



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Bioquímica

Profesor patrocinante:

Dr. Patricio Hinrichsen R.

Instituto de Investigaciones

Agropecuarias. CRI La Platina.

Profesor copatrocinante:

Dra. Gloria León

Instituto de Bioquímica

Facultad de Ciencias

**Desarrollo de un mapa de ligamiento genético en *Vitis vinifera L.*,
basado en marcadores moleculares SSR y AFLP**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado
de **Licenciado en Bioquímica** y al
Título profesional de **Bioquímico**

Kattina Cecilia Zavala Martínez

Valdivia Chile 2002

*A mis padres Ana María y Arturo, por estar siempre conmigo,
por enseñarme tantas cosas...*

*A mi hermana, Marlene, por su fortaleza y su
compañía...*

Agradecimientos

Mis primeras palabras de agradecimiento son para mi familia, en especial a mis padres, por su cariño incondicional y por instarme siempre a seguir adelante, y a mi hermana Marlene por su compañía, especialmente estos últimos años.

Al Dr. Patricio Hinrichsen, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y guiarme en esta importante etapa de mi formación profesional.

A las Dras. Gloria León y Ana María Zárraga, de la Universidad Austral de Chile, por sus consejos, y disponibilidad durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Boris Sagredo, de INIA Remehue, por su ayuda en el manejo de los programas MapMaker y Mapmanager.

En general a todos mis compañeros del laboratorio de biotecnología de INIA La Platina no solo por sus recomendaciones y colaboración durante el desarrollo de mi tesis, sino también por los gratos momentos compartidos, especialmente a Humberto P., Víctor O., Nilo M., Antonieta R., Mireya Z., Ximena M. y M. Herminia C.

A mis grandes amigas, Claudia T., Taty P., Angara Z. y Anita C. por nuestra amistad a lo largo de estos años.

No puedo dejar de nombrar a mi Cacharrito y a los pequeños, por su incondicional compañía.

Esta tesis fue financiada por el proyecto 1990204 del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, FONDECYT.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INDICE DE CONTENIDOS	i
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Información general	3
2.2 Marcadores moleculares	7
2.3 Mapa de ligamiento genético	14
2.4 Hipótesis y objetivos	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS	22
3.1 Materiales	22
3.1.1 Material genético	22
3.1.2 Reactivos y solventes	22
3.1.3 Partidores de PCR y adaptadores	23
3.2 Equipos	27
3.3 Métodos	27
3.3.1 Extracción de ADN	27
3.3.2 Selección del material genético	28
3.3.3 Reacciones de microsatélites	29

3.3.3.1 Reacción de PCR	29
3.3.4 Separación en geles de poliacrilamida	33
3.3.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante.	33
3.3.4.2 Tinción de ADN con plata usando el sistema Promega Silver Sequence™	34
3.3.5 Reacción de AFLP.	34
3.3.5.1 Digestión del ADN y ligación del adaptador.	34
3.3.5.2 Reacción de PCR+3.	35
3.3.6.- Reacción de RAPD.	36
3.3.6.1.-Reacción de PCR.	36
3.3.6.2.-Electroforesis en geles de agarosa.	36
3.3.7.- Análisis de ligamiento.	37
3.3.7.1.- Obtención de los grupos de ligamiento.	37
4. RESULTADOS	41
4.1.- Material biológico: cruzamientos analizados.	41
4.2.- Análisis mediante microsatélites	44
4.2.1.- Caracterización de nuevos marcadores de microsatélites de vid.	44
4.2.2.- Selección de marcadores de SSR informativos en el cruzamiento #33.	48
4.2.3.- Tamaño de la población de mapeo (cruzamiento #33).	50
4.3 Análisis por AFLP.	54

4.4 Análisis estadístico.	62
4.4.1 Obtención de los grupos de ligamiento.	62
5. DISCUSIÓN	70
6. BIBLIOGRAFÍA	79

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	6
Fotografía de cvs. mantenidos en campos de INIA La Platina.	
Figura 2	10
Base genética y detección de polimorfismo de microsatélites.	
Figura 3	13
Base genética de marcadores moleculares AFLP.	
Figura 4	19
Esquema de la elaboración de mapas genéticos empleando la estrategia del pseudocruzamiento prueba o pseudoretrocruzamiento en dos sentidos.	
Figura 5	43
Extracciones de ADN realizadas según el método descrito en la sección 4.2.1.	
Figura 6	46
Diagrama que ilustra la migración de nuevos microsatélites caracterizados.	
Figura 7	47
Análisis de la población de mapeo con partidor VMC3f2.	
Figura 8	49
Marcadores informativos para el cruzamiento #33.	
Figura 9	51
Genotipos descartados por autopolinización.	
Figura 10	56
Análisis de un gel de poliacrilamida 6% / urea 7M. Se muestran los productos de AFLP.	

Figura 11	59
Geles de poliacrilamida que muestran los resultados de reacciones de AFLP obtenidas a partir de distintas condiciones de preamplificación.	
Figura 12	63
Grupos de ligamiento para Ruby Seedless.	
Figura 13	64
Grupos de ligamiento obtenidos para Thompson Seedless.	
Figura 14	67
Grupos de ligamiento para Ruby Seedless.	
Figura 15	68
Grupos de ligamiento para Thompson Seedless.	

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1:	25
Secuencias de partidores de AFLP utilizados.	
Tabla N°2:	30
Partidores del VMC y otros SSR analizados en los progenitores del cruzamiento#33	
Tabla N°3:	42
Algunos cruzamientos de INIA La Platina, con el número de segregantes correspondientes.	
Tabla N°4:	45
Condiciones determinadas para cada marcador.	
Tabla N° 5:	53
Resumen de la información obtenida con los marcadores SSR.	
Tabla N°6:	57
Resumen de las bandas polimórficas obtenidas por combinación de partidores de AFLP.	
Tabla N°7:	61
Resumen del análisis de los marcadores obtenidos por AFLP.	
Tabla N°8:	65
Comparación de los primeros mapas de ligamiento genético obtenidos para ‘Ruby Seedless’ x ‘Thompson Seedless’.	

Tabla N°9:

69

Comparación de los mapas de ligamiento genético de ‘Ruby Seedless’
x ‘Thompson Seedless’, construidos con menor estrictez de acuerdo al criterio
de ajuste a χ^2 .

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
APS	Persulfato de amonio (<i>Ammonium Persulfate</i>)
BSA	Seroalbúmina de bovino (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CAP	Secuencia polimórfica amplificada y cortada. (<i>Cut Amplified Polymorphic Sequence</i>)
cM	centimorgan
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
cv, cvs	cultivar, cultivares
df	Grados de libertad
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
dTTP	2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
dNTP	2'-desoxirribonucleósido-trifosfato
DTT	1,4 - ditiotreitól
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G	Guanina
Ha	Hectáreas
MAS	Selección asistida (<i>Marker Assisted Selection</i>)

Min	Minutos
NEB	<i>New England Biolabs</i>
PAA	Poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPD	Amplificación de fragmentos de ADN usando partidores de diseño aleatorio (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RF	Frecuencia de recombinación
RFLP	Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción. (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	RNA nucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SAMPL	Amplificación selectiva de <i>loci</i> polimórficos de microsatélites. (<i>Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci</i>)
SCARs	Regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (<i>Sequence characterized amplified region</i>)
SSR	Microsatélites (<i>Simple Sequence Repeat</i>)
T	Timina
TEMED	N, N ,N',N'-tetrametiléndiamina
Tris-HCl	Hidrocloreuro de tris(hidroximetil)-aminometano
VMC	<i>Vitis Microsatellite Consortium.</i>
U	Unidades enzimáticas

1. RESUMEN

En el Instituto de Investigaciones Agropecuarias se ha establecido un programa de mejoramiento genético de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.), la principal especie frutal de Chile. Por tratarse de una especie leñosa, la selección de individuos mejorados es lenta ya que los caracteres de interés en la fruta se manifiestan sólo cuatro a cinco años después de realizado un cruzamiento.

El objetivo de esta tesis fue la construcción de un mapa de ligamiento genético para uva de mesa basado en marcadores moleculares, el que se preparó en base a 127 segregantes del cruzamiento Ruby Seedless x Thompson Seedless.

Se trabajó con dos tipos de marcadores, microsatélites (SSR) y AFLP, aunque en el análisis también fueron incluidos 5 marcadores de RAPD y 1 marcador morfológico (color de la baya). En una primera etapa, se usaron cinco marcadores de SSR para confirmar la filiación de los segregantes, determinándose un 17% de plantas con patrones genéticos que no coincidían con los progenitores, correspondientes a eventos de autopolinización del cultivar madre, Ruby. Para el mapa se completó el análisis de 20 marcadores de SSR, con los cuales se identificaron 19 alelos mapeados en Ruby y 25 en Thompson. En el caso de AFLP, se analizaron 33 combinaciones de partidores, de las cuales sólo 16 fueron analizadas en la población completa, obteniéndose 47 marcadores dominantes para Ruby y 57 para Thompson.

Con una estrategia de pseudoretrocruzamiento y usando el programa MapManager se obtuvo 2 mapas de ligamiento (uno para cada progenitor). Para Ruby se identificaron 16 grupos de ligamiento, cubriendo una distancia total de 525 cM. En el caso de Thompson, el mapa obtenido constó de 17 grupos de ligamiento, cubriendo una distancia total de 940 cM. Dado que la vid tiene 19 pares de cromosomas, estos mapas tienen un grado de saturación intermedio.

SUMMARY

A breeding program on table grapes (*Vitis vinifera* L.), the main fruit crop for Chile, was established at Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Because this is woody specie, the selection of individuals takes a long period of time, since the expression of fruit traits of interest is delayed by at least four to five years after the crossing.

The main objective of this Thesis was to construct a linkage map for table grapes based on molecular markers. This was based in a 127 individuals progeny corresponding to the cross Ruby Seedless x Thompson Seedless.

Two kind of markers were used, microsatellites (SSR) and AFLP, although five RAPD polymorphisms and one morphological trait (berry color) were also considered. In a first step, five SSR markers were used to confirm the correct filiation of the segregants under study. 17% of plants showed unrelated profiles to their progenitors, this result may reflect a self-pollination events of the mother cultivar, Ruby. For the mapping itself, a total of 20 SSR markers analysed revealed 19 alleles corresponding to Ruby and 25 to Thompson. In the case of AFLP, 16 out 33 primer combinations were evaluated in the hole population, obtaining 47 dominant markers for Ruby and 57 for Thompson.

Based on a pseudo-testcross approach and using the MapManager statistical program, two linkage maps were obtained, one for each progenitor. In the case of Ruby, 16 linkage groups were identified, covering a total of 525 cM. For Thompson, the map was made of 17 linkage groups, covering a distance of 940 cM. Considering that grapes is a diploid specie with 19 chromosomes, these maps have an intermediate saturation level.

2. INTRODUCCION

2.1 Información general.

La vid (*Vitis vinifera* L.) es el frutal de mayor importancia para Chile, tanto en superficie cultivada como en ingresos por exportaciones. De las 125.000 Ha totales plantadas de vid, 44.000 Ha corresponden a uva de mesa. Una buena parte de esta producción se destina a exportación a diferentes mercados, principalmente a los Estados Unidos y Europa, aunque en años recientes se ha incrementado la colocación en países de América Latina (principalmente Brasil), así como a países del sud-este asiático, encabezados por Hong-Kong. De hecho, Chile es el principal exportador de uva de mesa del mundo. Las exportaciones de uva de mesa corresponden a cerca de la mitad de todas las exportaciones frutícolas nacionales, sin considerar las exportaciones de vino.

Las variedades de uva de mesa más importantes en cuanto a volumen exportado son Thompson Seedless o Sultanina (con un 40% del total de los envíos), Flame Seedless, Ribier y Red Globe (INE, 1997), siendo las dos primeras, variedades apirénicas.

La especie, proveniente de Eurasia, se ha aclimatado en todos los continentes, desarrollándose numerosos cultivares usados tanto para uva de mesa como para vino, otros licores y pasas. Se estima que el número de cultivares existentes en el mundo es cercano a 8.000 (Alleweldt, 1988), cantidad muy difícil de precisar por el aparentemente elevado número de sinónimos y homónimos que presentan los diversos genotipos de esta especie. Por ejemplo, una base de datos internacional mantenida en Alemania contiene datos de pasaporte para 16.000 accesos (Dettweiler y Eibach, 1996), lo que incluye también una cantidad importante de genotipos de otras especies del género

Vitis, o híbridos interespecíficos, usados como portainjertos. Aún existiendo esta gran cantidad de genotipos, el desarrollo de nuevas variedades sería muy beneficioso para Chile, ya que permitiría:

- Evitar la dependencia de cultivares protegidos, tendencia cada vez más fuerte a nivel internacional lo que implica un costo por los derechos de propiedad intelectual.
- Disponer de variedades con las características más apropiadas para nuestras condiciones agro-climáticas y sistemas de cultivo.
- Desarrollar variedades resistentes al transporte y que cumplan con las demandas de los mercados compradores.
- Tener variedades con una mayor amplitud en el período de cosecha.
- Identificar al país con un producto propio, “emblemático”, que lo proyecte en los mercados internacionales, lo que crea fortalezas para el mercadeo.

En uva de mesa, la característica más importante, al menos para el mercado americano, es la apirenia, o ausencia de semilla palatable (Ledbetter y Ramming, 1989). Además existe una serie de características de interés agronómico, como la maduración temprana, soltura de las bayas en el racimo, tamaño de las bayas, resistencia al transporte, incorporación del sabor Moscatel, etc. (revisado por Mattheou *et al.*, 1995; Barticevic *et al.*, 1998). Otro carácter de gran interés, por su efecto sobre el costo de producción, es la característica de requerir el uso de ácido giberélico (GA) exógeno para inducir el crecimiento de las bayas; genotipos no semillados que tengan un tamaño de baya adecuado sin el uso de GA constituye un material genético muy conveniente.

Bouquet y Danglot (1996) desarrollaron un modelo que explicaría las bases de la herencia de la apirenia, según el cual la expresión de la apirenia depende de una serie de tres genes recesivos bajo el control de un gen regulador dominante. Este modelo es capaz de explicar cómo el cruzamiento de dos variedades semilladas puede llegar a producir un segregante apirénico, así

como la aparición de plantas semilladas a partir de variedades apirénicas (Bouquet y Danglot, 1996). Además, este modelo explica los resultados de numerosos cruzamientos, siendo hasta ahora el modelo que mejor se ajusta a las observaciones de campo.

Los métodos clásicos de fitomejoramiento para uva de mesa involucraban el cruzamiento de una variedad hembra semillada con una variedad macho apirénica que aportaba el polen, con lo que se obtenía entre un 15 y un 45% de líneas sin semilla (Ramming, 1990). El rendimiento de genotipos no semillados aumenta hasta 45 a 85%, si ambos progenitores son variedades no semilladas. En INIA La Platina, se cuenta con más de 100 cruzamientos entre variedades apirénicas de maduración temprana, como Beauty, Superior, Flame Seedless, Perlette y Sultanina, o de maduración más tardía, como Centennial, Red Seedless, Black Seedless y Ruby Seedless (figura 1). El cruzamiento usado en este trabajo fue Ruby Seedless x Sultanina.

La vid es una especie de tipo leñoso por lo que el proceso de fitomejoramiento convencional, requiere de al menos 5 años desde que las plantas son transplantadas al campo y evaluadas, siendo su principal limitante el número de genotipos que pueden manejarse en campo. Por esta razón, es de gran utilidad disponer de marcadores moleculares para detectar tempranamente (cuando las plantas aún están en cultivo *in vitro*) caracteres favorables o indeseables, y así disminuir el número de genotipos manejados. Además, la disponibilidad de un gran número de marcadores genéticos neutros, altamente polimórficos, cuya herencia puede ser estudiada fácilmente sin influencia ambiental, facilita la construcción de mapas de ligamiento.

La obtención de los segregantes del cruzamiento se hizo a través de un proceso denominado emasculación y que consiste en la extracción de las anteras (que contienen el polen) de la variedad macho (Thompson Seedless, en este caso), luego con ese polen se poliniza los pistilos de la variedad hembra (Ruby Seedless).

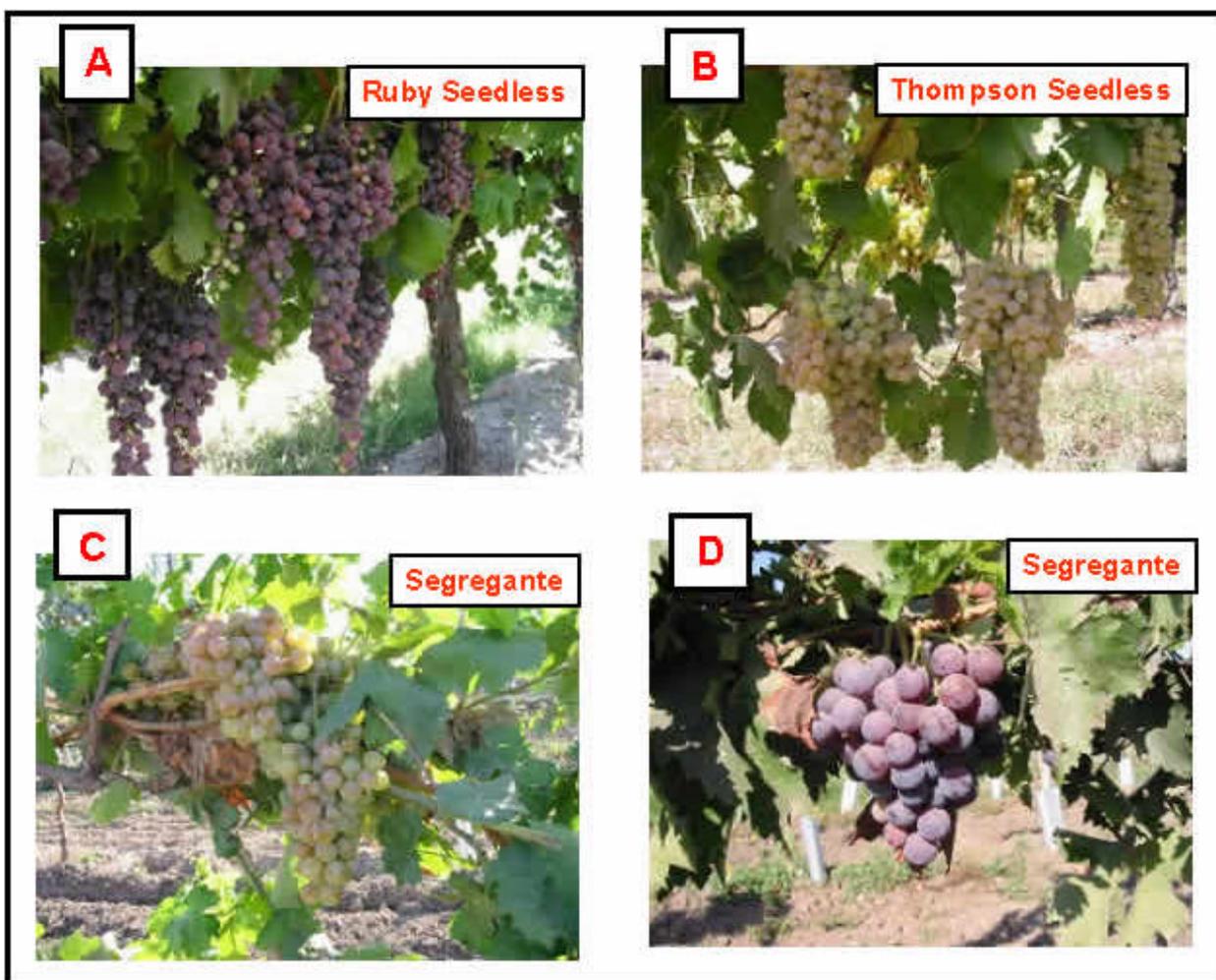


Figura 1.

Fotografía de cvs. mantenidos en campos de INIA La Platina. En el panel A, se muestra imagen de Ruby Seedless, en el panel B, se muestra a Thompson Seedless y los paneles C y D corresponden a dos segregantes provenientes del cruzamiento de estos cvs. (Fotos Nilo Mejía).

2.2 Marcadores moleculares.

Existen diversos tipos de marcadores genéticos, desde los que corresponden directamente al producto de expresión génica, como metabolitos secundarios, proteínas o isoenzimas, hasta los marcadores basados en la identificación de polimorfismos de ADN. Las isoenzimas han sido usadas para identificar ligamientos genéticos en vides (Weeden *et al.*, 1988), así como en otras especies de frutales leñosos, como manzanos (Weeden y Lamb, 1987). Sin embargo, también su uso está limitado debido al reducido número de *loci* que pueden estudiarse. En vides, la aplicación de las isoenzimas se ha visto restringida a la definición de relaciones de parentesco (Parfitt y Arulsekhar, 1989; Ohmi *et al.*, 1993) y al análisis de diversidad genética de portainjertos, dado que éstos presentan un grado de divergencia genética mayor, identificándose varios alelos en cada *loci* (Walker y Liu, 1995). Por eso se prefiere trabajar con marcadores moleculares, ya que una ventaja importante de analizar directamente el genoma de una planta, es que se superan los efectos de la interacción genotipo-ambiente, a la vez que se puede acumular una mayor cantidad de información, abarcando un número casi ilimitado de *loci*. Al mismo tiempo, el genoma es idéntico en todos los tejidos de la planta, por lo que se puede analizar cualquier órgano en cualquier estado de desarrollo de ésta, aunque se ha descrito diferencias entre patrones de ADN aislado desde diferentes tejidos vegetales usando AFLP (Donini *et al.*, 1997).

Los marcadores moleculares, definidos como segmentos del genoma o secuencias específicas de ADN que le son propios a un individuo o grupo de individuos, se han usado en genética de plantas para diferentes propósitos, como estimación de las relaciones genéticas entre individuos de un determinado germoplasma, determinación de parentesco, *fingerprinting* de variedades, preparación de mapas de ligamiento, mapeo de caracteres simples o complejos (QTL's) e

identificación de marcadores para ser usados en selección asistida (MAS, por *Marker Assisted Selection*) (Waugh y Powell, 1992; Rafalski, 1994; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Un método óptimo de análisis de ADN es aquel que muestra un alto índice de polimorfismo, exhibe una herencia co-dominante, y permite una fácil interpretación de los datos generados. En buena medida, estos requisitos son cumplidos por las secuencias de microsatélites de plantas o SSR (*Simple Sequence Repeats*, según Rafalsky y Tingey, 1993), estudiadas mediante PCR. Los SSR son secuencias de entre dos y cinco nucleótidos que se repiten entre 5 y 10 veces (por ejemplo (GA)₁₀, (CAC)₅, etc.), series que a su vez se repiten muchas veces en el genoma entero (Jeffreys *et al.*, 1985; Tautz, 1989). Su tipo y abundancia varía entre distintas especies de plantas y animales (Lagercrantz *et al.*, 1993), y son considerados excelentes marcadores moleculares para distintos propósitos, como para estudios de caracteres cuantitativos (Hearne *et al.*, 1992) u otros estudios genéticos en plantas (Morgante y Olivieri, 1993), siendo propuestos como un enfoque general para mapeo genético en eucariontes (Tautz, 1989; Beckmann y Soller, 1990). El principal inconveniente de esta metodología es la identificación de los partidores, diseñados a partir de secuencias conservadas que rodean los SSRs; se han propuesto metodologías alternativas que no requieren del clonamiento de estas secuencias (Yuille *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1992; Thomas y Scott, 1994), pero parecen no ser tan eficientes como los SSR's basados en las propias secuencias aleatorias. Las regiones de secuencias sencillas repetidas son amplificadas individualmente a través de PCR a partir de un par de partidores específicos (de 20 a 30 bases) complementarias a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite. Los segmentos amplificados a partir de estos sitios, casi invariablemente presentan un extenso polimorfismo resultante de la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos. De tal forma, cada "isla" microsatélite, independientemente del elemento repetido (CA, TG, AGT, etc.) constituye un *locus* genético altamente variable, multialélico, de gran contenido

informativo. Cada segmento amplificado de tamaño diferente (generalmente de varias decenas de pares de bases) representa un alelo diferente del mismo *locus*. La figura 2 presenta la base genética de los marcadores de microsatélites (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

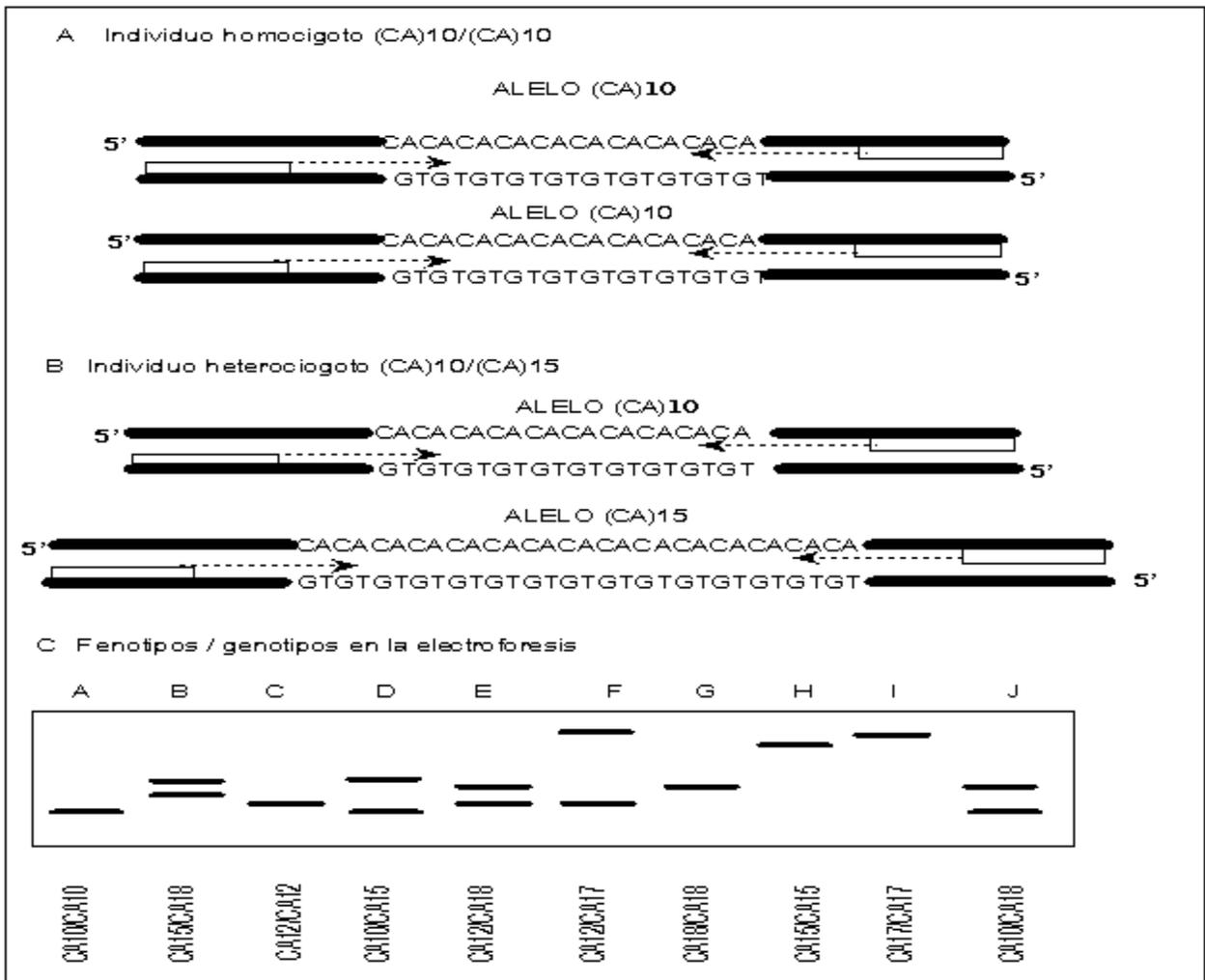


Figura 2.

Base Genética y detección de polimorfismos de microsatélite. Los paneles A y B ilustran genotipos homocigotos (alelos iguales) y heterocigotos (alelos diferentes) para una región genómica que comprende un microsatélite de elementos (CA)/(GT). Los partidores utilizados para la reacción de PCR son mostrados con un cuadro blanco, y las flechas indican la dirección de replicación en la reacción de PCR. El panel C ilustra como ejemplo de la detección de fragmentos de ADN amplificados, un gel de electroforesis con diferentes genomas homocigotos (banda única) y heterocigotos (dos bandas) en individuos diploides, como lo es *Vitis vinifera L.*

Otro marcador muy utilizado es el AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Vos *et al.*, 1995). Este presenta elevados índices de polimorfismo, lo que lo hace muy informativo (Rafalski, 1994; Mazur y Tingey, 1995). Además, ha sido usado en vides (Sensi *et al.*, 1996) así como en otras especies, para diferentes propósitos, como por ejemplo, el estudio de las relaciones genéticas de germoplasma. El análisis de AFLP es un método altamente sensible para detectar polimorfismos de ADN (Vos *et al.*, 1995). AFLP consta esencialmente de cuatro etapas (Figura 3). En primer lugar, el ADN genómico total es digerido con dos enzimas de restricción, una de corte infrecuente como *EcoRI* y otra de corte frecuente como *MseI*, de manera de generar un gran número de fragmentos de pequeño tamaño, que representarían un gran número de *loci* comparables. En la segunda etapa, se incorporan adaptadores específicos a los extremos de fragmentos genómicos generados por la digestión enzimática. En la tercera etapa, una fracción de los fragmentos generados es amplificada selectivamente vía PCR utilizando partidores diseñados para reconocer las secuencias en los adaptadores, pero que además contienen entre 1 y 3 nucleótidos adicionales (selectivos) en el extremo 3', es decir, complementarios a los fragmentos de digestión. De esta forma, se genera una amplificación de un subconjunto de los segmentos (*loci*) generados por la digestión del ADN. En la cuarta y última etapa, la subpoblación de fragmentos amplificados es separada en geles de poliacrilamida de alta resolución. Cada reacción puede generar 50, 100 o más bandas de amplificación, lo que depende de la relación entre el número de nucleótidos selectivos en los partidores y la complejidad o tamaño del genoma. Para genomas de mayor tamaño deben utilizarse mayor número de nucleótidos selectivos.

El método de AFLP no requiere información específica del genoma de la especie analizada, y cubre teóricamente cualquier punto del genoma de la planta debido al uso de partidores de diseño aleatorio. Esto permite analizar zonas genómicas de las que no se posee ninguna o escasa

información de secuencia, como son las regiones no codificantes, proporcionalmente muy importantes.

Los marcadores AFLP no permiten la detección de heterocigotos, o sea, no es posible distinguir si una banda en un gel es resultado de la amplificación de uno o de dos alelos (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Aunque hay trabajos que, basados en el análisis cuantitativo de los fragmentos amplificados por equipos automatizados (ABT u otro secuenciador) han sugerido que es posible esta diferenciación.

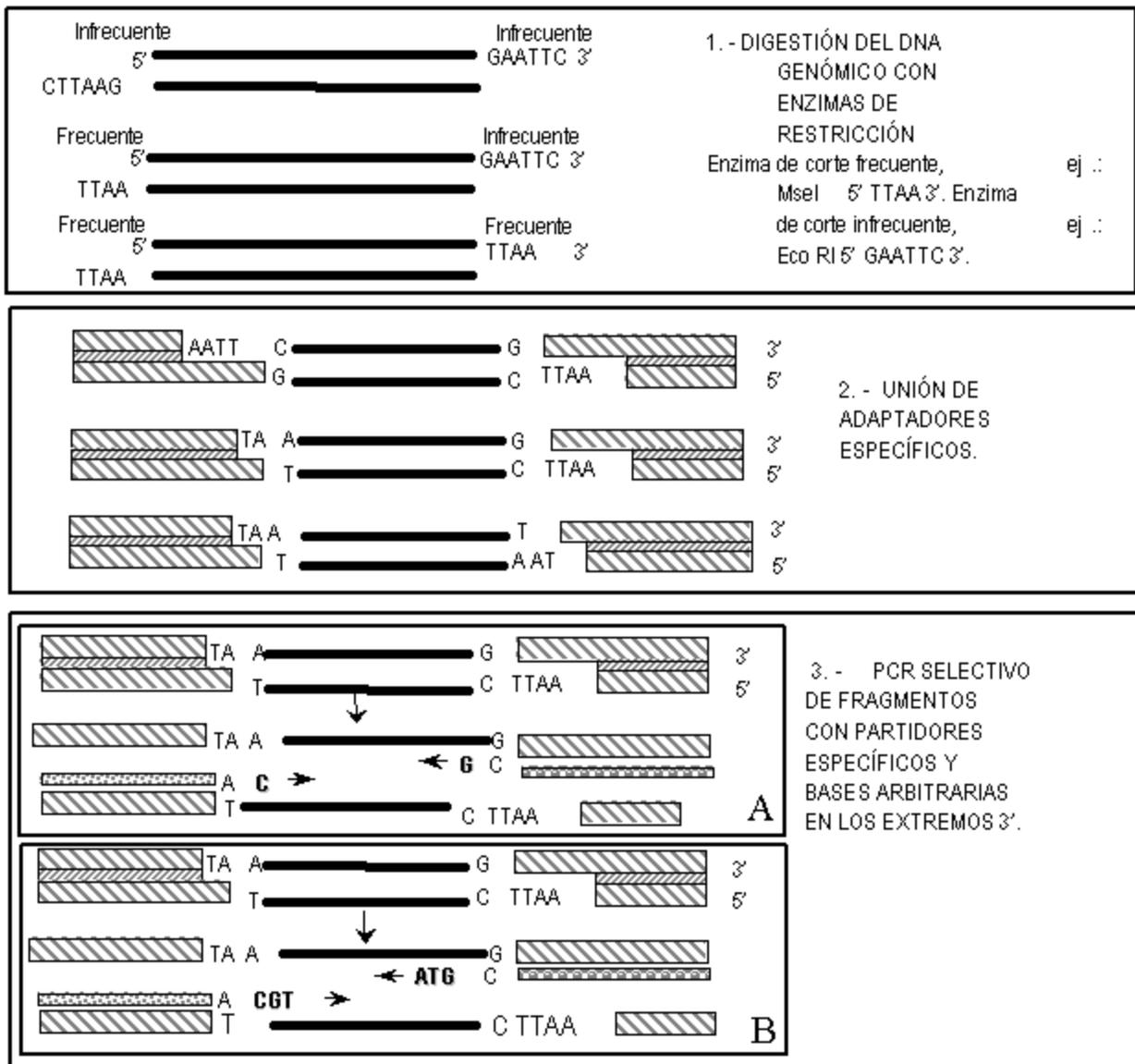


Figura 3.

Base genética de AFLP. El panel uno, muestra la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción. El panel dos muestra la unión de adaptadores específicos, que se unen a cada extremo digerido por las enzimas de restricción. Estos adaptadores son reconocidos por partidores de PCR diseñados *ad hoc* (panel 3) muestra un PCR selectivo de fragmentos con partidores de secuencias complementarias a los adaptadores, en (A) se muestra la preamplificación con una base selectiva, y en (B) se muestra una amplificación final con tres bases selectivas.

2.3 Mapa de ligamiento genético.

El desarrollo de un mapa de ligamiento se basa en la estimación de la frecuencia de recombinación meiótica entre los gametos de los progenitores. Si se tienen dos genes situados a una cierta distancia fija, donde los entrecruzamientos ocurren de forma aleatoria a lo largo de los cromosomas homólogos apareados, en algunas divisiones meióticas se produce por azar un entrecruzamiento entre cromátidas no hermanas, en la zona comprendida entre los dos genes; en estas meiosis se forman recombinantes. En otras divisiones meióticas en las que no se produce un entrecruzamiento entre los genes no se forman recombinantes.

Conforme mayor es la distancia entre genes ligados, mayor es la probabilidad de que ocurra un entrecruzamiento entre cromátidas no hermanas en la zona que separa esos genes y, por tanto, es mayor la proporción de recombinantes que se produce. Así, podemos tener una medida de la distancia de mapa que hay entre los genes, determinando la frecuencia de recombinantes entre ellos. Una unidad de mapa genético (m.u.) o centimorgan (cM) se define como la distancia entre genes para la que uno de cada 100 productos de la meiosis resulta ser recombinante. Por lo tanto, una frecuencia de recombinación de 0,01 (o 1 por 100) se define como 1 m.u.

Se debe recalcar que el mapa genético es un ejemplo de entidad abstracta construida exclusivamente a partir del análisis genético, aunque estudios citogenéticos y moleculares han demostrado que las distancias genéticas son, en realidad, aproximadamente proporcionales a las distancias físicas cromosómicas (Griffiths *et al*, 1995).

Los mapas de ligamiento sitúan a los *loci* unos en relación con otros, separados por unidades de mapa.

Un mapa de ligamiento es considerado como una de las aplicaciones de mayor impacto de los marcadores moleculares en el análisis genético de las plantas y su mejoramiento genético (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Son, además, imprescindibles en el análisis de caracteres cuantitativos y absolutamente necesarios cuando se quiere conocer la localización cromosómica y el efecto relativo de cada uno de los genes responsables de caracteres cualitativos.

Un mapa permite:

- Cubrir completamente un genoma para su estudio.
- Descomponer caracteres complejos en sus componentes mendelianos.
- Localizar regiones genómicas que controlan caracteres de importancia.
- Cuantificar el efecto de cada una de estas regiones.
- Canalizar esta información para ser aplicada en selección asistida (MAS, *Marker Assisted Selection*) (Waugh y Powell, 1992; Rafalski, 1994; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Se han construido mapas para numerosas especies vegetales, prácticamente para todas las especies anuales de interés productivo (Staub *et al.*, 1996), a diferencia de los frutales que no han recibido la misma atención (Mehlenbacher, 1995). Tradicionalmente, los mapas genéticos se han desarrollado a partir del estudio de segregación de marcadores en poblaciones derivadas de cruces entre líneas puras, progenies F_2 , o retrocruzamientos, pedigríes de los que no se dispone en muchas especies leñosas (forestales o árboles frutales). En 1994, Grattapaglia y Sederoff publicaron los primeros mapas de eucaliptos basados en la combinación de una nueva estrategia de mapeo, el pseudocruzamiento prueba o pseudoretrocruzamiento en dos sentidos, con marcadores dominantes (RAPD). Esta estrategia aprovecha el elevado nivel de heterocigocidad que muestran las especies no mejoradas, como por ejemplo la vid, para construir mapas genéticos estudiando la segregación de marcadores en progenies F_1 , es decir las derivadas del cruce

controlado entre dos plantas. Se denomina pseudocruzamiento prueba «en dos sentidos» porque permite obtener de forma simultánea los mapas genéticos de ambos progenitores, empleando marcadores que segregan 1:1 en la progenie, es decir, presentes en heterocigosis en uno de los progenitores y ausentes en el otro (figura 4). La utilización de marcadores dominantes de alta eficacia, como AFLP, constituye la herramienta clave para construir, de forma rápida, la estructura de los mapas genéticos, así como saturar regiones genómicas de interés. Los marcadores dominantes heterocigotos en ambos progenitores (que muestran segregación 3:1) y los marcadores codominantes, como microsatélites (SSR) permiten identificar grupos de ligamiento homólogos entre los mapas genéticos de los progenitores. Los marcadores codominantes, como se indicó previamente, también se emplean para la identificación de grupos de ligamiento homólogos entre mapas genéticos desarrollados por diferentes grupos de investigación y, de esta manera, comparar los resultados del análisis de caracteres.

Los primeros mapas genéticos del género *Vitis* fueron desarrollados por Lodhi *et al.* (1994a, 1995a, 1995b), quienes elaboraron los mapas de ligamiento de los híbridos inter-específicos ‘Cayuga White’ (híbrido complejo de *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. rupestris* y *V. aestivalis*) y ‘Aurora’ (híbrido complejo de *V. vinifera*, *V. rupestris* y *V. aestivalis*), mediante el estudio de una pequeña progenie F₁, compuesta por tan sólo 60 individuos, con 15 isoenzimas, 13 RFLP y 422 RAPD. Estos mapas se están empleando en el estudio de caracteres relacionados con resistencias a oidio y pudrición gris, tolerancia a frío, y con producción (tamaño y número de racimos y bayas, y tiempo de floración y maduración). También existen los mapas genéticos de ‘Horizon’ (Seyval x Schuyler) e ‘Illinois 547-1’ (*V. cinerea* B9 x *V. rupestris* B38) realizados al estudiar la segregación de 277 RAPD, 25 microsatélites, 4 CAP (*Cut Amplified Polymorphic Sequence* (secuencia polimórfica amplificada y cortada) y 12 AFLP en 58 individuos resultantes

del cruce inter-específico entre ambos clones (Dalbó *et al.*, 2000b). En el mapa genético de 'Illinois 547-1' se ha localizado un *locus* único que determina que sus flores sean masculinas, identificándose dos marcadores ligados a dicho *locus*. Estos mapas también se están empleando en el análisis del control genético de la resistencia cuantitativa a oidio y a pudrición negra y producción de resveratrol (Dalbó *et al.*, 1997, 2000a). Simultáneamente, se han identificado grupos de ligamiento homólogos entre los cuatro mapas genéticos obtenidos por este grupo de investigación, con el fin de analizar la capacidad de transferencia de marcadores entre dichos mapas, y la estabilidad de los *loci* detectados, responsables de los caracteres de interés.

Actualmente, se están desarrollando proyectos centrados en el estudio de diversos caracteres de interés, tanto de variedades de vinificación como de uva de mesa, por lo que se están generando varios mapas genéticos de la especie. Los alemanes Buck y Zyprian (2000) están construyendo, con RAPD y SCAR (regiones amplificadas de secuencias caracterizadas), los mapas genéticos de las variedades de *V. vinifera* 'Regent' y 'Lemberger', resistente y susceptible a mildiu, oidio y pudrición gris, respectivamente, con objeto de estudiar la base genética de dichas resistencias. El grupo italiano integrado por Grando *et al.* (2000) está construyendo los mapas genéticos de *V. vinifera* cv. Moscato bianco y *V. riparia* con AFLP y microsatélites, para identificar en el mapa de *V. riparia* los *loci* que controlan la resistencia a mildiu y oidio. El mapa resultante del análisis de la segregación de microsatélites en la progenie obtenida mediante cruzamiento controlado entre *V. vinifera* cv. Riesling y *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon se está empleando para estudiar caracteres de interés en vinificación relacionados con la producción y calidad, como color y peso de la baya, concentración de antocianos en la baya y peso del racimo, identificando un *locus* que controla el color del hollejo (Riaz y Meredith, 2000). Algunas bodegas como E. & J. Gallo Winery y Sun World International, Inc. también están desarrollando mapas

genéticos de híbridos, empleando AFLPs y microsatélites, para conocer el control genético de diferentes caracteres de interés (Georgiady *et al.*, 2001).

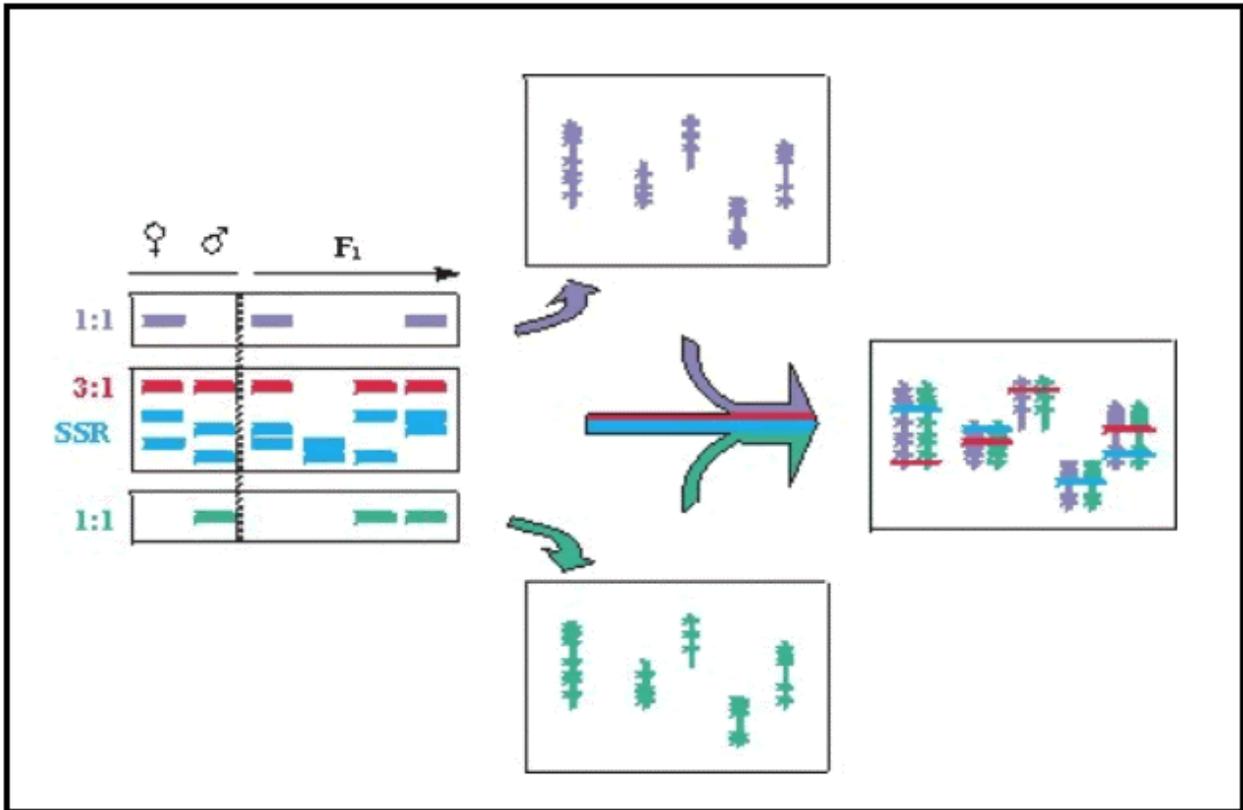


Figura 4.

Esquema de la elaboración de mapas genéticos empleando la estrategia del pseudocruzamiento de prueba o pseudoretrocruzamiento en dos sentidos. Los marcadores heterocigotos en uno de los progenitores y nulos en el otro (segregando 1:1, en color morado para la madre y verde para el padre) permiten la construcción de los mapas genéticos de ambos progenitores. Los marcadores dominantes heterocigotos en ambos progenitores (en color rojo), y los marcadores codominantes (en color azul), todos segregando 3:1, permiten identificar los grupos de ligamiento homólogos entre ambos mapas.

2.4 Hipótesis y objetivos.

Basados en estos antecedentes, se propone como hipótesis que **las relaciones de proximidad entre cada par de marcadores (determinada por su frecuencia de recombinación meiótica) se reflejará en un mapa de ligamiento, donde cada marcador podrá posicionarse, dimensionando su proximidad genética con marcadores circundantes. También podrán posicionarse los genes relacionados a caracteres de interés. De esta manera, un marcador (o un grupo de ellos) podrá ser usado en un programa de fitomejoramiento para seleccionar (o descartar) genotipos.**

Por lo tanto, los objetivos de la presente tesis son:

1.- Identificación de los grupos de segregantes apropiados de distintos cruzamientos, que expresen diferencialmente los caracteres para los cuales se propone obtener marcadores moleculares (apirenia y respuesta a ácido giberélico).

2.- Obtención de ADN de las muestras seleccionadas para el análisis. Optimización de las metodologías de análisis molecular con este grupo de muestras.

3.- Desarrollo de un número apropiado de marcadores informativos para elaborar el mapa de ligamiento. Estos marcadores serán tipo microsatélites, aunque para una mayor saturación del mapa básico se usarán otros marcadores, del tipo AFLP.

4.- Preparación de un mapa genético basado en marcadores moleculares co-dominantes (SSR). Este, además será saturado utilizando marcadores de tipo dominante, AFLP y RAPD.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1.- Materiales

3.1.1- Material genético

Se trabajó sobre segregantes de un cruzamiento entre los cvs. Ruby Seedless y Sultanina o Thompson Seedless. Este cruzamiento es el número 33 en los registros del Programa de Mejoramiento Genético del INIA, y en adelante se hará referencia a estos materiales como “cruzamiento #33”.

Los segregantes analizados (160) corresponden a plantas únicas, mantenidas en terrenos de INIA La Platina, y provienen de diferentes eventos de cruces (cruzamientos de diferentes años). Se colectaron hojas de cada planta y se conservaron a -80°C hasta la extracción de su ADN genómico.

Se ha determinado que el mejor sustrato vegetal para la extracción del ADN de esta especie leñosa son hojas recién brotadas de plantas en activo desarrollo después de la dormancia invernal (en Chile corresponde al período comprendido entre los meses de septiembre y diciembre).

3.1.2.- Reactivos y solventes.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se usaron los siguientes productos: Trizma-base, CTAB, aceite mineral, agarosa, acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, nitrato de plata, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), bromuro de etidio, urea ultrapura y formamida.

De Merck (Darmstadt, Alemania) se usó: EDTA, TEMED, APS, etanol p.a., ácido acético glacial p.a., hidróxido de sodio, urea, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloroformo p.a., alcohol isoamílico p.a., solución de formaldehído al 37% p.a. y BindSilaneTM.

El sistema de tinción con plata se adquirió de Promega Corp. (Madison, WI, EEUU) al igual que la Taq polimerasa.

Todas las enzimas utilizadas en la reacción de AFLP fueron adquiridas a New England Biolabs (Beverly, MA, EEUU).

RepelSilane EC, compuesto repelente que impide la adherencia de poliacrilamida al vidrio, es de Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia).

3.1.3.- Partidores de PCR y adaptadores.

Los partidores de AFLP y SSR, además de los adaptadores de AFLP, se sintetizaron en IDT, Inc. (Coralville, IA, EEUU).

Para el análisis de SSR se usaron partidores diseñados en laboratorios pertenecientes al Vitis Microsatellites Consortium (VMC) del cual INIA La Platina es uno de sus 20 miembros. Además de éstos, se usaron las series VVS (del grupo de M. Thomas, CSIRO, División de Horticultura, Adelaida, Australia); serie VVMD (de C. Meredith, Dept. de Viticultura y Enología, Universidad de California-Davis, Davis California) y la serie VrZAG (de H. Steinkellner, Univ. Fur Bodenkultur, Viena, Austria). Algunas de estas secuencias han sido publicadas (Bowers *et al.*, 1996; Bowers *et al.*, 1999; Regner *et al.*, 1996; Sefc *et al.*, 1999; Thomas y Scott, 1993).

La secuencia de los adaptadores de AFLP, están diseñadas de manera que se unan en los cortes hechos por las respectivas enzimas de restricción (subrayadas en la secuencia) y sin que se reconstituya el sitio de restricción.

La secuencia de los adaptadores usados en AFLP es la siguiente.

	<u>Adaptador</u>	<u>sitio de restricción</u>
<u>EcoRI</u>	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC -3' 3'- CTGACGCATGG <u>TAA</u> -5'	AATTCNNNN <u>G</u> NNNN
<u>MseI</u>	5'- GAC GAT GAG TCC TGA G -3' 3'- TA CTC AGG ACT <u>CAT</u> -5'	<u>TA</u> NNNN <u>T</u> NNNN

Los partidores usados en la reacción de amplificación selectiva (PCR+3) presentan una parte complementaria al adaptador, otra al sitio de restricción (enz) y una extensión (ext) de 3 nucleótidos seleccionados al azar (A,T,C ó G). Las secuencias de los partidores para PCR +3 son las siguientes:

	adaptador	enz.	ext.(+3)
<u>Partidor EcoRI (PE 1)</u>	5'- GACTGCGTAC CAATTC		NNN-3'
<u>Partidor MseI (PM 1)</u>	5'- GATGAGTCCTGAG TAA		NNN-3'

Tabla N°1:

Secuencias de partidores de AFLP utilizados.

Combinación de partidores	Secuencia de extensión PCR +3 (Eco/Mse)
E1A/M1A	AAC/GTA
E1H/M1C	AGA/GAC
E1A/M1C	AAC/GAC
E1H/M1A	AGA/GTA
E1A/M1G	AAC/GCA
E1A/M1F	AAC/GTC
E1C/M1A	AGT/GTA
E1H/M1F	AGA/GTC
E1F/M1F	ATG/GTC
E1G/M1D	ATC/GGT
E1D/M1G	ACA/GCA
E1D/M1A	ACA/GTA
E1D/M1D	ACA/GGT
E1C/M1D	AGT/GGT
E1D/M1H	ACA/GAG
E1AA ¹ /M1A	AA/GTA
E1AA ¹ /M1AA ¹	AA/GA

E1 ² /M1B	A/GCG
E1 ² /M1F	A/GTC
E1C/M1B	AGT/GCG
E1H/M1B	AGA/GCG
E1 ² /M1G	A/GCA
E1 ² /M1H	A/GAG
E1 ² /M1 ¹	A/GAT
E1 ² /M1AA ¹	A/AA
E1 ² /M1AC ¹	A/AC
E1 ² /M1AD ¹	A/AG
E1 ² /M1AB ¹	A/AT
E1 ² /M1F	A/GTC
E1 ² /M1 ²	A/G
E1 ² /M1A	A/GTA
E1 ² /M1C	A/GAC
E1 ² /M1D	A/GGT
E1 ² /M1E	A/AAT

(1) Partidores con 2 nucleótidos selectivos.

(2) Partidores con 1 nucleótido selectivo.

3.2.- Equipos

Centrífuga para microtubo Spectrafuge Labnet 16 M, centrífuga para microtubo Kubota 1700, agitador magnético y pHmetro Cole-Parmer, vortex Genie 2 Fisher, balanza analítica precisa Ainsworth modelo 100A, balanza mecánica Mettler PE 6000, cámaras de electroforesis horizontal, baños termostáticos Polyscience[®] y Pharmacia Biotech, transiluminador, freezer de -80°C, freezer de -20°C, refrigerador, sistemas FisherBiotech para electroforesis vertical de PAA con placas de vidrio de 33x42 cm, estufa Napco[®] Modelo 5831, termocicladores Perkin-Elmer, termociclador MJResearch PTC-100, termociclador MJResearch MiniCycler y termocicladores Eppendorf Mastercycler gradient y Mastercycler.

3.3.- Métodos

3.3.1.-Extracción de ADN.

Las extracciones de ADN se basaron en el método descrito por Lodhi *et al.* (1994b), con algunas modificaciones.

Se pesó aproximadamente 100 mg de tejido foliar juvenil, que fue macerado con nitrógeno líquido. Se agregaron 700 µL de tampón de extracción (EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NaCl 1,4 M, CTAB 2% y β-mercaptoetanol 0,2%) y 50 mg de PVP. Las muestras se colocaron en un baño termostático a 65°C durante 20 a 30 min y se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 min, aproximadamente. Luego, se agregó 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v). El tubo se homogenizó suavemente por inversión hasta formar una emulsión y se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL y se procedió a precipitar el ADN con 900 µL de etanol

absoluto y 200 μ L de NaCl 5 M, mezclando suavemente. Se centrifugó durante 3 min a 3000 rpm para luego aumentar la velocidad de centrifugación a 6000 rpm por 3 min. El precipitado se conservó y se lavó con 500 μ L de etanol 70%. Se centrifugó durante 3 minutos a 6000 rpm. Se removió completamente el etanol y el precipitado se disolvió en 100 μ L de agua destilada estéril. Se trató con 1 μ L de RNasa por 100 μ L de solución de ADN y se incubó a 37°C por 15 min o hasta la completa disolución del precipitado. Se cuantificó el ADN en un fluorímetro. El ADN se diluyó 100 veces y se almacenó a 4°C.

3.3.2.- Selección del material genético

De las 160 muestras de ADN obtenidas a partir de las plantas del cruzamiento 33, se seleccionaron 127 genotipos. Para realizar esta selección se utilizaron marcadores de microsatélites que presentaron patrones alélicos diferentes para cada uno de los progenitores, para así descartar los genotipos que corresponden a autopolinizaciones. Por ejemplo, si Ruby Seedless, que es la madre, presenta un patrón de segregación “ab” (donde “a” y “b” son los dos alelos diferentes) y Thompson Seedless que aporta el polen, es “cd” (donde “c” y “d” corresponden a distintos alelos), se descartaron aquellos “segregantes” que presentaron una combinación alélica “aa”, “ab” o “bb” por ser éstas autopolinizaciones de Ruby. Para este ejemplo, los patrones alélicos de segregación esperados para genotipos provenientes del cruzamiento entre ambos progenitores son: “ac”, “ad”, “bc” y “bd”.

3.3.3.- Reacciones de microsatélites

3.3.3.1.-Reacción de PCR

Cada mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) 10 ng de ADN, 10 pmoles de cada partidor de SSR (directo y reverso), dNTPs 1 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, tampón de PCR 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM y gelatina 0,01%) y 0,3 U de Taq polimerasa, en 16 μ L de volumen final. Se usaron indistintamente termocicladores Perkin-Elmer o MJResearch; los programas de amplificación variaron levemente según la combinación de partidores usada, siendo en general la siguiente: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, temperatura de alineamiento por 45 segundos (ver tabla N°2) y extensión a 72°C por 90 segundos; elongación final por 7 minutos a 72°C.

Tabla N°2:

Partidores del VMC y otros SSR analizados en los progenitores del cruzamiento #33.

Partidor	Temperatura de Alineamiento	Nombre abreviado usado en esta tesis
VMCSsrVrZAG_112 * ²	50 °C	SsrSt-1
VMCSsrVrZAG_12	50 °C	SsrSt-2
VMCSsrVrZAG_14	51 °C	SsrSt-3
VMCSsrVrZAG_15	50 °C	SsrSt-4
VMCSsrVrZAG_21 * ³	50 °C	SsrSt-5
VMCSsrVrZAG_25 * ¹³	61 °C	SsrSt-6
VMCSsrVrZAG_26	N.D.	SsrSt-7
VMCSsrVrZAG_29 * ⁶	50 °C	SsrSt-8
VMCSsrVrZAG_30 * ¹	50 °C	SsrSt-9
VMCSsrVrZAG_47	55 °C	SsrSt-10
VMCSsrVrZAG_62 * ⁵	55 °C	SsrSt-11
VMCSsrVrZAG_64 * ¹³	55 °C	SsrSt-12
VMCSsrVrZAG_67* ¹³	N.D	SsrSt-13
VMCSsrVrZAG_79 * ⁷	50 °C	SsrSt-14
VMCSsrVrZAG_7	N.D	SsrSt-15
VMCSsrVrZAG_82	N.D	SsrSt-16
VMCSsrVrZAG_83 * ³	51 °C	SsrSt-17
VMCSsrVrZAG_89	50 °C	SsrSt-18
VMCSsrVrZAG_93 * ¹²	55 °C	SsrSt-19
VVMD28 * ¹⁶	56 °C	VVMD28
VVMD32 * ³	56 °C	VVMD32
VVMD5 * ¹⁰	56 °C	VVMD5
VVMD7 * ⁵	56 °C	VVMD7

VMC3a1	51 °C	Ssr1
VMC3f2	61 °C	Ssr2
VMC3f3	61 °C	Ssr3
VMC3e5	61 °C	Ssr5
VMC3h5	51 °C	Ssr4
VMC2a7	51 °C	Ssr1a
VMC2c7	50 °C	Ssr2a
VMC2d7	N.D	Ssr3a
VMC2e7	55 °C	Ssr4a
VMC2f7	N.D	Ssr5a
VMC2e8	N.D	Ssr6a
VMC6d12 * ¹	50 °C	Ssr7a
VMC2h9 * ¹	61 °C	Ssr8a
VMC8h10 * ²	55 °C	Ssr9a
VMC5b3 * ²	N.D	Ssr10a
VMC7h3 * ³	51 °C	Ssr11a
VMCNG1f1 * ³	50 °C	Ssr12a
VMC3g7 * ⁴	55 °C	Ssr13a
VMC7h2 * ⁴	50 °C	Ssr14a
VMC1a12 * ⁵	55 °C	Ssr15a
VMC16f3 * ⁵	51 °C	Ssr16a
VMC4d2 * ⁶	55 °C	Ssr17a
VMC9h4_2 * ⁸	55 °C	Ssr18a
VMC3d8 * ⁸	55 °C	Ssr19a
VMC4h9 * ⁹	55 °C	Ssr20a
VMC1g3.2 * ⁹	50 °C	Ssr21a
VMC1e11 * ¹⁰	55 °C	Ssr22a
VMC3e12 * ¹¹	N.D	Ssr23a
VMC6c3 * ¹¹	51 °C	Ssr24a

VMC7g3 * ¹²	55 °C	Ssr25a
VMC2a10 * ¹³	55 °C	Ssr26a
VMC2h3 * ¹⁴	51 °C	Ssr27a
VMC3a9 * ¹⁴	61 °C	Ssr28a
VMC9a2.1 * ¹⁵	60 °C	Ssr29a
VMC3b7.2 * ¹⁵	61 °C	Ssr30a
VMC8f10 * ¹⁶	55 °C	Ssr31a
VMC7f2 * ¹⁷	55 °C	Ssr32a
VMC6f11 * ¹⁷	55 °C	Ssr33a
VMC5g8 * ¹⁸	N.D	Ssr34a
VVS1	56 °C	SsrS1
VVS2	56 °C	SsrS2

(*) Marcadores correspondientes a aquellos identificados en los extremos de los 18 grupos de ligamiento identificados en el mapa preparado por Riaz y Meredith. Se indica con un superíndice el grupo de ligamiento correspondiente.
 ND: no determinado

3.3.4.- Separación en geles de poliacrilamida.

Las reacciones de SSR se analizaron en un gel de agarosa al 2% y luego, en caso de detectarse el producto, las soluciones se diluyeron 2 veces con tampón de carga (0,05% de azul de bromofenol y xilen cianol en EDTA 10 mM, en 95% de formamida), para ser separados en un gel de poliacrilamida.

3.3.4.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante.

Los productos de SSR se separaron en un gel de secuencia de PAA al 6% y 7,5 M de urea. La solución de poliacrilamida-urea se preparó a partir de una solución acrilamida-bisacrilamida al 40%. El gel de poliacrilamida se preparó con una solución que contiene 70 mL de acrilamida-urea al 6%, 163 μ L de persulfato de amonio 10% y 88 μ L de TEMED (Sambrook *et al.*, 1989). A uno de los vidrios se aplicó RepelSilane para impedir que el gel se pegue al vidrio. Al otro vidrio se le agregó una solución compuesta por 1 mL de etanol 95%, 3 μ L de BindSilano y 5 μ L de ácido acético 10%. Una vez polimerizado, el gel se precorrió durante 30 min o hasta alcanzar una temperatura de 50°C, en una cámara de electroforesis vertical con TBE 0,5x como tampón de corrida. Los productos de PCR diluïdos en un 50% con tampón de carga (95% de formamida, xilen cianol y azul de bromofenol 1 mg/mL, y EDTA 10 mM) se calentaron durante 5 min a 95°C. Las muestras se colocaron en hielo inmediatamente, hasta que se cargaron en el gel. En el gel se cargó 9 μ L de la mezcla.

Las muestras se sometieron a electroforesis durante 2,5-3 horas (ó hasta 5 cm antes de la salida del xilen cianol del gel) a 70-80 watt, a 50°C como temperatura óptima. Luego se procedió a la tinción del gel con nitrato de plata.

3.3.4.2.- Tinción de ADN con plata usando el sistema Promega Silver Sequence™

Los productos de PCR se fijaron al gel dejándolo inmerso en 2 L de ácido acético al 10% durante 30 min o hasta la desaparición del xilencianol. El ácido acético se recuperó para su uso posterior en la detención del revelado. Luego, el gel se lavó 3 veces con agua destilada durante 5-10 min cada vez y se transfirió el a una bandeja que contenía 2 litros de solución de nitrato de plata (1 g/L) con 3 mL de formaldehído al 37%. Al cabo de 30 min, el gel se lavó brevemente con agua destilada e inmediatamente se sumergió en la solución de revelado, carbonato de sodio (30 g/L), formaldehído al 37% y 400 µL de tiosulfato de sodio (10 mg/mL), y se esperó la aparición de las primeras bandas. La reacción se detuvo con ácido acético y luego se lavó varias veces con agua destilada.

3.3.5.- Reacción de AFLP

El protocolo de AFLP se desarrolló en el laboratorio en base a la publicación original de Vos *et al.* (1995), con algunas modificaciones, como lo sugería el protocolo estandarizado en el Centro de Agricultura Tropical CIAT de Cali, Colombia.

3.3.5.1.- Digestión del ADN y ligación del adaptador.

Para la reacción de digestión se usó 250 ng de ADN digeridos con 2,5 U de *EcoRI* y de *MseI* en tampón NEB2 (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM; pH 8,0) a un volumen final de 25 µL. Se incubó durante 2 horas a 37°C.

Se preparó una mezcla de ligación en 5 µL con 2,5 pmol de adaptador de *EcoRI*, 25 pmol de adaptador de *MseI* y 100 U de ADN ligasa de T4, en tampón de ADN ligasa de T4 (Tris-HCl 50 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM y BSA 50 µg/mL).

Las mezclas de ligación y de digestión se combinaron e incubaron toda la noche en un termociclador MJResearch PTC-100 con un programa de temperaturas alternadas de 30 seg a 10°C y 30 seg a 30°C (Lund *et al.*,1996). Una alícuota de este producto se diluyó 10 veces.

3.3.5.2.- Reacción de PCR+3.

Se mezclaron 5 µL de dilución 1 en 10 del producto de ligación con 30 ng de cada uno de los partidores *EcoRI*+3 y *MseI*+3 (ver tabla N°1), además de dNTP 0,8 mM, MgCl₂ 2 mM, tampón de PCR (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, y gelatina 0,01%) y 0,4 U de Taq pol en 20 µL de volumen final.

El programa de temperaturas que se aplicó fue el siguiente: desnaturalización inicial durante 3 min a 92°C; luego 1 ciclo de desnaturalización a 92°C durante 30 seg, apareamiento a 65°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 min; en los 11 ciclos siguientes se bajó gradualmente 0,7°C la temperatura de alineamiento en cada ciclo hasta llegar a 56°C (proceso en ‘*touchdown*’); posteriormente se completaron 23 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 30 seg, alineamiento a 56°C durante 30 seg y de extensión a 72°C durante 60 seg; la elongación final fue de 7 min a 72°C.

El producto se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida (de la misma manera que para SSR, ver sección 3.3.4.1) durante 2 a 3 horas o hasta que el xilencianol llegó al extremo inferior del gel. Los productos se visualizaron tiñéndolos con nitrato de plata según el protocolo descrito en el sistema de tinción Silver SequenceTM (sección 3.3.4.2).

3.3.6.- Reacción de RAPD.

Se utilizaron 5 marcadores de RAPD que habían sido determinados con anterioridad en nuestro laboratorio por M. Herminia Castro. Estos 5 marcadores de RAPD utilizados corresponden a

3.3.6.1.-Reacción de PCR.

Las condiciones de la reacción (concentración de $MgCl_2$ y de Taq polimerasa) y el programa de temperaturas de PCR fueron las descritas por Sagredo *et al.* (1998).

La mezcla de reacción de PCR contiene 5 ng de ADN de *Vitis*, 0,2 mM de cada dNTP, $MgCl_2$ 3 mM, 0,4 μ M de cada partidor, tampón de PCR 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,3 KCl 50 mM y de gelatina 0,01%) y 0,5 U de Taq polimerasa en un volumen total de 12,5 μ L. Las reacciones se hicieron en un termociclador Perkin-Elmer con el siguiente programa de amplificación: **a)** 3 ciclos de: desnaturación a 95°C durante 1 min; alineamiento a 37°C durante 1 min; extensión a 72°C durante 80 segundos ; **b)** 37 ciclos de: desnaturación a 94°C durante 35 seg; alineamiento a 40°C durante 40 seg; y extensión a 72 °C durante 80 seg; **c)** elongación durante 7min a 72°C.

3.3.6.2.-Electroforesis en geles de agarosa.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE 1x (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM). La corrida se realizó a 100V durante 2,5-3 horas y los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron con bromuro de etidio en un transiluminador UV de onda corta. El gel fue fotografiado para su análisis posterior.

3.3.7.- Análisis de ligamiento.

3.3.7.1.- Obtención de los grupos de ligamiento.

Los perfiles de fragmentos de ADN obtenidos por AFLP, SSR y RAPD se evaluaron por inspección visual de fotos de los geles de poliacrilamida. Los datos obtenidos con microsatélites fueron analizados como marcadores “dominantes” para que pudieran ser incluidos en el análisis de mapeo.

Las bandas consideradas polimórficas se ordenaron en una matriz binaria, considerando tres tipos de marcadores:

- aquellas bandas que segregaron 1:1 y que se encontraban presentes sólo en Ruby Seedless.
- Las bandas que segregaron 1:1, que estaban presentes en Thompson Seedless, pero ausente en Ruby Seedless y
- Bandas presentes en ambos padres, cuya segregación esperada fue de 3:1.

La amplificación de una banda desde uno de los padres indica que el *locus* es heterocigoto sólo en uno de los padres y homocigoto nulo en el otro. La presencia de una banda en ambos padres y su segregación en la progenie refleja heterocigocidad del *locus* en ambos padres. Las bandas heterocigotas en ambos padres no fueron usadas en el análisis de ligamiento.

Estos datos obtenidos fueron sometidos a la prueba de χ^2 . Esta prueba nos dice con qué frecuencia las observaciones se desvían del patrón esperado, simplemente por azar.

La fórmula para calcular el valor del χ^2 es la siguiente:

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

donde, “O” corresponde al número observado en cada clase y “E” el número esperado según la hipótesis nula que establecía que la falta de ligamiento conduciría a una razón 1:1, que fija la frecuencia de recombinación en un 50%.

También se calculó otro factor: el número de grados de libertad (df). Para el análisis de mapeo debemos considerar dos factores (presencia o ausencia del alelo), por lo tanto:

$$df = (\text{número de factores} - 1)$$

Para el análisis se consideró un valor de p de 0.05, esto significa que si la hipótesis nula es correcta, una desviación al menos tan grande como la observada, se produciría en algo más del 5% de las veces. Asimismo, cualquier valor de p menor del 5% lleva a rechazar la hipótesis y por lo tanto, podrán ser incluidos en el análisis de mapeo.

En un comienzo, se usó MAPMAKER/EXP 3.0 (Lincoln *et al.*, 1992) para la detección de ligamiento, usando como condiciones, para construir el mapa, un $LOD \geq 3.0$ y 50 cM como distancia máxima entre 2 *loci*. Luego, se optó por utilizar el programa MapManager QTX03 (Manly, K.F. y Elliot, R.W., 1991), ya que los grupos de ligamiento encontrados por éste fueron igual a los encontrados por el programa MAPMAKER.

Para realizar el análisis de ligamiento, cada *locus* segregado fue ordenado de la siguiente forma:

Locus A AAHAAAHHHHHHHAAHH

Locus B HHAHHHHHAAHHHHAA

donde A representa el genotipo del homocigoto nulo (-/-) y H el genotipo heterocigoto (+/-). Cada letra representa un individuo del cruzamiento.

Un ejemplo del análisis de ligamiento se muestra a continuación. Se tiene una población formada por 120 individuos. Se quiere calcular la distancia que existe entre los *loci* recombinantes. Los *loci* recombinantes son *locus a*, *locus b* y *locus c*.

El *locus* “a”, se encuentra en 20 de los 120 genotipos analizados; el *locus* “b” en 15 y el “c” en 30.

Se debe efectuar el cálculo de la frecuencia de recombinación (RF).

La fórmula para calcular RF es la siguiente:

$$\mathbf{RF = (I^+ / S_{\text{totales}}) \times 100}$$

donde, “I⁺” corresponde al número de individuos que presentan el alelo, y “S_{totales}” corresponde al total de la población, en el ejemplo RF para los *locus* “a” y “b” sería:

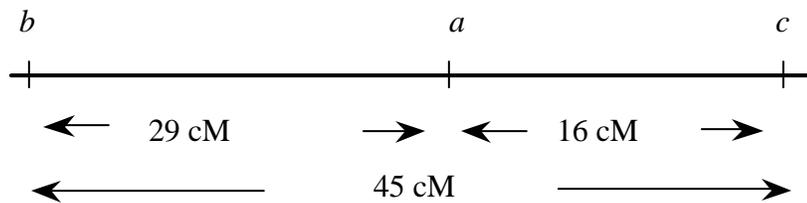
$$\mathbf{RF = ((a^+ + b^+) / S_{\text{totales}}) \times 100}$$

RF = 35 / 120 = 0,29 x 100 = 29%. Esto implica que estos genes están ligados en el mismo cromosoma ya que su RF es menor a 50.

Del mismo modo, la RF para los *locus* “b” y “c” es 45%.

Resulta obvio que los tres genes están ligados en el mismo cromosoma, puesto que los valores de RF son menores que el 50%. Dado que los *loci* “*b*” y “*c*” son los que muestran una RF más alta, deben ser los que están más alejados; luego, el *locus* “*a*” debe estar en medio de ellos.

Se puede dibujar el siguiente mapa:



4. RESULTADOS

4.1.- Material biológico: cruzamientos analizados.

El propósito de esta tesis fue desarrollar un mapa de ligamiento genético de uva de mesa, basándose en progenies desarrolladas en un programa de mejoramiento genético de este frutal, en el Centro Experimental La Platina, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Para lo cual, se disponía de un número importante de cruzamientos, sobre 100, entre los que se encuentran, Sultanina x Black, Sultanina x Ruby Seedless, Flame x Perlette, Red Globe x Centenial, en distintos estados de avance: *in vitro*, aclimatadas en invernadero, en sombreadero o en campo. En la tabla 3 se muestran algunos de los cruzamientos más numerosos. Entre éstos, se escogió el cruzamiento #33 correspondiente a Ruby Seedless x Thompson Seedless (Sultanina).

El criterio de selección se basó en el número de plantas presentes en campo (sobre 250).

Un ejemplo del resultado de las extracciones de ADN obtenidas por el método descrito en 3.2.1 se muestra en la figura 5.

Tabla N°3

Algunos cruzamientos de uva de mesa de INIA La Platina, con el número de segregantes correspondientes.

Cruzamiento	Número de Descendientes
5 Flame S. x Black S.	59
42 Flame S. x Blush S.	35
85 Red S. x Dawn S.	49
25 Ruby S. x Flame S.	46
29 Ruby S. x Perlette	98
31 Ruby S. x Red S	47
32 Ruby S. x Black S.	44
33 <i>Ruby S. x Sultanina</i>	293
56 Ruby S. x Centennial S.	55
57 Ruby S. x Superior	49
58 Ruby S. x Autumn	77
63 Ruby S. x Blush S.	61
84 Ruby S. x Beauty	67

* Con negrita y cursiva se indica el cruzamiento utilizado en esta tesis.

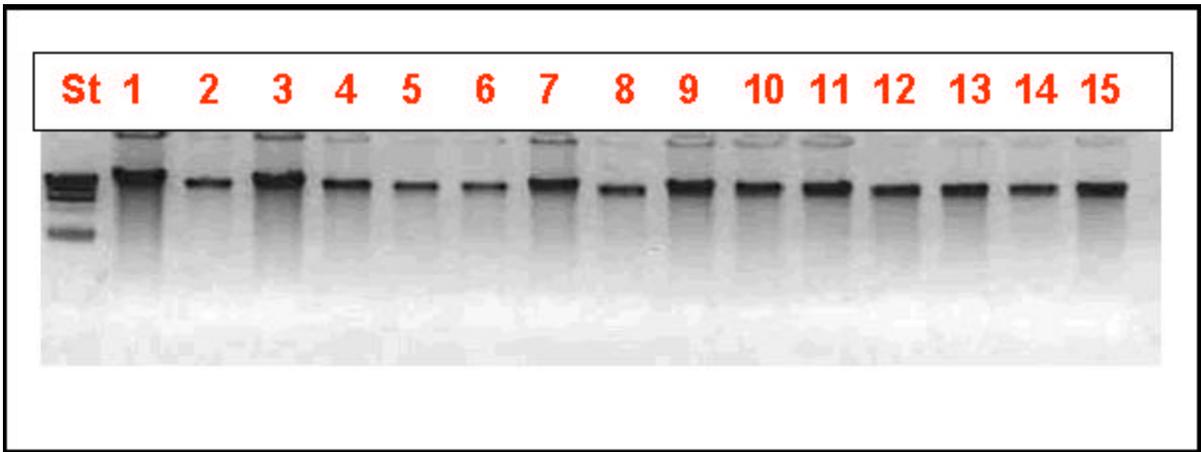


Figura 5.

Extracciones de ADN a partir de tejido foliar juvenil de los segregantes y progenitores del cruzamiento #33, realizadas según el método descrito en la sección 3.2.1. Gel de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio. En cada carril se cargó 5 μ L de muestra. En los carriles 1-15, se puede apreciar el ADN genómico de algunos segregantes, cuya migración a la altura de la banda mayor del estándar λ /HindIII (St) indica que tiene un mínimo grado de degradación. Además, no presenta ARN residual, que ha sido descrito como interferente para algunos protocolos de PCR.

4.2.- Análisis mediante microsatélites

4.2.1.- Caracterización de nuevos marcadores de microsatélites de vid.

Se contaba hasta hace un par de años con sólo 20 o 30 marcadores de microsatélites, por lo que la única posibilidad era hacer un mapa de ligamiento sobre la base de marcadores dominantes, como AFLP o RAPD. Por esta razón, principalmente, en 1999 se formó un consorcio internacional (VMC, *Vitis Microsatellite Consortium* coordinado por Agrogene, una empresa biotecnológica con sede en Francia) con el propósito de identificar un número adecuado de marcadores de microsatélites (SSR). En este contexto, la primera actividad de esta tesis fue caracterizar siete de estos nuevos SSR del VMC, según se describe a continuación.

Los siete marcadores fueron evaluados usando una paleta de cuatro genotipos, los cvs. Cabernet Sauvignon, Riesling y Sultanina, más una muestra de otra especie de *Vitis*, *V. riparia*. Los resultados de optimización de las condiciones de PCR para cada uno de estos marcadores, implicó modificar las concentraciones de partidores, ADN y Mg^{+2} . Lo más crítico fue determinar la mejor temperatura de apareamiento, entre 50 y 60°C. En definitiva, en cada reacción se usó (a concentraciones finales), 10 ng de ADN, 5 pmol de cada partidador, 1 mM total de los cuatro dNTPs y Taq polimerasa (0.3 U).

Un resumen de estos resultados se muestra en la tabla 4, mientras que en la figura 6 se representa un esquema de los amplicones obtenidos con cada marcador. Un gel que ilustra el comportamiento del marcador VMC3f2 (uno de los que se desarrollaron en INIA) sobre los segregantes del cruzamiento #33 (Ruby x Sultanina) se muestra en la figura 7. Para este marcador Ruby fue homocigoto y Sultanina heterocigoto, lo que genera la segregación simple que se observa, con sólo dos combinaciones alélicas presentes (flechas laterales).

Tabla N° 4:

Condiciones determinadas para cada marcador.

Pareja de partidores	MgCl ₂	T° de alineamiento	Tamaño amplicón, Aprox.	Resultados
VMC3a1	1,5 mM	51°C	238 bp	Útil, pero monomórfico en <i>V. vinifera</i>
VMC3f2	1,5 mM	61°C	200 bp	Útil
VMC3f3	1,5 mM	61°C	186 bp	Útil
VMC3e5	1,5 mM	51°C	115 bp	Útil, pero monomórfico en <i>V. vinifera</i>
VMC3f5	1,0 – 3,0 mM	51-61°C	120 bp	No útil
VMC3h5	1,5 mM	51°C	168 bp	Útil
VMC3d6	0,5 - 1,5 mM	51 – 61°C	ND	No útil

ND: No determinado. No pudo ser determinado debido a su pequeño tamaño.

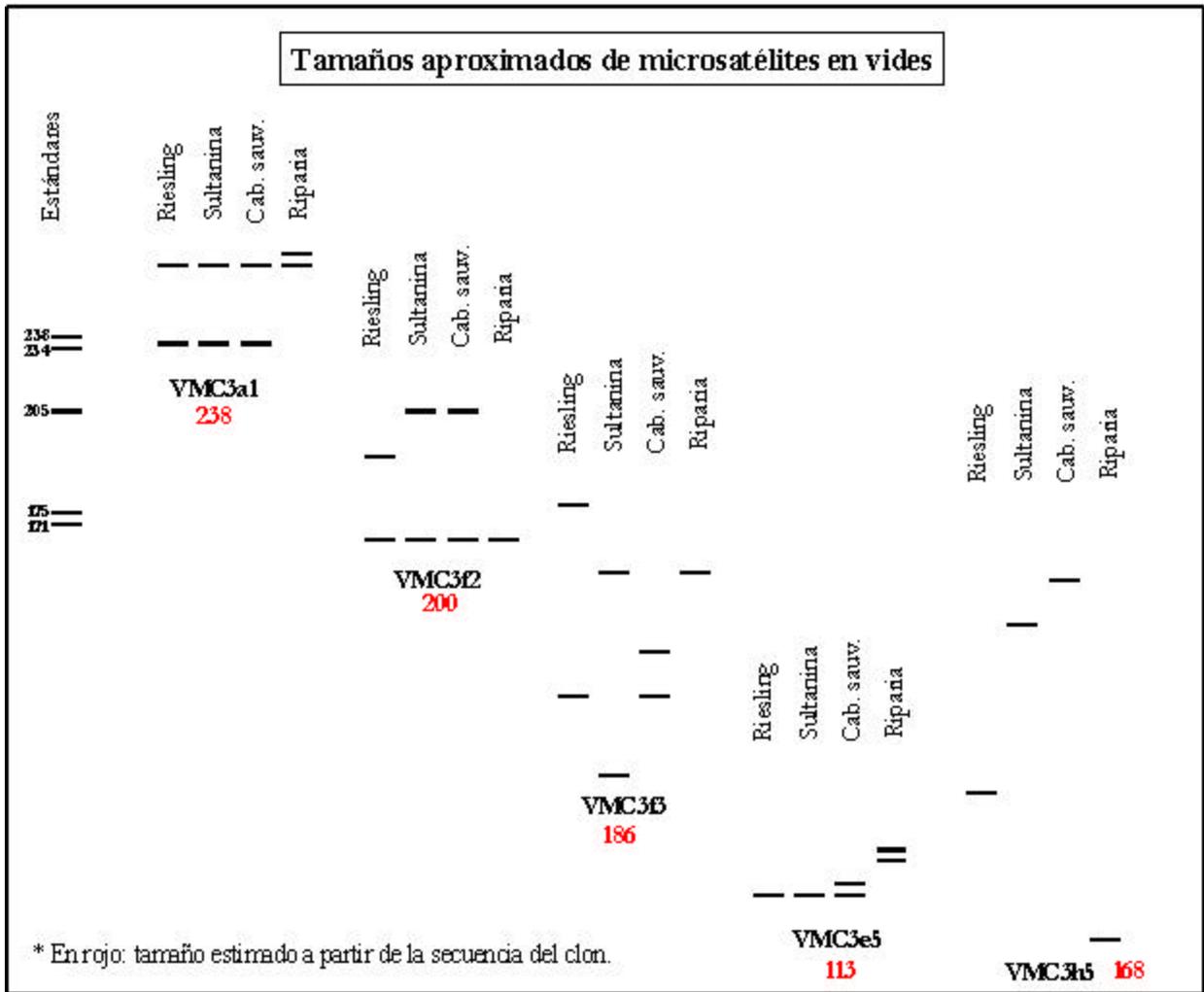


Figura 6.

Diagrama que ilustra la migración de nuevos microsatélites caracterizados. Se muestra un esquema de los amplicones obtenidos con cada genotipo.

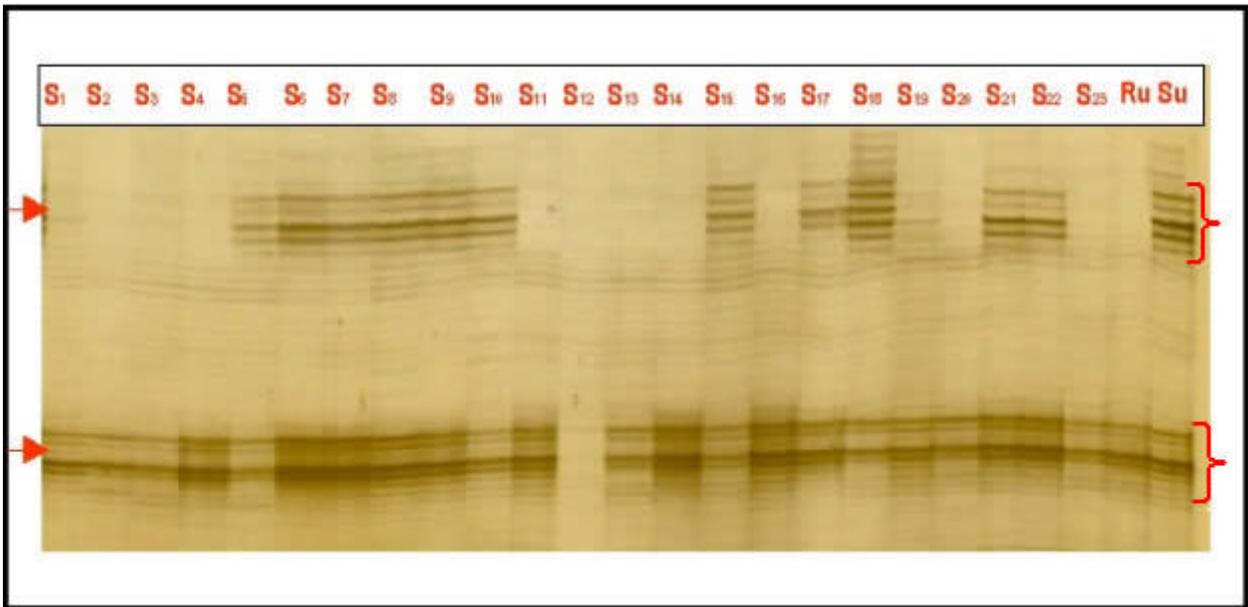


Figura 7.

Análisis de la población de mapeo con partidor VMC3f2. Se muestra un gel de poliacrilamida al 6% / urea 7M. Las flechas indican los 2 alelos obtenidos (cada alelo es presentado con una llave). Los carriles indicados como Ru y Su corresponden a los progenitores (Ruby seedless y Sultanina, respectivamente), los carriles siguientes indican los segregantes de la familia y son mostrados como S₁, S₂, etc. No se utilizó un estándar de peso molecular ya que para el análisis no fue necesario determinar los tamaños de los alelos, sino sólo su segregación en la población.

4.2.2.- Selección de marcadores de SSR informativos en el cruzamiento #33.

Aunque la planificación original de esta tesis contemplaba el análisis de la población de mapeo usando un número mínimo de 200 marcadores codominantes (SSR); en el curso de esta etapa se obtuvo información preliminar, sobre un mapa preparado en base a marcadores de SSR usando una población de cepas de vinificación (Cabernet Sauvignon x Riesling). Considerando este antecedente, se seleccionó un mínimo de dos marcadores por grupo de ligamiento, ubicados en los extremos de cada grupo identificado por Riaz y Meredith (2000), además de otros marcadores elegidos porque se disponía de las condiciones óptimas de amplificación (serie VrZAG). Así, dado que la vid tiene 19 cromosomas (19 grupos de ligamiento), sólo se ensayaron 64 pares de partidores, para lo cual se utilizaron ambos progenitores de la familia de referencia #33 (Ruby Seedless y Sultanina), al mismo tiempo que tres segregantes seleccionados al azar, con el fin de determinar las condiciones óptimas de amplificación de cada marcador y, especialmente, si eran informativos en este cruzamiento (heterocigotos y polimórficos entre los progenitores). Un ejemplo de estas evaluaciones se muestra en la figura 8, donde se distingue el patrón de alelos de los dos progenitores y tres segregantes con ocho marcadores de SSR. Para estas determinaciones, en un comienzo se ensayaron dos temperaturas de alineamiento (50°C y 55°C). Aunque estaba descrita la temperatura óptima de los partidores VMC-VrZAG, no dieron los resultados esperados, por lo que también debieron ser optimizados.

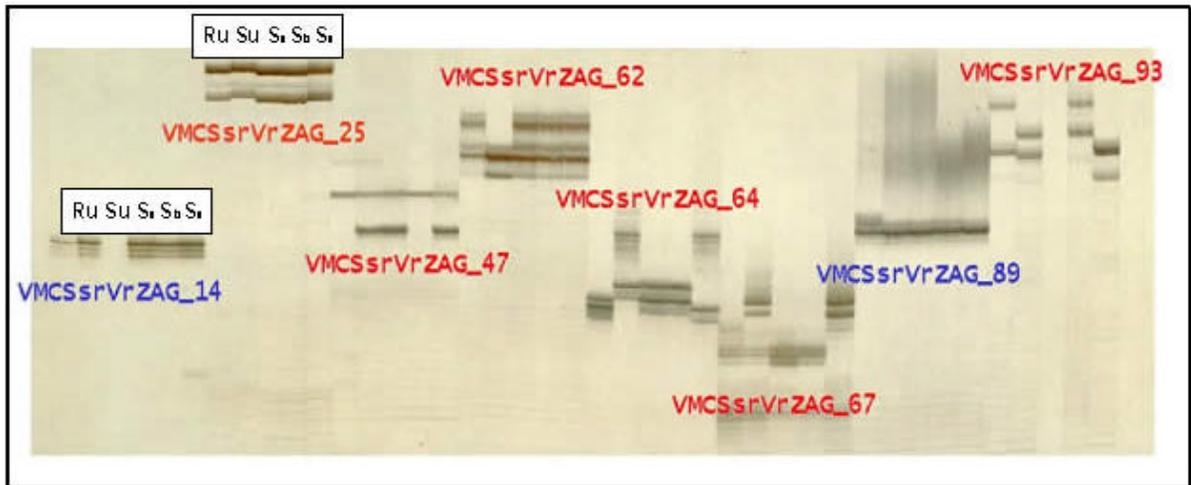


Figura 8.

Marcadores informativos para el cruzamiento #33. Gel de poliacrilamida al 6% / urea 7M. Se indica en rojo los partidos polimórficos para los progenitores del cruzamiento y en azul aquellos que no resultaron informativos. Los dos primeros carriles, de cada grupo de marcadores probados, corresponden a Ruby y Sultanina, respectivamente; los tres siguientes son segregantes escogidos al azar.

4.2.3.- Tamaño de la población de mapeo (cruzamiento #33).

Para que el mapa preparado tenga un valor estadísticamente significativo, es deseable que esta población sea de a lo menos 100 individuos, ya que mientras mayor es el tamaño de la población, menor es el error en las estimaciones de ligamiento.

Se contaba con 160 muestras de ADN de las cuales se descartó aproximadamente un 15%, por coincidir sus alelos con autopolinización de Ruby. Así mismo, se descartaron aquellos ADNs provenientes de plantas que no habrían presentado fruta, por lo tanto la población de mapeo estuvo formada con un total de 127 segregantes, más los progenitores. La selección de los genotipos, que eran efectivamente segregantes del cruzamiento escogido, se realizó utilizando cinco marcadores de SSR (como se indica en la sección 3.2.2).

En la figura 9 se muestra un gel de electroforesis donde se observan los segregantes y sus formas alélicas estudiados con el marcador St-5, se muestra en la figura 9. Este partidor fue uno de los utilizados para descartar genotipos de autopolinización.

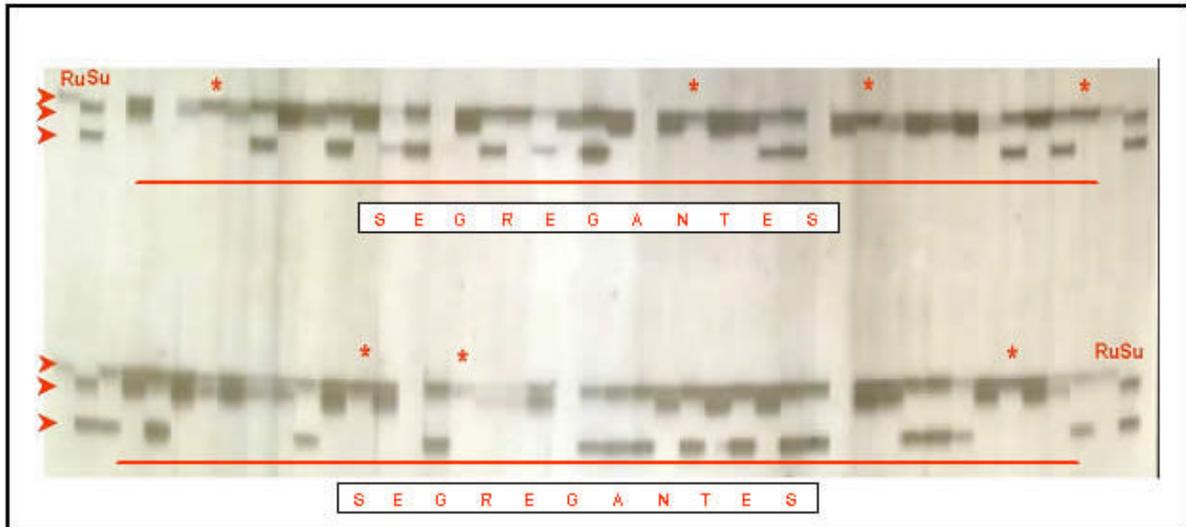


Figura 9.

Genotipos descartados por autopolinización. Gel de poliacrilamida 6%, urea 7 M. Se indica con un asterisco (*) algunos de los genotipos descartados de la población de mapeo (autopolinización). Los carriles indicados como Ru y Su, corresponden a los progenitores del cruzamiento, Ruby Seedless y Sultanina, respectivamente.

Se analizó un total de 20 pares de partidores de SSR en la población de mapeo, observándose un total de 51 alelos diferentes.

Es importante destacar que los microsatélites fueron analizados como marcadores “dominantes” para ser incluidos en el análisis de mapeo, por lo que cada alelo se consideró como una banda polimórfica. Así, se obtuvo 19 bandas de origen materno y 25 bandas de origen paterno, mientras que 7 bandas que segregaron en la progenie se encontraron en ambos progenitores. En la tabla 5 se muestra un resumen de los marcadores obtenidos.

Del total de partidores de SSR analizados, un 35% presentó dos alelos diferentes entre los progenitores, un 50% presentó tres y un 15% presentó los 4 alelos diferentes.

Tabla N°5

Resumen de la información obtenida con los marcadores SSR.

Origen Paterno	Bandas Totales	Segregación Esperada	Desviación “no significativa” (%)
Materno	19	1:1	73,6
Paterno	25	1:1	76,0
Presente en ambos	7	3:1	42,8
Totales	51	-	-

Nota:

Se debe recordar que la prueba de χ^2 nos dice con qué frecuencia las observaciones se desvían del patrón observado, simplemente por azar. Por lo tanto, la columna ‘Desviación “no significativa”’ nos indica el porcentaje de marcadores obtenidos que pueden ser incluidos en análisis de mapeo.

4.3 Análisis por AFLP.

Para estas reacciones se utilizaron las mismas muestras de ADN que se usaron para microsátélites, pero a una concentración de entre 250 y 300 ng/ μ L.

La reacción de AFLP resultó en la mayoría de las muestras de ADN analizadas y con un perfil general de bandas amplificadas comparables. Esto indicaría que la cantidad y calidad de ADN utilizado es adecuada para este tipo de reacción. Esto es significativo ya que según Vos *et al* (1995), la eficiencia de la reacción de AFLP es dependiente de la calidad del ADN, lo que afectaría principalmente la etapa de digestión.

En la figura 10 se presenta un gel de poliacrilamida en que se han separado los productos de una reacción de AFLP en la que se usó la combinación de partidores E1A /M1C. Además, se debe considerar que el protocolo de AFLP fue modificado y se hizo una amplificación PCR+3 directamente desde la ligación, descartando la etapa de preamplificación. La preamplificación tiene por objeto aumentar la cantidad de material y disminuir el fondo, por lo que al no realizar este paso los productos finales de la amplificación se encuentran con más ‘ruido’ que lo habitual.

Es importante destacar que la información obtenida como se indica en la tabla 6, fue considerablemente menor, que lo indicado en la literatura, de 100 a 150 bandas polimórficas por combinación de partidores, Ferreira y Grattapaglia (1998). Esto se debe al uso de tinción con nitrato de plata como método de visualización, el cual es menos sensible que la marcación radiactiva con γ -P³³ ATP. Se realizó un ensayo utilizando como partidores +0 los propios adaptadores (de la reacción de ligación) y partidores +1 que se encontraban en el laboratorio que habían sido probados anteriormente y no funcionaban; los resultados de este análisis se muestra en la figura 11. El efecto no fue el esperado ya que se obtuvo productos de PCR con mucho ‘ruido’, lo que dificultó su estudio, optándose por continuar realizando la reacción de PCR+3

directamente desde la ligación. Al hacerlo así, se obtuvo información de buena calidad aunque se dispuso de menos material para los ensayos.

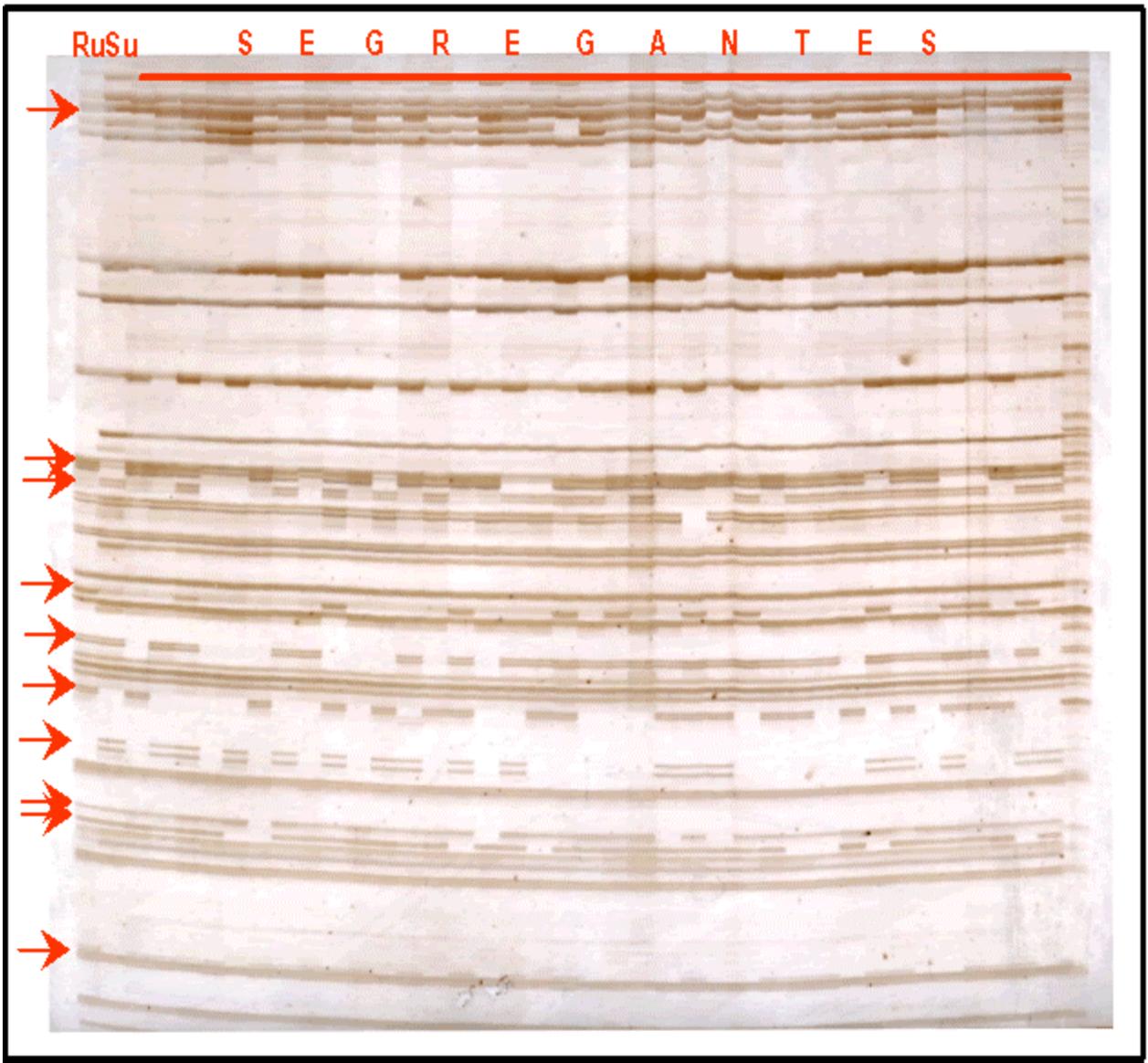


Figura 10.

Análisis de un gel de poliacrilamida 6% / urea 7M. Se muestran los productos de AFLP.

Con una flecha roja se muestran las bandas polimórficas obtenidas con la combinación de partidores E1A / M1C. Los carriles Ru y Su corresponden a los progenitores del cruzamiento, Ruby Seedless y Sultanina, respectivamente; los carriles siguientes corresponden a 38 segregantes, parte de la población mapeada.

Tabla N°6:

Resumen de las bandas polimórficas obtenidas por combinación de partidores de AFLP.

Combinación de partidores	Secuencia de extensión PCR +3 (Eco/Mse)	Bandas polimórficas por gel
E1A/M1A	AAC/GTA	16
E1H/M1C	AGA/GAC	5
E1A/M1C	AAC/GAC	10
E1H/M1A	AGA/GTA	5
E1A/M1G	AAC/GCA	9
E1A/M1F	AAC/GTC	12
E1C/M1A	AGT/GTA	13
E1H/M1F	AGA/GTC	10
E1F/M1F	ATG/GTC	7
E1G/M1D	ATC/GGT	10
E1D/M1G	ACA/GCA	10
E1D/M1A	ACA/GTA	6
E1D/M1D	ACA/GGT	9
E1C/M1D	AGT/GGT ³	4
E1D/M1H	ACA/GAG	11
E1AA ¹ /M1A	AA/GTA	N. I.
E1AA ¹ /M1AA ¹	AA/GA	N. I.
E1 ² /M1B	A/GCG	N. I.
E1 ² /M1 ²	A/G	N.I.
E1 ² /M1A	A/GTA	N.I.
E1 ² /M1C	A/GAC	N.I.
E1 ² /M1D	A/GGT	N.I.
E1 ² /M1E	A/AAT	N.I.
E1 ² /M1G	A/GCA	N.I.

E1 ² /M1H	A/GAG	N.I.
E1 ² /M1 ¹	A/GAT	N.I.
E1 ² /M1AA ¹	A/AA	N.I.
E1 ² /M1AC ¹	A/AC	N.I.
E1 ² /M1AD ¹	A/AG	N.I.
E1 ² /1AB ¹	A/AT	N.I.
E1 ² /M1F	A/GTC	N. I.
E1C/M1B	AGT/GCG	N. I.
E1H/M1B	AGA/GCG ³	4

(1) Partidores con 2 nucleótidos selectivos.

(2) Partidores con 1 nucleótido selectivo.

(3) Partidores no incluidos en el análisis.

N.I. No informativo para el cruzamiento.

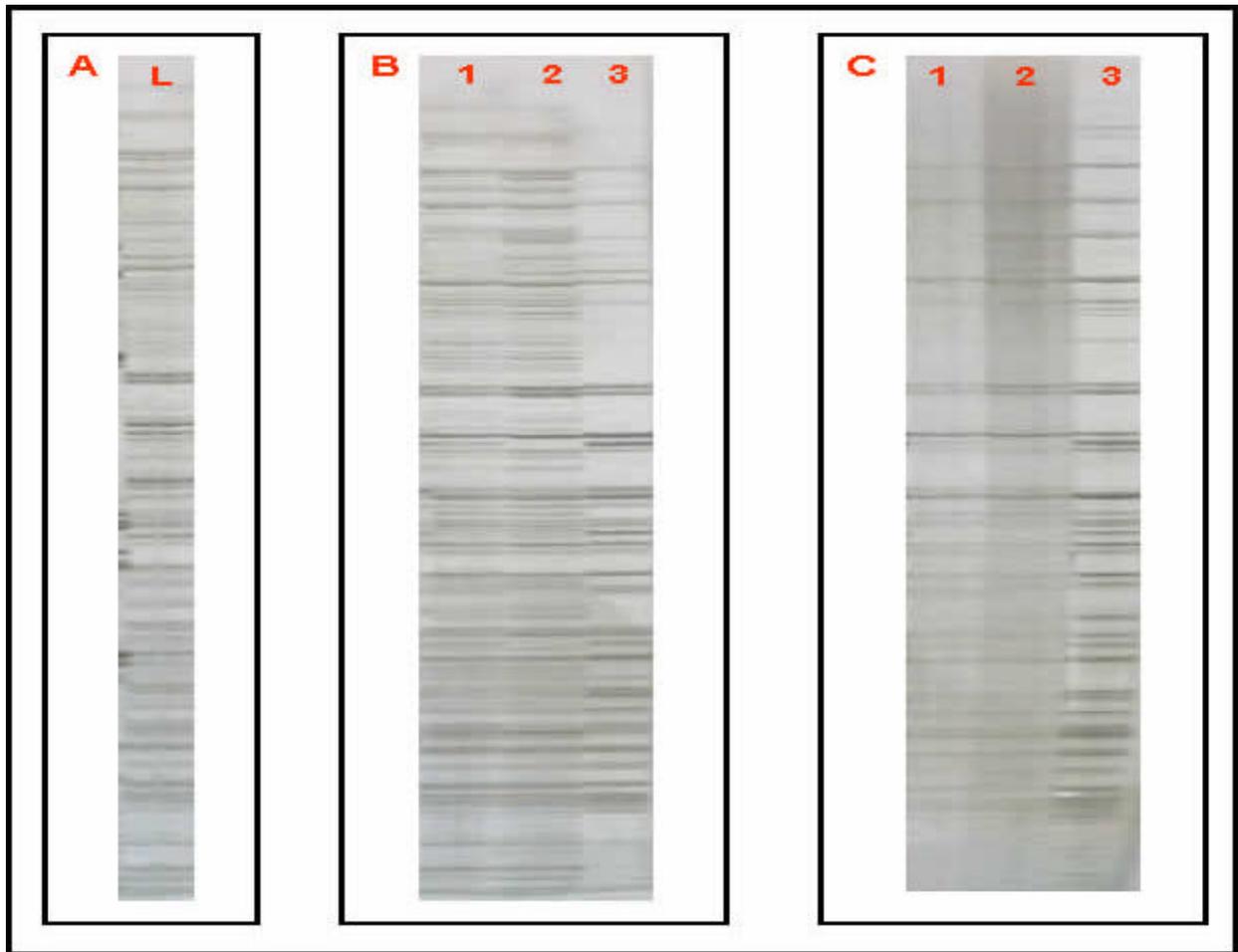


Figura 11.

Geles de poliacrilamida que muestran los resultados de reacciones de AFLP obtenidas a partir de distintas condiciones de preamplificación. El panel A corresponde a una muestra amplificada directamente desde la mezcla de ligación, y se tomó como control. El panel B, corresponde a los productos de tres reacciones de AFLP en que la preamplificación usó como partidor el propio adaptador y debe considerarse, por lo tanto, un PCR+0. El panel C corresponde a productos de AFLP en los que la preamplificación se realizó con un partidor que tiene un nucleótido selectivo, PCR+1. Las muestras utilizadas corresponden a segregantes de la familia #33 y fueron escogidos al azar.

El uso de 16 combinaciones de partidores, *EcoRI* y *MseI*, en la población completa generó 133 bandas polimórficas de las cuales 47 fueron propias de la madre y 57 fueron aportados por el padre. Se obtuvo un promedio de 9,5 bandas por combinación de partidores, con un rango entre 4 y 16 bandas polimórficas por gel. Además, 29 bandas se encontraron en ambos progenitores. En la tabla 7 se indica el resumen del análisis de los marcadores obtenidos por AFLP.

Tabla N°7.

Resumen del análisis de los marcadores obtenidos por AFLP.

Origen de las Bandas	Bandas Totales	Segregación Esperada	Desviación “no significativa” (%)
Materno	47	1:1	80,8
Paterno	57	1:1	78,9
Presente en ambos	29	3:1	82,8
Totales	133	-	-

Nota:

Se debe recordar que la prueba de χ^2 nos dice con qué frecuencia las observaciones se desvían del patrón observado, simplemente por azar. Por lo tanto, la columna ‘Desviación “no significativa”’ nos indica el porcentaje de marcadores obtenidos que pueden ser incluidos en análisis de mapeo.

4.4 Análisis estadístico.

Las bandas consideradas polimórficas, tanto para AFLP, SSR y RAPD, se sometieron a una prueba de χ^2 . De un total de 158 marcadores (incluidos SSR, AFLP, RAPD y un marcador morfológico) encontrados en uno de los padres, es decir, que se esperaba que segregaran 1:1 en la población estudiada, un 80,3% no presentó una desviación significativa de la esperada, lo que permitió incluirlos en el análisis de mapeo.

Por otra parte, se obtuvieron 40 marcadores para ambos padres cuya segregación esperada era 3:1. Según la prueba de χ^2 un 75% no presentó una desviación significativa de lo esperado, y pueden ser utilizados en la identificación de grupos de ligamiento homólogos entre los mapas genéticos de los progenitores.

4.4.1 Obtención de los grupos de ligamiento.

Se consideraron aquellos marcadores que según el análisis de χ^2 segregaron 1:1 para cada uno de los padres, obteniendo así un mapa preliminar para cada progenitor. Utilizando los programas MAPMAKER y MAPMANAGER, se obtuvo un total de 53 marcadores para Ruby Seedless y 69 para Sultanina. Se encontraron 14 grupos de ligamientos para Ruby cubriéndose un total de 474,6 cM, en base a 36 marcadores mapeados. La distancia promedio entre estos marcadores fue de 13,18 cM, quedando 17 marcadores no ligados. Para Sultanina se identificaron 15 grupos, cubriendo un total de 742,8 cM, localizando 51 marcadores. Su distancia promedio fue de 14,2 cM entre *loci*, quedando 18 marcadores no ligados (figuras 12 y 13).

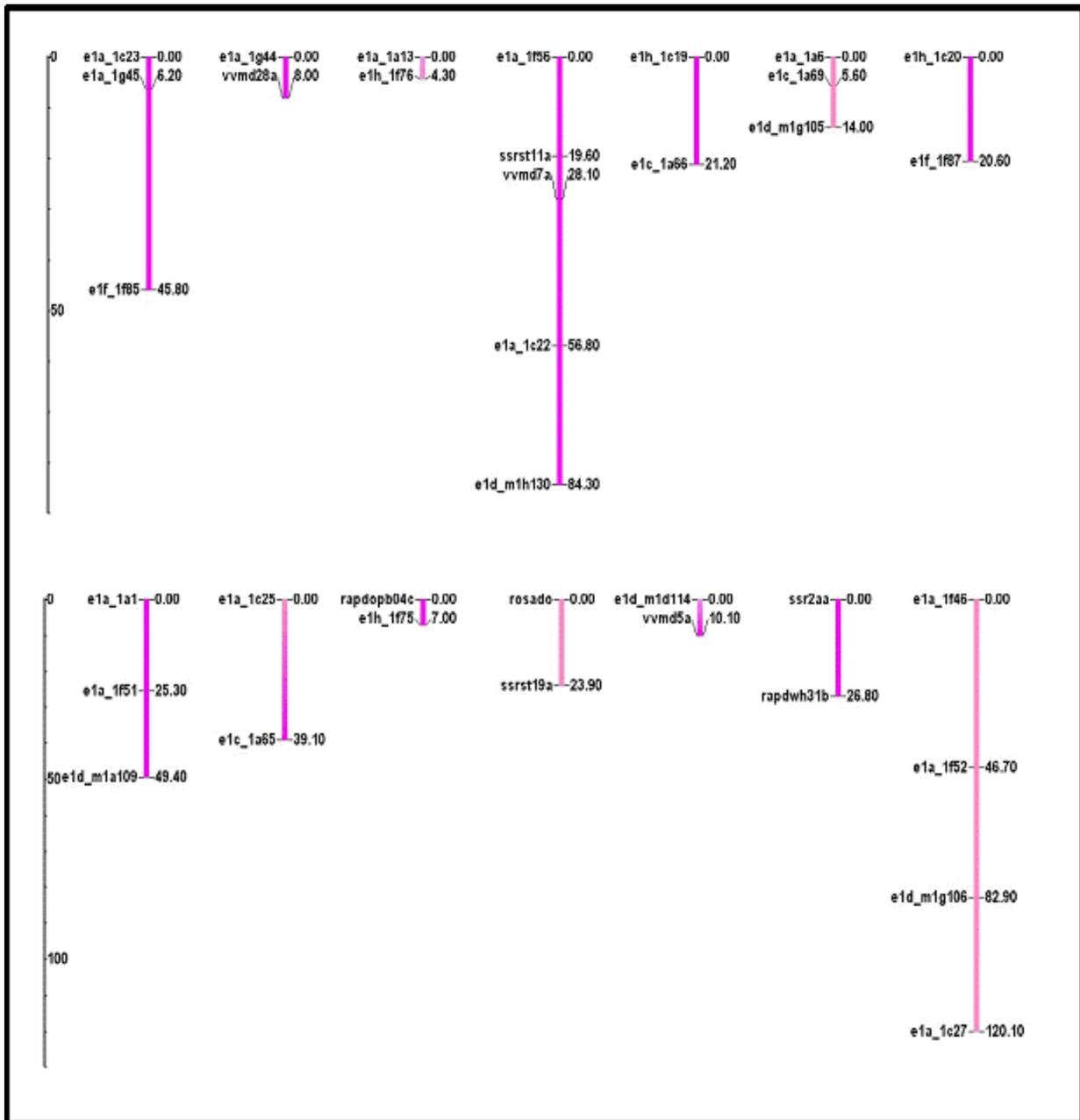


Figura 12.

Grupos de ligamiento para Ruby Seedless. Se muestran 14 grupos de ligamiento obtenidos con el programa MapManager. Se incluyeron sólo aquellos marcadores que presentaron una desviación “no significativa” en su segregación. Con ellos se cubrió una distancia total de 474,6 cM,

localizando 36 marcadores. La figura se obtuvo utilizando el programa Graphical GenoTypes.

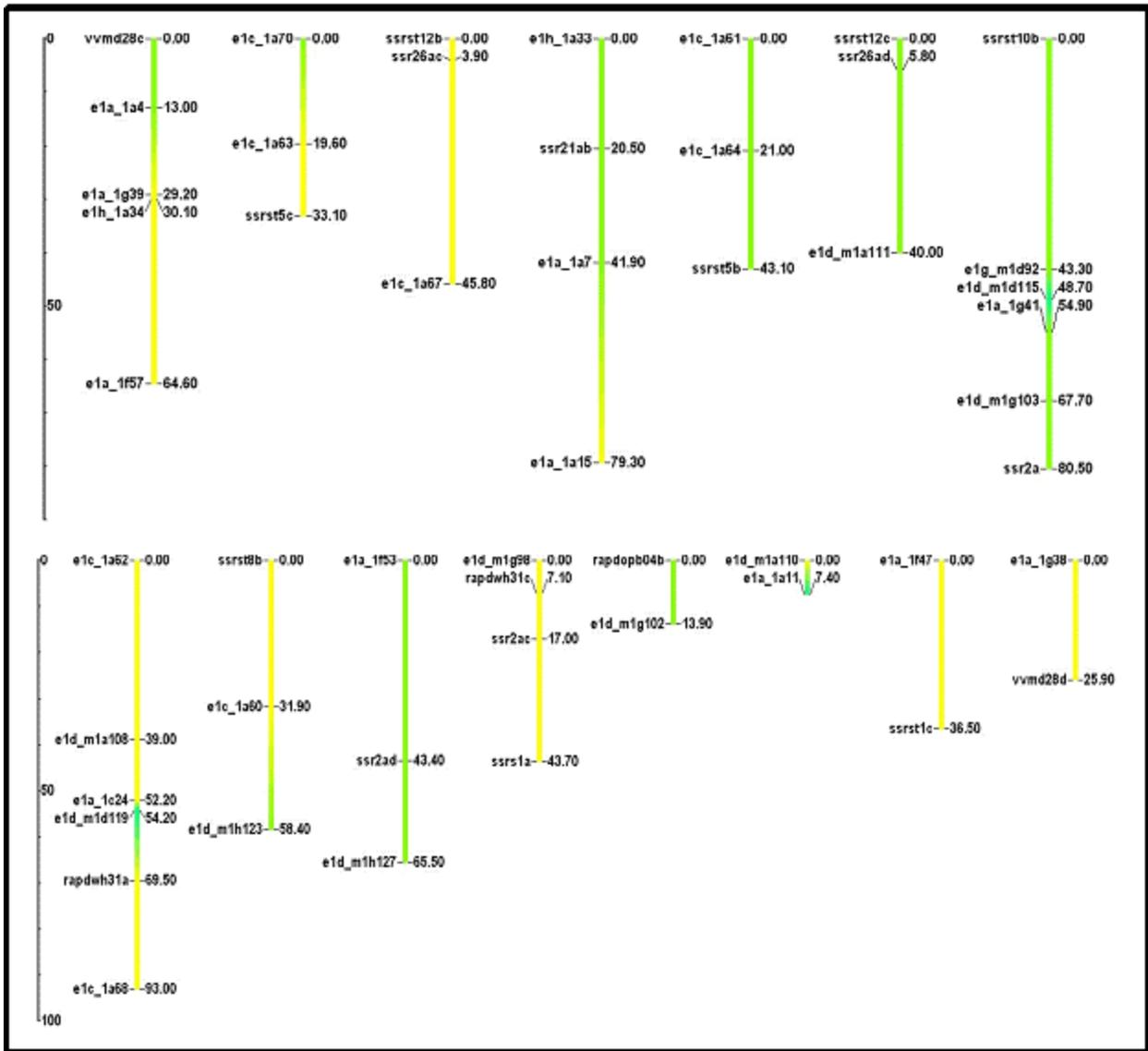


Figura 13.

Grupos de ligamiento obtenidos para Thompson Seedless. Se muestran 15 grupos de ligamiento obtenidos con el programa MapManager. Se incluyeron 51 marcadores que presentaron una desviación “no significativa” en su segregación. Con ellos se cubrió una distancia total de 742,8 cM. La figura se obtuvo utilizando el programa Graphical GenoTypes.

Tabla N°8:

Comparación de los primeros mapas de ligamiento genético obtenidos para ‘Ruby Seedless’ x ‘Thompson Seedless’.

Parámetro	Total	‘Ruby Seedless’	‘Thompson Seedless’
Distancia total cubierta (cM)	-	474,6	742,8
N°total de marcadores mapeados	122	53	69
Distancia promedio entre marcadores (cM)	13,69	13,18	14,2
N° Total de marcadores asignados	87	36	51
N° de grupos de ligamiento	29	14	15
N° de marcadores no ligados	35	17	18
Grupo de ligamiento mas grande	-	120,1	93
N° de marcadores en el grupo mas grande	-	4	6

En una segunda instancia también se incluyeron marcadores que presentaron una mayor desviación a la segregación esperada de 1:1, es decir, su valor de χ^2 fue mayor a 3,84 pero inferior a 16, obteniéndose 68 marcadores totales (incluidos SSR, AFLP, RAPD y el marcador morfológico) para Ruby Seedless y 78 marcadores totales para Sultanina. De esta manera se encontraron 16 grupos de ligamiento para Ruby, con 44 marcadores ligados y una distancia total de 524,9 cM, con una distancia promedio de 11,9 cM entre *loci*. Para Sultanina, se identificaron 17 grupos con 940,4 cM totales con 59 marcadores ligados y una distancia promedio de 15,4 cM entre *loci* (figuras 14 y 15).

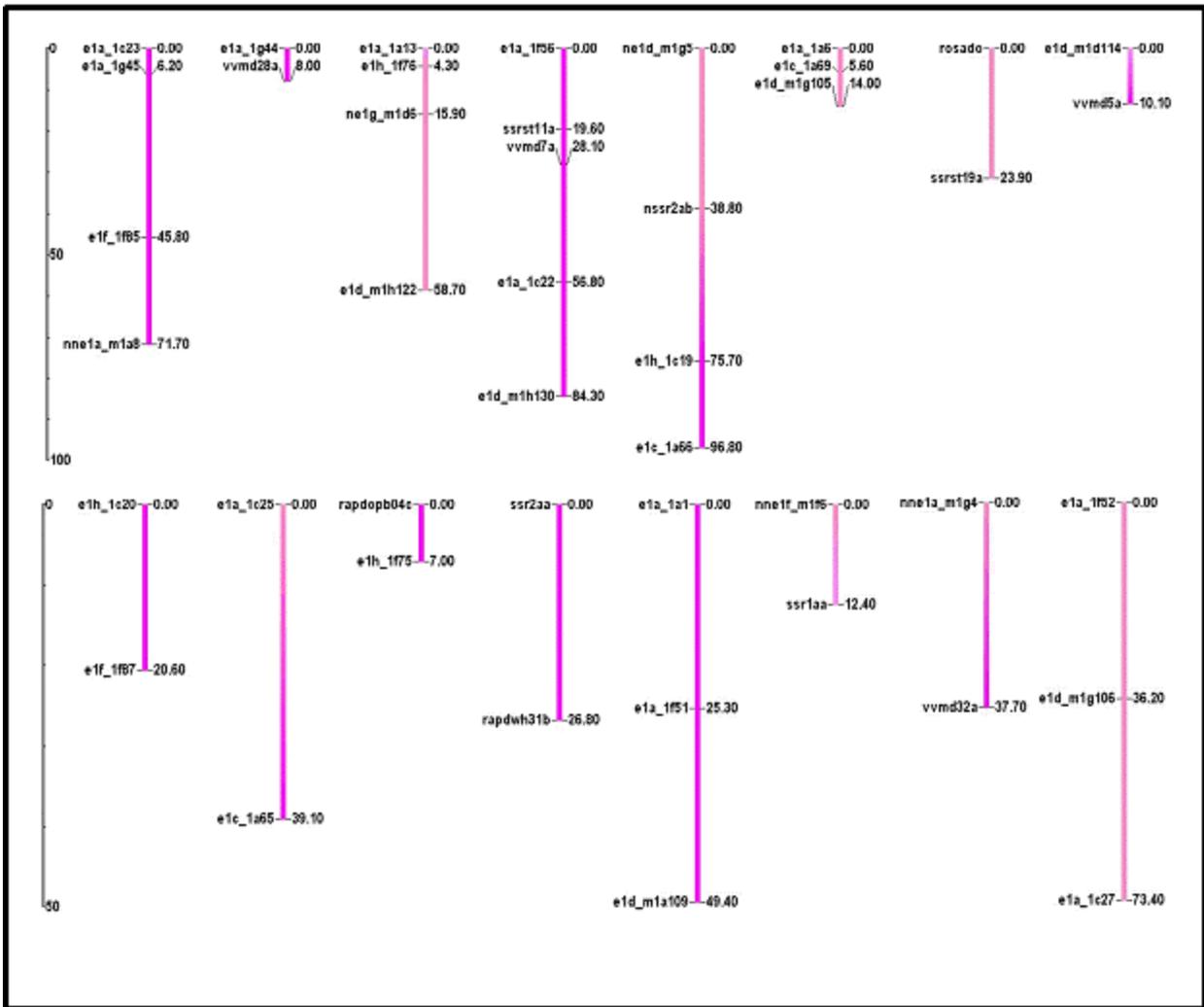


Figura 14.

Grupos de ligamiento para Ruby Seedless. Se muestran los 16 grupos de ligamiento obtenidos al incluir los marcadores que presentaron una “desviación significativa” respecto al valor esperado, según la prueba de χ^2 . A los marcadores que presentaron una desviación mayor a 3,8 pero inferior a 5, se les agregó una “n” delante del nombre; y a aquellos marcadores cuya desviación fue entre 5 y 16, se les agregó “nn” como prefijo. La distancia cubierta fue de 524,9 cM, con 44 marcadores ligados y un promedio de 11,9 cM entre *loci*.

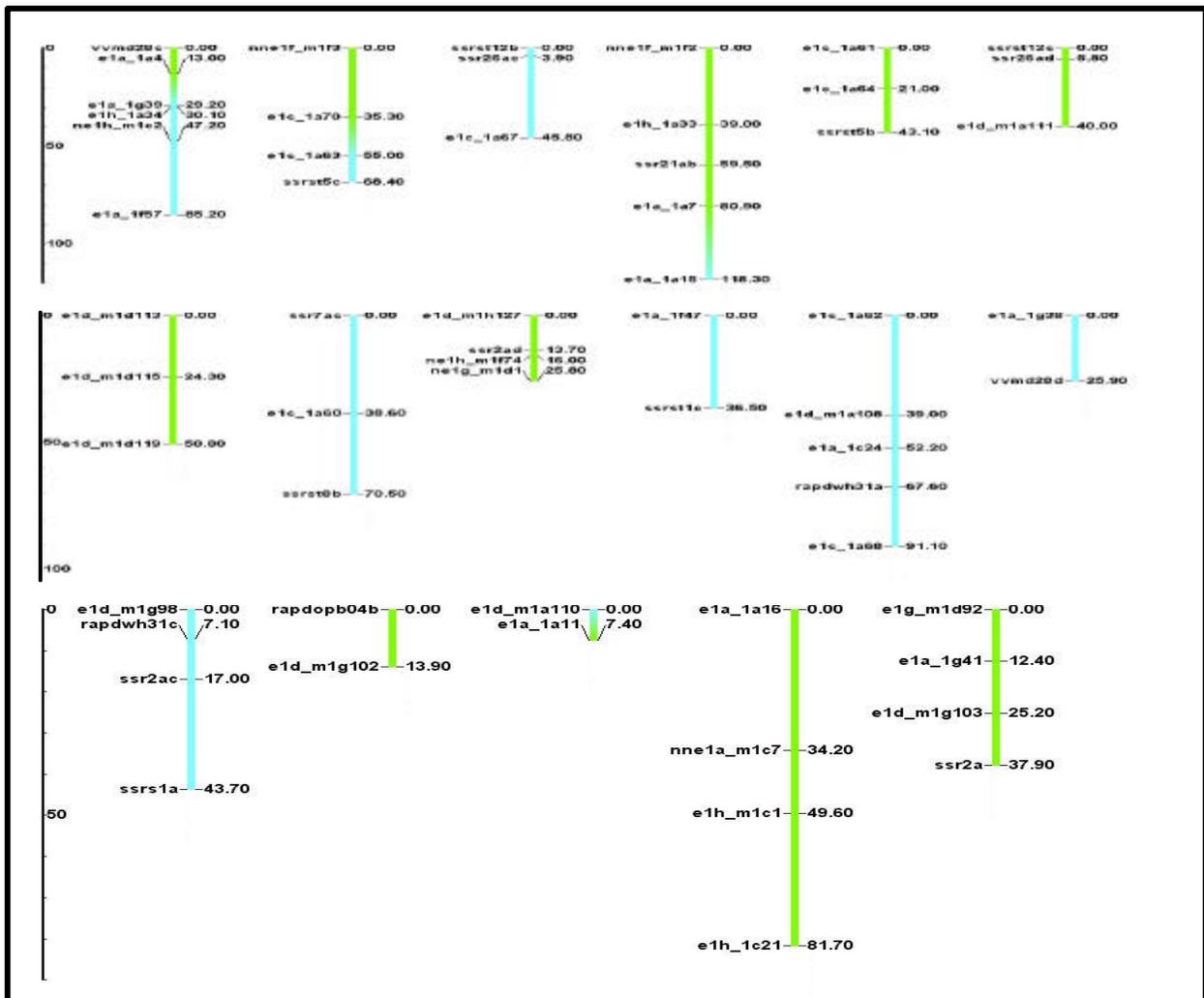


Figura 15.

Grupos de ligamiento obtenidos para Thompson Seedless. Se encontraron 17 grupos de ligamiento al incluir los marcadores que presentaron una “desviación significativa” respecto al valor esperado, según el análisis de χ^2 . A los marcadores que presentaron una desviación mayor a 3.8 pero inferior a 5, se les agregó una “n” delante del nombre; y a aquellos marcadores cuya desviación fue entre 5 y 16 se les agregó “nn” como prefijo. La distancia cubierta fue de 940,4 cM, con 59 marcadores ligados y un promedio de 15,4 cM, entre *loci*.

Tabla N°9:

Comparación de los mapas de ligamiento genético de ‘Ruby Seedless’ x ‘Thompson Seedless’,
construidos con menor estrictez de acuerdo al criterio de ajuste a χ^2 .

Parámetro	Total	‘Ruby Seedless’	‘Thompson Seedless’
Distancia total cubierta (cM)	-	524,9	940,4
N°total de marcadores mapeados	146	68	78
Distancia promedio entre marcadores (cM)	13,6	11,9	15,4
N° Total de marcadores asignados	103	44	59
N° de grupos de ligamiento	33	16	17
N° de marcadores no ligados	43	24	19
Grupo de ligamiento mas grande	-	96,8	118,3
N° de marcadores en el grupo mas grande	-	4	5

5. DISCUSION

En esta tesis, se desarrolló un mapa de ligamiento genético para *Vitis vinifera* L. basado en marcadores moleculares SSR, RAPD y AFLP, que segregaron 1:1 en una población formada por 127 segregantes del cruzamiento Ruby Seedless x Thompson Seedless. Este cruzamiento fue elegido por el alto número de plantas ya establecidas en campo, además de las características contrastantes entre sus progenitores, siendo Ruby un cv. que transmite sabor moscatel y que no requiere de ácido giberélico para el crecimiento de las bayas.

En una primera etapa se caracterizaron siete partidores nuevos de SSR desarrollados para el género *Vitis*, para los cuales se obtuvieron las mejores condiciones de amplificación. Además, se determinó el tamaño de los alelos obtenidos para tres cultivares, Riesling, Cabernet Sauvignon y Sultanina, más otra especie de *Vitis*, denominada *Vitis riparia*. El tamaño de los amplicones obtenidos fluctuó entre 115 y 238 bp. Como usualmente sucede en el desarrollo de marcadores de SSR, un porcentaje cercano a la mitad de ellos resultó no polimórfico, o con patrones de difícil interpretación. Estos marcadores son parte de un grupo de más de 300 SSR que han sido desarrollados por un consorcio de laboratorios, el *Vitis Microsatellite Consortium* o VMC, del cual INIA es un integrante.

El uso de cinco partidores de SSR, para los cuales los patrones alélicos de los respectivos progenitores eran diferentes entre si, permitió identificar los segregantes auténticos del cruzamiento, es decir, los que no fueron producto de autopolinización de Ruby Seedless. La característica de codominancia de los marcadores SSR fue fundamental para cumplir este propósito. Esto es de importancia puesto que los individuos que se originan de autopolinización de la madre no son verdaderos segregantes y pueden llegar a producir serias distorsiones en el

mapa de ligamiento obtenido. Cabe destacar que en este cruzamiento se detectó un porcentaje elevado de plantas de autopolinización, cercana al 17%.

En los casos en que sólo se utilizan marcadores dominantes (como AFLP y RAPD) para preparar un mapa de ligamiento, un buen método para identificar los segregantes auténticos de un cruzamiento es realizar un análisis de agrupamiento (*'clustering'*), como lo demuestran Hackett *et al.* (2000) en un mapa de ligamiento realizado para té. Aunque éste no es exactamente el caso, pues se usaron marcadores de SSR (codominantes), se realizó un análisis de agrupamiento, el cual mostró sólo un grupo por cada progenitor, descartando la posibilidad de que existan mezclas de progenitores diferentes a Ruby o Thompson en el cruzamiento.

Otro resultado que confirma la correcta identificación de los segregantes (como auténticos descendientes de Ruby x Thompson), es que cuando los datos de polimorfismos fueron sometidos a la prueba de χ^2 , presentaron un bajo porcentaje de “desviación significativa” respecto al valor esperado (1:1 ó 3:1), o, en otras palabras, que un alto porcentaje de los marcadores, aproximadamente un 78%, segregó efectivamente en una razón 1:1 cuando estaban presentes en sólo uno de los progenitores, al tiempo que fueron efectivamente 3:1 cuando se encontraban en ambos.

Aunque se tenía considerado analizar cerca de 200 SSR en la población completa, sólo se analizaron 64 partidores de SSR en los progenitores del cruzamiento, y solamente 20 en la población completa, ya que se obtuvo información preliminar sobre un mapa preparado en base a marcadores de SSR usando una población de cepas de vinificación (C. Sauvignon x Riesling). Considerando este antecedente, se seleccionó un mínimo de dos marcadores por grupo de ligamiento, ubicados en los extremos de cada cromosoma identificado por Riaz y Meredith

(2000), obteniéndose 57 alelos totales, de los cuales 47 se usaron en el análisis, considerando para ello a cada alelo como un marcador dominante.

La mayoría de los marcadores utilizados presentó un patrón de segregación esperado. Sin embargo, inesperadamente se encontró una proporción no despreciable de segregantes que mostraban alelos que no eran “coincidentes” con ninguno de los progenitores. Aunque es sabido que estas secuencias (microsatélites dinucleotídicos) tienen una frecuencia de mutación más alta que otras regiones no repetitivas del genoma, la frecuencia de aparición de estas formas alélicas “no esperadas” fue mayor que lo que ha sido descrito en otras especies, específicamente, en humanos, con frecuencias de mutación alrededor de tres órdenes de magnitud menor (Xu *et al.*, 2000; Ellegren, 2000). Estas anomalías detectadas en los segregantes de vid estudiados pueden deberse a distintas razones; por una parte, puede tratarse de una mala ‘calidad’ del ADN, es decir, presencia de impurezas, principalmente del tipo azúcares simples u oligosacáridos complejos propios de las estructuras de las plantas, los que se sabe interfieren con la actividad de la enzima Taq polimerasa. Sin embargo, esto es poco probable, ya que afectaría a todas las reacciones de PCR de una muestra determinada, y lo que se ha observado es que las muestras con alelos anómalos varían para los distintos marcadores estudiados. Una segunda alternativa también corresponde a un problema en la metodología, y es la existencia de fallas en la técnica de electroforesis, como por ejemplo obtener una migración defectuosa de las bandas o una desviación de los tamaños observados por diferente concentración de sal en las muestras, lo que puede ser un factor de distorsión especialmente para marcadores con alelos de tamaños muy cercanos, o que presentan el fenómeno de ‘*stuttering*’ o escalerillas muy pronunciado.

Finalmente, si estas diferencias alélicas son reales, podrían explicarse por mutaciones, las que pueden ser de 2 tipos:

- mutaciones en el proceso de multiplicación celular (replicación del ADN); o
- mutación en el cruzamiento propiamente tal, es decir, en el proceso meiótico, durante la combinación gamética.

Dado que la hipótesis más sólida o respaldada que explica las variaciones de tamaño de estas secuencias de microsatélites se refiere a la falta de fidelidad de la ADN polimerasa (replicación del ADN), la primera alternativa parece la más razonable para explicar estas alteraciones alélicas. No obstante, considerando la muy alta frecuencia de “alteraciones alélicas”, es probable que en esta especie (y otras plantas) las mutaciones tengan un rol también importante en la extrema variabilidad de estas regiones hipervariables.

Es importante destacar que todos los partidores analizados en la población completa, fueron capaces de amplificar segmentos específicos, aún cuando existieron muestras que no generaron producto de PCR con algunos partidores. Se han descrito algunos alelos nulos (Thomas *et al.*, 1994), es decir, el *locus* no existe en el genoma o aunque existe, éste no se puede amplificar porque el sitio de unión al partidor está mutado.

En algunos casos los productos de PCR que incluyen secuencias de SSR's originan un patrón doble o como una escalera de bandas, esto ocurriría porque la ADN polimerasa agrega dATP en los extremos del producto de PCR, generando hebras del mismo segmento de ADN con movilidad electroforética diferente. También se ha propuesto que estas escaleras se formarían porque la polimerasa no es capaz de reproducir exactamente el número de repeticiones en cada evento replicativo (alta tasa de mutación), lo que además explicaría la alta variabilidad de los microsatélites y otras secuencias repetidas (mecanismo de ADN *slippage*) (Narváez, 1998). Hancock (1999), por su parte, señala que el fenómeno de “*slippage*” podría ocurrir por que la

hebra nascente de ADN puede disociarse del ADN templado y al rehibridarse ambas hebras, por el alto número de secuencias repetidas, existe una alta probabilidad de que el realineamiento ocurra en una zona errada, produciendo amplificadas de mayor o menor tamaño que el ADN templado. Esto se debe considerar pues implicaría un cierto grado de incerteza en la definición de los alelos.

Aunque los SSR son marcadores codominantes, es decir, poseen la capacidad de revelar la heterocigocidad de un genotipo, y además sirven para generar un mapa homólogo entre los mapas de los progenitores, generan poca información por reacción. Por eso se optó por utilizar AFLP, para poder saturar rápidamente el mapa de ligamiento complementando los datos de SSR. AFLP genera gran cantidad de bandas en cada reacción, las que son analizadas en geles de poliacrilamida de alta resolución, y posee un mayor índice de polimorfismo, lo que lo hace muy informativo. Además, no requiere información específica del genoma y cubre una amplia región de éste debido al uso de partidores de diseño aleatorio. Para AFLP se analizaron, en la población completa, 16 combinaciones de partidores +3/+3 y se obtuvieron 133 bandas polimórficas, con un promedio de 9,5 bandas por gel. También se estudiaron otras combinaciones de partidores, (+2/+3, +1/+1, +1/+3 y +2/+2), pero no se consiguieron los resultados deseados, probablemente debido al tamaño del genoma de la vid, $4,75 \times 10^8$ bp/C (Lodhi y Reisch, 1995), que es considerado un genoma grande, (aunque si se le compara con otras especies leñosas es de tamaño medio). Por esto, es necesario utilizar partidores con mayor cantidad de nucleótidos selectivos.

Inicialmente, se obtuvieron 2 mapas de ligamiento, uno para cada progenitor, que incluyeron para Ruby Seedless 53 marcadores (incluidos los marcadores obtenidos por SSR, AFLP, RAPD y un marcador morfológico para el color de las bayas), cubriendo una distancia de 474,6 cM, en 14 grupos de ligamiento. Para Thompson Seedless, se identificaron 15 grupos de

ligamiento, cubriendo una distancia de 742,8 cM, con 69 marcadores localizados. Como se esperaba identificar 19 grupos de ligamiento (coincidente con el número de cromosomas haploides de la vid) se decidió, en una segunda instancia, incluir aquellos marcadores que según la prueba de χ^2 presentaron una distorsión en la segregación mayor a 3,84. Así, se aumentaron las distancias cubiertas a 524,9 cM para Ruby y a 940,4 cM para Sultanina. El número de grupos de ligamiento aumentó a 16 en Ruby S., con 68 marcadores incluidos en el análisis (44 de ellos ligados), mientras que para Thompson se llegó a 17 grupos de ligamiento, en base a 59 marcadores ligados de un total de 79 marcadores incluidos en el análisis. Al comparar los 2 mapas de Ruby Seedless, y los 2 mapas de Sultanina entre si, los mapas obtenidos en segunda instancia presentaron un mayor número de grupos de ligamiento y se encuentran más saturados, (ver tablas 8 y 9), es por esto que son más recomendables para la identificación de grupos de ligamiento homólogos entre los mapas genéticos de los progenitores, ya que si bien son menos restrictivos en cuanto a condiciones de segregación, presentan un mayor número de *loci* y más cantidad de grupos de ligamiento, por lo que la probabilidad de que algunos de los marcadores localizados se encuentre ligado con un marcador SCAR asociado a apirenia, recientemente identificado por Nilo Mejia en INIA La Platina, es aún mayor.

El análisis subsiguiente se basará en estos últimos mapas obtenidos.

El mapa obtenido para Thompson Seedless abarcó una distancia 415,5 cM mayor que el de Ruby Seedless. Esta diferencia fue mayor a la reportada por Lodhi *et al.* (1995) para los mapas de los cultivares ‘Cayuga White’ y ‘Aurora’, realizados con 214 y 225 marcadores, respectivamente, cuya diferencia fue de 281 cM (1196 cM y 1477 cM, respectivamente); y a las reportadas por Dalbó *et al.* (2000b) para los cultivares ‘Horizon’ (1199 cM) e ‘Illinois 547-1’ (1470 cM), con 153 y 179 marcadores, respectivamente, cuya diferencia fue de 271 cM. Es curioso constatar que

en los 3 casos el ‘padre’ presentó una distancia total más grande que la ‘madre’; esto contrasta con otros reportes, en los cuales se ha observado lo contrario (Hackett *et al.*, 2000). Esta diferencia se puede deber a que el número de marcadores encontrados para Thompson fue mayor que para Ruby Seedless; lo mismo ocurrió en el caso de los mapas entre ‘Horizon’ e ‘Ill. 574-1’ (Dalbó *et al.*, 2000b) y entre ‘Cayuga White’ y ‘Aurora’ (Lodhi *et al.*, 1995).

La distancia promedio entre los marcadores mapeados fue en promedio de 12,5 cM para Ruby Seedless y 14,8 cM para Sultanina. Estos valores son mayores a los reportados por Dalbó *et al.* (2000b), que fue de un promedio 7,81 cM y a los reportados por Lodhi *et al.* (1995), que fue de 6,1 cM en promedio.

Las diferencias descritas en cuanto a distancias cubiertas y distancias promedio entre *loci*, se deberían a que el número de *loci* totales, incluidos SSR, AFLP y RAPD, fue menor que los casos citados. Se esperaría que al aumentar el número de marcadores analizados, disminuya la distancia promedio entre ellos y se pueda identificar los 19 grupos de ligamiento. Sería también conveniente la identificación de un mayor número de marcadores que segreguen 3:1 para identificar los grupos de ligamiento homólogos entre los cultivares seleccionados para el análisis.

Para algunos grupos de ligamiento de Sultanina se encontraron regiones centrales con una mayor densidad de marcadores. Estas zonas podrían corresponder a regiones centroméricas, de acuerdo a lo descrito en tomate (Tanksley *et al.*, 1992). Sin embargo, estas regiones de mayor densidad de marcadores también podrían ser zonas teloméricas, especialmente en un mapa como el presentado aquí, cuya densidad es aun baja y puede haber dos cromosomas representados en un mismo grupo de ligamiento. También se observaron agrupamientos en los extremos de algunos grupos, tanto de Ruby Seedless como de Thompson Seedless. Estas regiones con mayor densidad

de marcadores, corresponderían a regiones teloméricas, como fue encontrado en *Drosophila* (Lefevre, 1970).

El tamaño del genoma de la vid es aproximadamente $4,75 \times 10^8$ bp / C (Lodhi y Reich, 1995). Se asume teóricamente que la distancia física en el genoma es directamente proporcional a la distancia calculada por recombinación (lo que inusualmente no se cumple). Así, en la vid 1,0 cM sería aproximadamente equivalente a 300 kb, distancia menor a lo que se ha calculado en otra especie como tomate (1 cM sería equivalente a 750 kbp) (Tanksley *et al.*, 1992). Por lo tanto, de acuerdo a la teoría, deberíamos esperar que el mapa de *Vitis vinifera* comprenda una distancia de 1580 cM. Dado que los resultados muestran haber cubierto una distancia de 524 y 940 cM, se considera que los mapas no están lo suficientemente saturados, aunque la distancia cubierta por éstos, es cercana a la publicada por Callahan *et al.* (2002) para los mapas de *Vitis rupestris* ($2n=38$) y *Muscadinia rotundifolia* ($2n=40$), con 806 y 902 cM, respectivamente.

Desafortunadamente, el número de partidores de SSR utilizados en este análisis fue menor al propuesto originalmente, con lo que el porcentaje de marcadores SSR que fueron incluidos en el análisis de mapeo fue de sólo un 12% para Ruby Seedless (con respecto al total de marcadores identificados en este trabajo), y para Thompson Seedless fue aproximadamente un 11%. Esto es importante de destacar, ya que SSR es un marcador que permite comparar estos mapas con otros mapas de ligamiento.

Es importante mencionar que se están elaborando diferentes proyectos de mapeo. En Francia, Doliguez *et al.* (2000) están abordando el estudio de la apirenia mediante la construcción de los mapas genéticos de dos genotipos parcialmente apirenos: '2223-27' (Alfonso Lavallée x Sultanina) y '2121-30' (Dattier Beyrouth x 75 Pirovano), empleando mayoritariamente AFLP y microsatélites, aunque también isoenzimas y un SCAR asociado a la apirenia (Lahogue *et al.*,

1998). Otro grupo de investigación está generando los mapas de dos variedades de vid, una semillada que es 'Dominga' y otra apirena, 'Autum Seedless', mediante el estudio de segregación de marcadores dominantes de alta eficacia (AFLP y SAMPL) y microsatélites (Cabezas *et al.*, 2001).

La información proporcionada por este mapa será usada en el programa de mejoramiento de uva de mesa de INIA La Platina, con énfasis a la identificación de marcadores SCARs estrechamente relacionados a apirenia. La identificación y utilización de estos marcadores asociados a caracteres de interés agronómico permitirá, en la mejora de uva de mesa, la evaluación precoz y la selección de individuos de la progenie que sean portadores del carácter deseado. Por otro lado, las regiones del genoma donde se localizan los *loci* responsables de dichos caracteres y los marcadores asociados a los mismos, constituyen el punto de partida para iniciar el clonamiento posicional de genes que controlan estos marcadores, mediante saturación de la región que contiene el gen con marcadores flanqueantes.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alleweldt, G. (1988). The genetic resources of *Vitis*. Report. Federal Research Centre for Grape Breeding, Geilweilerhof, Alemania.
- Barticevic, M., Valenzuela, J. y Muñoz, C. (1998). Uva de mesa. Mejoramiento genético en Chile. *Tierra Adentro*, **21**: 12-14.
- Beckmann, J.S. & Soller, M. (1990). Toward a unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. *Bio/Technology*, **8**: 930-932.
- Bouquet, A. & Danglot, Y. (1996). Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, **35**: 35-42.
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R. & Meredith, C.P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat *loci* in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, **39**: 628-633.
- Bowers, J.E., Dangl, G.S. y Meredith, C.P. (1999) Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**: 243-246.
- Buck, S. & Zyprian, E. (2000). First approaches of molecular mapping in a model population derived from the crossing of the grapevine varieties 'Regent' x 'Lemberger'. *Acta Horticultura*, **528**: 203-207.
- Cabezas, J.A., Cervera, M.T., Cenís, J.L. y Zapater, J.M. (2001). Construcción de un mapa genético de AFLPs y microsatélites en *Vitis vinifera*. *IV Reunión de Biología Molecular de Plantas*, Toledo, España.
- Callahan, M., Jin, Y., Gao, F. & Walker, A. (2002). A genetic map of *Vitis rupestris* x *Muscadinia rotundifolia* locating resistance to *Xiphinema index*, the dagger nematode. *Plant, Animal and Microbial Genomes Conference X*, San Diego. USA.

- Dalbó M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. & Reisch, B.I. (1997). QTL analysis of powdery mildew resistance in grapes. *Plant and Animal Genome Conference V*, San Diego. USA.
- Dalbó M.A., Weeden, N.F. & Reisch, B.I. (2000a). QTL analysis of disease resistance in interspecific hybrid grapes. *Acta Horticultura*, **528**: 215-219.
- Dalbó M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Steinkellner H. & Reisch, B.I. (2000b). A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome*; **43**: 333-340.
- Dettweiler, E. & Eibach, R. (1996). The international *Vitis* database. <http://www.dainet.de/genres/vitis/vitis.htm>
- Doliguez, A., Adam-Blondon, A.F., Ballaquest, J.F., Bouquet, A., Roux, C. & This, P. (2000). Construction of a *Vitis vinifera* linkage map for detection of QTLs of several bunch quality traits. *Plant and Animal Genome Conference VIII*, San Diego, USA.
- Donini, P., Elias, M.L., Bougourd, S.M. & Koebner, R.M.D. (1997). AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome*, **40**: 521-526.
- Ellegren, H. (2000). Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequence. *Nature Genetics*, **24**: 400-402.
- Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN. Brasil.
- Geordiady, M., Descenzo, R., Cain, D. W. & Irelan, N. (2001). Linkage mapping and QTL mapping in grape. *Plant and Animal Genome Conference IX*, San Diego, USA.
- Grando, M.S., Bellin, D., Madini, A., Stefanini, M., Pozzi, C. & Velasco, R. (2000). Construction of an AFLP and SSR genetic map of *Vitis* from an interspecific hybrid population. *Plant and Animal Genome Conference VIII*, San Diego, USA.

- Grattapaglia, D. & Sederoff R. (1994). Genetics linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, **137**: 1121-1137.
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. y Gelbart, W.M. (1995). Ligamiento I: Fundamentos de cartografía cromosómica en eucariotas. En: Introducción al análisis genético. Interamericana Mc Graw – Hill. 5^{ta} edición. Madrid. España.
- Hackett, C.A., Wachira, F.N., Paul, S., Powell, W. & Waugh, R. (2000). Construction of a genetic linkage map for *Camellia sinensis* (tea). *Heredity*, **85**: 346-355.
- Hancock, J.M. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanism. In: Microsatellites, Evolution and Applications. Edited by David B. and Christian Schlotterer. Oxford, University press. Great Clarendon Street, Oxford OX2 6DP. U.K.
- Hearne, C.M., Ghosh, S. & Todd, J.A. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.*, **8**: 288-294.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, **314**: 67-73.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H. & Andersson, L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.*, **21**: 1111-1115.
- Lahogue, F., This, P. & Bouquet, A. (1998). Identification of a codominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.*, **97**: 950-959.
- Ledbetter, C.A. & Ramming, D.W. (1989). Seedlessness in grapes. *Hort. Rev.*, **11**: 159-184.
- Lefevre, G. (1970). Salivary chromosome band and the frequency of crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **67**: 497-513.

- Lincoln, S., Daly, M. & Lander, E. (1992). Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report. 3rd ed.
- Lodhi M.A., Reisch B.I., Bruce I., & Weeden N.F. (1994a). Genetic linkage maps of *Vitis* and QTL detection by interval mapping. *Plant Genome Conference II*, San Diego, USA.
- Lodhi, M.A., Ye, G.-N., Weeden, N.F. & Reisch, B.I. (1994b). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molec. Biol. Rep.*, **12**: 6-13.
- Lodhi, M.A. & Reisch, B.I. (1995). Nuclear DNA content of *Vitis* species, cultivars, and other genera of the *Vitaceae*. *Theor. Appl. Genet.*, **90**: 11-16.
- Lodhi, M.A., Daly, M.J., Ye, G.-N., Weeden, N.F. & Reisch, B.I. (1995a). A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome*, **38**: 786-794.
- Lodhi, M.A., Moreno S., Weeden, N.F., Bruce, I. & Reisch, B.I. (1995b). Detection of Quantitative Trait *Loci* controlling important traits and characterization of RAPD markers in *Vitis*. *Plant Genome Conference III*, San Diego, USA.
- Lund, A.H., Dunch, M. & Pedersen, F.S. (1996). Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res.*, **24**: 800-801.
- Manly, K.F. & Elliot, R.W. (1991). MapManager, a microcomputer program for analysis of data from recombinant inbred strains. *Mamm. Genome*, **1**: 123-126.
- Mattheou, A., Stavropoulos, N. & Samaras, S. (1995). Studies on table germoplasm grown in Northern Greece. II. Seedlessness, berry and must characteristics. *Vitis*, **34**: 217-220.
- Mazur, B.J. & Tingey, S.V. (1995). Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. *Curr. Opinion Biotech.*, **6**: 175-182.
- Mehlenbacher, S.A. (1995). Classical and molecular approaches breeding fruit and nut crops for disease resistance. *HortScience*, **30**: 466-477.

- Morgante, M. & Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, **3**: 175-182.
- Narvaez, C. (1998). Uso de marcadores moleculares para identificación de variedades de vid. Tesis de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago. Chile.
- Ohmi, C., Wakana, A. & Shiraishi, S.-J. (1993). Study of the parentage of grape cultivars by genetic interpretation of GP-2 and PGM-2 isozymes. *Euphytica*, **65**: 195-202.
- Parfitt, D.E. & Arulsekhar, S. (1989). Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **114**: 486-491.
- Rafalski, A. (1994). Choosing technologies for DNA profiling of plants. En: Robertson Symposium, Canberra. Morell, M. and Gibbs, A., Eds. pp. 1-12.
- Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1993). Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.*, **9**: 275-279.
- Regner, F., Steinkellner, H., Turetschek, E., Stadlhuber, A. & Glössl, J. (1996). Genetic characterization of vine cultivars (*Vitis vinifera*) by microsatellite analysis. *Mitt. Klosterneuburg*, **46**: 52-60.
- Riaz, S. & Meredith, C. (2000). A microsatellite marker based linkage map of *Vitis vinifera*. *Plant and Animal Genome Conference VIII*, San Diego, USA.
- Sagredo B., Hinrichsen, P., López, H., Cubillos, A. & Muñoz, C. (1998). Genetic variation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) cultivated in Chile determined by RAPDs. *Euphytica*, **101**: 193-198.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. 2^{da} Ed.

- Sefc, K.M., Regner, F., Turetschek, E., Glössl, J. & Steinkellner, H. (1999) Identification of microsatellite sequence in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*, **42**: 367-373.
- Sensi, E., Vignani, R., Rohde, W. & Biricolti, S. (1996). Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis*, **35**: 182-188.
- Staub, J.E., Serquen, F.C. & Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, **31**: 729-741
- Taksley, S.D., Ganal, M.W., Prince, J.P., deVicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Miller, L., Paterson, A.H., Pineda, O., Röder, M.S., Wing, R.A., Wu, W. & Young, N.D. (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes: biological inferences and practical applications. *Genetics*, **132**: 1141-1160.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 6463-6471.
- Taylor, G.R., Haward, S., Noble, J.S. & Murday, V. (1992). Isolation and sequencing of CA/GT repeat microsatellites from chromosomal libraries without subcloning. *Anal. Biochem.*, **200**: 125-129.
- Thomas, M.R. & Scott, N.S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, **86**: 985-990.
- Thomas, M.R. & Scott, N.S. (1994). Sequence-tagged site markers for microsatellites: simplified technique for rapidly obtaining flanking sequences. *Plant Molec. Biol. Rep.*, **12**: 58-64.

- Thomas, M.R., Cain, P. & Scott, N.S. (1994). DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Molec. Biol.*, **25**: 939-949.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **23**: 4407-4414.
- Walker, M.A. & Liu, L. (1995). The use of isoenzymes to identify 60 grapevine rootstocks (*Vitis* spp.). *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**: 299-305.
- Waugh, R. & Powell, W. (1992). Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTech.*, **10**: 186-191.
- Weeden, N.F. & Lamb, R.C. (1987). Genetics and linkage analysis of 19 isozyme *loci* in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **112**: 865-872.
- Weeden, N.F., Reisch, B.I. & Martens, M.-H.C. (1988). Genetic analysis of isozyme polymorphism in grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **113**: 765-769.
- Xu, X., Peng, M., Fang, Z. & Xu, X. (2000). The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature genetics*, **24**: 396-399.
- Yuille, M.A.R., Goudie, D.R., Affara, N.A. & Ferguson Smith, M.A. (1991). Rapid determination of sequences flanking microsatellites. *Nucleic Acids Res.*, **19**: 1950.