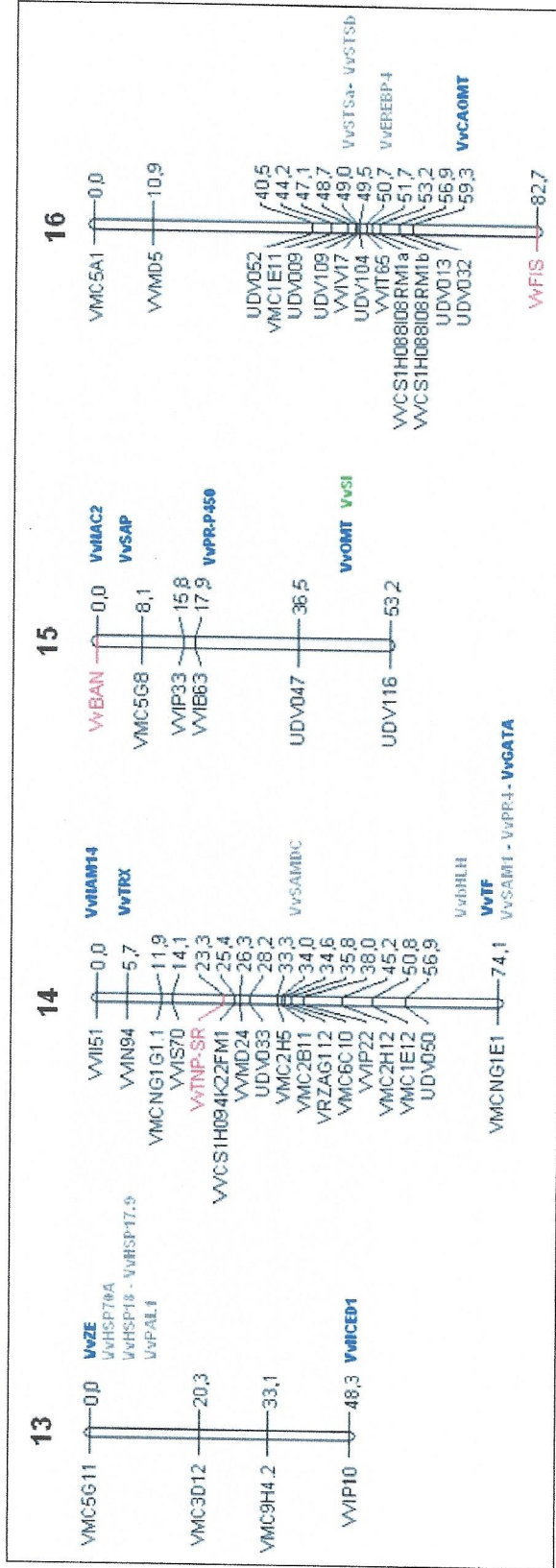
Continuación Figura 6. Mapa de ligamiento genético de *Vitis vinifera* L.



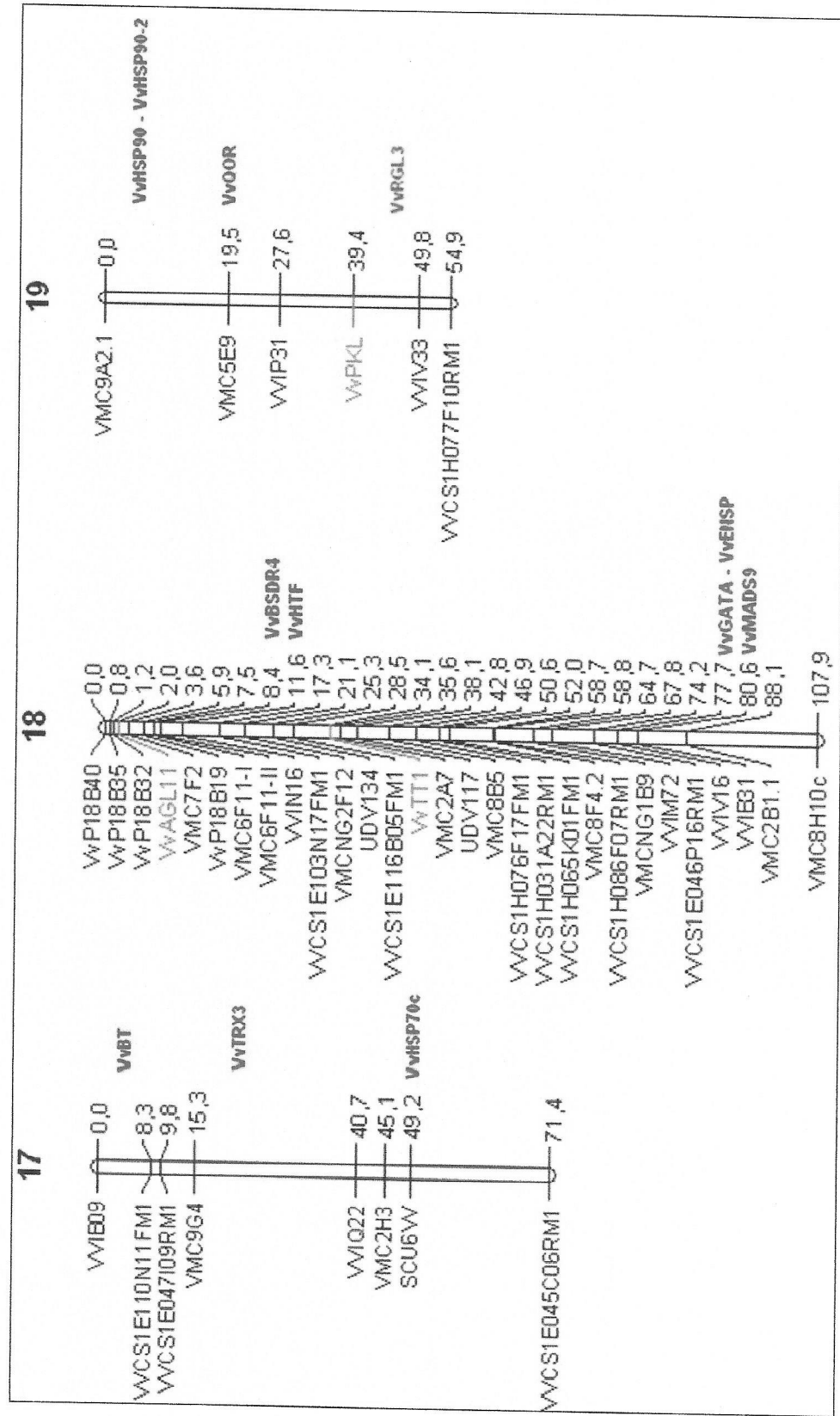
Continuación Figura 6. Mapa de ligamiento genético de *Vitis vinifera* L.



Continuación Figura 6. Mapa de ligamiento genético de *Vitis vinifera* L.



Continuación Figura 6. Mapa de ligamiento genético de *Vitis vinifera* L.



3.6 Detección de QTLs.

A través de la herramienta *Interval Mapping* (IM), que realiza un mapeo por intervalos, se encontraron en el mapa de ligamiento QTLs para PB en los GL2, GL8, GL14 y GL18 (Figura 7 y Tabla V), en tanto para el PS se encontraron QTLs en los GL2 y GL18 (Figura 7 y Tabla VI). Todos estos QTLs poseen un valor de LOD (cuociente logarítmico entre la probabilidad de que el QTL exista o no) al menos superior al LOD umbral subjetivo determinado para cada QTL, límite que llevó a descartar otros posibles QTLs. Los QTLs detectados en los distintos mapas (Ruby, Sultanina e Integrado) y su nivel de significancia se resumen en las tablas V (PB) y VI (PS).

Se determinó que el valor de LOD umbral para denominar como significativo un QTL debía tener un valor mayor o igual a 4,3 en el caso del peso de la baya (PB) y 4,2 en el caso del peso de la semilla (PS). Para el PB sólo el QTL del GL18 fue determinado como significativo (LOD = 6,78), debido a que sobrepasó el valor de LOD umbral establecido. En cambio, para PS ambos QTLs, GL2 y GL18, fueron establecidos como significativos, con valores de LOD de 4,88 y 24,92, respectivamente.

En tanto, en el mapa Integrado los QTLs determinados para PB en el GL2, GL8 y GL14 fueron establecidos como QTLs subjetivos, es decir, el valor de LOD detectado para cada uno de ellos estuvo bajo el LOD umbral estimado como significativo y sobre el LOD umbral considerado subjetivo. En tanto, el QTL detectado en el GL18 se determinó como significativo, ya que el valor de LOD detectado (6,78) superó el umbral límite de 4,3 (Tabla V).

Al comparar los QTLs presentes en los mapas generados, dos grupos de ligamiento presentaron diferencias, el GL8 y GL14. Se observó que en algunos casos no fue posible detectar los mismos QTLs. Por ejemplo, en el mapa de RU en el GL8 no se detectó un QTL para peso de la baya, que sí se observó en los otros mapas. Esta ausencia del QTL se puede deber a varias causas: ausencia de polimorfismos en esa región del cromosoma en este parental; porque simplemente el QTLs no es detectable, a pesar de presentarse polimorfismos en esa zona; o porque esa región del cromosoma no está presente. Lo mismo sucedió en el GL14 en el mapa de SU. De forma análoga, el QTL de PS en el GL2, no se detectó en el mapa de RU.

Tabla V. **QTLs detectados para el peso promedio de la baya (PB)**. El análisis fue realizado con los mapas generados para los respectivos progenitores (Ruby y Sultanina) y para el mapa Integrado. En las filas se indican los grupos de ligamiento (GL) que contienen los QTLs para peso de baya, los valores umbrales para determinar la significancia del QTL (LOD umbral subjetivo/significativo), el gen utilizado como cofactor en el análisis MQM, el valor de LOD detectado, el porcentaje de explicación de la varianza asociado al gen que co-localiza con el QTL detectado y el tipo de QTL determinado.

Mapa	GL	LOD umbral subjetivo	LOD umbral significativo	Cofactor para MQM	LOD detectado	% varianza explicada por el gen	Tipo de QTL
Ruby	2	2,9	4,2	<i>VvPMEI2</i>	3,37	19,0	subjetivo
	14	2,8		<i>VvTNP-SR</i>	2,93	7,3	subjetivo
	18	3,3		<i>VvAGL11</i>	8,07	29,9	significativo
Integrado	2	2,8	4,3	<i>VvPMEI2</i>	3,83	19,0	subjetivo
	8	3,0		<i>VvSPY</i>	3,22	12,9	subjetivo
	14	2,7		<i>VvTNP-SR</i>	2,88	7,3	subjetivo
	18	3,2		<i>VvAGL11</i>	6,78	29,9	significativo
Sultanina	2	2,8	4,2	<i>VvPMEI2</i>	3,61	19,0	subjetivo
	8	3,2		<i>VvSPY</i>	3,27	12,9	subjetivo
	18	3,2		<i>VvAGL11</i>	7,03	29,9	significativo

Tabla VI. **QTLs detectados para el peso promedio de las semillas (PS)**. El análisis fue realizado con los mapas generados para los respectivos progenitores (Ruby y Sultanina) y para el mapa Integrado. En las filas se indican los grupos de ligamiento (GL) que contienen los QTLs para peso de semillas, los valores umbrales para determinar la significancia del QTL (LOD umbral subjetivo/significativo), el gen utilizado como cofactor en el análisis MQM, el valor de LOD detectado, el porcentaje de explicación de la varianza asociado al gen que co-localiza con el QTL detectado y el tipo de QTL determinado.

Mapa	GL	LOD umbral subjetivo	LOD umbral significativo	Cofactor para MQM	LOD detectado	% varianza explicada por el gen	Tipo de QTL
Ruby	18	3,2	4,1	<i>VvAGL11</i>	24,78	74,8	Significativo
Integrado	2	2,7	4,2	<i>VvPMEI2</i>	4,88	11,2	Significativo
	18	3,1		<i>VvAGL11</i>	24,92	74,8	Significativo
Sultanina	2	2,8	4,2	<i>VvPMEI2</i>	5,26	11,2	Significativo
	18	3,2		<i>VvAGL11</i>	24,69	74,8	Significativo

3.7 Integración de Genes Candidatos y QTLs.

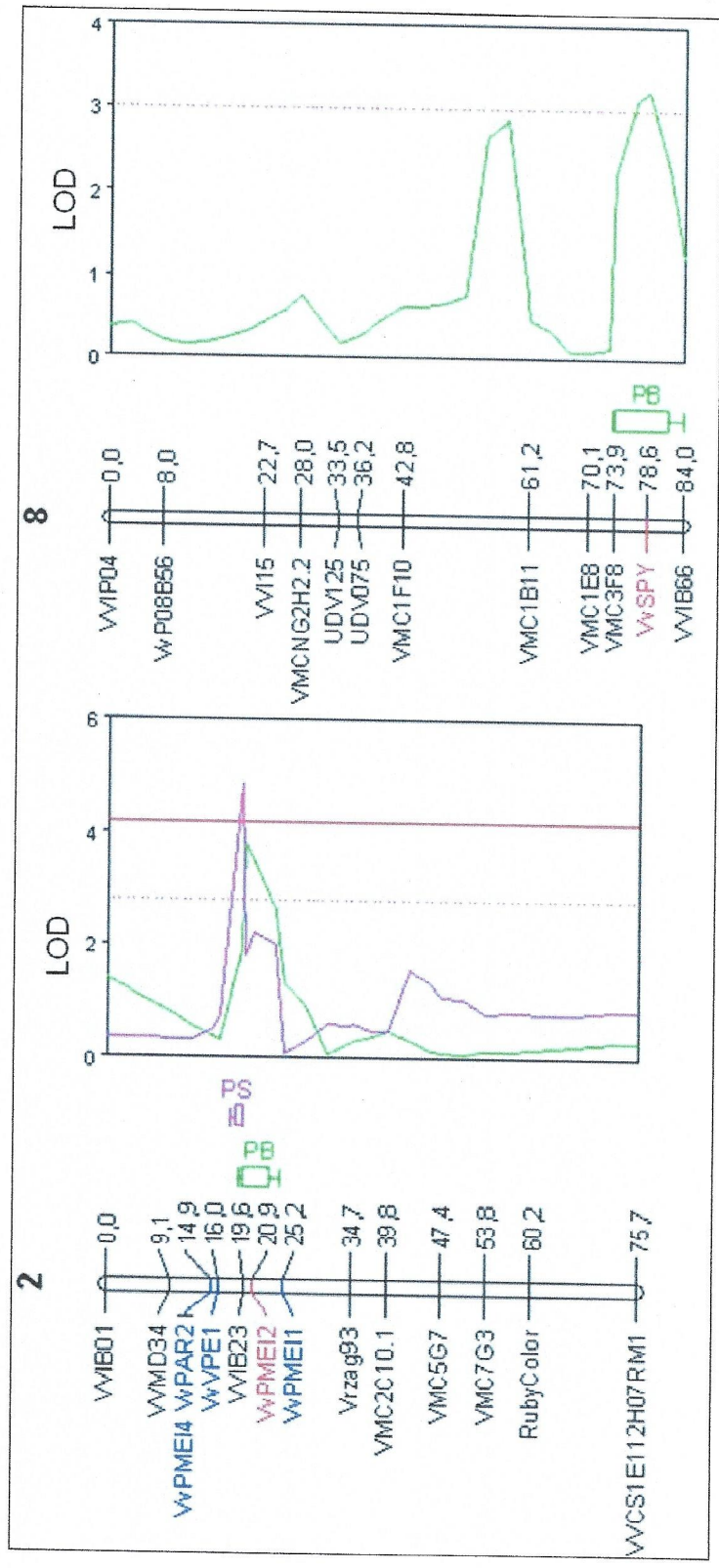
El análisis a través del programa MapQTL para el mapa Integrado determinó la co-localización de los QTLs detectados para PB y PS con genes candidatos en los distintos grupos de ligamiento (Figura 7).

En el GL2 se encontró un QTL subjetivo para PB y un QTL significativo para PS, ambos en la misma zona del GL y co-localizando con el gen *VvPMEI2*, de acuerdo a los análisis estadísticos de varianza mediante la prueba KRUSKAL WALLIS. Este gen explicó el 19,0% de la varianza fenotípica de PB (Tabla V) y el 11,2% de la varianza del carácter PS (Tabla VI).

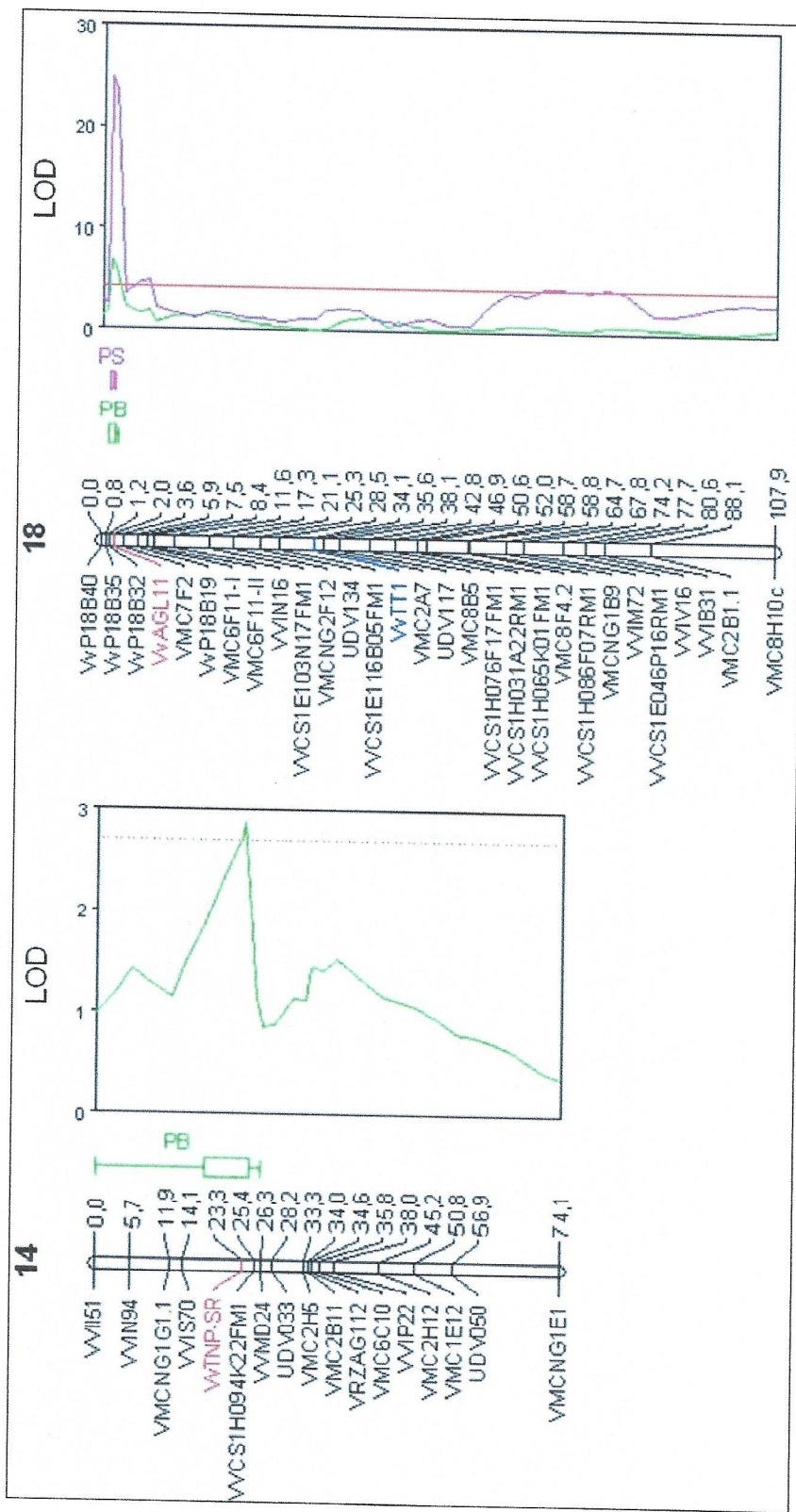
De forma análoga, en el GL18 se presentaron dos QTLs, uno principal para el peso de la semilla y un QTL para el peso de la baya, ambos ubicados en la misma región y co-localizando con el gen denominado *VvAGL11*. Estadísticamente este gen explicó el 29,9% de la varianza del peso de la baya y el 74,8% de la varianza en el peso de la semilla, presentándose como el principal candidato para determinar el desarrollo de la semilla y el carácter apirenia.

En tanto, en el GL8 y en el GL14 se presentaron sendos QTLs para peso de la baya, que co-localizaron con el gen *VvSPY* en el GL8 y el gen *VvTNP-SR* en el GL14, respectivamente. El primero de estos explicó un 12,9% y el segundo un 7,3% de la varianza fenotípica respectivamente.

Figura 7. Perfil de LOD para los QTLs detectados en el mapa Integrado para el peso promedio de baya (PB) y peso promedio de semillas (PS) en los GL2, GL8, GL14 y GL18. La curva representa el valor LOD a lo largo del mapa Integrado en los GL2, GL8, GL14 y GL18. La línea magenta representa el perfil para PS y línea verde el PB. Los genes marcados en rojo en cada GL co-localizan con el QTL respectivo, en tanto, en azul se presentan otros GCs presentes en el GL. Los intervalos de confianza de la región cromosómica que contiene el QTL se determinaron empíricamente con un 99 % de confianza y con un 95 % de confianza, respectivamente. La línea roja discontinua paralela al mapa indica el valor mínimo de LOD subjetivo, en tanto, línea roja continua paralela al mapa indica el valor mínimo de LOD significativo.



Continuación Figura 7. Perfil de LOD para los QTLs detectados en el mapa Integrado para el peso promedio de baya (PB) y peso promedio de semillas (PS) en los GL2, GL8, GL14 y GL18.



4. DISCUSIÓN

Los caracteres agronómicos de interés productivo, especialmente los relacionados a calidad y rendimiento, generalmente son rasgos continuos que presentan un control de tipo poligénico, es decir, están determinados por la acción conjunta y coordinada de una serie de genes. Para identificar las regiones genómicas donde se encuentran estos genes responsables del fenotipo se utiliza análisis de QTLs. La caracterización de los QTLs, identificar el gen o los genes responsables de la variación fenotípica, así como establecer la segregación alélica de este gen y comprender los mecanismos de control que regulan su expresión, es fundamental para identificar y caracterizar a nivel molecular caracteres de interés biológico y agronómico como el desarrollo del fruto o de la semilla. Esta información también puede tener aplicaciones en diversos ámbitos de la producción, entre los que destacan los programas de fitomejoramiento, mediante la selección de genotipos parentales y/o la selección de los segregantes que lleven las combinaciones alélicas más convenientes o bien para usar esos genes en el desarrollo de líneas transgénicas. En este estudio se han identificado genes que participan en la determinación de los caracteres peso de la baya (PB) y peso de semillas (PS) en uva de mesa (*Vitis vinifera* L.), a través de la identificación y mapeo de genes candidatos, y su asociación con QTLs.

Las evaluaciones fenotípicas de peso de bayas y peso de semillas sugieren que ambos caracteres presentan una distribución no normal (figuras 1 y 2), entre los cuales el peso de la semilla presenta una mayor desviación de la normalidad. Estas distribuciones presentan desviación negativa, es decir, se desplazan hacia valores bajos para el peso promedio de la baya y valores bajos de peso promedio de las semillas, aún cuando en el PS está desviación es más marcada que en PB. En tanto, al graficar el PS y el PB de cada individuo (figura 3) se aprecia una clara relación entre la presencia de semilla y el tamaño de la baya.

Esta distribución no normal puede tener diversas explicaciones: puede deberse a una selección sesgada de los individuos que componen la población de mapeo, a una respuesta a la interacción genotipo-ambiente (GxA), o a la presencia de un gen dominante. La distribución no normal se ha mantenido a través de los distintos periodos de evaluación (respecto a otras

temporadas) [MEJIA *et al*, 2007], y se presenta una correlación entre peso de baya y peso de semillas, por cual es posible descartar la primera explicación, pero no las dos últimas.

El mapeo físico de genes candidatos para el desarrollo de la baya realizado para 45 genes identificados en base a la mutante *flb*, presentó algunas limitaciones como ausencia de clones representativos que impide la identificación de coordenadas, presencia de falsos positivos que dan cuenta de *contigs* equivocados o presencia de *contigs* sin microsatélites, que hace imposible el anclaje de estos genes al mapa de ligamiento. Estas limitaciones probablemente se explican por el ensamblaje parcial de la librería de clones genómicos utilizada, que aunque tiene una cobertura teórica de 6X, en la realidad pueden quedar numerosos fragmentos de ADN o segmentos del genoma de la vid no incluidos en dicha genoteca. También pueden ser explicadas por la cantidad de marcadores moleculares de tipo microsatélites ubicados en el mapa de ligamiento, tanto en el mapa parcial que se ha desarrollado en nuestro laboratorio, como en mapas que han sido presentados por otro grupos de trabajo [ADAM-BLONDON *et al*, 2004. DOLIGEZ *et al*, 2006] y que se encuentran disponibles en las bases de datos. Estas limitaciones se reflejan en que de los 45 genes, sólo 32 (71,1%) fueron mapeados físicamente de forma correcta, es decir, coincidiendo el mapeo físico y el mapeo *in silico*. De los 13 genes que no han sido mapeados físicamente, ocho entregaron coordenadas para el PCR 3D, y que permite asociarlos a *contigs* específicos, pero no presentaron marcadores (SSRs) asociados, lo cual demuestra que son mapas parciales. Otros dos genes presentaron coordenadas puntuales, pero no fue posible encontrar *contigs* asociados, y el gen *VvDOF* no presentó coordenadas. En tanto, dos genes presentaron una posición distinta al comparar el mapeo físico y el mapeo *in silico*, lo que se explicaría por la presencia en la librería de clones de falsos positivos, lo cual generó a su vez coordenadas y *contigs* erróneos, y por ende, tales genes se asociaron incorrectamente a microsatélites.

En la búsqueda de genes candidatos para desarrollo de la semilla en el GL2, se identificó el gen *VvFbox2* a partir del *contig* 175, sin embargo, el mapeo genético y el mapeo *in silico* ubicaron a este gen en el GL10, lo que implica que en el armado de este *contig* se insertó de forma equivocada un clon (clon 10043) que no pertenece a esta posición. Por otro lado, el gen *VvPKL* fue mapeado genéticamente en el GL19, pero este resultado no coincide con el mapeo físico y el mapeo *in silico*, mediante los cuales se posicionó en el GL14. Este hecho puede

asociarse a 2 errores, en diseño de partidores y genotipado de la población. En el primero, los partidores diseñados para mapear este gen podrían haber reconocido una región conservada, común a otras familias de proteínas, y si el gen *VvPKL* no presenta polimorfismos en el segmento amplificado y en cambio los genes que codifican para las otras proteínas si presentaren diferencias, entonces el mapeo habría estado dirigido a esos otros genes y no al gen objetivo *VvPKL*. El otro motivo para la discordancia entre mapeo genético y mapeo *in silico*, es el procedimiento de genotipado, en el cual una incorrecta lectura de los perfiles de migración (bandas), genera datos erróneos, produciendo una pérdida del balance en las proporciones mendelianas, lo que al momento de realizar el mapeo genera una distorsión en la asociación de los genes candidatos (u otros marcadores).

La integración de los datos fenotípicos con los análisis de los marcadores moleculares, a través de los programas estadísticos, ha permitido identificar seis QTLs, cuatro de ellos para el peso de la baya (PB), ubicados en GL2, GL8, GL14 y GL18, y dos QTLs para el peso de la semilla (PS), ubicados en los GL2 y GL18. De estos seis QTLs, cuatro habían sido detectados en temporadas anteriores (2004 y 2005). Para el PB se habían detectado 3 QTLs ubicados en el GL8, GL14 y GL18, y para el PS sólo se había detectado el QTL presente en el GL18. La aparición de los QTLs en el GL2 para PS y PB se puede explicar por tres factores relacionados a la estrategia utilizada y a cambios en la población de mapeo entre temporadas:

- 1) Número de individuos: en las evaluaciones fenotípicas realizadas en las temporadas 2004 y 2005 la población analizada no superaba los 90 individuos, en cambio en la temporada 2007 el número de individuos llegaba a 116, con lo cual se incrementó el nivel de detección;

- 2) Número de bayas consideradas en la evaluación: la cantidad de bayas analizadas en la temporada 2004 y 2005 era de 25 bayas por planta para determinar PB y PS; en cambio, en la temporada 2007 se aumentó a 300 bayas para el PB y a 150 bayas para el PS por planta, con lo cual se produce una disminución en el error asociado a la medición.

- 3) Cantidad de marcadores utilizados en la construcción del mapa de ligamiento: el mapa parcial preexistente de los trabajos realizados entre el año 2004 y 2005 se basaba en marcadores dominantes (AFLP y SCARs) y un bajo número de marcadores co-dominantes (SSRs). En tanto, para la temporada 2007 se complementaron los mapas parciales del año 2004 y 2005 con marcadores de tipo co-dominante (SSRs), lo cual permite aumentar la saturación del mapa.

Los QTLs detectados para PB y PS co-localizan tanto en el GL2 como en el GL18, lo cual quiere decir que se ubican en la misma zona del cromosoma, y que pueden ser explicados por los mismos genes, o por grupos de genes ligados en esta zona. En resumen, cuatro genes explicarían los seis QTLs encontrados de los análisis fenotípicos y genéticos; estos genes son *VvPMEI2*, *VvSPY*, *VvTNP-SR* y *VvAGL11*, y aunque actuarían concertadamente, cada uno de ellos participaría de manera diferente en el desarrollo de la baya o en el desarrollo de la semilla, o en ambos procesos.

VvPMEI2, ortólogo de *PMEI* (inhibidor de pectina metilesterasa e invertasa) en *Arabidopsis*, se ubicó en el GL2 y co-localizó con los QTLs de PB y PS, a través de los cuales explicaría el 19,0% y el 11,2% de la varianza fenotípica para ambos rasgos. La pectina es el principal constituyente enlazante de la pared celular (lámina media) primaria en las plantas superiores, donde puede llegar a constituir el 30% del peso seco. Se compone principalmente de ácido D-poligalacturónico (PGA) y tiene inserciones periódicas de L-ramnosa. Durante los procesos de división y expansión celular, los grupos carboxilos en la posición C6 del PGA son desmetilados por la enzima pectina metilesterasa (PME). La modificación de las pectinas genera reordenamiento en la integridad de la lámina media, que es el elemento que controla la adhesión intercelular, por lo que se ha propuesto que esta desmetilación en el PGA produce disminución en la firmeza de los tejidos que están relacionados con fenómenos fisiológicos como elongación celular, maduración de frutos y respuestas de defensa [IRIFUNE *et al*, 2004]. La actividad de PME es regulada por un inhibidor de naturaleza peptídica, *PMEI* (inhibidor de la pectina metilesterasa e invertasa), cuya expresión aumenta con la progresión de la maduración de frutas. Por otro lado, se reconoce a la pectina como un importante componente del mucílago de las semillas, el cual es depositado en el integumento para formar la cubierta seminal [WESTERN *et al*, 2004]. En la vid, donde la expansión de las células de la pared externa de la baya y de la semilla, tienen un importante rol durante la segunda etapa de crecimiento rápido de la baya y durante el desarrollo de la cubierta seminal, se podría categorizar este gen en un subconjunto de responsables del carácter apirenia, debido a la presencia de un gen regulador principal en el GL18. La actividad de esta pectina metilesterasa y su inhibidor podrían desempeñar un papel crucial en el desarrollo de semillas y bayas.

VvSPY, ortólogo de *SPINDLY* en *Arabidopsis*, fue identificado en un QTL para PB, en el GL8. Este gen explica el 12,9% de la variación fenotípica. *SPY* codifica para una N-acetilglucosamina transferasa ligada a oxígeno, descrita como una reguladora negativa y positiva de las vías de señalización de giberelinas (GAs) y citoquininas [GREENBOIM-WAINBERG *et al*, 2005. JACOBSEN & OLSZEWSKI, 1993. SILVERSTONE *et al*, 2007], respectivamente, aún cuando no se conoce el mecanismo a través del cual *SPY* distingue entre ambas vías de señalización, es posible que la interacción entre diferentes proteínas a través de la creación complejos multiproteicos podría afectar en distintos niveles de estas vías. En *Arabidopsis*, las mutantes *spindly* fueron identificadas por primera vez en virtud de su resistencia a la inhibición de la germinación y disminuir los efectos de paclobutrazol, un inhibidor de la biosíntesis de giberelinas (GA). Todos los alelos *spy* conocidos son recesivos y exhiben fenotipos similares a las de plantas silvestres tratadas reiteradamente con GA. En arroz y *Arabidopsis*, la función de *SPY* en la transducción de señales en respuesta a GA, está probablemente relacionada a un aumento de la actividad de proteínas que presentan el motivo DELLA [SILVERSTONE *et al*. 2007, SHIMADA *et al*, 2006]. Además, en las uvas de mesa, tanto GAs y CPPU (citoquininas sintéticas), son usadas recurrentemente para el aumento de tamaño de bayas [DOKOOZLIAN, 2001].

VvTNP-SR, un ortólogo una proteína transportina en *Arabidopsis*, ha sido identificado en un QTL para PB, en el GL14. Este gen explica el 7,3% de la varianza fenotípica para este rasgo. Codifica para una proteína que participa en el tráfico de moléculas como proteínas y ARN, desde y hacia el núcleo [NAKIELNY & DREYFUSS, 1999]. En los organismos eucariontes, la replicación del ADN y la biogénesis de ARN son procesos que ocurren en el núcleo de la célula, pero estos procesos son dependientes de proteínas que son sintetizadas en el citoplasma, por lo cual estas proteínas deben ser selectivamente transportadas al núcleo. El proceso de replicación del ADN se relaciona directamente con el proceso de división celular, este último es importante en primera etapa del desarrollo de la baya. En tanto, el transporte de ARNm para la síntesis de proteínas es vital para todos los procesos que ocurren a nivel celular, tanto para la división celular, como para la elongación celular, entre otros. La transportina controla el flujo de proteínas y ARNm desde y hacia el núcleo, este control puede determinar procesos tan importantes en el desarrollo de la baya, como división y elongación celular.

Los QTLs de mayor importancia detectados para PB y PS están localizados en el GL18. Ambos QTLs co-localizan con el gen *VvAGL11*, un ortólogo del gen *AGAMOUS* tipo 11 (*AGL11*) descrito en *Arabidopsis*. Este gen explica el 29,9% de la variación fenotípica del peso de la baya, y el 74,8% del peso de la semilla. En *Arabidopsis* *AGL11* ha sido descrito como un gen de expresión específica de carpelo, durante el desarrollo de la flor, y se expresa fuertemente en las semillas durante el desarrollo temprano de la baya. Estudios realizados [BOSS *et al*, 2002] sugieren que *AGL11* podría influir en el desarrollo del óvulo y que su alteración podría generar uvas con ausencia de semillas. Otro estudio [PINYOPICH *et al*, 2003] demostró que *AGL11* está fuertemente expresado en los funículos desde las etapas iniciales de desarrollo del óvulo, en los óvulos maduros y después de la fertilización. Dentro de esta misma línea, demostraron que mutantes de *agl11* presentaban frutos y semillas que son más redondas y más pequeñas que en el tipo silvestre, y que las células funiculares de la mutante se incrementan en número y en tamaño, lo cual sugiere que este gen es necesario para impedir el anormal crecimiento del funículo, cuya función es análoga al cordón umbilical como estructura que conecta las semillas a la fruta durante el desarrollo.

El hecho de que el gen *VvAGL11* explique el 74,8% de la varianza fenotípica lo ubica como el candidato principal para explicar la presencia de semilla en la uva de mesa, y por ende, en el responsable de la apirenia. Según la teoría de Bouquet y Danglot (estudios que los llevaron a postular que el fenotipo apirénico estaría controlado por tres genes recesivos heredados de manera independiente controlados por un gen dominante regulador), este gen correspondería al *locus* controlador de este rasgo. Sin embargo, es importante no descartar al gen *VvPMEI2*, que explica hasta el 11,2% de la variación fenotípica, lo cual es significativo y podría añadir alguna variación al rasgo apirénico, aunque no sería un gen determinante de apirenia en la uva de mesa (al menos en la genética correspondiente al cruzamiento de prueba usado en este trabajo, Ruby x Sultanina).

El alto porcentaje de explicación de la varianza por parte del gen *VvAGL11*, sugiere que este gen es el principal determinante del rasgo apirenia. Sin embargo, no es posible descartar la presencia y acción de otros genes o QTLs menores en el control genético de la apirenia o del desarrollo de la baya, que no han sido posibles de detectar debido a su bajo efecto, pero que pueden explicar la variación continua encontrada en la población de segregantes.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha confirmado la localización de varios QTLs (en GL8, GL14 y GL18), identificados en estudios preliminares (MEJIA, 2007), relacionados a los principales rasgos que determinan la calidad de uva de mesa (ausencia de semilla y tamaño de baya), y se han detectado dos nuevos QTLs, uno para peso de la baya y otro para peso de las semillas. Estos QTLs se detectaron ampliando el número de individuos y el número de marcadores respecto a las temporadas pasadas, y se encuentran ubicados en el GL2.

Se mapearon genéticamente 17 GCs y físicamente 32 GCs, de los cuales sólo cuatro genes candidatos co-localizan con QTLs. El hecho que el resto de los genes mapeados no co-localice con QTLs no significa que no sean responsables de alguno de los caracteres estudiados, significa que si llegan a participar de alguno de los procesos, el efecto que tienen es muy bajo, y por ello no es cuantificable a través de esta metodología.

Se identificaron cuatro genes candidatos, *VvPMEI2*, *VvSPY*, *VvTNP-SR* y *VvAGL11*, que co-localizan con los QTLs detectados para PB y que explican 19,0%, 12,9%, 7,3% y 29,9% de la varianza fenotípica, respectivamente, para este rasgo. Por su parte, los genes *VvPMEI2* y *VvAGL11* co-localizan con los QTLs detectados para PS y explican 11,2% y 74,8 % de la varianza fenotípica, respectivamente. El alto porcentaje de la varianza fenotípica para el peso de la semilla que explica el gen *VvAGL11* (74,8 %), lo sitúa como el principal gen involucrado en el desarrollo de la semilla en la uva de mesa, y responsable del rasgo apirénico. Este hecho concuerda con la teoría de BOUQUET y DANGLLOT, y sugiere que este gen podría ser el propuesto por estos autores como un gen regulador principal de la apirenia.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se cumplen los objetivos determinados en este trabajo, y se acepta la hipótesis planteada, debido a que se encontraron dos genes comunes (*VvAGL11* y *VvPMEI2*) que participan en la determinación de los caracteres peso de la semilla y de la baya. Así mismo, los genes identificados pueden ser usados como herramientas de selección asistida en programas de mejoramiento genético orientados a mejorar la calidad de la uva de mesa.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAM-BLONDON, A-F. ROUX, C. CLAUX, D. BUTTERLIN, G. MERDINOGLU, D. THIS, P. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. Theor. Appl. Genet., 109: 1017-27. 2004.
- ADAM-BLONDON, A-F. BERNOLE, A. FAES, G. LAMOUREUX, D. PATEYRON, S. Construction and characterization of BAC libraries from major grapevine cultivars. Theor. Appl. Genet., 110: 1363-1371. 2005.
- ASOEX (Asociación de Exportadores de Chile A.G.). Boletín N°34. Informativo Trimestral. 2007.
- BOSS, P. K. SENSI, E. HUA, C. DAVIES, C. THOMAS, M. R. Cloning and characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. Plant Science, 162: 887-895. 2002.
- BOUQUET, A. DANGLLOT, Y. Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Vitis, 35: 35-42. 1996.
- BROMAN, Karl W. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. Lab. animal, 30: 44-52. 2001.
- CABEZAS, J.A. CERVERA, M.T. RUIZ-GARCÍA, L. CARREÑO, J. MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. Genome, 49: 1572-1585. 2006.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. GRESSHOFF, P. Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. Promega Notes Magazine, 45:13-20. 1994.
- CHAMBERS, J. CLEVELAND, W. KLEINER, B. TUKEY, P. Graphical methods for data analysis. Wadsworth. 1983.
- CHURCHILL, G. A. DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics, 138: 963-971. 1994.
- COLLARD, B. C. Y. JAHUFER, M. Z. Z. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concept. Euphytica, 142: 169-196. 2005.
- DOKOOZLIAN, N. CPPU: A potential new plant growth regulator for California table grapes. In: Grape Notes. Edited by Extension UoCC. Tulare County; 2001.
- DOLIGEZ, A. *et al.* Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. Theor Appl Genet, 105: 780-795. 2002.

- DOLIGEZ, A. *et al.* An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. Theor. Appl. Genet., 113: 369-382. 2006.
- EBADI, A. SEDGLEY, M. MAY, P. COOMBE, B. Seed development and abortion in *Vitis vinifera* L., cv. Chardonnay. Int. J. Plant Sci., 157: 703-712. 1996.
- FANIZZA, G. LAMAJ, F. COSTANTINI, L. CHAABANE, R. GRANDO, M.S. QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*). Theor. Appl. Genet., 111: 658-664. 2005.
- FARNUM, Nicholas R. Using Johnson curves to describe non-normal process data. Quality Engineering, 9: 329-336. 1996.
- FERNANDEZ, L. ROMIEU, R. MOING, A. BOUQUET, A. MAUCOURT, M. THOMAS, M.R. TORREGROSA, L. The grapevine *fleshless berry* mutation: a unique genotype to investigate differences between fleshy and non-fleshy fruit. Plant Physiol., 140: 537-547. 2006.
- FERNANDEZ, L. TORREGROSA, L. TERRIER, N. SREEKANTAN, L. GRIMPLET, J. DAVIES, C. THOMAS, M.R. ROMIEU, C. AGEORGES, A. Identification of genes associated with flesh morphogenesis during grapevine fruit development. Plant Molecular Biology, 63: 307-323. 2007.
- GOES DA SILVA, F. *et al.* Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple vitis species and development of a compendium of gene expression during berry development. Plant Physiol., 139: 574-597. 2005.
- GREENBOIM-WAINBERG, Y. MAYMON, I. BOROCHOV, R. ALVAREZ, J. OLSZEWSKI, N. ORI, N. ESHED, Y. WEISS, D. Cross talk between gibberellin and cytokinin: the *Arabidopsis* GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. Plant Cell, 17: 92-102. 2005.
- HEWSTONE, N. VALENZUELA, J. MUÑOZ, C. ISELA-INIA, Nueva variedad de uva de mesa. Agric. Téc., 67: 201-204. 2007
- HINRICHSEN, P. HEWSTONE, N. VALENZUELA, J. PRIETO, H. MUÑOZ, C. “Mejora de la calidad de la uva de mesa”. En “Mejora genética de la calidad en plantas”. Soc. Española de Ciencias Hortícolas, Sociedad Española de Genética. Univ. Politécnica de Valencia. Valencia, España. 497-522. 2006.
- IRIFUNE, K. NISHIDA, T. EGAWA, H. NAGATANI, A. Pectin methylesterase inhibitor cDNA from kiwi fruit. Plant Cell Report, 23: 333-338. 2004.
- JACOBSEN, S. E. OLSZEWSKI, N. Mutations at the SPINDLY locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. Plant Cell, 5: 887-896. 1993.
- JAILLON, O. *et al.* The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature, 449: 463-467. 2007.

JANSEN, R. STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics, 136: 1447-1455. 1994.

KENNEDY, James. Understanding grape berry development. Department of Food Science & Technology Oregon State University. 2002.

LAHOUE, F. THIS, P. BOUQUET, A. Identification of a codominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine. Theor. Appl. Genet., 97: 950-959. 1998.

LAMOUREUX, D. *et al.* Anchoring of large set of markers onto BAC library for development of a draft physical map of grapevine genome. Theor. Appl. Genet., 113: 344-356. 2006.

LANDER, E.S. BOSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics, 121: 185-199. 1989.

LODHI, M. *et al.* A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Molecular Biology Reporter, 12: 6-13. 1994.

MARTINS-LOPES, P. ZHANG, H. KOEBNER, R. Detection of single nucleotide mutations in wheat using single strand conformation polymorphism gels. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 159-162. 2001.

MEJIA, N. GEBAUER, M. HEWSTONE, N. MUÑOZ, C. HINRICHSEN, P. Identification of QTLs for seedlessness, berry size, and ripening date in a seedless x seedless table grape progeny. Am. J. Enol. Vitic., 58: 499-507. 2007.

MOHAN, M. NAIR, S. BHAGWAT, A. KRISHNA, T. YANO, M. BHATIA, C. SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Mol. Breed., 3: 87-103. 1997.

NAKIELNY, S. DREYFUSS, G. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. Cell, 99: 677-690. 1999.

NAVARRO, M. RETAMALES, J. DEFILIPPI, B. Efecto del arreglo de racimo y aplicación de citoquinina sintética (CPPU) en la calidad de uva de mesa variedad 'Sultanina' tratada con dos fuentes de Giberelinas. Agric. Téc., 61: 15-25. 2001.

PENG, F. Y. *et al.* Generation of ESTs in *Vitis vinifera* wine grape (Cabernet Sauvignon) and table grape (Muscat Hamburg) and discovery of new candidate genes with potential roles in berry development. Gene, 402: 40-50. 2007.

PINYOPICH, A. DITTA, G. S. SAVIDGE, B. LILJEGREN, S. J. BAUMANN, E. WISMAN, E. YANOSFSKY, M. F. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. Nature, 424: 85-88. 2003.

ROZEN, S. SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386. 2000.

- SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics, 8: 552–560. 1923.
- SEMAGN, K. BJORNSTAD, A. NDJIONDJOP, M. N. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants, review. African Journal of Biotechnology, 5: 2569-2587. 2006.
- SHIMADA, A. *et al.* The rice SPINDLY gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis. Plant Journal, 48: 390-402. 2006.
- SILVERSTONE, A. TSENG, T. SWAIN, S. DILL, A. JEONG, S. OLSZEWSKI, N. SUN, T. Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 143: 987-1000. 2007.
- SODERLUND, C. LONGDEN, I. MOTT, R. FPC: a system for building contigs from restriction fingerprinted clones. CABIOS, 13: 523-535. 1997.
- SOTO Flores, Braulio. Mapeo genético de saturación dirigido al QTL principal para apirenia en uva de mesa (*Vitis vinifera* L.). Tesis (Título de Bioquímico). Santiago, Chile. Universidad de Santiago de Chile. 2007. Facultad de Química y Biología, 2007. 43H.
- TAMARA, L. WESTERN, D. S. YOUNG, G. H. WEI, L. T. LACEY S. A. HAUGHN, G.W. (2004) *MUCILAGE-MODIFIED4* encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by *APETALA2*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*, and *GLABRA2* in the *Arabidopsis* seed coat1. Plant Physiol, 134: 296–306. 2004.
- THODAY, J. M. Location of polygenes. Nature, 191: 368–370. 1961.
- VAN OOIJEN, J. BOER, M. JANSEN, R. MALIEPAARD, C. MapQTL 4.0. Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Wageningen: Plant Research International. 2002.
- VIVIAN-SMITH, A. KOLTUNOW, A. Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 121: 437-451. 1999.
- WESTERN, T. L. YOUNG, D. S. DEAN, G. H. TAN, W. L. SAMUELS, A. L. HAUGHN, G. W. *MUCILAGE-MODIFIED4* encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by *APETALA2*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*, and *GLABRA2* in the *Arabidopsis* seed coat. Plant Physiol, 134: 296-306. 2004.
- YIN, X. STAM P. KROPFF, J. M. Crop modeling, QTL mapping, and their complementary role in plant breeding. Agrom. J, 95: 90-98. 2003.



Sitios www (World Wide Web).

BURGE, C. & KARLIN, S. **The new GENSCAN web Server at MIT.** [En línea] <<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>> [Consultado entre Noviembre 2006 y Junio 2007].

NCBI: **National Center for Biotechnology Information U.S.** [En línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>> [Consultado entre Noviembre 2006 y Junio 2007]

ROZEN, S. **PRIMER3 (v.0.4.0). Pick primers from a DNA sequence.** [En línea] <<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>> [Consultado entre Noviembre 2006 y Junio 2007]

CNS (Centre National de Séquençage). **Grape Genome Browser.** [En línea] <http://www.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_ML/projet.html#constitution> [Consultado entre el periodo comprendido entre Octubre 2006 y Diciembre 2007].

LOWRY, R. **Prueba de Kruskal-Wallis para tres o más muestras independientes.** [Documento electrónico] <<http://faculty.vassar.edu/lowry/ch14a.html>> [Consultado entre Octubre y Noviembre 2007].

CHILDS, K. **TIGR Plant Transcript Assemblies.** [En línea] <<http://plantta.tigr.org/>> [Consultado entre Noviembre 2006 y Junio 2007].

DEGECHIVID: **Plataforma científica-tecnológica para el desarrollo de la genómica vegetal en Chile.** [En línea] <<http://www.genomicafrutos.cl/>> [Consultado entre el periodo comprendido entre Octubre 2006 y Diciembre 2007].

ANEXOS

TABLA I: “Lista de Partidores para genes candidatos mapeados genéticamente”.

TABLA II: “Genes candidatos para desarrollo de la baya y de semillas seleccionados de Lista Preliminar”.

TABLA III: “Genes candidatos para desarrollo de la baya identificados por FERNANDEZ *et al*”.

TABLA IV: “Genes candidatos para desarrollo de la baya y de semillas en GL2 y GL18”.

Tabla I. Lista de Partidores para genes candidatos mapeados genéticamente. GCs cuya posición se ha determinado en el mapa de ligamiento, para los cuales se presentarán los partidores utilizados (*Forward* y *Reverse*) y el tamaño del amplicón determinado al realizar el diseño de los partidores.

Abreviatura	Nombre completo	Partidores		Tamaño (pb)
		Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	
VvAGLI1	AGAMOUS tipo 11	CAAAGTCCACACAAAAGAAACTCAA	CTTGGGTCTTTTCTCTTTGCC	339
VvAP2	APETALA 2	TGCCCTATCAACCAACAAAACAAA	CATTTTCCCTCTCCCTTGAC	290
VvAPI5	<i>Apoptosis Inhibitory Protein 5</i> (Proteína inhibidora de apoptosis 5)	TCCTTTCTTCCCTTCCGTTTTC	GTGGTGCCTTGGTCCCTTGCTCT	325
VvARF2	<i>Auxin Response Factor 2</i> (factor de respuesta a auxina 2)	CTGCCGAGGGCCAGAATACC	CGATGTGATGAACCTGTAGCAA	275
VvBAN	BANYULS	AGTGGGTATTGGAAGTTGTGG	TGGCTCTGGTCTTAGGTATGTTG	317
VvFbox2	Proteína de la Familia F-box	GGCTTCAGACACCCACACA	TCAGCATCAAACTCGTAGTCATC	285
VvFIS2	<i>Fertilization Independent Seed 2</i> (Semilla de fertilización independiente)	GAACAGTGCACAAAACCA	GAGTATCCCCCAAAATCCAAAAAG	
VvPAR2	<i>Auxin-repressed protein</i> (proteína represora de auxina)	CCATGACCAAAAATCTGCAAC	TCTCAACAACCTCCCCAAAACA	230
VvPKL	PICKLE	TGATACACCATCCCCACCA	TGAAAGCATGTCGAGAGACAAC	267
VvPMEI 1	<i>Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor 1</i> (Inhibidor de pectina metilesterasa e invertasa 1 en plantas)	GGAAATGGAACACCCCTGAA	TGATGAGAGCCCAAGGCAAC	200
VvPMEI2	Inhibidor de pectina metilesterasa e invertasa 2 en plantas	AGCAGTGGCAGCTTTGTCC	TTTGTATTGCCCCTGGAGGT	255
VvPMEI4	Inhibidor de pectina metilesterasa e invertasa 4 en plantas	TGAAAACCCAGAGAGGCTAGTG	GGTGGAGGCATACTTGTGTA	299
VvSPY	SPINDLY	ACTTCGCCCTTGTCTTTGG	TTGATGACGGGACCTGATTT	305
VvTNP-SR	<i>Transportin-SR</i> (Similar a transportina SR)	GTCCTTGTCCGGGAATGAAAGA	GGCACATCTACGCCATGAA	203
VvTT1	<i>Transparent Testa 1</i> (Testa transparente 1)	GGCTTCATACCAATGCTTCCCT	TCAACCGCTACAACAATCTCC	339
VvTT12	<i>Transparent Testa 12</i> (Testa transparente 12)	GCCCCACACCTTCCCATC	CAGTTAGTCTTTCACCTTACCCAAAA	328
VvVPE	<i>Vacuolar Processing Enzyme Beta</i> (Enzima de procesamiento vacuolar beta)	CATCGATCTGTTTGCCTCCT	CCCTCAGGCCCTCCTCTTTTC	305

Tabla II. Genes candidatos para desarrollo de la baya y de semillas seleccionados de Lista Preliminar. GCs procedentes de la lista preliminar presentados en orden alfabético de acuerdo al nombre. Se informa el nombre del ortólogo, número de acceso en GenBank, Función identificada, GL en *Vitis vinifera* L., determinado por mapeo físico o mapeo genético, según corresponda, la posición determinada por el mapeo *in silico* (chr: cromosoma y posición de la base de inicio y término del gen) y el acceso en CNS (Base de datos del programa de secuenciación del genoma de la vid). Los genes marcados por un * han sido mapeados físicamente e *in silico*, pero no genéticamente, en tanto, los que no presentan este símbolo han sido mapeados por las tres estrategias.

Nombre	Nombre ortólogo	GenBank	Función	GL en Vv	Posición <i>in silico</i>	# acceso CNS
VvAP2	APETALA2	AAC13770	Codifica para un gen homeótico floral, un miembro de la clase de factores de transcripción P2/EREBP (proteína que se une a elementos de respuesta a etileno) y que están involucradas: en la especificación de la identidad del órgano floral, en el establecimiento de la identidad del meristema floral, en la supresión de la "indeterminación" del meristema floral y en el desarrollo del óvulo y la cubierta seminal. AP2 también tiene un rol en el control de la masa de la semilla.	7	chr7:11563494..1156707 ₉	GSVIVT00019538001
VvAPI5	Apoptosis inhibitory protein 5 (Proteína Inhibidora de Apoptosis 5)	NP_565777	Esta familia está compuesta de secuencias de API5 de varios organismos. La apoptosis o muerte celular programada es una forma fisiológica de muerte celular que ocurre en el desarrollo embrionario y formación de órganos. API5 es un gen anti apoptosis, cuya expresión previene la muerte celular programada que ocurre ante la necesidad de otros factores de transcripción. Se utilizó este gen porque inicialmente había sido identificado como ortólogo de ARP1 en <i>Arabidopsis</i> .	10	chr10:758931..783535	GSVIVT00003005001
VvARF2	Auxin Response Factor 2 (Factor de Respuesta a auxina 2)	AAC49752	Codifica para un factor de respuesta a auxina. Los mutantes tienen muchos defectos incluyendo las hojas alargadas del rosetón, fertilidad reducida, senescencia tardía, defectos en la elongación del hipocotilo, semillas y cotiledones agrandados. No puede mediar (corregir) los efectos de la auxina. Aumenta el tamaño de la semilla debido a que incrementa la proliferación celular.	3	chrUn:58420724..584210 ₁₂	GSVIVT000009451001
VvAITS*	ABERRANT TESTA SHAPE (forma aberrante de la testa)	NP_199077	Codifica para un miembro de la familia KANADI de posibles factores de transcripción. Involucrado en a formación del integumento durante el desarrollo del óvulo y expresado en el límite entre el integumento interno y externo. Es esencial para orientar la dirección del crecimiento laminar del integumento interno.	4	chr4:8948711..8957617	GSVIVT00026687001
VvBAN	BANYULS	AAF23859	Regulador negativo de la biosíntesis de flavonoides, las mutantes acumulan los pigmentos flavonoides en su cubierta seminal, supuesta oxidoreductasa. Se piensa que un complejo ternario integrado por IT2, IT8 y ITG1 es necesario para la expresión correcta de BAN en el endotelio de la semilla., el gen BANYULS codifica para una proteína tipo DFR y es un marcador del desarrollo temprano de la cubierta seminal.	15	chr15:5716787..5718442	GSVIVT00026339001

Continuación Tabla II.							
Nombre	Nombre Ortólogo	GenBank	Función	GL en Vv	Posición in Siftico	# Acceso CNS	
VvBLH4*	BEL1-tipo homeodominio 4	NM_127939	Proteína con homeodominio involucrada en la morfogénesis del óvulo.	4	chr4:12261778..12267117	GSVIVT00025022001	
VvdYPE*	DELTA VACUOLAR PROCESSING ENZYME (enzima de procesamiento vacuolar delta)	NP_188656	Codifica para una proteína de procesamiento vacuolar con actividad tipo 1-caspasa, que es específicamente expresado en el integumento interno durante el desarrollo de la semilla. Las mutantes exhiben un anormal desarrollo de la cubierta seminal. Se especula que está involucrado en la muerte celular de las células de la capa limitrofe, cuyo propósito es formar la cubierta seminal.	9	chr9:15150985..15154508	GSVIVT00029598001	
VvFIS2	Fertilization Independent Seed 2 (Semilla de fertilización independiente)	AAD09104	Regulador negativo del desarrollo de la semilla en ausencia de la polinización. FIS2 codifica para una proteína con motivos dedos de zinc C2H2 y tres posibles señales de localización nuclear, indicando que es un probable factor de transcripción, confiere el fenotipo gametofítico femenino.	16	chr16:5180709..5195221	GSVIVT00014221001	
VvGAI*	GA Insensitive (Insensible a GA)	CAA72178	Regulador negativo de la hormona de plantas giberelina (GA) que se señala en <i>Arabidopsis</i> . La expresión ectópica del cDNA GA2-oxidasa2 de arveja causó el aborto de la semilla en <i>Arabidopsis</i> , extendiendo y confirmando observaciones previas obtenidas con mutantes deficientes de GA en arveja, sugiriendo que las GAs tienen un rol esencial en el desarrollo de la semilla.	1	chr1:3629459..3631051	GSVIVT00035115001	
VvMADS1*	MADS-box protein (proteína MADS-box)		Pseudogen. Similar a una proteína de la familia MADS-box [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	5	chr5:23032471..23040539	GSVIVT00034754001	
VvPKL	PICKLE	AAF13875	Codifica para el factor de remodelamiento de la cromatina CHD3 que participa en múltiples roles en el crecimiento y desarrollo en <i>Arabidopsis</i> , necesarios para la expresión de LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), un regulador central de la embriogénesis. Actúa con GA para establecer represión de los genes embrionarios sobre los de germinación.	19	chr4:5515786..5544369	GSVIVT00032703001	
VvRGL1*	REPRESSOR OF GA LIKE 1 (Represor de GA tipo 1)	NP_176809	Regulador negativo de las respuestas de GA, miembro de la familia de los factores de transcripción gRAs.	1	chr1:4905830..4907769	GSVIVT00030538001	

Continuación Tabla II.						
Nombre	Nombre Ortólogo	GenBank	Función	GL en Vv	Posición in Silico	# Acceso CNS
VvRGL2*	REPRESSOR OF GA LIKE 2 (Represor de GA tipo 2)	NP_186995	Regulador negativo de las respuestas de GA, miembro de la familia de los factores de transcripción gRAs.	1	chr1:4905830..4907769	GSVIVT00030538001
VvRGL3*	REPRESSOR OF GA LIKE 3 (Represor de GA tipo 3)	NP_197251	Regulador negativo de las respuestas de GA, miembro de la familia de los factores de transcripción gRAs.	19	chr19:825365..826957	GSVIVT00002066001
VvSIN*	DICER-LIKE1	ATIG01040	DICER es una ARN helicasa involucrada en el procesamiento del microARN. Mutaciones en este locus pueden resultar en la letalidad del embrión. La mutación corto integumento (<i>short integument</i> SIN) causa una infertilidad femenina específica, y un defecto en el control del tiempo de floración en <i>Arabidopsis</i> . La esterilidad femenina de plantas SIN es producto de un anormal desarrollo del integumento y una aberrante diferenciación del megagametofito.	15	chl5:7150026..7163679	GSVIVT00026189001
VvSPY	SPINDLY	AAC49446	Codifica para una N-acetil glucosamina transferasa que puede glicosilar otras moléculas involucradas en la señalización de GA. SPY actúa como ambos, un represor de respuestas a GA y como un regulador positivo en la señalización de citoquininas.	8	chr8:15900193..15918384	GSVIVT00021566001
VvTNP-SR	Transportin-SR (Similar a transportina SR)	AAK91418	Codifica para una proteína que pertenece a una Familia de transportadores de proteínas y ARN entre el citoplasma y el núcleo (carioferinas). Se ha relacionado con ambos procesos: Exportación de compuestos desde el núcleo (proteína Exportina) e Importación de compuestos al núcleo (proteína Importina). Se asocia a procesos de proliferación celular.	14	chr14:13613436..13639634	GSVIVT00038002001
VvTTI	TRANSPARENT TESTA 1 (Testa transparente 1)	AAL66407	Involucrado en el desarrollo de la semilla y definida como la subfamilia WIP de las proteínas dedos de zinc en plantas. Las semillas del mutante <i>transparent testa 1</i> (TT1) de <i>Arabidopsis thaliana</i> presentan color amarillo, debido a la carencia de los pigmentos taninos condensados en la cubierta seminal. La expresión del gen TTI fue detectada sólo en óvulos desarrollándose y en semillas juveniles, y se demostró que el gen codifica para una proteína nuclear. Las semillas del mutante exhibieron la morfología alterada del endotelio de la semilla en el cual los pigmentos taninos marrones se acumulan en la forma silvestre de las plantas, indicando que TTI está implicado en la diferenciación de esta capa de la célula.	18	chr18:4476887..4477819	GSVIVT00015220001

Continuación Tabla II.						
Nombre	Nombre Ortólogo	GenBank	Función	GL en Vv	Posición in Silico	# Acceso CNS
VvTT12	TRANSPARENT TESTA 12 (Testa transparente 12)	AJ294464	Codifica para una proteína tipo transportador secundario de múltiples drogas, requerida para el secuestro de flavonoides en vacuolas del endotelio de la cubierta seminal. El mutante de <i>Arabidopsis</i> tiene semillas marrones pálidas.	12	chr12:1681661...168477 ₈	GSVIVT000018841001
VvTT2*	TRANSPARENT TESTA 2 (Testa transparente 2)	NP_198405	TT2 codifica para un posible factor de transcripción de dominio R2R3 MYB que actúa como un determinante clave en la acumulación de proantocianinas en el desarrollo de la semilla. Se piensa que un complejo ternario compuesto de TT2, TT8 y TTG1 es necesario para la correcta expresión de BAN en el endotelio de la semilla.	9	chr9:1158346...1159150	GSVIVT000034095001
VvTT8*	TRANSPARENT TESTA 8 (Testa transparente 8)	NP_192720	Involucrado en la regulación de la biosíntesis de flavonoides en <i>Arabidopsis</i> . El transcrito TT8 está presente en el desarrollo de semillas juveniles. Requerido para la expresión normal de 2 genes tardíos en la biosíntesis de flavonoides, llamados 4-DIHIROFLAVONOL REDUCTASA (DFR) y BANYULS (BAN) en <i>Arabidopsis</i> . Los genes TTG1 y TT2 también controlan la expresión de los genes DFR y BAN.	7	chr7:1750681...1756478	GSVIVT000023708001
VvTTG2*	TRANSPARENT TESTA GLABRA 2 (Testa transparente GLABRA 2)	AAM61951	Codifica una proteína similar a los factores de la transcripción WRKY, expresados en el integumento y en el endospermo de la semilla. Los mutantes son defectuosos en síntesis del proantocianidina y la deposición del mucilato de la semilla. Las semillas son amarillas coloreadas. El tamaño de la semilla también se afecta; las semillas se reducen de tamaño pero solamente cuando el alelo del mutante se transmite a través del patrón femenino.	8	chr8:12916601...129225 ₉₂	GSVIVT000023080001
VvWR1*	WRINKLED 1	NP_191000	WRINKLED1 codifica para un factor de transcripción de la clase AP2/ERWEBP. La proteína tiene dos dominios específicos de unión a ADN (AP2/EREB) en plantas y está involucrada en el control de la biosíntesis de compuestos de almacenamiento en <i>Arabidopsis</i> . Las Mutantes tienen un fenotipo de semilla "arrugado", debido a un defecto en la incorporación de sacarosa y glucosa en los triacilglicéridos.	11	chr11:7485191...748789 ₂	GSVIVT000017130001

Tabla III. Genes candidatos para desarrollo de la baya identificados por FERNANDEZ *et al.* Estos GCs proceden del trabajo realizado por Fernandez *et al.*, y están clasificados de acuerdo al proceso al cual están asociados (metabolismo de ABA, desarrollo y morfogénesis, reguladores transcripcionales, metabolismo secundario, metabolismo de etileno y estrés/defensa). Se informa su nombre, número de acceso en GenBank, función probable, GL en *V. vinifera* por mapeo físico, la posición por mapeo *in silico* (Ch: cromosoma y posición de la base de inicio y término del gen) y el acceso en CNS. Los genes marcados por un * han sido seleccionados para mapeo físico; los marcadores marcados con ** están descritos por la literatura y los marcadores marcados con *** presentan una posición en el mapa distinta a la entregada por el mapeo *in silico*.

Nombre	Acceso Genbank	Función probable identificada	GL en Vv	Posición <i>in silico</i> en V. v.	Marcadores asociados
Metab. ABA	VvZE*	Zea-xantín epoxidasa (<i>Gentiana lutea</i>)	13	chr13:1055737..1056980	VMCNG1D12a **
	VvNCED1*	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa 1 (<i>Vitis vinifera</i>)	13	chr13:14466055..14467952	VVIP10
Desarrollo y Morfogénesis	VvLKB*	Proteína LKB de biosíntesis de Brasinosteroides (<i>Zinnia elegans</i>)	1	chr1:12754828..12755373	VMC4F9.2
	VvMADS4*	Proteína MADS-box 4 (<i>Vitis vinifera</i>)		chr1:4526610..4541353	
	VvSP2*	Proteína 2 tejido específico (<i>Cicer arietinum</i>)	3	chr3:3838595..3839214	VMC2E7
	VvBURP1*	Proteína que contiene el dominio BURP (<i>Brassica napus</i>)	3	chr3:3849711..3850588	VMC2E7
	VvSTY*	Proteína STYLOSA (<i>Antirrhinum majus</i>)	4	chr4:4368379..4373060	VMC7H3
	VvRALF1*	Precursor del Factor 1 de rápida alcalinización (<i>P. balsamifera</i> · <i>P. deltoïd</i>)		chr5:3090966..3091676	
	VvYAB2*	Factor de Transcripción tipo YABBY2 (<i>Antirrhinum majus</i>)	6	chr6:11246714..11253314	VMC4H5
	VvUBC*	Proteína Ubiquitina ligasa (<i>Capsicum annuum</i>)	8	chr8:5887173..5887859	VVIP04
	VvULTI*	ULTRAPETALA1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		chr12:5988604..5993603	
	VvNAMI4*	Proteína 14 tipo Nam (<i>Petunia hybrida</i>)	14	chr14:18929610..18930456	VVIN70 **
	VvMADS9*	Proteína 26 MADS-box (<i>Cucumis sativus</i>)	18	chr18:2253898..2255925	VMC5G1.1; VVAAP1a **
	VvNAC2*	Proteína NAC2 con dominio NAC (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	1 y 15	Sin identificación	VVIF52 ; VVBAN
	VvHBI3*	Homólogo AtHB13 - Proteína Homeótica (<i>Solanum demissum</i>)	1	chr1:2492755..2494105	VVIM25
	VvDOF*	Proteína dedos de zinc Dof (<i>Nicotiana tabacum</i>)		chr2:1849677..1850702	
	VvPRB*	Proteína tipo unión RB (<i>Oryza sativa</i>)		chr2:3041187..3045195	
	VvWRKY*	Factor de transcripción de la familia WRKY (<i>Oryza sativa</i>)	2	chr2:5171790..5173779	VMC6F1/VMC3B10 **
VvTF*	Factor de transcripción (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	11	chr14:1271900..1276477	VVSUS1a ***	
VvbHLH*	Dominio de unión a ADN hélice-vuelta-hélice (<i>Medicago truncatula</i>)		chr14:3344265..3344880		
VvBT*	Proteína con dominio BTB y TAZ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		chr17:11745874..11746928		
VvHTF*	Hipotético factor de transcripción (<i>Prunus persica</i>)		chr18:11782497..11783205		
VvGATA*	Proteína que contiene dedos de zinc GATA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	18	Sin identificación	VMC8H10a y b, **	
VvZNF*	Probable proteína dedos de zinc (<i>Oryza sativa</i>)		chrUn:104863550..104864168		
Otros Reguladores Transcripcionales					

Continuación Tabla III.					
Nombre	Acceso Genbank	Función Probable Identificada	GL en Vv	Posición in Sítico en Vv.	Marcadores asociados
VvCYP	CX017229	Similar a Citocromo P450 (<i>Citruslunata</i>)		chr2:17539271..17541699	
VvANM	CX017199	Proteína de membrana relacionada con Antocianina (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		chr5:19063684..19067957	
VvUNSMO	CX016756	Inespecifica monooxigenasa (<i>Rattus norvegicus</i>)		chr6:15282884..15283203	
VvCAD	CX016803	Cinamil alcohol deshidrogenasa (<i>Prunus mume</i>)		chr6:2808177..2809719	
VvC4Ha	CX017699	Cinamato-4-hidroxilasa (<i>Parthenocissus henryana</i>)		chr6:8813582..8816025	
VvLDOX	BQ795708	Leucoantocianidina dióxigenasa (<i>Medicago truncatula</i>)		chr8:6365146..6365912	
VvC4Hb	CX017191	Cinamato 4-hidroxilasa (<i>Phaseolus vulgaris</i>)		chr11:10159215..10159878	
VvPAL1*	BQ796207	Fenilalanina amoniliasa 1 (<i>P. balsamifera</i> · <i>P. deltoïd</i>)		chr13:5990646..5991272	
VvOMT*	CX017294	O-metiltransferasa (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	15	chr15:7261725..7262082	VvSIN
VvSTsb	CX016448	Estilbeno sintasa (<i>Vitis vinifera</i>)		chr16:3883591..3884107	
VvSTsa	CX016920	Estilbeno sintasa (<i>Vitis vinifera</i>)		chr16:3892041..3909099	
VvCAOMT*	AF239740	Ácido Caféico O-metiltransferasa (<i>Vitis vinifera</i>)	16	chr16:7291322..7294137	VMC5A1
VvQOR*	BQ796736	Quinona oxidoreductasa (<i>Cicer arietinum</i>)	19	chr19:4907528..4909520	VMC5E9
VvPPOb	CX016525	Polifenol oxidasa (<i>Camellia phillophylla</i>)		chrUn:74366459..74367117	
VvPPOa*	U83274	Polifenol oxidasa (<i>Vitis vinifera</i>)		chrUn:74412449..74414410	
VvFRIR	CX017160	Proteína de respuesta al deterioro del Rojo-Lejano (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		chr1:1205415..1205954	
VvET	CX017484	Transportador de electrones (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		chr1:451829..452310	
VvHSP*	CX017408	Proteína de shock térmico (<i>Hevea brasiliensis</i>)	2	chr2:221650..222407	VvIB01
VvOSM	BQ797921	Proteína tipo Osmotina (<i>Vitis vinifera</i>)		chr2:3757320..3758141	
VvRD22b*	BQ799245	Proteína RD22 que induce la deshidratación (<i>Prunus persica</i>)	4	chr4:3388090..3388828	VMC4D4
VvRD22a*	CX016929	Proteína RD22 que induce la deshidratación (<i>Vitis vinifera</i>)	4	chr4:3483294..3483809	VMC4D4
VvC4EC	BQ797671	Endoquitina de la Clase IV (<i>Vitis vinifera</i>)		chr5:22106419..22107657	
VvELJP	CX017986	Proteína temprana inducida por luz (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		chr5:5635667..5635946	
VvMChEA	CX016757	Alérgeno principal del Cerezo (<i>Prunus avium</i>)		chr5:604981..605788	
VvPRP10a*	CX016752	Proteína 10 relacionada con Patogénesis (<i>Vitis vinifera</i>)	5	chr5:642971..643786	ZAG79
VvPRP10b*	CX016473	Proteína 10 relacionada a Patogénesis (<i>Vitis pseudoreticulata</i>)	5	chr5:655838..656401	ZAG79
VvDRF	CX016328	Familia responsable de resistencia a Enfermedades (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		chr6:1080826..1081392	
VvWSP	CX016293	Proteína contra estrés/heridas (<i>Medicago truncatula</i>)		chr7:118506..118748	

Metabolismo Secundario

Estres/Defensa

Continuación Tabla III.						
Nombre	Acceso Genbank	Función Probable Identificada	GL en Vv	Posición in Sílco en Vv.	Marcaadores asociados	
VvLEA5*	CX016865	Proteína 5 abundante durante la embriogénesis tardía (<i>Nicotiana tabacum</i>)	7	chr7:3685105..3685881	UDV011/VVIB22 **	
VvPTF	CX017928	Factor transcripcional relacionado a patogénesis (<i>Medicago truncatula</i>)		chr7:3811470..3811879		
VvHSP70a	CX017418	Probable hsp70 (<i>Oryza sativa</i>)		chr8:13490787..13491562		
VvPMT	CX016871	Proteína tipo Metalotionina (<i>Camellia sinensis</i>)		chr8:13604366..13604866		
VvHSP70b	CX016608	Probable proteína de unión a Hsp70 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		chr8:13914758..13918399		
VvDRRP*	BQ799828	Proteína relacionada con resistencia a enfermedades (<i>Arachis hypogaea</i>)	8	chr8:19654488..19655227	VVIB66	
VvDNAJ-1*	BQ798821	Homólogo de la proteína DnaJ (DNAJ-1) (<i>Cucumis sativus</i>)	3 y 13	chr8:4786479..4787075	VMC2A9 ***	
VvLTI4	CX017013	Isoforma 4 de la proteína transportadora de lípidos (<i>Vitis vinifera</i>)		chr8:9614245..9614654		
VvGTST2.4*	CX017396	2,4-D inducible glutathione S-transferase (<i>Glycine max</i>)	9	chr9:3912939..3914266	VVIU37	
VvFb2*	CX017663	Probable proteína Fb2 (<i>Oryza sativa</i>)	10	chr10:275945..280481	VMC3D7	
VvTPX	CX017430	Peroxidasa dependiente de Tiorredoxina (<i>Plantago major</i>)		chr11:2926859..2929910		
VvBacPerox*	CX016640	Precursor de peroxidasa bacteriana (<i>Gossypium hirsutum</i>)	12	chr12:2430519..2431170	VMC8G6	
VvHSP70A	CX016307	Hsp 70 autónoma de la Célula (<i>Cucurbita maxima</i>)		chr13:3109760..3110350		
VvHSP18	CX018004	Proteína 18 de shock térmico (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		chr13:4222959..4223377		
VvHSP17.9	BQ798767	Proteína 17.9 de shock térmico (<i>Pennisetum glaucum</i>)		chr13:4341971..4342695		
VvTRX*	CX016449	Tiorredoxina (<i>Glycine max</i>)	14	chr14:17944711..17945137	VVII51/VVIN94	
VvPR4	BQ795632	Proteína tipo PR-4 (<i>Vitis vinifera</i>)		chr14:553719..571120		
VvSAP*	BQ800154	Proteína relacionada con Senescencia (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	15	chr15:1387188..1388394	VVIV67 **	
VvPR-P450*	BQ798537	Probable enzima P450 relacionada a la maduración (<i>Vitis vinifera</i>)	15	chr15:6346851..6348217	VVIM42.2/VVIV24 **	
VvHSP70c*	CX017169	Proteína 70 de shock térmico (<i>Cucumis sativus</i>)	17	chr17:3182952..3184263	SCU6VV	
VvTRX3	BQ794604	Tiorredoxina tipo 3 (<i>Plantago major</i>)		chr17:7030097..7031304		
VvBSDR4	CX017793	Proteína 4 de resistencia a enfermedades bacterianas (<i>Populus trichocarpa</i>)		chr18:15640315..15641170	VVIB31; VMC8H10-A1-A **	
VvENSP*	CX017018	Proteína tipo ENSP (<i>Hevea brasiliensis</i>)	18	chr18:2882839..2883528		
VvHSP90-2	CX017718	Chaperona molecular Hsp90-2 (<i>Nicotiana benthamiana</i>)		chr19:9149612..9150115		
VvHSP90	CX016566	Proteína 90 de shock térmico (<i>Nicotiana tabacum</i>)		chr19:9150158..9150379		
VvDNAJ	CX016738	Proteína DnaJ (<i>Euphorbia esula</i>)		chrUn:135852699..135854960		
VvCHIB1	Z68123	Precursor de Endoquitina Ácida (<i>Vitis vinifera</i>)		chrUn:38995827..38996848		

Continuación Tabla III.					
Nombre	Acceso Genbank	Función Probable Identificada	GL en Vy	Posición <i>in Silico</i> en Vy.	Marcadores asociados
VvSAM	CX016441	S-adenosilmetionina sintetasa (<i>Litchi chinensis</i>)		chr5:2452283..2452622	
VvAP2-ERF	CX017928	Proteína que contiene dominio AP2 y ERF (<i>Medicago truncatula</i>)		chr7:3811470..3811879	
VvEOL1	CX016567	Proteína tipo sobreproductor de Etileno 1 (<i>Medicago truncatula</i>)		chr7:966693..967837	
VvESP	CX017033	Proteína de señalización de Etileno (<i>Prunus persica</i>)		chr8:11730952..11731285	
VvACOI1	CX017177	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (<i>Populus euramericana</i>)		chr12:6506016..6506360	
VvSamDC	CX017008	Proenzima descarboxilasa SAM (<i>Vitis vinifera</i>)		chr14:11826639..11827260	
VvSAMI	CX016830	S-adenosil-Metionina (SAM) sintetasa 1 (<i>Solanum tuberosum</i>)		chr14:436574..437267	
VvEREBP4	BQ798503	Proteína ERBP-4 de unión a ADN (<i>Vitis aestivalis</i>)		chr16:5542424..5542999	

Tabla IV. **Genes candidatos para desarrollo de la baya y de semillas en GL2 y GL18.** GCs procedentes de búsqueda en GL2 y GL18, son presentados en orden alfabético de acuerdo al nombre. Se informa su nombre completo, número de acceso en GenBank, Función identificada, GL en *Vitis vinifera* L. determinado por mapeo físico o mapeo genético, según corresponda, la posición determinada por el mapeo *in silico* (chr: cromosoma y posición de la base de inicio y término del gen) y el acceso en CNS (Base de datos del programa de secuenciación del genoma de la vid).

Nombre	Nombre Ortólogo	GenBank	Función	GL en Vv	Posición <i>in Silico</i>	# Acceso CNS
VvAGL11	AGAMOUS tipo 11	AAC49080	Factor transcripcional "MADS box" expresado en el carpelo y en óvulos.	18	chr18:18299365..18307245	GSV1VT000021934001
VvFbox2	Proteína de la Familia F-box	NP_568718	AFB5 (Proteína Auxina F-box 5); proteína ubiquitina ligasa, similar a una proteína de la familia F-box (FBX14) [<i>Arabidopsis thaliana</i>].	10	chr10:421297..4224607	GSV1VT000028376001
VvPAR2	Auxin-repressed protein (proteína represora de auxina)	NP_191628	Proteína de respuesta a auxina. Esta familia consiste en los productos proteicos de los genes respuesta a auxina de la familia ARG7, ninguno de los cuales tiene un rol funcional identificado.	2	chr2:4916566..4917057	GSV1VT00007286001
VvPMEI 1	Plant invertase/pectin methyltransferase inhibitor 1 (Inhibidor de pectina metiltransferasa e invertasa 1 en plantas)		Posee un dominio que inhibe las pectinas metiltransferasas (PMEs) y las invertasas a través de la formación de un complejo no covalente 1:1. Este ha estado implicado en la regulación del desarrollo de la fruta, del metabolismo de carbohidratos y en la extensión de la pared celular.	2	chr2:4868107..4868721	GSV1VT00007281001
VvPMEI 2	Inhibidor de pectina metiltransferasa e invertasa 2 en plantas.	NP_564802	Posee un dominio que inhibe las pectinas metiltransferasas (PMEs) y las invertasas a través de la formación de un complejo no covalente 1:1. Este ha estado implicado en la regulación del desarrollo de la fruta, del metabolismo de carbohidratos y en la extensión de la pared celular.	2	chr2:4874658..4878668	GSV1VT00007282001
VvPMEI 4	Inhibidor de pectina metiltransferasa e invertasa 4 en plantas.		Posee un dominio que inhibe las pectinas metiltransferasas (PMEs) y las invertasas a través de la formación de un complejo no covalente 1:1. Este ha estado implicado en la regulación del desarrollo de la fruta, del metabolismo de carbohidratos y en la extensión de la pared celular.	2	chr2:4861356..4861731	GSV1VT00007280001
VvVPE	BETA-VPE, VACUOLAR PROCESSING ENZYME BETA (Enzima de procesamiento vacuolar beta)	NP_176458	Codifica para una enzima de procesamiento vacuolar que pertenece a un grupo de cisteína proteinasas que se expresan específicamente en la semilla y es esencial para el apropiado procesamiento de proteínas.	2	chr2:4910341..4911361	GSV1VT00007285001