

Desarrollo de nuevas variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) sin semilla mediante rescate de embriones*

Development of new seedless grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by embryo rescue

Martín Ernesto Tiznado Hernández^{1§}, Alejandro Miranda Jiménez¹, Ángel J. Ojeda Contreras¹, Alberto Sánchez Estrada¹, Héctor J. Arreola Ortiz² y Gerardo Martínez Díaz²

¹Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a La Victoria km 0.6. C.P 83000. Hermosillo, Sonora México. (alejandro@excelsusinc.com; ajoc@ciad.mx; aestrada@ciad.mx). ²Campo Experimental Costa de Hermosillo-INIFAP. Carretera a Bahía de Kino km 12.6 Colonia la Manga. C. P. 83000. Hermosillo, Sonora México. (tubutamachivas8@hotmail.com; germadz@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: tiznado@ciad.mx.

Resumen

Uno de los objetivos principales de un programa de mejoramiento genético de uva es el desarrollo de variedades sin semilla. Sin embargo, para lograr esto se requiere combinar la técnica de rescate de embriones con la genética tradicional. El objetivo de este trabajo fue desarrollar híbridos de cruza con las siguientes variedades de uva sin semilla: Perlette, Black Seedless, Crimson Seedless, Crispy, Flame, Superior, Princesa, Red Globe, Fiesta, Fresno y Thompson, utilizadas como padre y como madre. El experimento se realizó en el campo agrícola experimental Costa de Hermosillo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias en el año 2009. Se realizaron 23 hibridaciones mediante la polinización de las flores manualmente dos veces al día durante tres días consecutivos. Las bayas fueron cosechadas al inicio del envero y trasladadas al laboratorio donde se esterilizaron superficialmente antes del aislamiento de los rudimentos seminales. Los rudimentos fueron transferidos a un medio de cultivo donde permanecieron entre 75 y 90 días y los embriones rescatados de los rudimentos transferidos a medio para incubación de embriones. Se cosecharon en total 3 163 bayas de las cuales se aislaron 3836 rudimentos seminales. En 8.76% de los rudimentos, fue posible

Abstract

One of the main objectives of a grape breeding program is the development of seedless varieties. However, to achieve this it is necessary to combine the embryo rescue technique with classical genetics. The aim of this work was to develop hybrids from crosses with the following varieties of seedless grape: Perlette, Black Seedless, Crimson Seedless, Crispy, Flame, Superior, Princesa, Red Globe, Fiesta, Fresno and Thompson, used as father and mother. The experiment was conducted at the experimental field Costa of Hermosillo from the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock in 2009. 23 hybridizations were performed by pollinating flowers manually twice a day for three consecutive days. The berries were harvested at the beginning of veraison and taken to the laboratory where the surface was sterilized before isolating the seminal rudiment. The seminal rudiments were transferred to a culture medium where they were kept between 75 to 90 days; the rescued embryos from the seminal rudiments were transferred to an incubation medium for embryos. 3 163 berries were harvested from which 3 836 seminal rudiments were isolated. In 8.76% of rudiments, was possible to rescue embryos. From the rescued embryos, 32.14% developed seedlings, from which two were able to

* Recibido: enero de 2015
Aceptado: mayo de 2015

rescatar embriones. De los embriones rescatados, 32.14% desarrollaron plántulas de las cuales fue posible transferir dos al invernadero. Se concluye que la utilización de la genética tradicional con apoyo del protocolo de rescate de embriones del presente trabajo permite la obtención de progenie de hibridaciones con diferentes variedades de uva sin semilla.

Palabras clave: hibridaciones, rescate de embriones, uva, variedades sin semilla.

Introducción

La producción de uva de mesa sin semilla en el estado de Sonora tiene gran importancia social y económica debido tanto a los jornales que genera como a los ingresos provenientes de la exportación. De acuerdo a esto, en 2008 fueron exportadas 16 178 877 cajas solo a los Estados Unidos de América (<http://www.aalpum.com.mx>). El mercado Norteamericano cada día es más exigente y diverso, lo cual demanda la disponibilidad de una amplia gama de variedades que satisfagan al mercado en precio y calidad.

Considerando que la exportación de uva de mesa en Sonora, se realiza en base a cuatro variedades principalmente, a saber: Perlette, Flame, Sugraone y Red Globe, una de las estrategias que pueden permitir aumentar la capacidad competitiva por parte de los productores es incrementar el número de variedades de uva de mesa. La creación de variedades a partir de un programa de mejoramiento genético propio, evitaría la necesidad de pagar derechos por el uso de variedades para la comercialización y haría posible patentar nuevas variedades. Un programa de mejoramiento genético en uva de mesa, requiere el apoyo de la técnica de rescate de embriones debido a que uno de sus objetivos principales debe ser el desarrollo de variedades de uva sin semilla. Asimismo, este programa permitiría la creación de variedades con características agronómicas óptimas para las regiones productoras de uva en el estado de Sonora y para satisfacer las demandas del mercado de exportación.

La técnica de rescate de embriones es necesaria para obtener progenie de hibridaciones con variedades de uva sin semilla ya que el embrión es incapaz de desarrollarse completamente debido a diversas mutaciones. Debido a esto, es necesario rescatarlo e inducir su desarrollo hasta lograr la planta completa mediante métodos de laboratorio *in vitro*. A las diversas técnicas de laboratorio que se utilizan para inducir

be transferred to a greenhouse. It is concluded that the use of classical genetics along with embryo rescue technique allows obtaining progeny of hybrids with different varieties of seedless grapes.

Keywords: embryo rescue, grape, hybridizations, seedless varieties.

Introduction

The production of seedless table grapes in the state of Sonora has great social and economic importance due to the wage this activity generates and revenues from exports. Accordingly, in 2008, were exported 16 178 877 boxes to the United States of America (<http://www.aalpum.com.mx>). The North American market is becoming more demanding and diverse, requiring the availability of a wide range of varieties that meets market price and quality.

Considering that export of table grapes in Sonora is performed based on four varieties, mainly: Perlette, Flame, Sugraone and Red Globe; a strategy that can allow increasing competitiveness by producers is to count with a higher number of varieties of table grapes. The creation of varieties from a breeding program itself would avoid the need to pay royalties for the use of these for marketing, making possible to patent new varieties. A breeding program in table grapes requires the use of embryo rescue technique because one of its main objectives should be to develop seedless varieties. Also, this program would allow to create varieties with optimal agronomic characteristics for grape growing regions in the state of Sonora and to meet the demands of the export market.

The embryo rescue technique is necessary to obtain progeny from hybrids with varieties of seedless grape, since the embryo is unable to fully develop due to various mutations. Because of this, it is necessary to rescue and induce its development to complete plant, using *in vitro* methods. The different laboratory techniques used to induce the development of an embryo isolated from an ovary in development is known as embryo rescue (Sharma *et al.*, 1996; Ramming *et al.*, 2000). *In vitro* embryogenesis enables the establishment of the process under aseptic and controlled conditions at any time of the year, which allows obtaining complete seedlings (Hernández and González, 2010).

el desarrollo de un embrión aislado del ovario en desarrollo se le conoce como rescate de embriones (Sharma *et al.*, 1996; Ramming *et al.*, 2000). La embriogénesis *in vitro* posibilita el establecimiento de dicho proceso en condiciones asépticas y controladas en cualquier época del año, permitiendo obtener plántulas completas (Hernández y González, 2010).

Sin embargo, para el establecimiento exitoso, se hace necesario prevenir y controlar la contaminación microbiana y oxidación fenólica, ya que es uno de los problemas más graves durante la micropropagación de frutales (Baydar, 2006; Azofeifa, 2009; Hernández y González 2010).

Debido a que *Vitis vinifera* es ampliamente cultivada en diversas regiones, se han realizado estudios en diversas partes del mundo para mejorar las variedades ya existentes y generar nuevas variedades apoyándose en el rescate de embriones en combinación con la embriogénesis somática (Salunke y Mharte, 1997; Gray, 1989; Emershad y Ramming, 1994; Morgana *et al.*, 2004; Nicole Hewstone *et al.*, 2007; Yancheva y Roichev, 2007; Gambino *et al.*, 2007; Labrada *et al.*, 2008). En la técnica de rescate de embriones se evalúa la eficiencia en base al número de plántulas obtenidas a partir del número de embriones inmaduros aislados (Tsolova, 1990).

Esta eficiencia puede alterarse como resultado del tiempo de espera después de anthesis (García *et al.*, 2000); reguladores de crecimiento (Agüero *et al.*, 2000; Nookaraju *et al.*, 2007); variedad de uva utilizada (Hewstone *et al.*, 2006); intensidad y tipo de poda (Dalal *et al.*, 1992; Ponce *et al.*, 2009); genotipo, época de cosecha y tamaño del embrión (Ramming y Emershad, 1990; Pommer *et al.*, 1995) así como el medio de cultivo utilizado y tiempo de cultivo *in vitro* (Valdez, 2005). Con base en lo anterior mencionado, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la eficiencia de la técnica de rescate de embriones en individuos fl provenientes de hibridaciones realizadas mediante técnicas de genética tradicional utilizando diferentes variedades de uva sin semilla.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron las variedades Perlette, Black Seedless, Crimson Seedless, Crispy, Flame, Superior, Princesa, Red Globe, Fiesta, Fresno y Thompson, como donador de polen o como receptor.

However, for successful establishment, it is necessary to prevent and control microbial contamination and phenolic oxidation, as it is one of the most serious problems during micropropagation of fruit (Baydar, 2006; Azofeifa, 2009; Hernández and González, 2010).

Due to *Vitis vinifera* is widely grown in various regions, studies have been conducted in different parts of the world to improve existing varieties and generate new varieties relying on embryo rescue in combination with somatic embryogenesis (Salunke and Mharte, 1997; Gray, 1989; Emershad and Ramming, 1994; Morgan *et al.*, 2004; Hewstone Nicole *et al.*, 2007; Yancheva and Roichev, 2007; Gambino *et al.*, 2007; Labrada *et al.*, 2008). In the embryo rescue technique, efficiency is evaluated based on the number of seedlings obtained from the number of immature embryos isolated (Tsolova, 1990).

This efficiency can be altered as a result of time out after anthesis (García *et al.*, 2000); growth regulators (Agüero *et al.*, 2000; Nookaraju *et al.*, 2007); grape variety used (Hewstone *et al.*, 2006); intensity and type of pruning (Dalal *et al.*, 1992; Ponce *et al.*, 2009); genotype, harvest time and embryo size (Ramming and Emershad, 1990; Pommer *et al.*, 1995) thus culture medium and time of *in vitro* culture (Valdez, 2005). Based on the above, the present study aims to evaluate the efficiency of embryo rescue technique in fl individuals from hybridizations performed through classical genetic techniques using different varieties of seedless grapes.

Materials and methods

Plant material

Perlette, Black Seedless, Crimson Seedless, Crispy, Flame, Superior, Princesa, Red Globe, Fiesta, Fresno and Thompson varieties were used as pollen donor or as receiver.

Hybridizations

23 hybridizations were made using the varieties mentioned in the previous section as father or mother, for which five inflorescences of each plant between 3 to 8 years old were taken and emasculated before anthesis: to accomplish this, each variety was observed till showing in its bunch one to five open flowers.

Hibridaciones

Se realizaron 23 hibridaciones utilizando las variedades mencionadas en la sección anterior como padre o madre, para lo cual se tomaron 5 inflorescencias de cada planta de entre 3 a 8 años de edad y se emascularon justo antes de la antesis. Para poder realizar esto, se observó cada variedad hasta que en sus racimos mostraran de uno a cinco flores abiertas.

La emasculación consistió en remover las anteras del brote de la flor para prevenir su autofecundación. Se realizó la polinización de las flores manualmente con el polen de las plantas de interés dos veces al día durante tres días consecutivos. Una vez realizada la polinización las flores fueron cubiertas con una bolsa de papel para evitar una posible contaminación por polen proveniente de las plantas cercanas. Cada bolsa se etiquetó con la crucea realizada y la fecha de polinización. Al cuarto día, la bolsa de papel fue removida para permitir el desarrollo normal del fruto.

Cosecha de las bayas

Las bayas se cosecharon entre 30 y 45 días después de la polinización, antes del envero, estado de desarrollo que se identificó mediante la observación visual del inicio del cambio de color en la epidermis de la baya.

Los racimos cosechados fueron empacados en bolsas de plástico, etiquetados y colocados en hielo para ser trasladados al laboratorio donde se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Aislamiento de los rudimentos seminales

Bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, las bayas fueron sanitizadas superficialmente con alcohol al 70% durante 5 min y después en una solución de hipoclorito de sodio (1.5%) durante 15 min. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril para eliminar los residuos de cloro. Una vez que se realizó la esterilización superficial de las bayas, estas se diseccionaron para la extracción de los rudimentos seminales, bajo un microscopio estereoscópico. Se realizaron cortes transversales a cada baya de manera superficial para no dañar el rudimento. Una vez realizado el corte, se abrió cuidadosamente cada baya para localizar y extraer los rudimentos seminales colocándolos sobre una caja Petri estéril para después limpiarlos de residuos de tejido proveniente del pericarpio.

Emasculación consistió en removing the anthers of flower bud to prevent selfing. Pollination of flowers was made manually with pollen from plants of interest twice a day for three consecutive days; once pollination was made, flowers were covered with a paper bag to avoid possible contamination with pollen from other plants. Each bag was labeled with crosses made and date of pollination. On the fourth day, the paper bag was removed to allow normal fruit development.

Harvest of berries

The berries were harvested between 30 and 45 days after pollination, before veraison, stage of development that was identified by visual observation of the onset of color change in the skin of the berry.

The harvested bunches were packed in plastic bags, labeled and placed on ice for transportation to the laboratory and stored at 4 °C until analysis.

Isolation of seminal rudiments

Under aseptic conditions in a laminar flow hood, the berries were sanitized superficially with 70% alcohol for 5 min and then in a sodium hypochlorite solution (1.5%) for 15 min. Subsequently, three washes with sterile distilled water were performed to remove residual chlorine. After surface sterilization, these were dissected to extract the seminal rudiments under a stereomicroscope. Superficial transverse cuts were made to each berry to avoid damaging the rudiment. Once the cut was made, each berry was opened carefully to locate and extract the seminal rudiments, placing them on a sterile Petri dish and then clean residues of tissue from the pericarp.

Incubation of seminal rudiments in culture medium

The seminal rudiments were sown in sterile petri dishes with a culture medium containing macronutrients from Nitsch medium (Nitsch and Nitsch, 1969) and the micronutrients and vitamins from MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 20 g L⁻¹ sucrose, 0.34 mg L⁻¹ of gibberellic acid (GA3), 0.1 g L⁻¹ of myo-inositol and 0.1 mg L⁻¹ of biotin. In each plate 10 seminal rudiments were sown, which were incubated in a growth chamber with controlled temperature of 25 °C and photoperiod of 16 h light and 8 h of darkness during a period between 75 and 90 days.

Incubación de rudimentos seminales en medio de cultivo

Los rudimentos seminales fueron sembrados en cajas de Petri estériles con un medio de cultivo conteniendo los macronutrientes del medio Nitsch (Nitsch and Nitsch, 1969) y los micronutrientes y vitaminas del medio MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado con 20 g·L⁻¹ de sacarosa, 0.34 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA3), 0.1 g L⁻¹ de mio-inositol y 0.1 mg L⁻¹ de biotina. En cada placa se sembraron 10 rudimentos seminales, los cuales fueron incubados en una cámara de crecimiento con temperatura controlada de 25 °C y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad durante un período comprendido entre 75 y 90 días.

Aislamiento del embrión y desarrollo de la vitroplanta

Posteriormente al periodo de incubación, los rudimentos seminales fueron extraídos del medio de cultivo y se diseccionaron utilizando un microscopio estereoscópico para extraer el embrión. El embrión extraído fue incubado en tubos de 15 cm de largo y 2 cm de diámetro con un medio de cultivo incluyendo los macronutrientes del medio MS, descrito a continuación:

12 g·L⁻¹ de Ca (NO₃)₂·4H₂O, 3.2 g·L⁻¹ de KNO₃, 3.2 g·L⁻¹ de KCl, 7.2 g·L⁻¹ de NH₄NO₃, 4 g·L⁻¹ de Na₂SO₄, 15 g·L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 0.38 g·L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O y los micronutrientes del medio MS: 600 mg·L⁻¹ de MnSO₄·H₂O, 100 mg·L⁻¹ de H₃BO₃, 100 mg·L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O, 5 mg·L⁻¹ de CoCl₂·6H₂O, 5 mg·L⁻¹ de CuSO₄·5H₂O y 5 mg·L⁻¹ de Na₂MoO₄·2H₂O. El medio descrito fue suplementado con 30 g·L⁻¹ de sacarosa, 0.035 mg·L⁻¹ de ácido giberélico, 0.1 mg·L⁻¹ de la solución de citrato de hierro, 50 mg·L⁻¹ de caseína hidrolizada, 50 mg·L⁻¹ de mio-inositol, 3 g·L⁻¹ de carbón activado y 5 ml·L⁻¹ de una solución de vitaminas que contiene, la siguiente composición: 50 mg·L⁻¹ de tiamina, 5 mg·L⁻¹ de piridoxina, 5 mg·L⁻¹ de pantetonato de calcio y 600 mg·L⁻¹ de glicina.

Después de la siembra de los embriones, estos se incubaron en una cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones antes mencionadas para los rudimentos seminales. Cada tubo fue etiquetado con los datos de las variedades utilizadas en la hibridación y la fecha de inicio de la incubación. Los embriones fueron incubados aproximadamente de 8 a 12 semanas, hasta el desarrollo de hojas, raíces y tallo.

Isolation of embryo and development of in vitro plant

Following the incubation period, the seminal rudiments were extracted from the culture medium and dissected using a stereomicroscope to remove the embryo. The removed embryo was incubated in tubes of 15 cm long and 2 cm in diameter with a medium culture including macronutrients from MS medium, described below:

12 g·L⁻¹ Ca (NO₃)₂ · 4H₂O, 3.2 g·L⁻¹ of KNO₃, 3.2 g·L⁻¹ of KCl, 7.2 g·L⁻¹ NH₄NO₃, 4 g·L⁻¹ of Na₂SO₄, 15 g·L⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O, 0.38 g·L⁻¹ NaH₂PO₄ · H₂O and micronutrients from MS medium: 600 mg L⁻¹ of MnSO₄ · H₂O, 100 mg L⁻¹ of H₃BO₃, 100 mg·L⁻¹ of ZnSO₄ · 7H₂O, 5 mg·L⁻¹ of CoCl₂ · 6H₂O, 5 mg L⁻¹ of CuSO₄ · 5H₂O and 5 mg L⁻¹ of Na₂MoO₄ · 2H₂O. The medium described was supplemented with 30 g·L⁻¹ of sucrose, 0.035 mg L⁻¹ gibberellic acid, 0.1 mg L⁻¹ of iron citrate solution, 50 mg·L⁻¹ casein hydrolyzate, 50 mg·L⁻¹ myo-inositol, 3 g·L⁻¹ of activated carbon and 5 ml·L⁻¹ of a vitamins solution containing the following composition: 50·L⁻¹ mg of thiamine, 5 mg L⁻¹ pyridoxine, 5 mg L⁻¹ calcium pantothenate and 600 mg L⁻¹-glycine.

After sowing of embryos, these were incubated in a growth chamber under the same conditions stated above for seminal rudiment. Each tube was labeled with the data of the varieties used in hybridization and the date of incubation. The embryos were incubated approximately 8 to 12 weeks, until the development of leaves, roots and stem.

Transferring in vitro seedlings to substrate

Plants showing root development, including 5 to 6 true leaves were removed carefully using rubber gloves sterilized with 70% alcohol. Then washed with distilled water to remove the culture medium and transferred to plastic pots containing a sterilized mixture of perlite and peat moss (1: 1). The pots were covered with polyethylene bags to control water loss and placed in a chamber with controlled relative humidity and a photoperiod of 16: 8 light-dark at 26 °C for 10 days.

At the end of these period perforations were made in the bags to allow exchange of moisture with the atmosphere in order to induce slow acclimatization of the plants. After a period of approximately two weeks, the bags are completely removed to induce plant acclimation to the environment.

Transferencia de las vitroplántulas a sustrato

Las plantas mostrando el desarrollo de la raíz e incluyendo de 5 a 6 hojas verdaderas, fueron removidas cuidadosamente utilizando guantes de látex esterilizados con alcohol al 70%. Posteriormente se lavaron con agua destilada para eliminar el medio de cultivo y se transfirieron a macetas de plástico incluyendo perlita y una mezcla de turba musgo (1:1) esterilizada. Las macetas se cubrieron con bolsas de polietileno para controlar la pérdida de agua y se colocaron en una cámara con control de humedad relativa y un fotoperiodo de 16:8 luz oscuridad a una temperatura de 26 °C durante 10 días.

Al término de ese tiempo, se realizaron perforaciones en las bolsas para permitir el intercambio de humedad con el ambiente con el fin de inducir la aclimatación lenta de las plantas. Después de un período de aproximadamente dos semanas, las bolsas se removieron completamente para inducir la aclimatación de la planta al medio ambiente. Una vez que las plantas se adaptaron al crecimiento en la cámara, fueron transportadas a un sombreadero para permitir la adaptación de la planta al ambiente externo.

Resultados y discusión

En el Cuadro 1, se muestran los resultados de los 23 cruzamientos realizados entre las 11 variedades de uva de mesa evaluadas. Como se puede observar, se obtuvieron un total de 3 163 bayas cosechadas. De estas bayas, se lograron recuperar 3 836 rudimentos seminales, los cuales fueron sembrados en el medio de cultivo e incubados de acuerdo a lo descrito en líneas anteriores. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, 336 embriones que representa 8.76% de los rudimentos sembrados, fueron rescatados y sembrados en su medio de cultivo. De todos los embriones rescatados, 108 germinaron para convertirse en plántulas, lo que constituye 2.82% de los rudimentos sembrados y 32.14% de los embriones rescatados.

El porcentaje de recuperación de rudimentos, embriones y plantas obtenido en el presente trabajo es menor al reportado en otros trabajos, ya que se han reportado porcentajes de recuperación de rudimentos, embriones y plantas de 92, 48 y 21.1% respectivamente (Hewstone *et al.*, 2006). Es importante destacar que los autores(as) mencionan haber obtenido 32 801 bayas de las distintas cruas realizadas entre siete variedades utilizadas como madres y sus cruzamientos recíprocos durante

Once the plants were adapted to growth in the chamber, were transported to a shade to allow the plant to adapt to external environment.

Results and discussion

Table 1, show the results of the 23 crosses made between 11 table grape varieties. As can be seen, a total of 3,163 harvested berries were obtained. From these berries, 3,836 seminal rudiments were recovered, which were sown in the culture medium and incubated according to what is described in earlier lines. After incubation time, 336 embryos representing 8.76% of seeded rudiments were rescued and planted in their culture medium. From the rescued embryos, 108 germinated to become seedlings, which constitute 2.82% of seeded rudiments and 32.14% of recued embryos.

The percentage of recovery of rudiments, embryos and plants obtained in this study is lower than that reported in other studies as have been reported 92, 48 and 21.1% of recoveries of rudiments, embryos and plants respectively (Hewstone *et al.*, 2006). Importantly, the authors mentioned having obtained 32 801 berries from the different crosses made between seven varieties used as mother and their reciprocal crosses during 5 seasons and in this work were obtained 3 163 berries from crosses made in one season. Besides the above, during this work were able to transfer two plants to shades, since most of in vitro plants did not stand the transfer to substrate in pots.

During incubation of seminal rudiments was observed that some turned green and large while others turned brown with rough texture. It was not possible to relate these characteristics with parents as they were observed in almost all groups of rudiments. Gray (1992) reported that the brown in seminal rudiment is due to tannins production by tissue injury which spreads in the medium around each rudiment.

Added to this, it has been reported that phenolic compounds, product of plant tissue metabolism, affecting its spread during its cultivation *in vitro*, inducing browning and necrosis of tissues (Marks and Simpson 1990; Sharma *et al.*, 1992). Hernandez and Gonzalez (2010), report that this phenomenon occurs by the action of polyphenol oxidase and tyrosinase, which are induced

5 temporadas, y en este trabajo solo se obtuvieron 3 163 bayas de los cruzamientos realizados en una sola temporada. Además de lo anterior, en este trabajo solo se logró transferir dos plantas al sombreadero ya que la mayoría de las vitro plantas no soportaron el traslado al sustrato en maceta.

when tissues are injured. These enzymes exert their action on polyphenols and tyrosine, oxidizing them to quinones which are phytotoxic substances that can interact with proteins inhibiting the growth and viability of the explants.

Cuadro 1. Número de bayas cosechadas, rudimentos obtenidos, embriones aislados y plántulas desarrolladas en las diferentes hibridaciones realizadas entre las variedades sin semilla de uva de mesa.

Table 1. Number of harvested berries, obtained rudiments, isolated embryos and seedlings grown in different hybridizations performed between seedless table grapes.

Cruza (padre x madre)	Núm. de cruza	Núm. total de bayas	Núm. total de rudimentos	Núm. total de embriones	Núm. total de Plántulas
P x BS	1	573	673	58	8
CS x P	2	36	34	0	0
CS x S	3	20	29	0	0
C x P	4	37	20	4	2
P x F	5	480	761	101	29
P x S	6	298	402	50	7
Pr x S	7	20	27	0	0
Pr x P	8	71	69	1	1
F x RG	9	176	230	0	0
F x S	11	96	106	3	1
S x BS	12	6	8	3	0
S x F	13	29	28	2	1
S x P	14	115	236	35	23
Fa x P	15	30	44	2	2
F x P	16	349	380	37	30
F x BS	17	280	285	15	2
S x F	18	35	45	3	1
Fr x S	20	30	2	0	0
CS x F	21	78	68	0	0
T x P	22	213	211	21	0
T x S	23	191	178	17	0
Total		3 163	3 836	352	107

P= Perlette; BS= Black Seedless; CS= Crimson Seedless; C= Crispy; F= Flame; S= Superior; Pr= Princesa, RG= Red Globe; Fr= Fresno; Fa= Fiesta; T= Thompson.

Durante la incubación de los rudimentos seminales, se observó que algunos se tornaban verdes y grandes mientras que otros se tornaban de color café con textura rugosa. No fue posible relacionar estas características con los progenitores ya que se observaron en casi todos los grupos de rudimentos. Gray (1992), reportó que el color café en los rudimentos seminales se debe a la producción de taninos por heridas en los tejidos el cual se dispersa en el medio alrededor de cada rudimento.

Aunado a esto, Se ha reportado que compuestos fenólicos, producto del metabolismo de los tejidos vegetales afectan su propagación durante su cultivo *in vitro* induciendo

Moreover, Gray (1992) reported that the accumulation of tannins, phenols and other toxic substances in the medium, induce abortion of the embryo during the incubation of seminal rudiment. Due to this, when the oxidative stress cannot be avoided, different strategies described below are suggested: use of another culture medium, growth regulators change, use of low pH, changing the osmotic potential of the culture medium and use of explants in juvenile stage or material actively growing (Azofeifa, 2009). The latter author states that it is generally necessary to use more than one medium to prevent these problems.

oscurecimiento y necrosis de los tejidos (Marks y Simpson 1990; Sharma *et al.*, 1992). En este sentido, Hernández y González (2010), reportan que este fenómeno ocurre por la acción de las enzimas polifenoloxidasas y tirosinasas, que se inducen cuando los tejidos sufren heridas. Estas enzimas ejercen su acción sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son sustancias fitotóxicas que pueden interactuar con las proteínas inhibiendo el crecimiento y la viabilidad de los explantes.

Además, Gray (1992), publicó que la acumulación de taninos, fenoles u otras sustancias tóxicas en el medio, inducen al aborto del embrión durante la incubación del rudimento seminal. Debido a esto, cuando el estrés oxidativo no se puede evitar, se sugieren diferentes estrategias, descritas a continuación: utilización de otro medio de cultivo, cambiar los reguladores de crecimiento, utilización de pH bajo, cambio del potencial osmótico del medio de cultivo y utilización de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo (Azofeifa, 2009). Este último autor afirma que generalmente es necesario utilizar más de un medio de cultivo para evitar los problemas mencionados.

En la Figura 1, se muestran las etapas para la obtención de una planta completa adaptada al exterior a partir de un rudimento seminal. En Figura 1a, se muestra la incubación de los rudimentos seminales en el medio de cultivo descrito. Es importante comentar, que en ocasiones ocurre el desarrollo de colores verde o café en el rudimento. En la Figura 1b, se aprecia un embrión dentro de un rudimento seminal seccionado, después de nueve semanas de incubación. En la Figura 1c, es posible observar *in vitro* plantas completamente desarrolladas que pueden ser trasladadas al sustrato. En la misma figura, se observan la etiqueta correspondiente donde se detalla el tipo de hibridación realizada, la fecha de siembra del rudimento seminal y la fecha de siembra del embrión. En la Figura 1d, se muestran dos plantas creciendo en sustrato producto de la hibridación de Perlette con Flame con aproximadamente 12 semanas de desarrollo.

En (a), se muestran los rudimentos seminales, en (b) detalle de un embrión de uva en un rudimento, en (c) las vitroplantas completamente desarrolladas y en (d) plantas completamente adaptadas al exterior creciendo en sustrato en la cámara.

De acuerdo al Cuadro 1, la comparación del número de rudimentos seminales obtenidos en base al número de bayas cosechadas muestra que la cruce de Perlette (como

Figure 1, shows the steps to obtain a complete plant adapted to external conditions from a seminal rudiment. Figure 1a shows the incubation of seminal rudiment in the culture medium described. It is important to note that sometimes the development of green or brown colors occur in the rudiment. In Figure 1b can be appreciated an embryo within a sectioned seminal rudiment after nine weeks of incubation. In Figure 1c, it is possible to observe *in vitro* plants fully developed that can be transferred to substrate. In the same figure, can be seen the corresponding label where the type of hybridization performed is detailed, planting date of seminal rudiment and planting date of embryo. Figure 1d shows two plants growing in the substrate, product of the hybridization of Perlette with Flame with approximately 12 weeks of development.

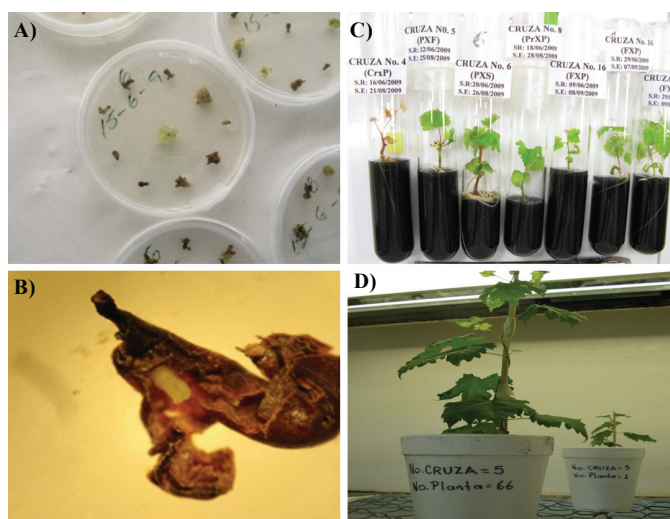


Figura 1. Imágenes de las diferentes etapas experimentales necesarias para el desarrollo de una planta completa a partir de un rudimento seminal.

Figure 1. Images of the different experimental stages required for the development of a complete plant from a seminal rudiment.

(a) shows the seminal rudiments; (b) detail of a grape embryo in a rudiment; (c) fully developed *in vitro* plants; and (d) plants fully adapted to outdoor conditions growing in substrate in the chamber.

According to Table 1, comparing the number of seminal rudiments obtained regarding number of harvested berries shows that crosses from Perlette (as mother) with Flame (as father) obtained the largest number of seminal rudiments. On the other hand, Perlette was the variety that showed the greatest amount of seminal rudiments per harvested berries regardless of being used as mother and father. However, the amount of rudiments obtained was different depending on

madre) con Flame (como padre) obtuvo el mayor número de rudimentos seminales. Por otro lado, Perlette fue la variedad que mostró mayor cantidad de rudimentos seminales por bayas cosechadas independientemente de ser utilizada tanto como madre y como padre. Sin embargo, la cantidad de rudimentos obtenida fue diferente dependiendo de las variedades utilizadas en la hibridación. De acuerdo a esto, con las variedades Black Seedless, Flame, y Superior, Perlette mostró mayor producción de rudimentos cuando fue utilizada como madre. En contraste, cuando fue utilizada como padre con las variedades Superior y Flame, el porcentaje de producción de rudimentos fue menor. Por otro lado, la variedad Flame mostró un comportamiento similar a la variedad Perlette. Resultados similares al presente trabajo fueron reportados por Hewstone *et al.* (2006) utilizando las variedades Black Seedless y Superior.

Estos investigadores compararon los resultados de embriones rescatados de hibridaciones realizadas durante cinco temporadas consecutivas en las que se observa claramente que existen mayores variaciones debido a las variedades utilizadas como madre con respecto a los efectos debidos a la variedad utilizada como material polinizante. También al comparar entre los resultados considerando las variedades utilizadas como padre, se encontró menor variación en cuanto al número de embriones rescatados por semilla y el número de plántulas obtenidas

De acuerdo a estos resultados, Ponce *et al.* (2000) reportan que el cultivar usado como madre, es el factor más importante que determina el éxito de la técnica. Además de este hecho, señalan los autores, que es importante conocer la mejor fecha de cosecha de cada cultivar debido a que el momento en que se da el aborto de la semilla varía de un cultivar a otro debido a la interacción genotipo y ambiente. Asimismo, mencionan que se obtienen diferencias significativas entre los porcentajes de plantas obtenidas *in vitro* usando el mismo cultivar es polinizado con diferente padre, lo cual es un aspecto importante a considerar durante las cruas. Se sugiere que este comportamiento se debe a incompatibilidad genética o al control de la expresión de la apirenia por el polinizador. Debido a lo anterior, Ponce *et al.* (2000) recomiendan utilizar solamente aquellos cultivares que como madre muestren rendimientos mayores al 5% en las plantas obtenidas, así como también como polinizadores aquellos cultivares cuyos porcentajes estén por debajo de este valor.

Estos resultados indican que es importante no sólo considerar las características de los padres que se quieren incorporar en los descendientes, sino que también es importante elegir las

the varieties used in the hybridization. Accordingly, with the varieties Black Seedless, Flame, Superior and Perlette showed an increased production of rudiments when it was used as mother. In contrast, when it was used as a father with Superior and Flame, the production rate of rudiments was lower. Moreover, Flame showed a similar behavior to Perlette. Similar results to the present study were reported by Hewstone *et al.* (2006) using Black Seedless and Superior.

These researchers compared the results from rescued embryos of hybridizations performed during five consecutive seasons in which it is clear that there are major variations due to the varieties used as mother regarding to the effects due to the variety used as pollinating material. Also the comparison between the results considering the varieties used as a parent, less variation was found regarding the number of rescued embryos by seed and seedlings number obtained.

According to these results, Ponce *et al.* (2000) report that the cultivar used as mother is the most important factor that determines the success of the technique. Besides this fact, the authors note, that it is important to know the best harvest date of each cultivar due to the moment in which seed abortion occurs varies from one cultivar to another because genotype and environment interaction. Also mention that significant differences were obtained between the percentages of plants obtained *in vitro* when the same cultivar is pollinated with different father, which is an important consideration during the crossings. It is suggested that this behavior is due to genetic incompatibility or control of the expression of apireny by the pollinator. Because of this, Ponce *et al.* (2000) recommend using only those cultivars that as mothers show higher yields than 5% in obtained plants, as well as pollinators, those cultivars whose percentages are below this value.

These results indicate that it is important not only to consider the characteristics of parents that want to incorporate in the offspring, it is also important to choose varieties that will be used as mother to obtain good performance in rescued embryo, and therefore greater amount of progeny to be evaluated in field.

Valdez (2005) found that there is a higher germination when embryos are extracted from seminal rudiments and inoculated directly into the culture medium as was made in this work, where it was able to obtain a percentage of 8.76 of rudiments. For hybridizations where Perlette was used as mother and father, 209 and 100 embryos were obtained

variedades que serán usadas como madre para obtener un buen rendimiento en el rescate de embriones, y por lo tanto, mayor cantidad de progenie para ser evaluados en el campo de cultivo.

Valdez (2005) encontró que existe una mayor germinación cuando los embriones son extraídos de los rudimentos seminales e inoculados directamente en el medio de cultivo como se realizó en este trabajo, donde se logró obtener un porcentaje de 8.76 de rudimentos obtenidos. En el caso de hibridaciones donde Perlette fue utilizada como madre y padre, se obtuvieron 209 y 100 embriones en total, respectivamente. Por otro lado, las hibridaciones recíprocas de Flame con Perlette fueron las que lograron mayor número de embriones rescatados por rudimentos disponibles, esto es 37 y 101 embriones cuando Flame fue utilizada como madre y padre, respectivamente. Por otro lado, en las hibridaciones de Crimson seedless como madre con Superior como padre; Princesa como madre y Superior como padre; Crimson seedless como madre con Perlette como padre; Flame como madre con Red Globe como padre; Fresno como madre con Superior como padre y Crimson Seedless como madre con Flame como padre no se logró la obtención de un solo embrión.

En cuanto al número de plántulas obtenidas a partir de los embriones extraídos, se observó de nuevo que las variedades Perlette y Flame son las que muestran los mejores resultados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, destaca la variedad Perlette como la más productiva entre las variedades evaluadas. Perlette es una de las variedades más importantes en la producción sonoreense y mexicana. Del número de plántulas totales obtenidas (108 plántulas), 102 involucran a la variedad Perlette y 64 a la variedad Flame. Esto indica que ambas variedades de alta importancia productiva, tienen un gran potencial para ser utilizadas como progenitores en un programa de mejoramiento genético. Resultados similares fueron reportados por Qi Guimei (2002), quien comparó cuatro medios de cultivo distintos para la incubación de rudimentos seminales, encontrando que las hibridaciones entre las variedades Perlette y Flame fueron las más productivas. Por otro lado, el medio a base de macronutrientes del medio Nitsch mostró los mejores resultados, el cual fue utilizado en el presente trabajo. Resultados similares fueron obtenidos por Barticevic *et al.* (2004) en un proyecto que involucró muchas más variedades y análisis en las plántulas generadas.

En la Figura 2, se muestran varias plántulas obtenidas en este trabajo. Se pueden observar algunas diferencias entre las plántulas provenientes de distinta cruce considerando las

respectively. On the other hand, reciprocal hybridizations of Flame with Perlette were those that achieved the largest number of rescued embryos by available rudiments, i.e. 37 and 101 embryos when Flame was used as mother and father, respectively. On the other hand, hybridizations with Crimson seedless as mother and Superior as father; Princess as mother and Superior as father; Crimson seedless as mother and Perlette as father; Flame as mother and Red Globe as father; Fresno as mother and Superior as father and Crimson Seedless as mother with Flame as father did not achieve to obtain a single embryo.

As the number of seedlings obtained from the extracted embryos, it was observed that Perlette and Flame varieties showed the best results.

According to the results, highlights Perlette as the most productive among the varieties tested. Perlette is one of the most important varieties in Sonoran and Mexican production. From the total number of seedlings obtained (108 seedlings), 102 involve Perlette and 64 Flame. This indicates that both varieties are of high productive importance, have great potential for use as parents in breeding program. Similar results were reported by Qi Guimei (2002), who compared four different culture media to incubate seminal rudiments, finding that hybridizations between Perlette and Flame were the most productive. On the other hand, the medium based of macronutrient from Nitsch medium showed the best results, which was used in this study. Similar results were obtained by Barticevic *et al.* (2004) in a project that involved many more varieties and analysis in generated seedlings.

Figure 2, show several seedlings obtained in this work. It can be seen some differences between seedlings from different crosses considering characteristics such as stem color, root size, size and number of leaves. Figure 2a, show a sample of progeny from Flame with Perlette, where seedlings showed strong vigor since the beginning of development and a thin and green stem.

Figure 2b, shows a sample of progeny from hybridization between Princesa and Perlette varieties, which showed low vigor and a thick stem. Figure 2c, shows a sample of progeny from Perlette with Flame, which showed low vigor, large leaves and thick stems with a pale red color. Figure 2d, shows a sample of the progeny from Perlette with Superior, with high vigor, medium stem and branched with a pale red color and long roots.

características de color del tallo, tamaño de raíz, así como, tamaño y número de hojas. En la Figura 2a, se observa una muestra de la progenie proveniente de Flame con Perlette, donde las plántulas mostraron mucho vigor desde el inicio del desarrollo y un tallo delgado y verde.

En la Figura 2b, se observa una muestra de la progenie proveniente de la hibridación entre las variedades Princesa y Perlette, donde se observa bajo vigor y un tallo grueso. En la Figura 2c, se observa una muestra de la progenie proveniente de Perlette con Flame, las cuales muestran bajo vigor, hojas grandes y tallo grueso con un color rojo pálido. En la Figura 2d, se observa una muestra de la progenie de Perlette con Superior, donde se observa alto vigor, tallo mediano y ramificado de color rojo pálido y largas raíces.

Conclusiones

La técnica de rescate de embriones del presente trabajo puede ser utilizada para la obtención de progenies a partir de cruza con progenitores sin semilla utilizando muchas variedades de uva.

Los resultados de esta técnica varían dependiendo del tipo de variedades utilizadas en la hibridación, principalmente de la variedad utilizada como madre.

Literatura citada

- Agüero, C.; Viglioco, A.; Abdala, G. and Tizio, R. 2000. Effect of gibberellic acid and unicastol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. *Plant Growth Regulation*. 30:9-16.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agron. Mesoam*. 20(1):153-175.
- Barticevic, M. R.; Zavala, K. M.; De Felice, S.; Valenzuela, J. B.; Muñoz, S. C. y Hinrichsen, R. P. 2004. Caracterización fenotípica de segregantes identificados con marcadores moleculares de microsátelites, con énfasis en apirenia y respuesta a ácido giberélico en crecimiento de bayas de uva. *Agric. Téc*. 64(1):3-16.
- Baydar, N. 2006. Phenolic composition of grapevine shoot tips collected in different months and their effects on the explant browning. *Biotechnol. Biotechnol. Eq*.
- Dalal, M. A.; Sharma, B. B. and Srinivasa, M. 1992. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in vitro cultures of grapevine. *Scientia Hort*. 51:35-41.
- Emershad, R. L. and Ramming, D. W. 1994. Somatic embryogenesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*. 14:6-12.

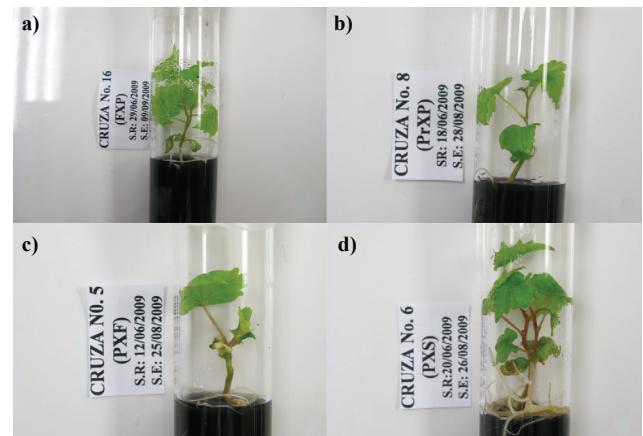


Figura 2. Plántulas de uva en desarrollo a partir de embriones rescatados producto de diversas hibridaciones. P= variedad Perlette; F= Flame; Pr= Princesa; S= Superior; SR= siembra de rudimento; SE= siembra de embrión.

Figure 2. Grape seedlings in development from rescued embryos product of various hybridizations. P= Perlette; F= Flame; Pr= Princesa; S= Superior; SR= seeded rudiment; SE= seeded embryo.

Conclusions

The rescue embryo technique of this work can be used to obtain progeny from crosses with seedless parents using many grape varieties.

The results of this technique vary depending on the varieties used in hybridization, mainly from the variety used as mother.

End of the English version



- García, E.; Martínez, A.; García de la Calera, E. Pérez, L. J.; Cenis, J. L. and Carreño, J. 2000. *In vitro* culture of ovules and embryos of grape for the obtention of new seedless table grape cultivars. *Proc. VII Int'l Symp. On Grapevine Genetics and Breeding*. Acta Hort. 528:663-666.
- Gambino, G.; Ruffa, P.; Vallania, R. and Griabudo, I. 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 90:79-83.
- Gray, D. J. 1998. Effects of dehydration and exogenous growth regulators on dormancy, quiescence and germination of grape somatic embryos. *in vitro Cell Dev Biol*. 25:1173-1178.
- Guimei, Qi. and Hanfeng, D. 2002. Ovules culture and plant formation of hybrid progeny of seedless grape. *Ecofruit - 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing*, Weinsberg- Germany. 226-230 pp.

- Hewstone, N. O.; Valenzuela, J. B. y Muñoz, C. S. 2006. Efecto de la variedad en el desarrollo de embriones *in vitro* de vides estenospermocárpicas. *Agric. Téc.* 66(2):124-132.
- Hewstone, N. O.; Valenzuela, J. B. y Muñoz, C. S. 2007. ISELA-INIA, nueva variedad de uva de mesa. *Agric. Téc.* 67(2):201-204.
- Labrada, C. A.; Medina, C.; Martinelli, L. and Arce, J. P. 2008. Somatic embryogenesis and efficient regeneration of *Vitis vinifera* L. 'Carménère' plants. *Vitis Res. Note.* 47(1):73-74.
- Marks, T. R. y Simpson, S. E. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. *J. Hort. Sci.* 65(2):103-111.
- Morgana, C.; Di Lorenzo, R. y Carimi, F. 2004. Somatic embryogenesis of *Vitis vinifera* L. (cv. Sagraone) from stigma and style culture. *Vitys.* 43(4):169-173.
- Murashige, T. and Skoog, F. C. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Navarro-Ainza, C. J. A. 2008. Evaluación de variedades de uva para mesa en baja California sur. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Todos Santos.
- Nistch, J. P. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science.* 163:85-87
- Nookaraju, A.; Barreto, M. S.; Karibasappa, A. D. C. 2007. Synergistic effect of CPPU and benzyladenine on embryo rescue in six stenospermocarpic cultivars of grapevine. *Vitys* 46(4):188-191.
- Ponce, M. T.; Agüero, C. B.; Gregori, M. T. and Tizio, R. 2000. Factors affecting the development of stenospermic grape (*vitis vinifera*) embryos cultured *in vitro*. *Proc. VII Int'l Symp. On Grapevine Genetics and Breeding.* *Acta Hort.* 52:667-671.
- Ponce, Ma. T.; Agüero, C. y Ocvirk, M. 2009. Efecto de la intensidad de poda en el desarrollo *in vitro* de embriones de vides estenospermocárpicas. *Rev. Fac. Cienc. Agrar.* 51(1):45-53.
- Pommer, C. V.; Ramming, D. W. and Emershad, R. L. 1995. Influence of grape genotype, ripening season, seed trace size and culture date on *in vitro* embryo development and plant formation. *Bragantia, Campinas.* 54(2):237-249.
- Ramming, D. W. and Emershad, R. L. 1990. Embryo culture of early ripening seeded grape (*Vitis vinifera*) genotypes. *HortSci.* 25(3):339-342.
- Ramming, W.; David, E.; Richard, L. y Tarailo, R. 2000. Astenospermocarpic, seedless *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* hybrid developed by embryo rescue. *HortScience.* 35(4):732-734
- Salunke, C. K.; Rao, P. S. and Mharte, M. 1997. Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Reports.* 17:65-67.
- Sharma, D. R.; Kaur, R. y Kumar, K. 1996. Embryo rescue in plants a review. *Euphytica.* 89:325-337.
- Tsolova, V. 1990. Obtaining plants from crosses of seedless grapevine varieties by means of *in vitro* embryo culture. *Vitys.* 29:1-4.
- Valdez, J. G. 2005. Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L.) after and extended period of seed trace culture. *Vitys.* 44(1):17-23.
- Yancheva, S. and Roichev, V. 2007. Embryogenesis in seedless grapes and hybrid combinations of (*Vitis Vinifera* L.). *Biotechnol Biotechnol.*
- Hernández, Y. y González, Ma. E. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perenes. *Cultivos Tropicales.* 31(4):58-69.
- Hernández, Y. y González, Ma. E. 2010. Contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perenes. *Cultivos Tropicales.* 31(4):258-5936.