



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Desarrollo de un sistema para la microinjertación *in vitro* de vid
(*Vitis vinifera* L.)**

Tesis que presenta:

Estefany Alejandra Sánchez Mendoza

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA
DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.**

COTUTORES:

Dr. Eugenio Pérez-Molphe Balch

M. C. Otilio Vázquez Martínez (Centro de Ciencias Agropecuarias)

COMITÉ TUTORAL:

Dr. José Francisco Morales Domínguez

Aguascalientes, Ags. Agosto 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

ESTEFANY ALEJANDRA SÁNCHEZ MENDOZA
MAESTRÍA EN CIENCIAS, ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
PRESENTE.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA LA MICROINJERTACIÓN *In vitro* DE VID (*Vitis vinifera* L.)”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 16 de octubre de 2018

“Se lumen proferre”

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ruíz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JOSE DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente como Tutor designado de la estudiante **ESTEFANY ALEJANDRA SÁNCHEZ MENDOZA** con ID **106011** quien realizó *el trabajo de tesis* titulado: **“DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA LA MICROINJERTACIÓN In vitro DE VID (*Vitis vinifera* L.)”** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 16 de Octubre de 2018.

M. EN C. OTILIO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

COTUTOR DE TESIS

Departamento de Fitotecnia

Centro de Ciencias Agropecuarias

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JOSE DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente como Tutor designado de la estudiante **ESTEFANY ALEJANDRA SÁNCHEZ MENDOZA** con ID **106011** quien realizó el trabajo de tesis titulado: **“DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA LA MICROINJERTACIÓN In Vitro DE VID (*Vitis vinifera* L.)”** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 16 de Octubre de 2018.

DR. EUGENIO PÉREZ MOLPHE BALCH
COTUTOR DE TESIS
Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

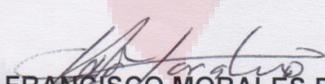
M. en C. JOSE DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente como Tutor designado de la estudiante **ESTEFANY ALEJANDRA SÁNCHEZ MENDOZA** con ID **106011** quien realizó *el trabajo de tesis* titulado: **“DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA LA MICROINJERTACIÓN In Vitro DE VID (*Vitis vinifera* L.)”** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 16 de Octubre de 2018.


DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ
MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL
Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada con el número 462218 para la realización de este proyecto de maestría.

A la **Coordinación de la Maestría en Ciencias, Área Biotecnología Vegetal /Toxicología** por brindarme la oportunidad de realizar mi posgrado.

Al **M. C. Otilio Vázquez Martínez** por su confianza, apoyo y todo el aprendizaje que me ha permitido adquirir académicamente, profesionalmente y laboralmente, por ser mi tutor y más que eso mi guía en este proyecto de tesis, por aportar a mi crecimiento sus experiencias, tiempo, consejos y sabiduría, que han generado en mi esa satisfacción por introducirme y desarrollarme en el maravilloso mundo de los cultivos *in vitro*.

Al **Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch** porque desde aquel primer día de clases en la Licenciatura me ha transmitido el amor por la biotecnología vegetal, representando la base de mi formación, a través de su tutoría y apoyo. Gracias por todas las enseñanzas y conocimientos.

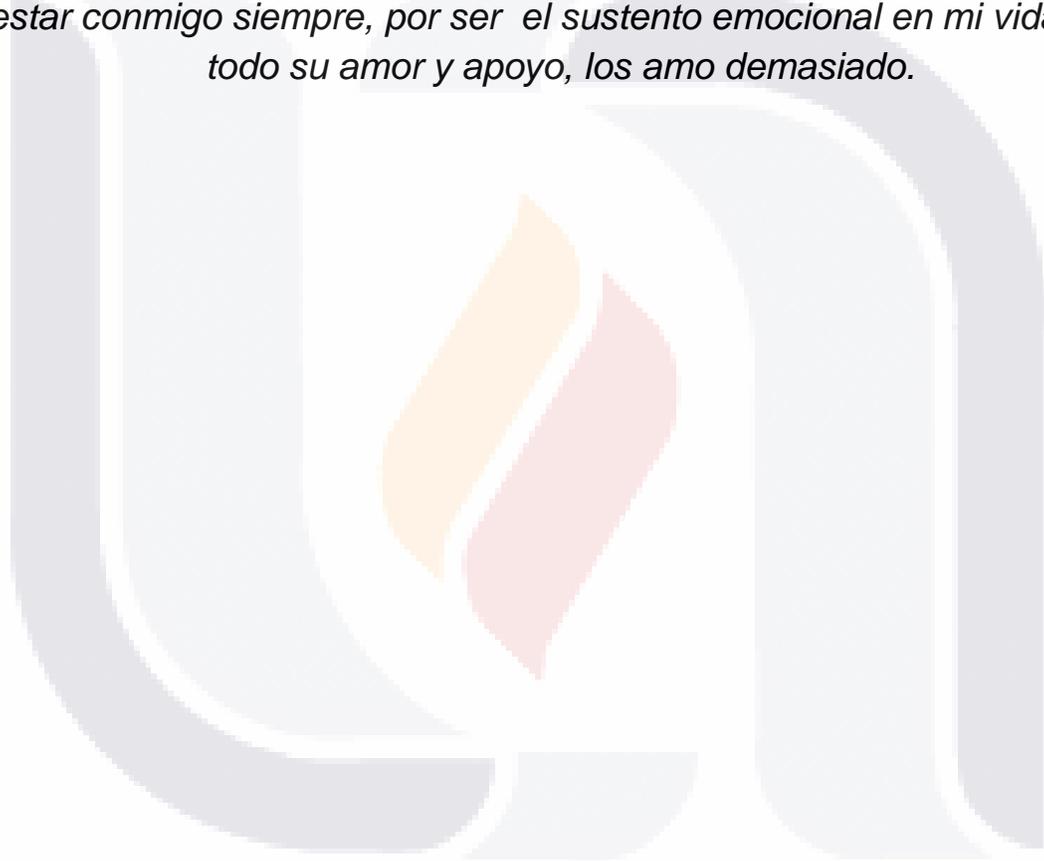
Al **Dr. Francisco Morales Domínguez**, por alentarme en la presentación y divulgación de este trabajo, por su asesoría, correcciones y ayuda en el desarrollo de este proyecto de tesis.

A **mi familia**, especialmente a mi mamá por estar siempre apoyando cada paso que he decidido dar, a mi papá por siempre estar ahí atrás de mí, a mi hermana Tania por motivarme a crecer personalmente y profesionalmente, a Edson por todas las veces que de emergencia recibía tus consejos y ayuda, gracias a todos por todo el tiempo que me brindaron y por ser siempre mi soporte.

A **mis compañeros, amigos, maestros y personal administrativo de la Universidad Autónoma de Aguascalientes**, por aportar desde una palabra hasta una gran acción para la culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis tres grandes amores, Jimena, Mechita y Ramón, gracias por estar conmigo siempre, por ser el sustento emocional en mi vida, por todo su amor y apoyo, los amo demasiado.



INDICE GENERAL

CONTENIDO

INDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Características del cultivo de la vid.	12
2.1.1. Características botánicas de la vid.....	12
2.1.2 Cultivos de vid en México.	13
2.2 Problemas que afectan al cultivo de vid.	14
2.2.1 Filoxera (<i>Dactylosphaera vitifolii</i>).....	15
2.2.2 Nematodos.	16
2.2.3 Hongos.....	18
2.2.4 Sequía.....	19
2.2.5 Virus.	20
2.3 Uso de portainjertos y su importancia.....	22
2.3.1 Especies utilizadas como portainjertos.....	24
2.4 Cultivo y propagación <i>in vitro</i> de plantas.....	26
2.4.1 Importancia de cultivos de tejidos vegetales en la viticultura.....	29
2.5 Microinjerto <i>in vitro</i>	31
2.6 Antecedentes sobre la propagación <i>in vitro</i> y microinjertación de la vid.	33
3. JUSTIFICACIÓN	41
3.1 HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN.....	42
4. OBJETIVOS	42
4.1 Objetivo general.....	42
4.2 Objetivos específicos	42

5. METODOLOGÍA.....	43
5.1 Material vegetal.....	43
5.2 Desinfección y establecimiento <i>in vitro</i> de cultivos asépticos.	43
5.3 Multiplicación.....	44
5.4 Evaluación de enraizamiento de portainjertos de vid.	45
5.5 Desarrollo de la técnica de microinjertación <i>in vitro</i>	45
5.6 Aclimatación y establecimiento en suelo.....	47
5.7 Análisis de datos.....	48
5.8 Detección isotérmica rápida en plantas de vid, por AmplifyRP® Acceler8® (Agdia, Elkhart, EE. UU.) Para el Grapevine red blotch associated virus (GRBaV).	49
5.9 Procesamiento histológico de tejidos vegetales de plántulas injertados.....	49
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	52
6.1 Desinfección y establecimiento <i>in vitro</i>	52
6.2 Desarrollo de un sistema eficiente de multiplicación <i>in vitro</i> para variedades y portainjertos de vid.....	55
6.3 Enraizamiento de portainjertos.....	62
6.4 Desarrollo de la técnica de injerto <i>in vitro</i>	68
6.5 Adaptación a condiciones de suelo de plantas microinjertadas.	75
6.6 Detección isotérmica rápida en plantas de vid, por AmplifyRP® Acceler8® para GRBaV.....	79
6.7 Histología de plántulas microinjertadas.....	82
7. CONCLUSIONES.....	85
8. BIBLIOGRAFÍA.....	86
9. ANEXOS.....	98
9.1 Descripción del material vegetal.....	98
9.1.1 Dog Ridge (<i>V. x champinii</i>).	98
9.1.2 SO4 (<i>V. riparia</i> X <i>V. berlanderi</i>).	98
9.1.3 Rupestris du Lot.....	99
9.1.4 <i>Vitis vinífera</i> cv. Red Globe.....	99
9.1.5 <i>Vitis vinífera</i> cv. Crimson seedles.....	100
9.1.7 <i>Vitis vinífera</i> cv. Tinta de toro.....	101
9.2 MEDIO MS MODIFICADO (Chee y Pool, 1982).	103

9.3 MEDIO MS MODIFICADO (Roubelakis y Zivanovitc, 1991). 104



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Acrónimos asignados para la identificación de variedades y portainjertos de vid, introducidos a cultivos *in vitro*. 44

Tabla 2. Diseño de combinaciones de injertos, de acuerdo al interés agronómico y características de cada variedad productora. 47

Tabla 3. Protocolo de tinción de cortes histológicos de tejidos vegetales. 51

Tabla 4. Desinfección de cuatro variedades de vid y dos portainjertos para su introducción al cultivo *in vitro*. 53

Tabla 5. Establecimiento *in vitro* de variedades de interés productivo y genotipos de portainjertos de interés agronómico. 54

Tabla 6. Cuantificación de diferentes parámetros de crecimiento y multiplicación para explantes nodales de variedades establecidos en MS modificado (Según Roubelakisy Zivanovite, 1991) adicionado con 0.2 mg L⁻¹, después de 8 semanas de incubación. 57

Tabla 7. Eficiencia de la técnica de microinjertación *in vitro*, mg L⁻¹ sobre autoinjertos, mostrados como tratamiento control, después de 4 semanas de incubación. 70

Tabla 8 Eficiencia de la técnica de microinjertación *in vitro*, mg L⁻¹ sobre las combinaciones de injertos y portainjertos de interés agronómico, después de 4 semanas de incubación. 71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Brotes juveniles de plantas adultas establecidas en campo, de *V. vinifera* var. Malbec (a), var. Tinta de toro (b), portainjerto SO4 (c), portainjerto 110-Ritcher (d)..... 102

Figura 2. Representación general de la técnica de microinjertación *in vitro*..... 46

Figura 3. Establecimiento *in vitro* de explantes de variedades y portainjertos de vid. Brotes asépticos de a) Tinta de toro, b)SO4, c) Malbec, d) Red Globe , sobre medio Chee y Pool adicionado 0.25 mg L⁻¹ de BA, después de 6 semanas de cultivo..... 55

Figura 4. Crecimiento de brotes expresado en altura (cm) y número promedio de segmentos nodales de a) variedades , b) genotipos de portainjertos de vid, después de 8 semanas de cultivo. 58

Figura 5. Efecto del medio MS modificado según Roubelakis y Zivanovite, (1991) adicionado con 0.2 mg L⁻¹ sobre el crecimiento de segmentos nodales de variedades a) Malbec b) Red Globe c) Crimson d) Tinta de toro, durante 8 semanas de cultivo.. 60

Figura 6. Efecto del medio MS modificado según Roubelakis y Zivanovite, (1991) adicionado con 0.2 mg L⁻¹ sobre el crecimiento de segmentos nodales de portainjertos a) 110- Ritcher b) Dog Ridge, durante 8 semanas de cultivo 61

Figura 7. Efecto sobre la inducción y formación de raíces de diferentes concentraciones de IBA, T0-0.0 mg L⁻¹, T1-0.1 mg L⁻¹, T2-0.2 mg L⁻¹, T3-0.5 mg L⁻¹; en portainjertos de vid SO4 (a), Rupestris du Lot (b) y Dog Ridge(c). durante 4 semanas de cultivo. 58

Figura 8. Aspectos cualitativos de las raíces de genotipos de *Vitis*, inducidas por diferentes concentraciones de IBA, a) 0.0 mg L⁻¹, b) 0.1 mg L⁻¹, c) 0.2 mg L⁻¹, d) 0.5 mg L⁻¹, durante 4 semanas de cultivo. 60

Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de la auxina IBA sobre segmentos nodales con una yema axilar y la formación de plántulas completas del portainjerto Rupestris du Lot (IBA mgL⁻¹, a) 0.0, b) 0.1, c) 0.2 y d) 0.5, después 4 semanas de cultivo..... 66

Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de la auxina IBA sobre segmentos nodales con una yema axilar y la formación de plántulas completas del portainjerto Dog Ridge (IBA mgL⁻¹, a) 0.0, b) 0.1, c) 0.2 y d) 0.5, después 4 semanas de cultivo. 67

Figura 11. Efecto de Ac. Cítrico + Ac. Ascórbico, sobre la sobrevivencia de injertos (a) a las 48 horas después de la microinjertación y sobre la unión del injerto (b) a las 4 semanas de la microinjertación. 69

Figura 12. Plántula microinjertada *in vitro* (Cr-DR), acercamiento del área de unión (unión en “V” y púa) del injerto, después de 4 semanas de incubación. 72

Figura 13. Plántulas microinjertadas *in vitro* (Tt-DR), a las 48 horas (a) y a las 4 semanas (b) después de la microinjertación..... 73

Figura 14. Crecimiento de plántulas microinjertadas expresado en promedio de altura del injerto (variedad) (a) y número promedio de raíces producidas (b), después de 8 semanas de cultivo. 74

Figura 15. Plántulas *ex vitro* microinjertadas a) Tt-DR b) Ma-DR c) Tt-SO4 d) RG-Rup; Condiciones de microinjertación unión en “V” (portainjerto) y púa (injerto), corte y unión con (Ac. Cítrico+ Ac. Ascórbico 500 mg/L). 76

Figura 16. Plántulas *ex vitro* microinjertadas, después de 16 semanas en condiciones de suelo y sombra al 50 por ciento, Cr-DR (a), Tt-DR (b) y Tt-SO4 (c). 78

Figura 17. Área de unión del microinjerto en el tallo de las plántulas microinjertadas de Tt-DR (a) y Cr-DR (b)..... 78

Figura 18. Detección de GrBaV en los extractos crudos no infectados (izquierda), hojas de vid infectadas con GrBaV (derecha) usando AmplifyRP® Acceler8TM. La prueba negativa y los resultados positivos para GrBaV se muestran con los símbolos (-) y (+). 80

Figura 19. Detección de GrBaV en los extractos crudos de hojas de portainjertos y variedades, usando AmplifyRP® Acceler8TM. 81

Figura 20. Inclusiones de parafina de segmentos de tallo de plántulas microinjertadas. a) cubos de parafina, b) corte longitudinal (8µm) de área de unión en microtomo. 83

Figura 21. Cortes longitudinales de tallos de plántulas microinjertadas de Tt/ DR, cuatro semanas después de la microinjertación *in vitro* (a) y (c), cuatro semanas después de la aclimatación de plántulas microinjertadas (b). 84



RESUMEN

Los drásticos cambios medioambientales, déficit de agua, sensibilidad a malas condiciones del suelo, incidencia de plagas y enfermedades, son los principales problemas que afectan actualmente las plantaciones a pie franco de variedades de vid, generando una reducción considerable de plantas y baja producción de fruto, por lo anterior es indispensable injertar las variedades sobre portainjertos tolerantes a dichas condiciones. Sin embargo el sistema convencional de injertación contiene un nivel de riesgo cuando se utilizan materiales no certificados como libres de patógenos, limitaciones por su dependencia a la temporalidad y edad de los materiales. En este proyecto se propagaron *in vitro* variedades y portainjertos a partir de segmentos nodales como explantes basales, en medio Ms modificado por Roubelakis y Zivanovitch, (1991) adicionado con 20 g L⁻¹ de sacarosa, 7.0 g L⁻¹ de agar y 0.1 g L⁻¹ de ácido indolbutírico (IBA) y pH 6.4. Se desarrolló un sistema de microinjertación, obteniendo plántulas al unir segmentos apicales de las variedades sobre segmentos nodales de portainjertos, en forma de púa y “V” respectivamente, el uso de antioxidante (Ac. cítrico/Ac. ascórbico 500 mg L⁻¹) indujo un aumento en la sobrevivencia del injerto, propiciando un mayor número de plántulas microinjertadas. Se registraron un 65% de prendimiento para Crimson/Dog Ridge, 78% para Tinta Toro/Dog Ridge, 84% Malbec/Dog Ridge, 75% Red Globe/Rupestris du Lot y 55% para Tinta de toro /SO4. Los porcentajes de sobrevivencia a condiciones de suelo para todas las combinaciones fue mayor al 50% excepto para Tinta de toro /SO4. La prueba molecular confirmó la ausencia del virus GRBaV (Grapevine red blotch associated virus) en las plantas madre, cultivos *in vitro* y plántulas microinjertadas. Fue posible obtener plántulas de variedades vinícolas y de mesa sobre portainjertos de gran importancia agronómica regional, determinando las mejores condiciones de microinjertación.

Palabras clave: microinjertación, portainjertos, propagación *in vitro*, *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

The drastic environmental changes, water deficit, sensitivity to poor soil conditions, incidence of pests and diseases, are the main problems that currently affect commercial plantations that utilize direct planting varieties, generating a reduction of plants and low fruit production; therefore it is essential to graft the varieties on tolerant rootstocks to these conditions. However, the conventional grafting system contains a level of risk when use of non-certified material, It also has limitations due to their dependence to temporality and age of the materials. In this project varieties and rootstocks were propagated *in vitro* from nodal segments as explants, in MS culture medium modified by Roubelakis and Zivanovic, (1991) added with 20 g L⁻¹ of sucrose, 7.0 g L⁻¹ of agar and 0.1 g L⁻¹ of indolebutyric acid (IBA) and pH 6.4. A micrografting system was developed obtaining seedlings by joining apical segments of the varieties on nodal segments of rootstocks, in the form of barb and "V" respectively, the use of citric acid / ascorbic acid (500 mg L⁻¹) as antioxidant induced an increase in graft survival, favoring a greater number of micrografted seedlings. The results were recorded as percentages, obtaining for a 65 for Crimson / Dog Ridge, 78 for Tinta Toro / Dog Ridge, 84 for Malbec / Dog Ridge, 75 for Red Globe / Rupestris du Lot and 58 for Malbec / SO4. Survival percentages to soil conditions for all combinations were greater than 50% except for Malbec / SO4. The molecular test confirmed the absence of the GBaRV virus (Grapevine red blotch associated virus) in the mother plants, *in vitro* cultures and micrografted seedlings. It was possible to obtain seedlings of varieties of wine and table varieties upon rootstocks of great regional agronomic importance, determining some suitable *in vitro* conditions of micrografting.

Keywords: micrografting, rootstocks, *in vitro* propagation, *Vitis vinifera*

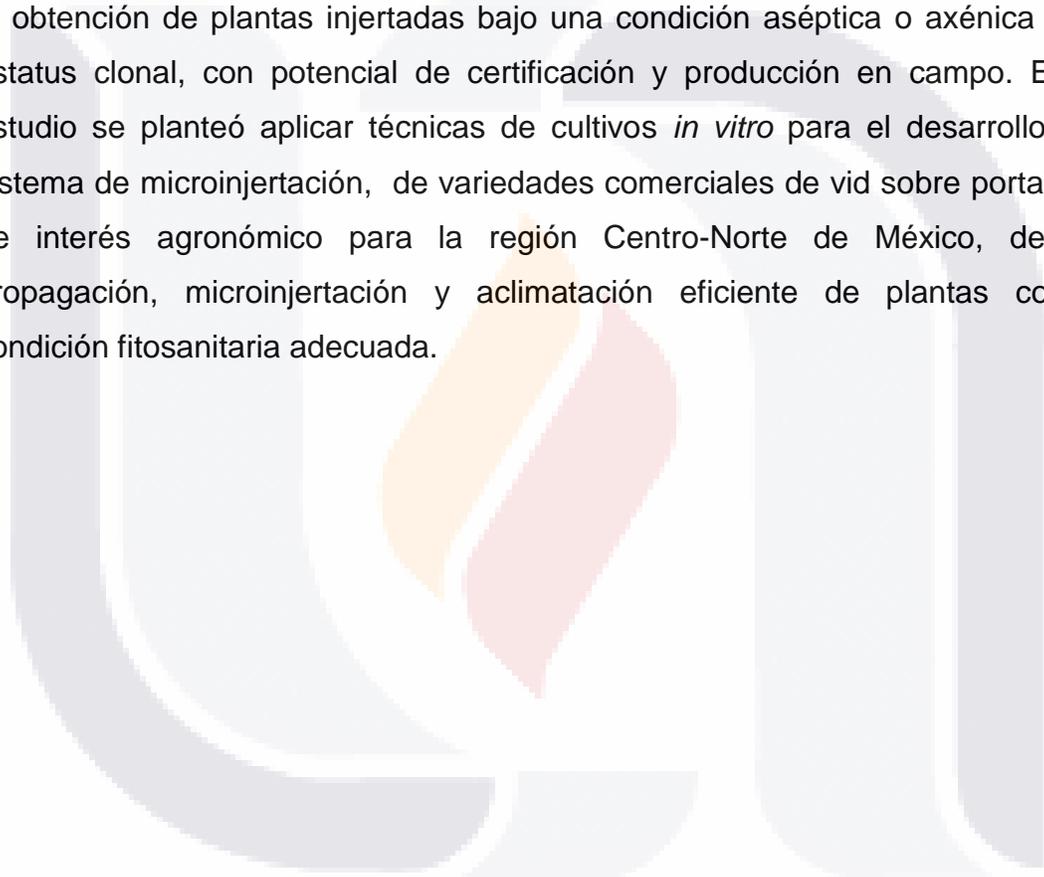
1. INTRODUCCIÓN

La vid pertenece a la familia Vitaceae, el único género de importancia agronómica lo constituye el género *Vitis*, formado aproximadamente por 60 especies (Galet, 1979) la mayoría de los cultivares de interés comercial pertenecen a *Vitis vinifera* L. y son clones de origen antiguo. Adaptados a una gran diversidad de climas, es uno de los mayores cultivos frutícolas del mundo, los cuales han estado estrechamente relacionados con el desarrollo de la cultura humana por su alto valor económico, nutricional y religioso. Algunas otras especies de este género se han introducido en el cultivo comercial en los últimos siglos, como portainjertos o híbridos, debido a los problemas que han presentado las variedades comerciales reduciendo los cultivos, generando baja producción y pérdidas económicas (Borja *et al.*, 2016)

Los principales problemas de plantaciones a pie franco de variedades de vid, es la susceptibilidad a enfermedades y la sensibilidad a las malas condiciones del suelo. Por lo anterior es indispensable utilizar portainjertos tolerantes a dichas condiciones. El gran alcance del uso de portainjertos en la viticultura se encuentra bien documentado, no solo se usan como un medio efectivo para controlar plagas biológicas importantes tales como filoxera, nematodos, virus y hongos, también pueden ser utilizados efectivamente para regular la absorción de nutrientes y agua, además influyen en la fructificación y maduración (Walker y Golino, 1999). Los portainjertos son utilizados como la porción inferior de la planta injertada que solo incluye el sistema radical (Bundschuh *et al.*, 2000).

La injertación es una técnica vitivinícola utilizada en todo el mundo (Cookson *et al.*, 2013) consiste en un formar un sistema fisiológico-anatómico compuesto, de dos porciones vegetativas de especies distintas. El proceso de injerto es muy importante y comprende cambios complejos bioquímicos y estructurales durante la adhesión de los dos materiales injertados, seguido de la formación de callos y el establecimiento de un sistema vascular funcional (Hartmann y Kester, 1990). Sin

embargo, la forma convencional de injertación contiene un nivel de riesgo cuando se utilizan materiales no certificados como libres de enfermedades, depende de una temporada y la edad de los materiales. Por tal motivo se ha buscado una alternativa biotecnológica de solución a estas limitaciones o problemáticas, así los cultivos *in vitro* representa una técnica que incluye la micropropagación *in vitro* aunado a la técnica de microinjertación, ofrecen las ventajas necesarias para la propagación rápida del material, el incremento de la capacidad de enraizamiento y la obtención de plantas injertadas bajo una condición aséptica o axénica y buen estatus clonal, con potencial de certificación y producción en campo. En este estudio se planteó aplicar técnicas de cultivos *in vitro* para el desarrollo de un sistema de microinjertación, de variedades comerciales de vid sobre portainjertos de interés agronómico para la región Centro-Norte de México, desde la propagación, microinjertación y aclimatación eficiente de plantas con una condición fitosanitaria adecuada.



2. ANTECEDENTES

2.1 Características del cultivo de la vid.

Las diversas especies de vid pertenecen a la familia botánica Vitaceae, que incluye en su mayoría arbustos y lianas leñosas. La gran mayoría de los miles de cultivares de uva pertenecen a la especie *Vitis vinifera* L; algunas de las otras especies se utilizan como portainjertos en los cuales se injertan los cultivares con propiedades de fruto deseables. El único género de importancia agronómica lo constituye el género *Vitis*, formado aproximadamente por 60 especies. El número de variedades de *V. vinifera* registradas y que surgieron por evolución natural, es al menos de 5,000 variedades.(Duque y Barrau, 2005). Adaptadas a una gran diversidad de climas, el cultivo de *V. vinifera* es uno de los frutales más antiguos y de mayor tradición. En la actualidad, la vid es uno de los principales cultivos frutícolas del mundo, el cual ha estado estrechamente relacionado con el desarrollo de la cultura humana por su alto valor económico (SEDRAE, 2014). Tradicionalmente el cultivo de la vid ha sido utilizado para la producción de fruto para consumo en fresco y en la industrialización del mismo como fabricación de vino, jugos y concentrados, por lo que existe una gran diversidad de variedades según su propósito (Duque y Barrau, 2005).

2.1.1. Características botánicas de la vid.

Los cultivares de vides convencionalmente se propagan asexualmente como esquejes para que cada individuo sea un clon de su planta madre. Las vides comprenden órganos vegetativos (raíces, tronco, cordón, brotes, hojas y zarcillos) y órganos reproductivos (grupos con flores o bayas). Todos los órganos están interconectados a través del sistema vascular que comprende el xilema para el transporte de agua y nutrientes y el floema para el transporte de asimilación. Las

raíces forman la interfaz planta-suelo, mientras que el tronco, los cordones y los brotes de una vid forman su tallo. Los brotes llevan las hojas, brotes, zarcillos y racimos. Los brotes son brotes jóvenes, comprimidos incrustados en escamas foliares. Después de la fertilización, el pistilo flor se desarrolla en la baya. El fruto de la vid en conjunto forma el racimo cuya forma puede ser regular o irregular y está constituido por el escobajo, parte leñosa del racimo que sirve de soporte. La baya comprende hasta cuatro semillas rodeadas por el endocarpo, mesocarpo y exocarpo, presentando características que son propias de cada variedad (Keller, 2015).

2.1.2 Cultivos de vid en México.

En México se cultivan alrededor de 31.5 mil hectáreas de vid, distribuidas en 15 estados y generan una producción de 375.3 mil toneladas, valuada en 7093 millones de pesos; 71 % de la producción de uva se destinó al mercado para su consumo en fresco; 25 % se usó como insumo en la elaboración de vinos, jugos y concentrados; y 4 % fue consumida como fruto seco o uva pasa. Los principales productores en orden a la superficie plantada son: Sonora, Baja California, Zacatecas y Aguascalientes, encontrándose estados como Querétaro y Guanajuato con tendencia regional al crecimiento de producción según datos presentados por el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2018).

El estado de Aguascalientes ocupó el cuarto lugar a nivel nacional en la producción de uva. Ese mismo año la entidad tenía plantadas 32 variedades de vid en una superficie de 835 ha; 75 % de la superficie estaba plantada con variedades cuya producción tenía como destino la industria procesadora de jugos y concentrados; 14 % correspondió a variedades de uva para mesa y el resto a variedades para la elaboración de vinos de mesa. Dentro de la diversidad de variedades plantadas en la entidad destacan la denominada Salvador, cuya producción se destina a la industria y la Red Globe, que es uva para mesa. Anualmente se producen 11.3 mil toneladas de uva en Aguascalientes, generando

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un valor de 41.5 millones de pesos que representaron 3 y 0.6 % del total nacional, respectivamente (SIAP, 2018)

La producción de vid hace uso intensivo de la mano de obra; de ahí que esta actividad sea importante por la generación de empleo en el medio rural en las etapas de producción, industrialización y comercialización. Datos del Consejo de Viticultores de Aguascalientes A.C., señalan que en 2013, existían 234 productores dedicados a la actividad (Borja *et al.*, 2016) distribuidos principalmente en los municipios de Cosío, Tepezalá, el Llano y Rincón de Romos con una producción anual de 11.3 mil toneladas, son productores de pequeñas extensiones pero en desarrollo de tecnificación y la mayoría de ellos vinculados a empresas industrializadoras de jugo o vino, ya que la calidad agronómica del cultivo, refleja productos industrializados con alto valor agregado (SEDRAE, 2014).

En los últimos años la viticultura de Aguascalientes se encuentra en un proceso de resurgimiento; el gobierno estatal pretende detonar la actividad y convertirla en una de las más importantes en el estado y la región. Impulsando la creación de programas de inversión agrícola y de plantación de variedades que puedan impactar en la región y reconvertir los cultivos tradicionales utilizando las que sean material vegetativo de calidad con mayor rentabilidad y promover la producción de vinos con valor económico adicional, posicionando a la región con productos innovadores (Borja *et al.*, 2016).

2.2 Problemas que afectan al cultivo de vid.

La actividad vitivinícola hoy se encuentra reducida debido a factores negativos como la gran incidencia de enfermedades virales, fungosas y bacterianas, así como la presencia de plagas como filoxera y nematodos que hacen complicado su tratamiento y representan una condición riesgosa por ser portadores de virus principalmente, que al final ocasionan enfermedades devastadoras, al propagarse vegetativamente, si bien esta forma de propagación permite la uniformidad varietal, arrastra consigo enfermedades que ocasionan

pérdidas importantes en las plantaciones. (Rodrigo *et al.*, 2006). La mayoría de las plantaciones comerciales utilizan siembra directa de variedades seleccionadas. Sin embargo, las variedades de vid son susceptibles a las infecciones virales, ácaros, insectos, nematodos y más importante aún, a la filoxera. Lo que lleva a una disminución en la productividad total de los cultivos. Por lo tanto, es necesario que el material de siembra obtenido para el establecimiento de nuevos viñedos deba estar libre de enfermedades, especialmente virales. Dado que una vez que se establece un viñedo, es difícil lograr la minimización de las pérdidas causadas por la infección viral (Martelli *et al.*, 1993).

Los principales problemas que afectan el cultivo de la vid son:

2.2.1 Filoxera (*Dactylosphaera vitifolii*).

En la actualidad este homóptero está presente en todas las regiones vitícolas europeas y en algunos otros lugares del mundo. Con el empleo de portainjertos resistentes, su importancia económica es escasa, aunque en el pasado (1890-1910) fue la peor plaga que han padecido los viñedos europeos y obligó a una reestructuración casi total de la viticultura al producir la muerte y pérdida de gran parte de cepas francas, fue necesario sustituirlas por viníferas sobre pies tolerantes. Se le conoce por el nombre común de “filoxera”. Técnicamente se le ha conocido como *Pemphigus vitifolii*, *Phylloxera vastatrix* y *Viteus vitifoli* y actualmente como *Dactylosphaera vitifolii*.

Los síntomas y daños, en las hojas, solo en las vides americanas (portainjertos), se manifiesta por unas agallas, especie de bolsa que sobresale por el envés y que casi se cierra en el haz, por una especie de pelos que dejan ver un pequeño orificio. En las raíces, principalmente de las vides europeas, se manifiesta siempre por formación de nodos (en raicillas jóvenes) y tuberosidades (en raíces viejas), produciendo una hipertrofia de los tejidos por el ataque de los insectos. Representando el principal daño lo causa en las raíces de las vides europeas, absorbiendo la savia e impidiendo que llegue a la parte aérea, facilitando

la putrefacción de la raíz, debilitando la cepa, que toma un aspecto de entrenudos cortos y hojas pequeñas amarillentas que acaba por secarse y morir al cabo de 2 a 3 años. El daño en las hojas de vides americanas no tiene mucha importancia económica. Sin embargo, la presencia de insectos en las hojas es un factor de riesgo, para vides a pie franco.

Actualmente la única forma eficaz de proteger las vides europeas es la utilización de portainjertos (especies americanas) tolerantes. En la selección de estos debe tenerse en cuenta que posean una buena adaptación al tipo de suelo (caliza activa, sequia, exceso de humedad, compacidad, salinidad entre otras), una buena afinidad con la variedad de vinifera, considerando además sus efectos sobre la misma (vigor, efectos sobre la maduración y ciclo vegetativo) y una cierta resistencia a nematodos. Todo esto con el objetivo a mantener un buen estado vegetativo y productivo de la cepa. Las vides americanas resisten bien los ataques de las larvas radicícolas no quiere decir que sean inmunes, excepto *Vitis rotundifolia*. Esta resistencia se debe a que sus raíces están rodeadas de unas capas de corcho que no puede ser atravesado por el pico de las larvas radicícolas (Pérez, 2004).

2.2.2 Nematodos.

Los nematodos son invertebrados de 0,5 a 5 mm de longitud, alargados y de cuerpo transparente, que se desarrollan y viven en el suelo, atacan las raíces de las plantas por medio de un estilete con el que perforan los tejidos. Estos pequeños gusanos no han constituido, históricamente, un problema mayor en el viñedo, con excepción de su presencia en algunas zonas fundamentalmente arenosas. No obstante su papel de transmisores de virus los ha convertido en enemigos importantes de la vid, situación que se coloca como un gran peligro a los viñedos a mediados de este siglo. Una de las especies identificadas en la viñas, pertenecen a dos órdenes: *Tylenchidos* y *Dorylaimidos*. (García, 2004).

Los *Tylenchidos* son los más antiguamente conocidos. El mayor daño lo causan por el efecto mecánico de sus picaduras y sobre todo, por la secreción salivar que inyectan en las raíces provocando deformaciones en la zona atacada. La mayor parte son endoparásitos, es decir, penetran en las raíces y en ellas viven, se alimentan y se reproducen. Algunos son ectoparásitos, viviendo fuera del sistema radicular. Por su importancia sobresalen las especies de *Meloidogyne* considerados endoparásitos sedentarios. Las secreciones salivares de larvas y adultos inyectadas a través del estilete, al alimentarse, provocan una hipertrofia de las células de la corteza de la raíz y una proliferación de éstas. Se forman hinchazones en forma de bola o agalla que pueden afectar seriamente el sistema radicular, que llega a ser destruido. Aunque no se producen daños característicos en la parte aérea, todo ello provoca que la planta, resentida en su alimentación subterránea, frene su crecimiento, se debilite, tome aspecto raquítrico, con amarilleos, sarmientos delgados, cortos y mal agostados en su extremidad. Problemas de déficit hídrico o nutricional agravan esta sintomatología. Si existe el riesgo de estos parásitos en el terreno, cabe la posibilidad de elegir portainjertos resistentes. En efecto, las raíces de algunos patrones soportan bien el ataque del nematodo y no provocan una proliferación importante. También influye positivamente el desarrollo rápido de algunas variedades que adquieren un vigor suficiente para contrarrestar la población y el ataque del parásito. De los trabajos de diversos autores, con resultados, se pueden señalar como más resistentes a los *Meloidogyne* los siguientes portainjertos: SO 4, 5 BB, 8 B, 1103 P, 1616 C, 1613 C, 101-14 Mgt, 140 Rg, 99 R, 1447 P, 3306 C, Dog Ridge, Harmony, Freedom y Salt Creek (García, 2004).

Los *Dorylaimidos*, son nematodos ectoparásitos migrantes, que viven en el suelo y se alimentan de las raíces jóvenes, especialmente picando su extremidad. Destacan por su importancia como vectores de virus de gran transcendencia económica. Sus picaduras producen daños directos e indirectos. Los directos tienen poca importancia y consisten en hinchazones de la extremidad de las raíces

jóvenes. Los indirectos son de gran importancia, ya que pueden transmitir el virus del entrenudo corto desde plantas enfermas a otras sanas.

En ocasiones se necesitan más de seis años para sanear un suelo infectado, y se comprende que la práctica es, con frecuencia, difícil de aplicar por el viticultor. En cualquier caso, es siempre recomendable dar descanso al terreno antes de una replantación, dependiendo del grado de infección anterior. El período será mayor o menor según el estado sanitario del viñedo arrancado, la población de nematodos y el tipo de suelo. Replantaciones sucesivas, sin descanso suficiente, empeoran progresivamente la sanidad del viñedo, aun partiendo de una viña aparentemente sana. Es difícil que ésta lo sea en su totalidad y pequeñas infecciones se intensifican a lo largo de repetidas replantaciones que, además, pueden ir aumentando la contaminación con el material vegetal (Rodríguez y Chávez, 2003).

2.2.3 Hongos.

El ataque a la raíz de diferentes hongos producen las podredumbres de la raíz, que están presentes en mayor o menor grado en casi todos los suelos. Las enfermedades se conocen con los nombres comunes de podredumbres o pudriciones de la raíz. Aunque en un principio los ataques se presentan por zonas, los daños que se originan son muy importantes: las plantas de vid afectadas acaban por morir y el terreno queda infectado por largo tiempo con los órganos de propagación de los hongos. Las pudriciones radiculares se presentan al principio en plantas de vid aisladas y posteriormente se difunden. La gravedad del daño no se contempla solamente en la muerte de las plantas de vid afectadas, sino en que también lleva implícito la contaminación del terreno ya que los hongos son de carácter saprófito, de su persistencia su presencia subterránea y sus rizomorfos pueden alcanzar grandes profundidades, por lo tanto se dificulta su eliminación de suelos infectados. La pudrición texana es la principal enfermedad causada por hongos radiculares presente en el sur de Estados Unidos y en el Norte de México.

Esta enfermedad es inducida por el hongo *Phymatotrichum omnivorum*, el cual invade y mata raíces de los cultivos por completo (Winkler, 1965). Las raíces presentan el principal daño, que se refleja en las hojas presentando una apariencia amarillenta y tendencia a marchitarse a mediados de la tarde, en cambio las vides muy dañadas tienden a morir, por la excesiva pudrición del sistema radical, las macroestructuras del hongo generan una obstrucción del tejido vascular. El método de protección más efectivo es el empleo de portainjertos tolerantes. (Pérez, 2004).

2.2.4 Sequía.

El agua es indispensable en la vida de las plantas e influye en su crecimiento y productividad. El estrés hídrico es un problema perjudicial en la eficiencia, rendimiento y calidad, de los cultivos y es una de las principales causas de muerte en plantas, ocurre cuando la transpiración excede el agua absorbida por las raíces (Munns y Tester, 2008). Los principales efectos del estrés hídrico sobre el crecimiento está en la reducción en la altura, tallo, raíces, área foliar, peso foliar específico y biomasa de la planta (Khurana y Singh, 2004).

La vid necesita una alimentación en agua suficiente para asegurar el crecimiento de sus órganos vegetativos y fructíferos. El uso de portainjertos a través del injerto tiene el potencial de mantener los rendimientos, aumentar la conservación del agua reduciendo la necesidad de riego o protegiendo las vides de daños a largo plazo resultantes de la sequía. Las especies de portainjertos tienen diferente comportamiento a condiciones de falta de agua. Incluso la *Vitis vinífera* tiene cierto grado de resistencia a sequía en terrenos donde esa es la única condicionante. Cuando las raíces son atacadas por algún insecto o microorganismo en condiciones de sequías, no existe la posibilidad de renovarse. *V. rupestris* resiste en los terrenos profundos gracias a que su raíz se incrusta; *V. riparia* no exhibe tolerancia y *V. berlandieri* es muy resistente (Howell, 1987).

2.2.5 Virus.

Los virus son partículas ultramicroscópicas constituidas por un ácido nucleico, rodeado de una envoltura proteica, sin actividad metabólica propia y que, por tanto, necesitan de una célula huésped para poder desarrollar su ciclo vital. Por virosis se entiende tanto la virosis en sentido estricto como otras enfermedades cuya causa no es un virus sino otros agentes patógenos: fitoplasmas, rickettsias, viroides, etc., y también se conceptúan como virosis aquellas afecciones cuya causa es desconocida, pero que tienen en común el ser transmisibles mediante injerto; esta manera de transmisión es la que ha originado la dispersión de estas enfermedades, como consecuencia del cada vez mayor comercio nacional e internacional y a pesar de los controles fitosanitarios. Si bien más adelante se tratará con mayor profundidad de los efectos negativos de cada una de las principales virosis que afectan a la vid, es necesario destacar la gran importancia económica que en su conjunto tienen. Esta importancia se basa en que las cepas afectadas producen menos, con peor calidad y tienen una vida más corta. La mayor dificultad en la erradicación de virus estriba en la imposibilidad de combatirlos mediante tratamientos fitosanitarios convencionales, por lo que su control se basa en la eliminación de las cepas infectadas y lucha contra vectores transmisores: debiendo acudir, para lograr planta sana a procesos de selección clonal-sanitaria y en caso necesario aplicar técnicas de regeneración de las plantas afectadas (Padilla, 2004)

Las pérdidas pueden llegar hasta un 80% de la cosecha, estas pérdidas se hacen más importantes en todas las variedades de uva de mesa debido a que se impide la formación del racimo uniforme que implica una fuerte desvalorización comercial. En la uva para vino no tiene repercusión ni en el índice de acidez ni en el grado de azúcar, pero sí en la menor longevidad de las cepas. A los 6 u 8 años de haberse producido la infección se observa que la planta afectada presenta un marcado estado depresivo y muere. La incidencia de virus sobre el material

vegetal de multiplicación produce que la madera procedente de la planta infectada tenga una menor capacidad de enraizado, el número de estaquillas obtenidas es más bajo y el porcentaje de prendimientos de los injertos se ve también muy afectado. Asimismo, el injertar una variedad infectada sobre un patrón libre de virus conduce a la obtención de una planta también infectada.

Se estima que las pérdidas globales debidas a la infección viral de las vides son superiores a miles de millones de dólares estadounidenses debido a efectos tales como la reducción del rendimiento, el retraso de la maduración, la reducción del contenido de azúcar en la fruta y disminución del vigor de la planta. Sin embargo, los medios para reducir las pérdidas causadas por una infección viral una vez que se establece un viñedo son extremadamente limitados. Por lo tanto, es importante contar con técnicas robustas, sensibles, rápidas y confiables para evaluar los clones de vid para detectar cualquier infección viral que puedan tener Pathirana y Mckenzie (2005). La forma típica de transmisión de la mayoría de los virus es la multiplicación vegetativa de plantas infectadas: Cuando se injerta un patrón sano con una variedad infectada o una variedad sana sobre un patrón enfermo, la planta entera resulta infectada al cabo de poco tiempo. Otra forma importante de transmisión la realizan los nematodos. La transmisión por herramientas utilizadas en la poda no es de temer, como ocurre con otras enfermedades debidas a bacterias u hongos.

La prolongada historia del cultivo de vid y la práctica más reciente del injerto en viticultura ha llevado a un gran número de virus que la infectan, la degeneración de la hoja de abanico, la madera rugosa y la mancha foliar son las enfermedades más importantes de la vid (Martelli *et al.*, 1993).

Reyes *et al.*, (1992) anotan que la mayoría de las enfermedades causadas por hongos, nemátodos y bacterias se pueden combatir, eliminándolas o minimizándolas en el campo, mientras que con los virus o viroides ello no es posible, lo cual representa una destrucción progresiva de la plantación o un deterioro tal que la convierte en una unidad de explotación no rentable. La

disponibilidad de materiales de siembra libre de patógenos es crucial para altos rendimientos y calidad de todos los cultivos. Enfermedades virales en plantas amenazan la productividad y la sostenibilidad de la agricultura. (Wang *et al.*, 2011). La realización de toda nueva plantación o replantación con planta exenta de virus constituye, hoy por hoy, es la mejor y casi la única estrategia que se puede adoptar para evitar la presencia posterior de estas enfermedades en los viñedos. Los procesos por los que se logra material vegetal exento de virus son la termoterapia y el cultivo de tejidos (Meng *et al.* 2006).

2.3 Uso de portainjertos y su importancia.

Al final del siglo XIX, después de la expansión geográfica de la vid, aparecieron nuevos agentes causantes de enfermedades, tales como los hongos o la filoxera. Se extendieron desde América hasta Europa, causando la destrucción de muchos viñedos europeos, cambiando radicalmente la diversidad de esta especie, tanto en vides cultivadas como en vides silvestres. La viticultura europea se libró de su extinción gracias a la introducción de varias especies no viníferas del género *Vitis* originarias de América, que fueron utilizadas como portainjertos y para la producción de híbridos resistentes a enfermedades. (Martelli *et al.*, 1993). En muchas de las áreas viticultoras del mundo las enfermedades, las condiciones agroclimáticas y de suelo, producen importantes daños económicos, causando decaimientos, reducción de la vida comercial de los árboles, bajas producciones, frutas de mala calidad, así surge la necesidad del uso de portainjertos con cualidades agronómicas favorables. (Schmid *et al.*, 2003).

El término portainjerto es referido a la porción inferior de la planta injertada que solo incluye el sistema radical (Bundschuh *et al.*, 2000). Según Atkinson y Else (2001), la manipulación del sistema radical y la propagación son los principales objetivos del uso de los portainjertos desde hace siglos. El uso de genotipos de portainjertos en la actualidad ya no solo es valioso por su tolerancia a los parásitos

de las raíces como son la filoxera y nematodos, sino también por su principal influencia relacionada con el vigor, ciclo de vida, madurez, capacidad de modificar la eficiencia de rendimiento (Howell, 1987) o adaptación a condiciones adversas del suelo como lo son sequía, anegamiento, suelos calcáreos, salinos, ácidos o infestados. La influencia del portainjerto parece expresarse, fundamentalmente, a través del vigor y, consecuentemente, sobre la exposición de la vegetación y la disponibilidad de agua y nitrógeno en la maduración. Los portainjertos débiles tienden a producir vinos de más calidad salvo en los suelos tan pobres en los que la superficie foliar sea insuficiente; en estas situaciones son los portainjertos vigorosos los que consiguen mejores resultados (Martínez, 2011).

En todo el mundo, la producción selectiva y los programas de desarrollo han proporcionado portainjertos para muchos frutales, capaces de resistir plagas y enfermedades, suelos pobres y condiciones climáticas desfavorables. Los atributos requeridos de un portainjerto se vuelven más sofisticados con los años, desde influencia en el crecimiento, mejorar la eficiencia del cultivo, modificación de los tiempos de floración y fructificación son de los principales. El logro de algunos de estos objetivos ha permitido gran parte de la producción de frutales en diversas condiciones climáticas en el mundo (Bouquet y Hevin, 1978).

El gran alcance del uso de portainjertos en la viticultura se encuentra bien documentado, no solo se usan como un medio efectivo para controlar plagas biológicas importantes tales como filoxera, nematodos y hongos, también pueden ser utilizados efectivamente para regular la absorción de nutrientes y agua (Walker y Golino, 1999). Sin embargo, la elección de estos portainjertos se está volviendo cada vez más difícil, ya que resultado de múltiples investigaciones existe la disponibilidad de numerosos genotipos (Loreti y Massai, 2006). Reynolds y Wordle (2001) describieron algunos criterios principales para la elección de portainjertos ordenados según su importancia se encuentra la resistencia a la filoxera, resistencia a los nematodos, adaptabilidad a suelos de pH alto, suelos salinos, suelos de pH bajo, suelos pobremente drenados y sequía. Estos criterios son consecuencias de las interacciones entre factores ambientales, fisiología de la

variedad productora y los genotipos de portainjertos empleados. La selección de un portainjerto para una región en particular depende de las interacciones entre el tipo, composición, propiedades físicas y químicas del suelo, plagas, enfermedades, factores agroclimáticos y finalidad productiva del fruto, por tal motivo es importante la evaluación en campo con plantaciones prueba (Cookson *et al.*, 2013).

2.3.1 Especies utilizadas como portainjertos.

La acentuada susceptibilidad de la vid europea (*Vitis vinifera* L.) al ataque de varios patógenos ha inducido a probar el potencial de los portainjertos, como una solución definitiva al problema. Los portainjertos que se utilizan en el mundo son numerosos y variados pudiendo establecerse que la mayoría de ellos pertenecen a cuatro especies americanas como: *Vitis riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* y *V. champinii* (González, 2007).

Vitis riparia, *V. rupestris* y *V. berlandieri* son especies adaptados a entornos específicos de estas principalmente resultan los híbridos considerados portainjertos comerciales que exhiben una amplia variedad de rasgos. Numerosos híbridos a través de estas especies han sido desarrollados por los criadores y juegan un papel importante en la viticultura de hoy en día (Tandonnet *et al.*, 2010).

2.3.1.1 *Vitis riparia* Michaux.

Originaria de Estados Unidos de América, de las regiones templadas y frías muy cercanas a Canadá, comúnmente es encontrada cerca de ríos y corrientes. Aptitudes. Especie con resistencia a filoxera, al mildiú (*Plasmospora viticola*), a la pudrición negra (*Gignardia bidwelli*), y al estrés por frío elevada, su crecimiento es eficiente en todos los suelos, es adaptable a suelos arenosos y húmedos,

susceptible a clorosis y sequía. Fácil enraizamiento. Es la especie es la más resistente de todas las especies nativas de América. El sistema radical tiende a ser superficial y es fibroso y extendido. Las vides *V. riparia* tienden a ser muy precoces, al brotar en primavera y también para la maduración del fruto. (Galet, 1979).

2.3.1.2 *Vitis rupestris* Scheele.

Su origen es el sur de Estados Unidos de América, especie silvestre. Aptitudes: Esta especie se considera altamente resistente a filoxera, al mildiú, a la pudrición negra y al estrés por frío. Las estacas enraízan fácilmente y las vides son moderadamente vigorosas cuando crecen sobre suelos salinos. La especie es sensible a sequía, requiere de terrenos francos profundos y permeables, tiene buena resistencia a enfermedades. (Galet, 1979)

2.3.1.3 *Vitis berlandieri* Planchon.

Originaria del Sureste de Texas y Norte de México. Aptitudes: La especie ofrece alta resistencia a la filoxera, al mildiú, a la pudrición negra y también a los nematodos, cuenta con una alta resistencia a clorosis y resistencia a sequías. *V. berlandieri* tiene dificultades cuando se enraízan estacas y es tolerante solo en un nivel moderado al estrés por frío. Es vigorosa en suelos arenosos como en suelos calcáreo. Las raíces son menos ramificadas pero muy penetrantes que en *V. riparia*, lo que explica su tolerancia a sequía (Galet, 1979).

2.3.1.4 *Vitis champini* Planchon.

Especie no tan reconocida, sin embargo es tolerable a suelos calcáreos y con poca disponibilidad de agua, es muy resistente a filoxera y a la pudrición

negra, moderadamente tolerante a mildiú, crece vigorosamente en suelos arenosos y calcáreos (Galet, 1979).

2.4 Cultivo y propagación *in vitro* de plantas.

El cultivo de tejidos vegetales es la ciencia de la planta en crecimiento, ya sea células, tejidos u órganos aislados de la planta madre, en medios artificiales. Incluye técnicas y métodos utilizados para la investigación y además tiene varios objetivos prácticos. El cultivo de tejidos tiene aplicaciones muy diversas: producción comercial, producción de planta comercial libre de enfermedades, en particular de virus. En conservación de germoplasma que de otra forma habría de conservarse en colecciones vivas, en la producción de variación utilizable en mejora por medio de la variación somaclonal.

Actualmente, en todo cultivo de tejidos vegetales pueden identificarse distintas etapas o fases bien definidas, cada una con sus objetivos específicos; fase 0: Selección y preparación de la planta madre/donante, fase 1: Establecimiento de los cultivos axénicos, fase 2: Multiplicación del material, fase 3: Enraizamiento y obtención de plantas completas, fase 4: Aclimatación de las plantas obtenidas (Jiménez, 1999)

Fase 0: En esta fase se debe tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban comúnmente en la fase I. Sin embargo, en la actualidad existe un consenso que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de trabajo eficiente y repetible, por lo que cada vez se le va prestando mayor atención. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético. En esta fase es necesario tener en cuenta; La selección de las plantas donantes; la iniciación de todo proceso de cultivo de tejidos sólo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. La constitución genética de la planta donante es el primer factor a evaluar. Para la mayoría de las

plantas propagadas *in vitro*, el material inicial es una planta seleccionada por características fenotípicas especiales. El estado fisiológico de la planta donante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferente edad fisiológica (Villalobos y Thorpe, 1991). Generalmente, se utilizan plantas en estado de crecimiento activo: vigoroso y sano.

Fase 1: establecimiento de los cultivos asépticos, esta etapa consiste básicamente en la elección del explante (parte del vegetal ya sea células, protoplastos, tejidos u órgano) y la desinfección del mismo para iniciar un cultivo axénico (Roca y Mroginski, 1991). Los explantes más utilizados para iniciar la propagación clonal *in vitro* de una planta son las yemas apicales, estacas uninodales portando yemas axilares, discos de hoja, secciones de raíz y meristemos. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede iniciarse a partir de diferentes órganos o tejidos, siendo de gran importancia en la posterior respuesta del explante: su tamaño, tipo y época de recolección. Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos y García, 1982).

Esta etapa incluye la desinfección de los explantes, la desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70%, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio con gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad (Olmos *et al.*, 2004). El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana (Alvarado, 1998). Como se mencionó anteriormente el éxito de los sistemas de propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana, por lo tanto es necesario establecer cultivos asépticos.

Fase 2: Multiplicación del material, el objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. Es importante señalar que en esta etapa, cualquiera sea la vía de regeneración, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes (Olmos *et al.*, 2004). La composición del medio de cultivo es uno de los principales factores a tener en cuenta para lograr una respuesta morfológica deseada, estimular la diferenciación y conducir el crecimiento de tejidos vegetales *in vitro*. Las composiciones químicas de los medios de cultivo resultan esenciales para las plantas porque forman parte de los requerimientos para el crecimiento, de productos y suministran energía para la síntesis de metabolitos y el mantenimiento celular (Sharry, 2015).

La micropropagación constituye la principal aplicación comercial del cultivo de tejidos vegetales. Consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación limitada (Olmos *et al.*, 2004). Uno de los aspectos a tomar en cuenta en esta etapa para estimular la respuesta deseada son los medios de cultivos utilizados.

Fase 3: Enraizamiento y obtención de plantas completas, en esta etapa se produce la formación de raíces. En las especies herbáceas es relativamente fácil, mientras que en las especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis. El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren

simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una conexión vascular continua entre el brote y la raíz.

Fase 4: Aclimatación de las plantas obtenidas, Muchas plantas mueren durante este período, por lo tanto, después del pasaje a condiciones *ex vitro*, las plantas usualmente necesitan un período de aclimatización, donde se tiene en cuenta la humedad, temperatura, concentración de CO₂ y flujo de aire. Durante la aclimatización pueden diferenciarse dos períodos: un período de adaptación con poco crecimiento de los brotes y baja formación de raíces, seguido de un período de rápido crecimiento de raíces y parte aérea (Muñoz, 2002.)

Es extremadamente importante el momento en que las plántulas son transferidas al ambiente *ex vitro*. Si no son transplantadas cuidadosamente puede significar grandes pérdidas debido a que los brotes han sido desarrollados bajo condiciones de alta humedad y baja intensidad de luz, las hojas de las plántulas bajo estas condiciones poseen menos ceras cuticulares que plantas cultivadas en invernadero o vivero, por lo que plántulas cultivadas *in vitro* pierden agua rápidamente cuando son cambiadas a condiciones externas. Se requiere de un período de varios días para que las plantas sean completamente capaces de producir su propio recurso de carbono, debido a que cuando son cultivadas *in vitro*, el medio se suplementa con sacarosa (o algún otro carbohidrato) y el cultivo se mantiene con baja luz, por lo que las plántulas no dependen en su totalidad de su propia fotosíntesis (Sharry, 2015).

2.4.1 Importancia de cultivos de tejidos vegetales en la viticultura.

El cultivo *in vitro* de plantas se define como el cultivo de todo tipo de células, tejidos u órganos vegetales en un medio artificial bajo condiciones de esterilidad. Con este sistema de cultivo se pueden regular los factores que influyen en la producción y cultivo de especies vegetales, desde los requerimientos nutricionales, luz, fotoperiodo, temperatura y humedad. Es una técnica que,

actualmente, juega un papel muy importante en la producción de plantas, tanto ornamentales como de interés agronómico, además de servir como herramienta para estudios de tipo fitoquímico y genético-molecular. El amplio uso de estas técnicas se debe principalmente a la rapidez con que se pueden obtener plántulas para su estudio y al poco espacio que se necesita para mantener y cultivar numerosas plantas. Representando una estrategia de obtención de plantas de vid, tanto variedades como portainjertos, con estatus clonal, y estado fitosanitario adecuado.

La necesidad de modernizar la producción de material de siembra y utilizar tecnologías en los cultivos frutales ha sido estimulada por muchas consideraciones tales como las tendencias hacia el aumento de la siembra de árboles en el campo y la transición a un sistema de cultivo intensivo, que incluye la selección de programas en donde las plantas presenten características mejoradas, la creación e introducción de nuevos cultivares y la modernización del cultivo en las exigencias comerciales de producción. Todos estos cambios crean una demanda de más y más cantidades de plantación con material de calidad. El sistema convencional de propagación de este material no solo consume mucho tiempo, pero el material planteado no es uniforme y muchas ocasiones ni saludable. La aplicación de técnicas *in vitro* en la fruticultura puede por lo tanto, ser una alternativa viable para eludir estos problemas. La importancia que el cultivo de vid adquirió, es debido a las exigencias de un mejoramiento en la calidad de los viñedos, así como el uso de estrategias que aseguren una producción rentable y estable, en la búsqueda de reconversión de cultivos específicamente en la región Centro-Norte de México que incrementen el valor económico de la producción, se ha propuesto la viticultura ya que esta constituye una actividad de importancia en extensión, valor económico y producción para la industria vitivinícola, con destino a la elaboración de vinos para la exportación (Rodrigo *et al.*, 2006).

Las diferentes variedades de vid se enfrentan a numerosos problemas cuando se cultivan en condiciones naturales. Son problemas derivados de su

mayor o menor resistencia a las temperaturas extremas, a enfermedades provocadas por microorganismos o insectos. La selección de variedades resistentes a estos ataques ha sido un objetivo de los viticultores, empleando en ello mucho tiempo con amplias zonas de cultivo donde experimentar con nuevas variedades o realizar cruzamientos entre las ya existentes.

La propagación comercial de vid es efectuada generalmente por vía vegetativa. El método más utilizado para su obtención es el de enraizamiento de estacas. Esta técnica no ha cambiado durante siglos, ya que es económica y eficiente, pero posee una desventaja, la cual no permite una rápida multiplicación. Esta multiplicación es lenta y altamente dependiente de la época del año. Es en estos procesos de mejora donde el cultivo *in vitro* puede ayudar a la obtención eficiente, en un periodo de tiempo menor y en un menor espacio físico, de variedades resistentes o a mejorar las ya existentes, así como su propagación masiva. Existen numerosos trabajos publicados que describen la técnica de propagación *in vitro* en vid, misma que se describen a continuación.

2.5 Microinjerto *in vitro*.

El intercambio de material de propagación de árboles frutales a diferentes regiones y países en crecimiento es una fuente principal de nuevas plagas y patógenos, en particular los virus y viroides transmisibles por injerto que afectan a las especies en todo el mundo. Los procedimientos tradicionales a menudo no pueden poner en cuarentena a los patógenos y plagas con etiología desconocida, lo que lleva al estudio de procedimientos alternativos, incluidos los basados en técnicas de cultivo de tejidos.

El injerto es un método de propagación que consiste en unir una parte de una planta a otra. El resultado es un individuo autónomo formado por dos especies diferentes. La planta injertada está constituida por un patrón o portainjerto que es la planta que recibe a la porción de tejido llamada injerto. El portainjerto

generalmente no tiene valor productivo, pero genéticamente contiene genes de resistencia o tolerancia a estrés biótico (King *et al.*, 2010) o abiótico (Zhao *et al.* 2011) formando las raíces de la planta. La otra parte es el injerto o variedad comercial que es una porción de tallo o yema que se fija al portainjerto para que se desarrollen las ramas hojas flores y frutos (Hartmann y Kester, 1990). Originalmente el propósito de la técnica de injerto en los cultivos era evadir las enfermedades, sin embargo ya se han realizado diferentes técnicas derivadas del injerto como lo es el microinjerto *in vitro*.

El microinjerto *in vitro* es una técnica de injerto que consiste en injertar un ápice, ápice caulinar o meristemo tomado de una planta madre cultivada en condiciones asépticas. Las variaciones de las técnicas de injerto se han utilizado sobre todo en especies leñosas y especialmente en árboles frutales donde se realizaron trabajos en diferentes especies. El microinjerto se desarrolló en 1980 como técnica que consiste en la colocación en condiciones asépticas de un ápice en un portainjerto cultivado *in vitro*. El microinjerto es una técnica que potencialmente puede combinar las ventajas de la multiplicación *in vitro* rápida con una mayor productividad que resulta de injertos, portainjertos y combinaciones de injertos. Entre los diversos métodos de corte del microinjerto, se han encontrado que el injerto con ranura o cuña es el más adecuado en el caso de cultivos de leñosos. Las ventajas de utilizar ápices *in vitro* en lugar de ápices *in vivo* para llevar a cabo el microinjerto, da como resultado un mayor éxito del injerto, menos contaminación, menos vitrificación, menor necrosis del brote y buen vigor de los microinjertos (Rehman y Gill, 2015). Una de las principales ventajas de esta técnica la posibilidad de injertar en cualquier momento del año y trasplantar las plantas injertadas cuando se desee. El proceso requiere de ciertas condiciones, la principal es colocar un ápice o meristemo en la superficie recién cortada de una plántula decapitada donde se mantiene en su lugar mientras se cura en condiciones de alta humedad (Walker y Golino, 1999).

Según Guerrero *et al.*, (2004) el éxito del injerto depende de numerosos factores como, la temperatura, que determina el crecimiento de los tejidos de

cicatrización, la humedad ambiental, que puede provocar estrés hídrico en la variedad injertada, la necesidad de oxigenación de los tejidos en cicatrización, la hiperactividad o hipoactividad del patrón que determina el flujo de savia y que no debe ser excesivo o reducido.

Los microinjertos han revelado que hay cinco etapas de desarrollo de formación de la unión del injerto (a) desarrollo de una capa necrótica, (b) proliferación de una puente de callos en la interfaz de injerto, (c) diferenciación de nuevo cambium vascular, (d) restauración de nuevo tejido vascular, y (e) restauración de la continuidad de tejido epidérmico en la zona de unión (Estrada *et al.*, 2002).

Los resultados del microinjerto *in vitro* y el material vegetal que se deriva de él se pueden cultivar en condiciones de cultivo de tejidos o aclimatarse a condiciones exteriores (Onay *et al.*, 2003). El microinjerto también se aplicó con éxito para el rejuvenecimiento de los tejidos adultos. La técnica también se puede utilizar para la producción de plantas libres de virus (Wu *et al.*, 2007) y la evaluación de la incompatibilidad del injerto entre vástagos y portainjertos (Navarro, 1988).

2.6 Antecedentes sobre la propagación *in vitro* y microinjertación de la vid.

El primer método utilizado para propagar especies de *Vitis* y el establecimiento de cultivos *in vitro* fue descrito por Galzy (1961), en el cual los segmentos nodales que contienen brotes funcionales eran cultivados en un medio sin reguladores de crecimiento. Más tarde, Barlass y Skene (1971) propusieron un método para la propagación *in vitro* de la vid a partir de ápices que contienen grupos de células que colocadas en un medio líquido adicionado con citocininas se diferenciaron y fueron transferidas en un medio solidificado con agar, el medio compuesto formó

grupos de brotes, que se dividieron y se propagaron. Los brotes individuales se enraizaron en medio sin fitohormonas.

Continuando con los trabajos de propagación de vid, Silvestroni (1981) propuso la posibilidad de aumentar la producción vegetal mediante la propagación de segmentos nodales que contienen una yema axilar en medios complementados con citocininas para inhibir la dominancia apical y aumentar la brotación. La inclusión de citocininas en el medio es generalmente aceptada como necesaria para la proliferación de brotes a partir de ápices o segmentos nodales. (Mhatre *et al.* 2000). El explante utilizado en la micropropagación de la vid ha sido principalmente brotes axilares (Salunkhe *et al.*, 1999) y se encontró que el éxito fue altamente dependiente del genotipo.

Novak *et al.*, (1983) Probaron los efectos de las citocininas en el crecimiento y desarrollo de meristemas aislados de la vid. Se indujo la formación de yemas axilares y se derivaron cultivos de brotes en proliferación continua de 8 clones de vid en medio MS suplementado con 6-bencilaminopurina 10 μ M. Se estudiaron los factores que inducen el enraizamiento *in vitro* de brotes resaltando la importancia de la propagación *in vitro* para el almacenamiento a largo plazo y la selección clonal de cultivares de vid.

Como antecedentes prácticos de la propagación *in vitro* de cultivares de vid (*Vitis vinifera* L.) como lo son Cabernet Sauvignon y Merlot, se inició utilizando yemas axilares y meristemas como fuente de explante, éstos se establecieron en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), la mayor respuesta se presentó con 1.0 mg L⁻¹ de BAP en ambos explantes. Para la etapa de multiplicación de brotes, la mejor respuesta para número de brotes fue de 6.37, mientras que para longitud de brotes de 2.72 cm, ambos en el medio MS al 50% con 1.0 mg L⁻¹ de BAP. (Cavazos *et al.*, 2018)

Los trabajos para vides silvestres (*Vitis* spp) de Jiménez *et al.*, (2013) reportan su micropropagación en dos composiciones medios de cultivo, Murashige-Skoog (MS) y woody plant medium (WPM) en donde la generación de brotes no se

presentaron diferencias significativas por efecto de los medios de cultivo; sin embargo, entre accesiones existieron diferencias en vigor del explante, formación de callo, número de raíces, hojas y nudos; ninguna accesión sobresalió en todos los parámetros evaluados de forma constante.

Trabajos reportados por Jiménez *et al.*, (2013) para enraizar los brotes en MS, adicionaron tres auxinas, ácido naftalen-1-acético (ANA), ácido indol-3-butírico (AIB) o ácido indol-3-acético (AIA) a 0,5 mg/L. ANA generó el mayor número de raíces principales en las diferentes accesiones, por otro lado, AIB y AIA indujeron una mayor elongación de las raíces principales. Los presentes datos indican que el genotipo determina, al menos en parte, el comportamiento morfogénico *in vitro* de cada accesión.

En la cuestión de productividad trabajos que comparan las vides que provienen de propagación *in vitro* con las vides de propagación convencional muestran resultados sin diferencia significativas como lo mencionado por Deloire *et al.*, (1995) Cerca de dos hectáreas de vides experimentales provenientes de *in vitro* se plantaron en un viñedo de Champagne y sus características vitícolas y enológicas se estudiaron durante un período de 10 años. En comparación con las vides de control, no se observaron diferencias morfológicas ni daños por filoxera en el 41B (*Vitis vinifera* cv. *Chasselas* x *Vitis berlandieri*) y 333EM (*Vitis vinifera* cv. *Cabernet Sauvignon* x *Vitis berlandieri*) de vides propagadas *in vitro*, después de que las plantas hubieran alcanzado los ocho años de edad. Las bayas desarrolladas fueron normales (forma, tamaño, madurez). Todas las diferencias anormales desaparecieron progresivamente después de siete años.

Más allá de la micropropagación *in vitro* el cultivo de tejidos vegetales ofrece alternativas de solución para algunos otros problemas fisiológicos que se presentan en el material vegetativo *in vivo* como los es el envejecimiento, los primeros trabajos desarrollados para el microinjerto *in vitro* tenían como reto superar el proceso de envejecimiento, presenta una pérdida de vigor y capacidad de enraizamiento, que da como resultado la pérdida de capacidad morfogenética

(baja tasa de brotes de brotes, regeneración y enraizamiento de brotes). Para evitar estos problemas, se han utilizado diferentes técnicas para rejuvenecer y restaurar la capacidad morfogénica del material maduro, incluido el microinjerto. Pliego y Murashige (1987) probablemente fueron los primeros en demostrar que fue posible restablecer la capacidad de enraizamiento en el material de plantas adultas, en este caso el aguacate, mediante el microinjerto de yemas laterales aisladas de plantas con flores en *in vitro*, indicando reversión a la fase juvenil.

Posteriormente el microinjerto *in vitro*, ha sido propuesto para muchos fines fisiológicos y de saneamiento, Parkinson y Yeoman (1982), introdujeron un método de injerto *in vitro* usando como explantes segmentos axilares, Cortaron una parte del tallo de una planta en segmentos, los injertaron y los cultivaron en medio MS. Para simular condiciones fisiológicas normales, el medio se dividió en dos partes. El medio en contacto con el vástago se complementó con sacarosa, auxina y citocinina en concentraciones particulares, mientras que el medio en contacto con el portainjerto solo se suplementó con citocinina. Dado que es fácil cambiar la composición de los medios y las condiciones de cultivo, este método se ha utilizado para explorar los impactos de diferentes factores y condiciones en la compatibilidad del injerto y la función fisiológica.

Yıldırım *et al.*, (2010) estudiaron el éxito de varias técnicas de microinjerto *in vitro*, el establecimiento del rizoma, el tamaño de la microinjerto y los efectos del medio de cultivo en el desarrollo de plántulas injertadas para los cultivares de almendra, los ápices de brotes regenerados, fueron microinjertados en plántulas *in vitro*, dando como resultado la restauración en la proliferación de brotes. Los resultados indicaron que el método más exitoso para el injerto de los cultivares de almendra probados fue el microinjerto por ranura. Se lograron altos niveles de prendimiento de microinjertos con todos los rangos de scions (4–15 mm) obtenidos de los ápices de brotes regenerados. El crecimiento lento y la falta de desarrollo de brotes axilares en los microinjertos se notaron cuando los microinjertos se cultivaron en un medio de germinación libre de hormonas. Las plántulas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

microinjertadas *in vitro* se aclimataron con éxito y no se encontraron problemas con el establecimiento de plantas microinjertadas.

Los microinjertos *in vitro* propuestos por Sanjaya *et al.*, (2006) se lograron mediante la colocación de segmentos apicales de 1 a 2 cm de longitud en el hipocotilo de portainjertos *in vitro* de 45 días. El uso de brotes cultivados *in vitro* dio mejor éxito de injerto (60%) que pruebas de microinjerto *in vivo*. El injerto *in vitro* también fue influenciado por el tamaño del vástago y la edad del patrón.

En vid, el microinjerto es uno de los métodos para recuperar sin enfermedades plantas de *Vitis* spp., para plantaciones a gran escala, programas de saneamiento y cuarentena o para la indexación efectiva de virus (Tanne *et al.*, 1993, Pathirana y Mckenzie, 2005). El éxito del microinjerto, es dependiente y muy influenciado por la fuente del scion aunque no tiene un efecto marcado. La manipulación hábil de las condiciones de las plantas microinjertadas es la clave para conservar la viabilidad *ex vitro* e *in vitro*. Además de esto, el microinjerto también encuentra uso en el estudio básico de la incompatibilidad del injerto, la fisiología de la unión del injerto y envejecimiento vegetal (Navarro, 1988). Esta técnica también encuentra aplicación en variedades de vid cultivadas que son difíciles de enraizar. El mayor costo en la propagación de plantas por cultivo de tejidos es el trabajo manual para la automatización.

Para la vid los trabajos más importantes que se han llevado a cabo para la obtención de plántulas microinjertadas *in vitro* es lo reportado por Cantos y Troncoso, (1995) estudiaron la adaptación *in vitro* del injerto por hendidura tradicional en el campo de las plantas de vid. Cultivaron *in vitro* ápices (0,3 mm) de los portainjertos de 110- Richter, 49 Couderc, las plantas de rizoma obtenidas *in vitro* se dividieron con un escalpelo, produciendo una pequeña hendidura donde se insertó un explante con brotes de los cultivares. El conjunto (injerto) fue nuevamente cultivado *in vitro*, la evolución de la unión injertada fue seguida por la observación de muestras correlativas en microscopios ópticos y electrónicos

encontrando que la curación del callo ocurrió durante los primeros seis días y la unión vascular entre los 8 y 12 después del injerto.

Rodrigo *et al.*, (2006) Implemento la técnica de microinjerto *in vitro* de meristemos apicales de dos variedades productoras de vid; Moscatel Alejandría y Cabernet Sauvignon sobre patrones de injerto: 99 y 110 Ritcher en medio (Murashige y Skoog) y (Chee y Pool). En la etapa de microinjertación obtuvieron un rendimiento un 40% en promedio.

Pathirana y Mckenzie (2005) En contraste con la técnica descrita por Tanne *et al.*, (1993), no envolvieron en el injerto el ápice y el patrón solo están cuidadosamente unidos y solo cuando la humedad del recipiente de cultivo es inherentemente alta. Sin embargo, si el ápice no encaja correctamente en el patrón, sugieren sumergir el extremo inferior del ápice en el medio antes de colocarlo ayuda a establecer el injerto, probablemente para mantener las superficies cortadas húmedas hasta que se establezca la humedad relativa del recipiente. Después del cierre y suministrando nutrientes directamente al lugar del injerto. Los injertos exitosos forman callos en la unión de injertos en unos pocos días y siguen creciendo, con nuevo rizoma y brote del ápice. Encontramos que alrededor del 80% de los microinjertos son exitosos; no hubo diferencias significativas entre las combinaciones de rizoma y ápice que probaron

En el cultivo de meristemos para la erradicación de patógenos, Por lo tanto, es importante eliminar los consejos sobre meristemos tan pequeños como posible para el cultivo y la regeneración *in vitro* para garantizar su libertad de virus y fitoplasmas. (Wang *et al.*, 2011).

Se han realizado numerosos intentos para generar variedades resistentes pero han tenido un éxito limitado. Para superar esto, se han desarrollado varios métodos para certificar el estado fitosanitario o de las enfermedad de las vides, como (a) serológico (b) molecular (c) injerto leñoso (Martelli *et al.*, 1993) y (d) microscopía electrónica inmunoabsorbente, electroforesis en gel de poliacrilamida secuencial para viroides, análisis de dsRNA e hibridación de ácidos nucleicos.

Como solución para el saneamiento surgió la idea de injertar meristemas o ápices caulinares en portainjertos resistentes para obtener vides libres de infecciones virales.

El injerto *in vitro* de ápices caulinares, también llamado microinjerto, consiste en injertar asépticamente una pequeña punta de vástago en un rizoma de plántulas *in vitro*. Se desarrolló inicialmente para obtener plantas de cítricos libres de virus (Navarro *et al.*, 1975) y tiene muchas ventajas sobre otros métodos para obtener plantas sanas. Actualmente, se usa habitualmente en muchos países para mejorar la variedad de los cítricos y también para el intercambio de germoplasma (Navarro *et al.*, 2002). La aplicación del microinjerto en un programa de saneamiento para recuperar plantas de almendra y melocotón libres de virus se desarrolló en la década de 1980.

La metodología propuesta por Mhatre y Bapat (2007) se tomó en cuenta para desarrollar una técnica de microinjertación más práctica para la aplicación en la obtención de plántulas microinjertadas a gran escala para su producción en campo, ellos propusieron la unión de un injerto nodal del cultivar sobre los portainjertos decapitados los cuales se cortan longitudinalmente con una navaja estéril y afilada, que produce una pequeña hendidura longitudinal (2–4 mm). Un segmento apical apropiado con un solo nodo y una hoja puede ser seleccionado para que coincida con el tamaño del patrón. La parte basal del tallo del segmento apical debe cortarse de forma que la cuña formada coincida con la hendidura del patrón. Después de la inserción del segmento apical en la hendidura del patrón, se envuelve con papel aluminio estéril para sostener el injerto también se puede intentar fortalecer y apoyar el injerto. Sin embargo, para lograr esto es laborioso y consume mucho tiempo en condiciones asépticas.



3. JUSTIFICACIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) se caracteriza por su alto valor económico. Zacatecas y Aguascalientes ocupan el cuarto lugar a nivel nacional en la producción de uva (SIAP, 2018). La problemática actual de plantaciones comerciales que utilizan la siembra a pie franco de variedades de vid es la susceptibilidad a enfermedades y la sensibilidad a las malas condiciones medioambientales y del suelo, que conducen a la disminución en la productividad total del cultivo. Por lo anterior es indispensable utilizar plantas seleccionadas (*Vitis* spp.) que toleran dichas condiciones específicas de cada región, denominadas portainjertos utilizados como raíces que permiten manifestar el máximo potencial de las variedades productoras. No obstante existe el riesgo de incidencias de enfermedades de la forma convencional que se lleva el injerto, si alguno de los materiales tiene algún patógeno sólo crecerán plantas enfermas.

Es necesario que el material de multiplicación obtenido para el establecimiento de nuevos cultivos esté libre de patógenos, conserven las características deseadas a través de su estatus clonal, preservando la calidad de la especie y no dependa de la estacionalidad. Así la biotecnología vegetal ofrece una alternativa real para la resolución de problemas relacionados con los requerimientos de este tipo de plantas, recurriendo a la micropropagación. Esta técnica, además de facilitar la propagación de las plantas en forma masiva, permite generarlas libres de patógenos. Un sistema de este tipo se ve reforzado por la capacidad de injerto bajo condiciones estériles en cultivo *in vitro*, donde el entorno del injerto puede ser cuidadosamente controlado y manipulado

El desarrollo de la técnica de microinjertación *in vitro* permitió la obtención de plantas asépticas, con potencial para su aplicación en programas de certificación y su introducción como herramienta biotecnológica para la viticultura de la región Centro-Norte de México.

3.1 HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

Es posible multiplicar *in vitro* tanto variedades comerciales como portainjertos de vid, esto a través del cultivo de segmentos nodales.

Es posible obtener plántulas injertadas de variedades sobre portainjertos comerciales de vid, determinando las condiciones más eficientes para la microinjertación *in vitro*, aclimatación y trasplante a suelo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar un protocolo para microinjertar segmentos apicales de variedades de interés comercial sobre portainjertos de vid, en condiciones *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Establecer cultivos *in vitro* de variedades y portainjertos comerciales de vid.
- 2) Evaluar el medio basal y las concentraciones de fitoreguladores más adecuados para la multiplicación del material vegetal.
- 3) Desarrollar la técnica de microinjertación, de variedades comerciales sobre portainjertos de vid en condiciones *in vitro*.
- 4) Establecer al menos una combinación de plántula injertada (variedad/portainjerto) a condiciones de suelo.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material vegetal

Se seleccionaron brotes laterales de entre 10 a 15 cm de longitud de plantas adultas con apariencia sana, certificadas y establecidas en Casa – Ubon; Antiguo camino a Calvillo S/N Viñedos San Felipe Aguascalientes, Ags., durante los meses de Abril-Mayo, de *V. vinífera* var. Malbec, *V. vinífera* var. Tinta de Toro y *V. vinífera* var. Merlot, se enjuagaron con agua destilada y se transportaron dentro de bolsas plásticas para su procesamiento en el Laboratorio de Cultivo de tejidos, en la Posta Zootécnica, UAA.

Para los genotipos de *Vitis* spp. utilizados como portainjertos se seleccionaron brotes de 15 a 20 cm. de longitud, para SO4 y 110-Ritcher, colectados de plantas adultas establecidas en la Unidad Académica de Agronomía de la UAZ, ubicada en la comunidad de Cieneguillas en el municipio de Zacatecas, Zac., durante los meses de Agosto-Septiembre, llevando acabo la misma metodología de traslado que las variedades. El material vegetal complementario de los genotipos Dog Ridge, Rupestris du Lot y la var. Crimson fueron tomados de cultivos *in vitro* del banco de germoplasma del Laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales de la Posta Zootécnica, UAA. Anexo 1.

5.2 Desinfección y establecimiento *in vitro* de cultivos asépticos.

Los brotes de crecimiento activo obtenidos de campo se lavaron con detergente Dermocleen® (ingrediente activo Cloruro de benzalconio) y se enjuagaron vigorosamente en varias ocasiones con agua corriente. La desinfección continuó con una solución al 20%, v/v de Cloralex® adicionado con 2 gotas por cada 100 ml. de Tween® 80 (Polyoxietilensorbitán) durante 15 min. Posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Explantes

que contenían una yema lateral, 0.5 cm del entrenudo basal y 0.2 cm del entrenudo superior, se colocaron en posición horizontal en medio de cultivo MS modificado por Chee y Pool (1987) Anexo1, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.25 mg L⁻¹ de Benciladenina (BA) el pH se ajustó a 5.8 y se solidificó con 7.0 g L⁻¹ de agar. Los recipientes, se incubaron a 26°C, bajo condiciones de fotoperiodo 16/8 horas (luz/oscuridad) a 54 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica. Las observaciones se realizaron después de dos semanas de su inoculación, determinando el porcentaje de desinfección. Para fines prácticos del manejo en la investigación, se les asignó un acrónimo de identificación a las variedades y portainjertos de vid.

Tabla 1. Acrónimos asignados para la identificación de variedades y portainjertos de vid, introducidos a cultivos *in vitro*.

Acrónimo	Cultivar (Variedad/Portainjerto)
Ma	var. Malbec
Tt	var. Trempanillo
Cr	var. Crimson
RG	var. Red Globe
DR	Dog Ridge
SO4	SO4
RUP	Rupestris du Lot.

5.3 Multiplicación

A partir de cultivos asépticos para el establecimiento *in vitro* se tomaron segmentos nodales, designando por lo menos 30 explantes por tratamiento de multiplicación, optando por realizar una prueba preliminar, con base a lo reportado anteriormente en el trabajo de (Vázquez, 1999- Tesis de Maestría) donde se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

utiliza un medio MS modificado por (Roubelakisy Zivanovitc 1991) Anexo 2, adicionado con 0.2 mg L^{-1} IBA, con 30 g L^{-1} de sacarosa, el pH se ajustó a 6.4 y se solidificó con 7 g L^{-1} de agar. Los recipientes se incubaron a 26°C , bajo condiciones de fotoperíodo 16/8 horas (luz/oscuridad) a $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad lumínica.

5.4 Evaluación de enraizamiento de portainjertos de vid.

Para conocer la respuesta de enraizamiento de los genotipos de portainjertos se obtuvieron segmentos nodales que contenían una yema lateral de 1.0 cm del entrenudo basal y 0.5 cm del entrenudo superior, colocándolas sobre medio MS modificado (Roubelakisy Zivanovitc, 1991), con cuatro diferentes concentraciones del regulador ácido indolbutírico (IBA, mg L^{-1} ; 0.0, 0.1, 0.2, 0.5) adicionado con 20 g L^{-1} de sacarosa, pH de 6.4 y 7.0 g L^{-1} de agar. Los recipientes de cultivo, se incubaron a 26°C , bajo condiciones de fotoperíodo 16/8 horas (luz/oscuridad) a $54 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad lumínica. Por cuatro semanas se observó la respuesta evaluando el porcentaje de enraizamiento y características de la raíz.

5.5 Desarrollo de la técnica de microinjertación *in vitro*.

Se adaptaron y probaron métodos que se realizan como técnica de injerto en campo mediante la unión de un segmento apical de la variedad y un segmento nodal del portainjerto comercial. Se siguió una técnica de unión general como se representa en el siguiente esquema.

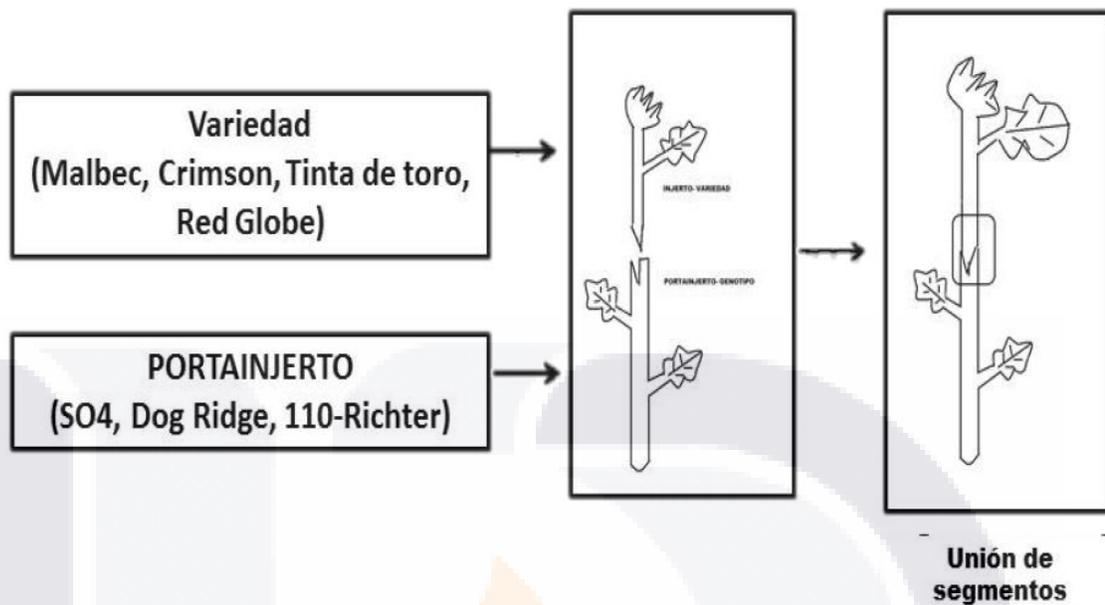


Figura 2. Representación general de la técnica de microinjertación *in vitro*.

Se tomaron segmentos nodales de aproximadamente 3.0 cm para los portainjertos, eliminando las yemas axilares; para las variedades a injertar se tomaron segmentos apicales de 2.0 cm que contenían el ápice, las condiciones de injerto fueron: a) condiciones de corte, los cortes y se realizaron en dos tratamientos de solución antioxidante Ac. Ascórbico/Ac. Cítrico a una concentración de 100 mg L⁻¹ y 500 mg L⁻¹, b) tipo de corte, el portainjerto en forma de “V” y la variedad en púa, c) tipo de unión, se utilizaron clips estériles de 1.6 mm de diámetro, d) condiciones de cultivo, se colocaron sobre medio MS modificado (Roubelakis Zivanovitch, 1991) adicionado con IBA 0.2 mg L⁻¹ más 20 gL⁻¹ de sacarosa y 7.0 g L⁻¹ de agar, a un pH de 6.4, se incubaron a 26°C, bajo condiciones de fotoperíodo 16/8 horas (luz/oscuridad) a 54 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica. Por cuatro semanas se evaluó el porcentaje de prendimiento, enraizamiento del portainjerto y elongación de variedad injertada.

Las combinaciones de injertos como se muestran en la tabla 2, se determinaron de acuerdo al interés agronómico y las características de cada

variedad, como controles se efectuaron homoinjertos, realizando 30 repeticiones para cada injerto.

Tabla 2. Diseño de combinaciones de injertos, de acuerdo al interés agronómico y características de cada variedad productora.

Homoinjertos*
SO4/SO4 (SO4-SO4)
Dog Ridge /Dog Ridge (DR-DR)
Rupestris du Lot /Rupestris du Lot (RUP /RUP)
Combinaciones variedades /portainjertos*
Tinta de toro / SO4 (Tt-SO4)
Crimson/ Dog Ridge (Cr-DR)
Red Globe /Rupestris du Lot (RG-RUP)
Malbec / Dog Ridge (Ma-DR)
Tinta de toro / Dog Ridge (Tt-DR)

*El número total de repeticiones para todos los tratamientos fue un n=30.

5.6 Aclimatación y establecimiento en suelo.

Después de la evaluación de la microinjertación *in vitro* a las cuatro semanas, se extrajeron las plántulas, a las cuales se les lavó la parte radical y se colocaron en recipientes transparentes individuales con una mezcla de sustrato (6:1 turba, agrolita) agregando 0.2 mg L⁻¹ de IBA, 1 gr L⁻¹ de fertilizante Triple 18 y como fungicida 1.0 ml/L de Previcur®, a pH de 6.4 y conductividad eléctrica de (CE) 2.2 ms/cm. Se mantuvieron completamente tapados por 10 días bajo sombra

del 70%, posteriormente se perforaron permitiendo el intercambio gaseoso, pasadas 2 semanas se destaparon por completo transfiriéndolas a macetas individuales agregando tierra de hojarasca y colocándolas en sombra del 50%. Finalmente a las 8 semanas se colocaron a sol directo. Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia y crecimiento de las plantas.

5.7 Análisis de datos.

Durante la etapa I, se registró el porcentaje de desinfección de explantes. No se realizaron pruebas comparativas entre proporciones debido que solo se implementó un método general de desinfección.

En la etapa II, se realizó la multiplicación simple, las variables evaluadas fueron porcentaje de brotación, número de segmentos nodales generados en cada brote y longitud en centímetros del brote. Los experimentos se realizaron completamente al azar, número total de explantes fue de 90 segmentos nodales por tratamiento.

Para la etapa III se evaluó el porcentaje de enraizamiento de los portainjertos, número de raíces por explante y sus características cualitativas. Los experimentos se realizaron completamente al azar.

En la etapa de microinjertación, se evaluó el porcentaje de sobrevivencia del injerto a las 48 horas, el porcentaje de prendimiento, longitud del injerto (variedad) a las 4 semanas y número promedio de raíces por plántula.

Durante la etapa IV, se registró el porcentaje de sobrevivencia a los 15 días y a las 4 semanas, se registró la longitud de la plántula y aspectos cualitativos de desarrollo y crecimiento.

5.8 Detección isotérmica rápida en plantas de vid, por AmplifyRP® Acceler8® (Agdia, Elkhart, EE. UU.) Para el Grapevine red blotch associated virus (GRBaV).

Los kits comerciales de diagnósticos moleculares de virus fueron adquiridos en la casa comercial AGDIA, siguiendo las instrucciones respectivas como lo indica el procedimiento. Se tomaron aproximadamente 300 mg de las hojas de las plantas de vid, se homogeneizaron en una bolsa de extracción de muestras que contenía 3.0 ml del tampón de extracción general (GEB4) (Agdia, Elkhart, EE. UU.). Los gránulos de reacción AmplifyRP® Acceler8™ (patentados) estuvieron presentados como liofilizados que contenían todos los componentes de reacción, un primer 5' terminador, un 3' terminador, un etiquetado de biotina y una sonda interna etiquetada como FAM en un solo tubo de PCR de 200µl. Los fragmentos de ADN específico de GRBaV (amplicones) se produjeron a través de un paso inverso de amplificación por transcripción-recombinasa de la polimerasa (RT-RPA) y escisión en el sitio de residuo básico de THF por una endonucleasa, la reacción se llevó a cabo a temperatura constante de 39 °C. Para realizar la prueba, se colocaron 10 µl de diluyente (PD1) agregando un 1µl de extracto crudo y se mezcló bien. Los tubos se incubaron a 39 °C en un bloque de calor, durante 15 min. Esta mezcla de reacción se aplicó a tiras de detección de amplicones (Agdia, Elkhart, EE. UU.) Los resultados se observaron y registraron dentro de los 20 min.

5.9 Procesamiento histológico de tejidos vegetales de plántulas injertados.

Se tomaron muestras de tallo de la región injertada (1.5 cm) de algunas plántulas microinjertadas, a dos tiempos, cuatro semanas de microinjertación *in vitro* y cuatro semanas después de la adaptación a suelo. Las muestras fueron fijadas con Formol-Ácido acético –alcohol (F.A.A.), durante 48 horas.

Para comenzar con el procesamiento histológico se colocaron las muestras en celdillas de aluminio acopladas en la canastilla transportadora del Histoquinet (LEICA, WAX BATH TP 1020), la metodología estándar consistió en sumergir las muestras en doce cubas por una hora, para su deshidratación se comenzó con alcohol al 70%, alcohol al 80%, posteriormente dos cubas de alcohol al 96% y finalmente dos de alcohol al 100%, el aclaramiento se llevó a cabo introduciendo las muestras por tres cubas con xilol al 100 por ciento. La infiltración con parafina líquida de las muestras se realizó en las últimas dos cubas. Para la inclusión se formaron cubos de parafina, a los cuales se les introdujo las muestras de manera individual, etiquetándolas.

5.9.1 Cortes en micrótopo y tinción de las muestras.

Los cortes se realizaron en un micrótopo de rotación tipo minot marca Leica. Los cortes longitudinales de 10 μm de grosor de los tallos injertados, se adhirieron al portaobjetos, secando a estufa por 24 horas. La desparafinación, hidratación y tinción, se realizó en el tren de tinción con la metodología presentada en el cuadro.

Tabla 3 Protocolo de tinción de cortes histológicos de tejidos vegetales.

Compuesto	Tiempo
Sustituto de Xilol	5 min.
Sustituto de Xilol	5 min.
Xilol: alcohol absoluto (1:1)	3 min.
Alcohol absoluto	3 min.
Etanol al 95%	3 min.
Etanol 70%	2 min.
Safranina	60 min.
Etanol al 95%	1 min.
Etanol al 70%	30 s.
Etanol al 70%	30 s.
Verde rápido	3 min.
Alcohol absoluto	1 min.
Xilol (1:1)	2 min.
Sustituto de xilol	2 min.
Sustituto de xilol	2 min.

A las laminillas teñidas se les colocó el cubreobjetos con resina Cytoseal 60, y se dejaron secar en cámara de extracción por 48 horas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Desinfección y establecimiento *in vitro*.

En el tabla 4 se muestran los resultados de la desinfección para las distintas variedades y portainjertos de vid, evaluados en esta investigación. Se observó resultados mayores al 50% de desinfección en todos los genotipos, este mismo porcentaje se consideró para el grado de supervivencia, ya que no se observaron pérdidas por necrosis resultantes de la desinfección.

Según los datos del tabla 4 el protocolo de desinfección para el caso de los genotipos de portainjertos, mostró porcentajes más bajos que las variedades, el porcentaje menor fue del 35 % para genotipo SO4, considerado un resultado bajo por debajo del porcentaje de aceptación, sin embargo el interés fue obtener al menos una plántula aséptica para su multiplicación. Los porcentajes de desinfección obtenidos para los genotipos; pueden relacionarse a la temporada de colecta realizada en el mes de Agosto, dicha temporada es considerada tardía ya que la mayoría de los brotes presentan daños mecánicos y endurecimiento de tallo, lo que impide la penetración del agente desinfectante, por lo tanto la contaminación principal fueron hongos que crecieron del explante hacia el medio de cultivo, reportado por Almanza, (2011) donde se comprobó que la respuesta *in vitro* es inferior cuando el establecimiento es durante el Otoño. La condición fisiológica de la planta madre tiene una marcada influencia en la respuesta de cultivo *in vitro*, como se manifiesta en los diferentes resultados. Esta influencia ha sido comentada por autores como (Botti *et al.*, 1993). Sin embargo existe diferencias sobre la mejor temporada para establecer un cultivo *in vitro*.

Tabla 4 Desinfección de cuatro variedades de vid y dos portainjertos para su introducción al cultivo *in vitro*.

Variedad/ Genotipo	No. de explantes totales	No. de explantes contaminados (%)*	Porcentaje de desinfección (%)
Tinta de toro	55	6	89
Malbec	32	7	78
Merlot	27	2	92
Red Globe	48	19	60
SO4	24	18	35
110-Ritcher	33	16	52

*Los resultados se tomaron de 10 a 15 días después de la inoculación de los explantes, posterior a la desinfección.

Se considerando brotes únicos mayores a 1 cm y los resultados se muestran en la tabla 5; se realizó un tratamiento control en ausencia de BA, reportando una brotación alrededor de 10%, en comparación con los porcentajes registrados utilizando la concentración descrita en un trabajo previo (Vázquez, 1999- Tesis de maestría) se confirmó que existe una viabilidad más alta al utilizar la citocinina induciendo un porcentaje de brotación mayor hasta del 88% para el genotipo 110-Ritcher, continuando con un con 68% para la var. Red Globe, sin embargo para la var. Merlot fue muy bajo, la literatura ha definido medios y condiciones de cultivo estándares para la propagación *in vitro* de muchas especies (Melyan *et al.*, 2015); los factores que suelen estar relacionados con la respuesta puede ser la variedad utilizada , el genotipo, el medio de cultivo (Valdez, 2005) o los reguladores de crecimiento vegetal (Nookaraju *et al.*, 2008) se han probado numerosos tipos de citocininas para la micropropagación de vid (Monette 1988) en la mayoría de las investigaciones, la Benciladenina ha demostrado los mejores resultados, el medio con macro y micronutrientes descritos por Chee and Pool (1982), fue el medio desarrollado para mejorar la multiplicación de brotes de vid;

esta formulación tiene niveles reducidos de cloruro, yoduro y manganeso en comparación con el MS, el cloruro de calcio fue reemplazado por nitrato de calcio en donde se han reportado los mejores resultados en comparación con otras formulaciones para cultivares de vid. Por lo tanto es posible que la variedad Merlot se comporte de manera distinta, necesitando una formulación de medio específica, por consiguiente fue descartada y no se utilizó en las etapas siguientes de la investigación.

Tabla 5. Establecimiento *in vitro* de variedades de interés productivo y genotipos de portainjertos de interés agronómico.

Variedad/ Genotipo	No. de explantes totales	No. de explantes con un brote ($< 1\text{cm}$)*	Porcentaje de brotación (%)
Tinta de toro	25	17	65
Malbec	25	10	41
Merlot	25	4	16
Red Globe	25	18	68
SO4	4	2	50
110-Ritcher	17	15	88

*Los resultados se tomaron de 22 a 30 días después de la inoculación de los explantes.

A los 45-60 días se tenían ya brotes de 1 a 5 cm, las variedades Tinta de toro y Malbec, mostraron (Figura 3) brotes diferenciados y de aspecto normal, se observaron diferencias cualitativas con los brotes de los portainjertos que se mostraron delgados con un crecimiento inferior y poca pigmentación. Otros autores (Martínez y Tizio, 1989) han reportado que la eficiencia de brotación está altamente condicionada por el genotipo o cultivar.

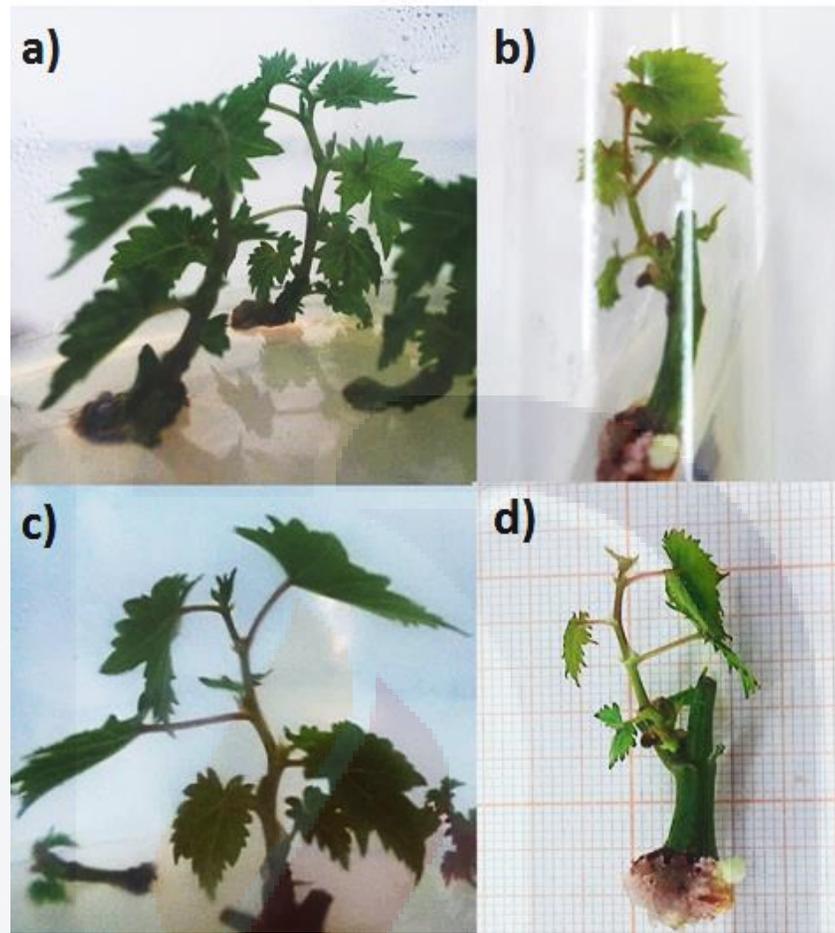


Figura 3. Establecimiento *in vitro* de explantes de variedades y portainjertos de vid. Brotes asépticos de a) Tinta de toro, b)SO4, c) Malbec, d) Red Globe, sobre medio Chee y Pool adicionado 0.25 mg L-1 de BA, después de 6 semanas de cultivo.

6.2 Desarrollo de un sistema eficiente de multiplicación *in vitro* para variedades y portainjertos de vid.

El desarrollo de los brotes se produjo a partir de las yemas axilares presentes en los explantes (Figura 6) produciendo la elongación y diferenciación de tallos, desarrollando una multiplicación de brotación única, registrando las variables de crecimiento en tabla 6.

Según los datos de la tabla 6 la utilización del medio modificado por Roubelakis y Zivanovic, (1991) indujo respuestas semejantes de enraizamiento y brotación secuencial de segmentos nodales, generando rizogénesis y elongación de los brotes en la mayoría de los genotipos probados, definiendo una formulación eficiente para la respuesta general sin importar el genotipo. Para la variable de número de segmentos nodales por brote, el promedio mayor se produjo en la variedad Malbec con 8.18 ± 3.09 . Sin embargo, según la prueba Tukey este promedio no difirió de manera significativa en comparación con el promedio para otras variedades como Tinta de toro (8.07 ± 2.44) o genotipo como Dog Ridge (7.5 ± 1.73), pero sí mostró diferencias significativas con variedades como Red Globe (5.89 ± 1.96) y el genotipo Rupestris du Lot (5.8 ± 1.52). Los resultados obtenidos muestran que la composición de sales fue crucial para estimular la brotación, elongación crecimiento y desarrollo del brote nuevo, influyendo en el número de yemas axilares. Esto resultó de gran importancia para la etapa de propagación ya que a través de subcultivos sucesivos de segmentos nodales de los brotes desarrollados según lo descrito por Castro, (1999) es uno de los efectos favorables de explantes con meristemos axilares preexistentes y una de las estrategias biotecnológicas que más han contribuido a la propagación clonal de especies forestales. La multiplicación puede realizarse partiendo de un explante uni o binodal con o sin hoja, fue lo descrito por Guerrero *et al*, 2010, para la micropropagación de portainjertos.

Tabla 6 Cuantificación de diferentes parámetros de crecimiento y multiplicación para explantes nodales de variedades y portainjertos de vid, establecidos en MS modificado (Según Roubelakis y Zivanovitch, 1991) adicionado con 0.2 mg L⁻¹, después de 8 semanas de incubación.

Variedad/Genotipo	Porcentaje de brotación (%)	Altura(cm) /brote (media)	Segmentos nodales/ brote (Media ± d. e.)
Crimson	90	8.6	6.43 ± 1.67 ab
Tinta de toro	84	9.9	8.07 ± 2.44 a
Malbec	73	10.2	8.18 ± 3.09 a
Red Globe	63	7.7	5.89 ± 1.96 c
110-Richter	90	9.1	7.44 ± 2.25 ab
SO4	100	9	6.75 ± 2.62 ab
Dog Ridge	95	9.7	7.5 ± 1.73 ab
Rupestris du Lot	98	8.8	5.8 ± 1.52 c

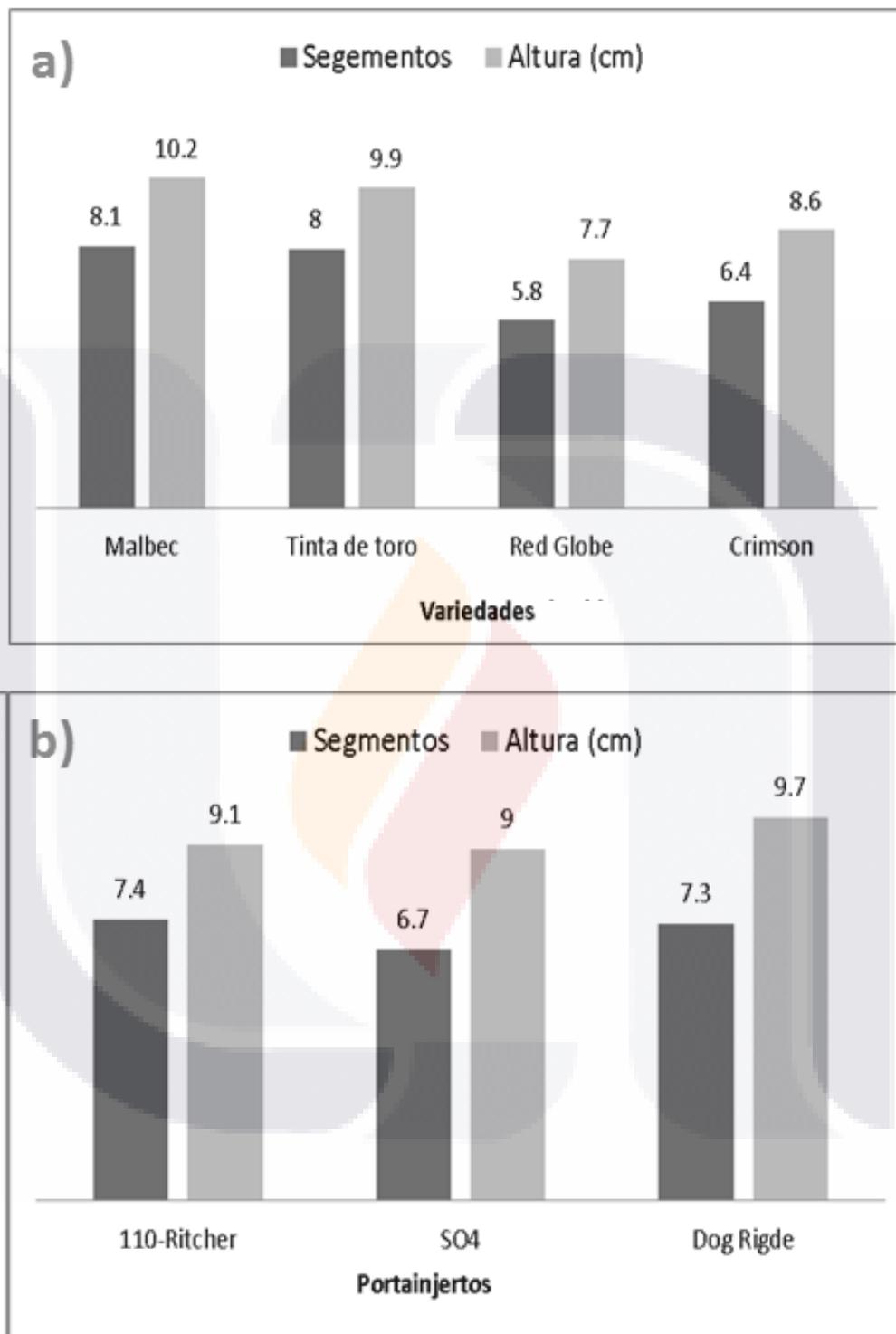


Figura 4. Crecimiento expresado en altura (cm) y número promedio de segmentos nodales por brote de a) variedades, b) genotipos de portainjertos de vid, después de 8 semanas de cultivo.

En el presente trabajo, los resultados obtenidos en la etapa de multiplicación permiten afirmar que la formulación de medio de cultivo y la adición de auxina, produce una rizogénesis y la brotación simultánea del segmento que contiene la yema axilar, teniendo un efecto favorable al incrementar de forma significativa el número de segmentos nodales por brote y su altura; como se muestra en la Figura 4, el promedio mayor de segmentos nodales por brote fue de 8 para las variedades Malbec y Tinta de toro y una altura del brote 10 cm , mientras que los promedios más bajos fueron 5 y 6 segmentos nodales por brote para Crimson y Red Globe, en el caso de los portainjertos no hubo diferencias significativas en el número promedio de segmentos nodales por brote ni en la altura.

Las plántulas de variedades y genotipos de portainjertos de vid (Figuras 5 y 6), mostraron en general un aspecto normal, vigoroso, con tallos engrosados y pigmentados, las hojas presentaron un desarrollo anatómico y fisiológico adecuado, debido a la pigmentación, firmeza y pubescencia, se observaron muy pocas hojas basales con necrosis en las orillas y algunas vitrificaciones. Sin embargo para ambos casos la respuesta más importante fue la elongación del tallo y formación de segmentos nodales, considerando resultados homogéneos para variedades y portainjertos.

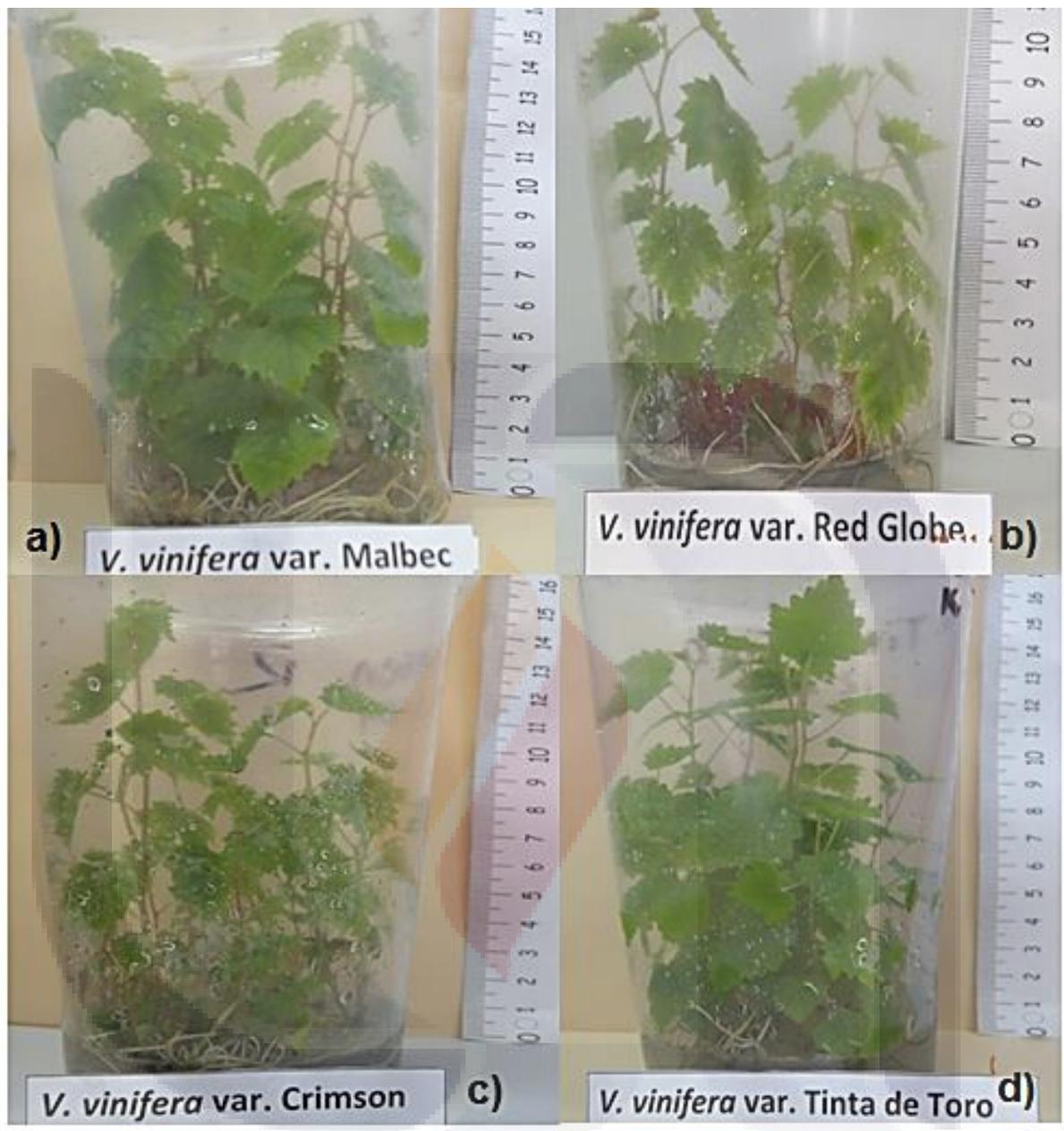


Figura 5. Efecto del medio MS modificado según Roubelakisy Zivanovitc, (1991) adicionado con 0.2 mg L^{-1} sobre el crecimiento de segmentos nodales de variedades de *V. vinifera* a) Malbec b) Red Globe c) Crimson d) Tinta de toro, durante 8 semanas de cultivo.

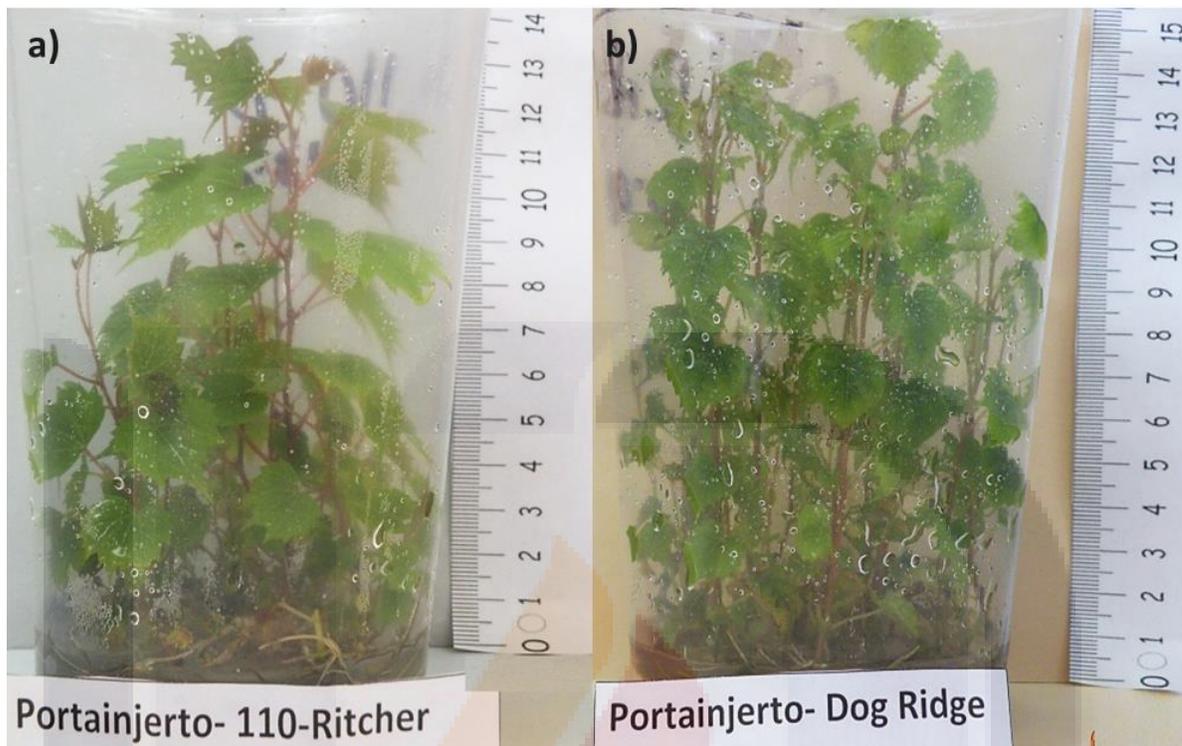


Figura 6. Efecto del medio MS modificado según Roubelakisy Zivanovitch, (1991) adicionado con 0.2 mg L^{-1} sobre el crecimiento de segmentos nodales de portainjertos de vid a) 110- Ritcher b) Dog Ridge, durante 8 semanas de cultivo.

El uso de segmentos nodales que contienen una yema axilar como explante es común en la multiplicación *in vitro* para protocolos de diferentes especies y variedades, ya que proporcionan estabilidad genética y solo requieren la inducción de crecimiento del brote preformado, que contienen todos los elementos de una plántula (Martin, 2013). Después del enraizamiento del nuevo brote formado, el buen desarrollo de las plántulas confirma la idea de utilizar estos brotes como punto de partida para llevar a cabo sucesivos ciclos de propagación.

6.3 Enraizamiento de portainjertos.

Para esta etapa el genotipo no influyó en el porcentaje de enraizamiento *in vitro*, ya que para todos los genotipos se obtuvieron alrededor del 80% de explantes con al menos una raíz. Los datos registrados en la Figura 8 muestran que la presencia de IBA en el medio de cultivo incrementa el número promedio de raíces al compararse con el tratamiento control. El promedio del número de raíces por explante observados en esta fase para todos los genotipos de portainjertos se muestran en la Figura 8.

El genotipo SO4, la diferencia estadísticamente significativa se observó para el T2 con la concentración de 0.2 mg L^{-1} la cual indujo la formación de raíces desde el tallo sin formación de tejido calloso intermedio y un promedio de $5 \pm .09$ raíces por plántula.

El genotipo Rupestris du Lot mostró diferencias significativas entre las concentraciones 0.1 mg L^{-1} y las de 0.2 y 0.5 mg L^{-1} de IBA, resultando estas últimas las de mayor promedio de raíces por plántula con $3 \pm .01$ con buen aspecto cualitativo.

Para el genotipo Dog Ridge la diferencia significativa para las concentraciones de auxinas se observó para el T3 correspondiente a 0.5 mg L^{-1} , con un número promedio de $6 \pm .05$ raíces por plántula, considerando el T1 con la concentración de 0.1 mg L^{-1} con un número promedio de $4 \pm .04$ raíces por plántula.

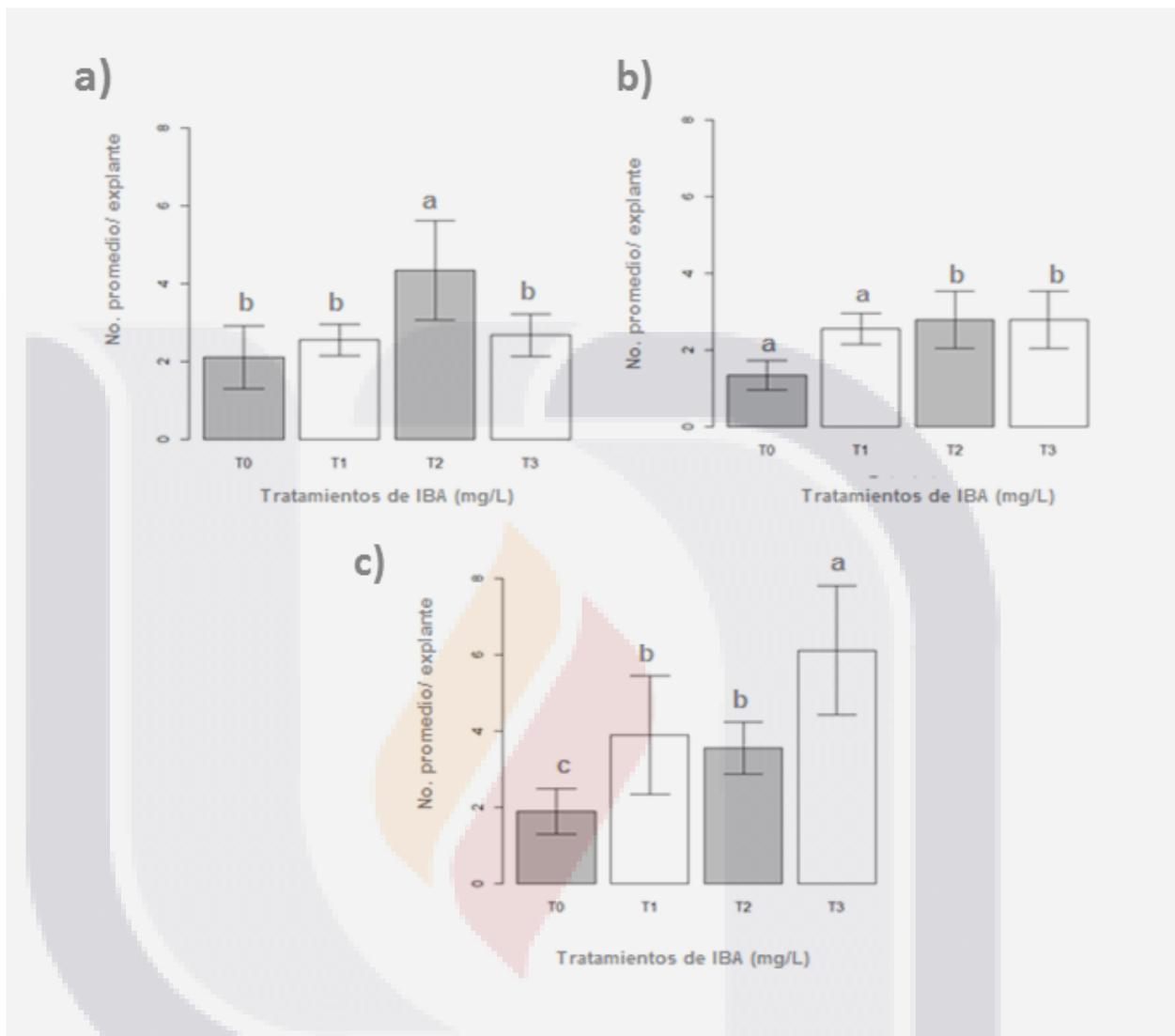
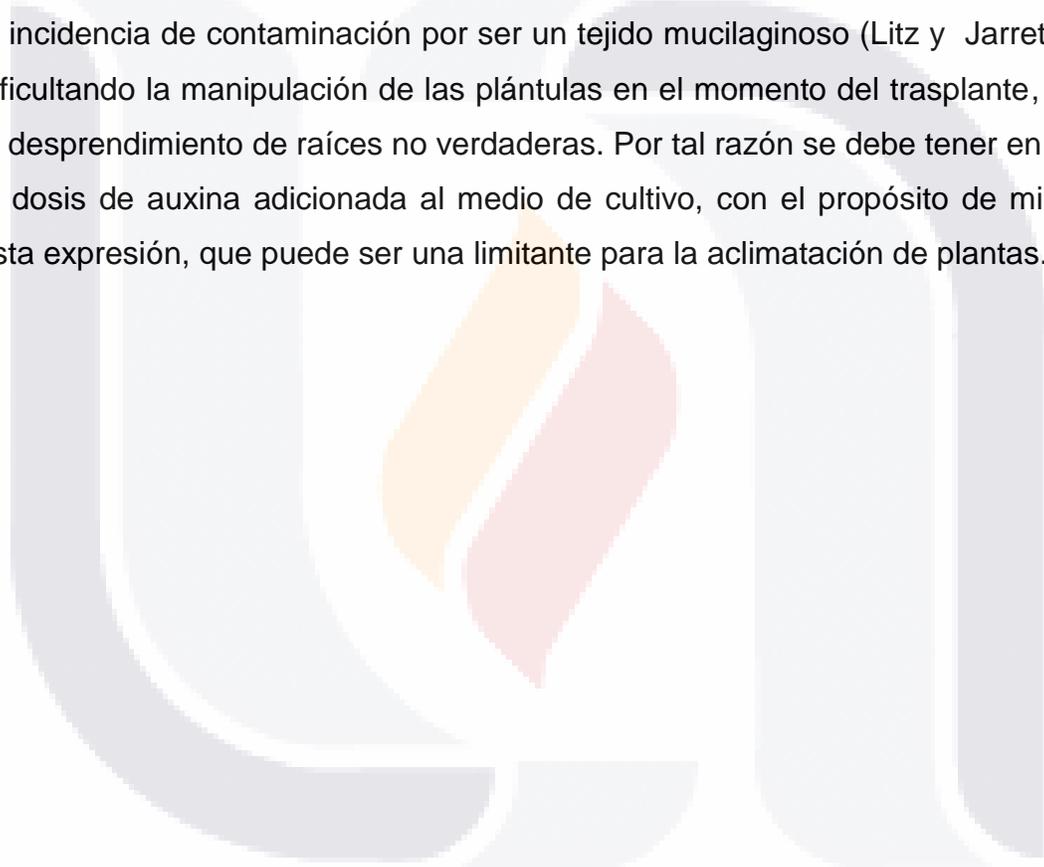


Figura 7. Efecto sobre la inducción y formación de raíces de diferentes concentraciones de IBA, T0-0.0 mg L⁻¹, T1-0.1 mg L⁻¹, T2-0.2 mg L⁻¹, T3-0.5 mg L⁻¹; en portainjertos de vid SO4 (a), Rupestris du Lot (b) y Dog Ridge(c).

El enraizamiento de los segmentos nodales se logró en todos los tratamientos con auxinas, incluso en el control sin presencia del fitoregulador, el enraizamiento de los genotipos de portainjertos se logró en promedio a los 10 días. En la Figura 7 se muestran las respuestas producidas en la formación de

callo por las diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) utilizado como regulador para el enraizamiento de los portainjertos de gran importancia agronómica para nuestra región.

La Figura 7 muestra que al incrementarse las concentraciones de auxina, se incrementa la formación de callo entre el tallo y las raíces, aspecto cualitativo no deseado ya que este tejido no es deseable en la etapa de enraizamiento, por diversos factores negativos que se promueven con su presencia, uno de ellos es la incidencia de contaminación por ser un tejido mucilaginoso (Litz y Jarret, 1993) dificultando la manipulación de las plántulas en el momento del trasplante, ya que el desprendimiento de raíces no verdaderas. Por tal razón se debe tener en cuenta la dosis de auxina adicionada al medio de cultivo, con el propósito de minimizar esta expresión, que puede ser una limitante para la aclimatación de plantas.



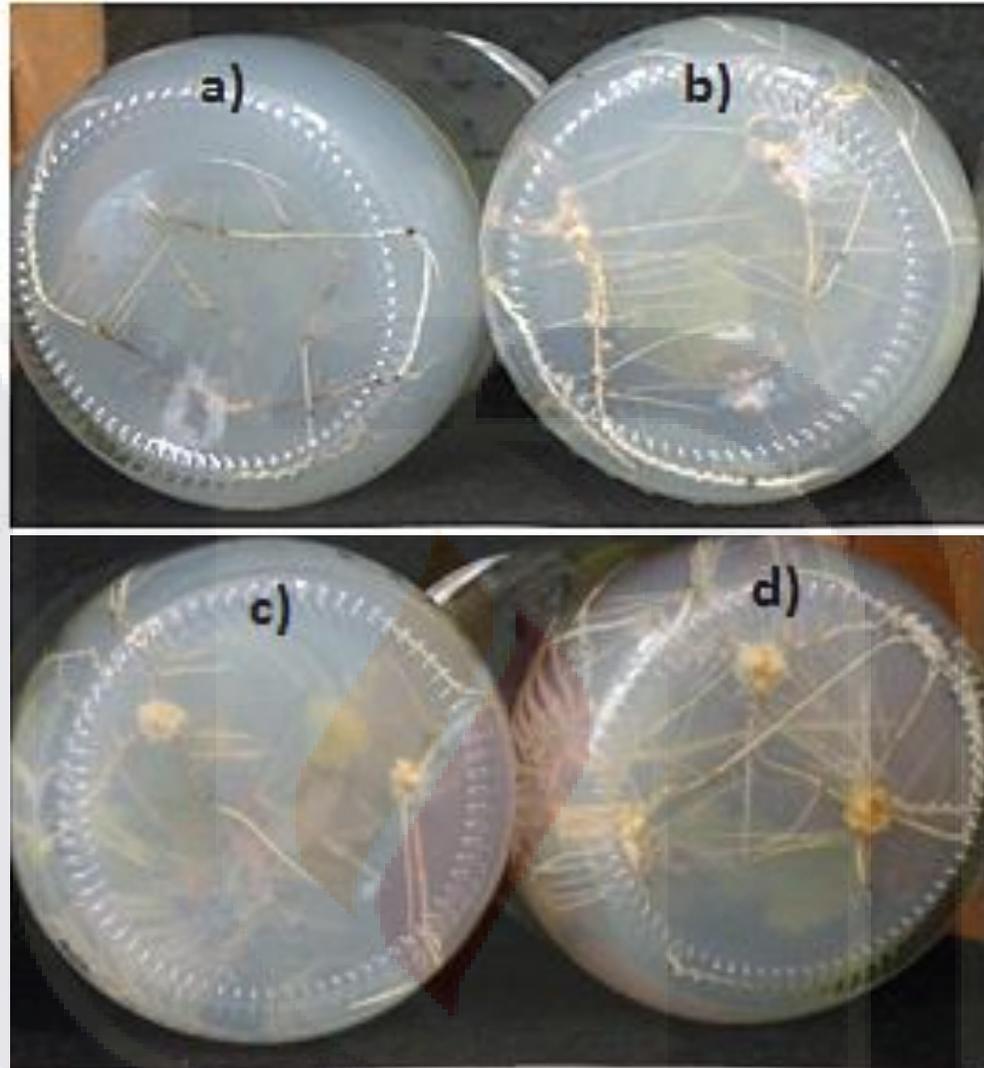


Figura 8. Aspectos cualitativos de las raíces de genotipos de *Vitis*, inducidas por diferentes concentraciones de IBA, a) 0.0 mg L⁻¹, b) 0.1 mg L⁻¹, c) 0.2 mg L⁻¹, d) 0.5 mg L⁻¹, durante 4 semanas de cultivo.

Se debe tomar en cuenta durante la formación de raíces, la presencia de callo en la base de los tallos, ya que este tiende a dificultar el proceso de toma de nutrientes, ocasionando efectos negativos, afectando su crecimiento y sobrevivencia *ex vitro*. Los aspectos cualitativos de las raíces se observan en las Figuras 8 y 9 donde las plántulas mostraron en general, un aspecto vigoroso,

normalmente diferenciado, tallos de buen grosor, endurecidos y hojas expandidas. La concentración más alta (0.5 mg L^{-1}) para el portainjerto Rupestris du Lot, generó como respuesta la formación de callo intermedio entre el tallo y las raíces lo que origina el fácil desprendimiento de estas, mostrando defectos anatómicos de las raíces, como engrosamientos y deformaciones, lo que no es ideal en esta etapa.

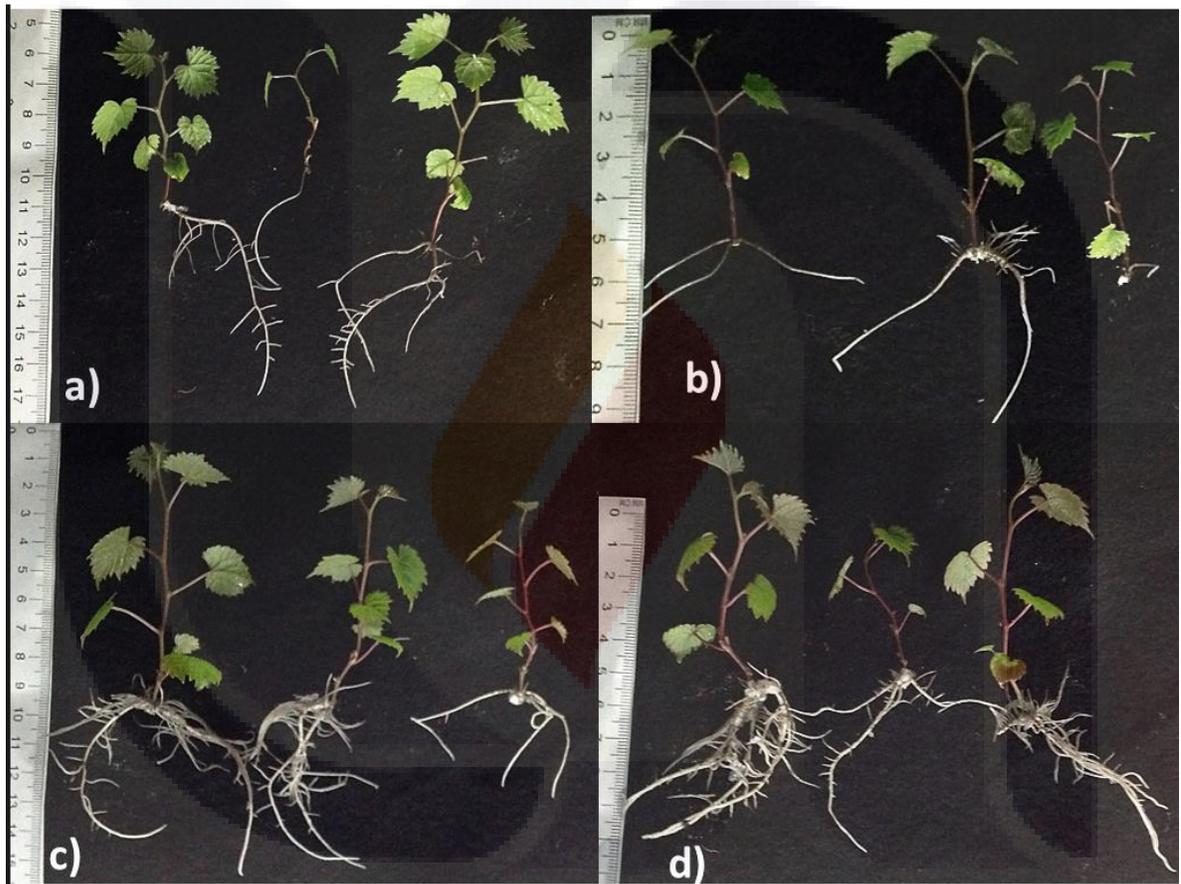


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de la auxina IBA sobre segmentos nodales con una yema axilar y la formación de plántulas completas del portainjerto Rupestris du Lot (IBA mgL^{-1} , a) 0.0, b) 0.1, c) 0.2 y d) 0.5, después 4 semanas de cultivo



Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de la auxina IBA sobre segmentos nodales con una yema axilar y la formación de plántulas completas del portainjerto Dog Ridge (IBA mgL^{-1} , a) 0.0, b) 0.1, c) 0.2 y d) 0.5, después 4 semanas de cultivo.

Las raíces que mostraron mejor morfología y aspecto cualitativo (Figuras 9 y 10) fueron las que presentaron una estructura delgada, sin ramificaciones laterales y de menor longitud, así como un crecimiento directo del tallo, sin callo intermedio, infiriendo que una concentración baja de auxina produce tales respuestas, como es en el caso de la Figuras 9a y 9b para el control y la concentración de 0.1 mg /L de IBA. Otros autores mencionan en trabajos previos habían propuesto el uso de medio MS con a la mitad, para enraizamiento de

diferentes genotipos del género *Vitis*, suplementado con auxinas, obteniendo siempre las mejores respuestas de enraizamiento (Novak y Jukova, 1983). Mhatre *et al.* 2007 Proponen para las variedades de *Vitis vinífera* (Thompson seedles, Sonaka y Tas-e-Ganesh) el medio líquido de MS con la mitad de concentración de macros y micronutrientes (MS ½) como un medio adecuado para el enraizamiento de brotes alargados de vid sobre puente de papel. Sin embargo, estos autores no cultivan directamente los segmentos uninodales en este medio sino que para la obtención de plantas completas realizan tres etapas previas (iniciación, multiplicación y alargamiento) en tres medios distintos, hasta conseguir brotes alargados que hacen enraizar con 0.1 mg.L^{-1} de ácido indol-3-acético (AIA).

6.4 Desarrollo de la técnica de injerto *in vitro*.

La eficiencia de microinjertación *in vitro*, se evaluó con la sobrevivencia de injertos a las 48 horas después del corte y unión, el porcentaje de prendimiento y el porcentaje de plántulas microinjertadas obtenidas después de cuatro semanas en cultivo *in vitro* se evidencian en la Figura 11.

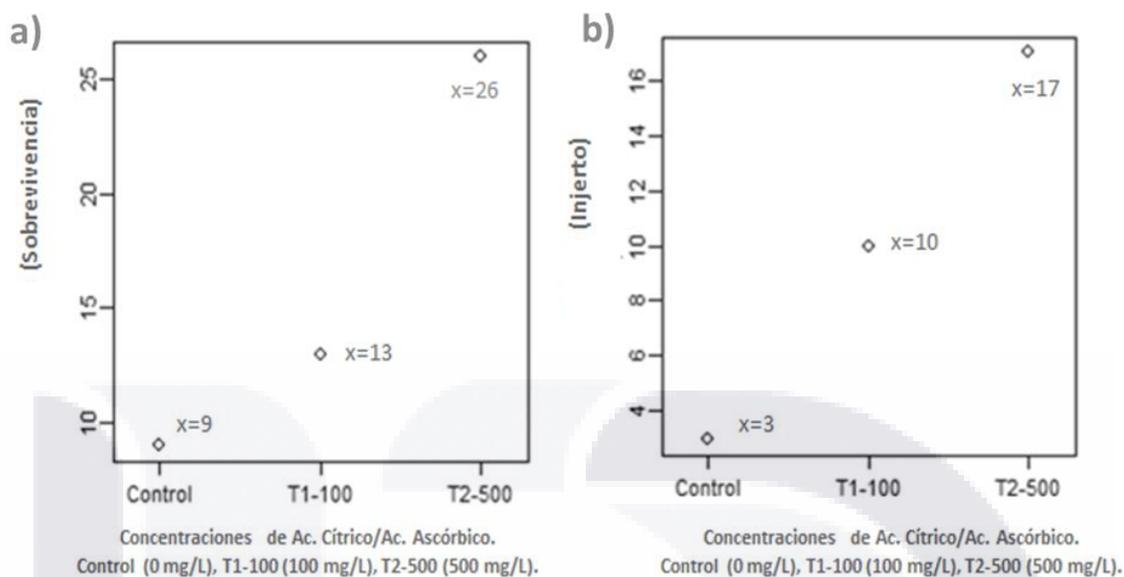


Figura 11. Efecto de Ac. Cítrico + Ac. Ascórbico, sobre la sobrevivencia de injertos (a) a las 48 horas después de la microinjertación y sobre la unión del injerto (b) a las 4 semanas de realizada la microinjertación.

Según el diagrama de puntos, el incremento de la concentración de antioxidante indujo una mejor respuesta de sobrevivencia del injerto a las 48 horas de realizado el microinjerto, propiciando un mayor número de plántulas microinjertadas (Figura 11b) después de cuatro semanas de cultivo en medio modificado, adicionado con 0.2 mg L^{-1} de IBA. Resultados que corroboran lo descrito por Jiménez, (1999) como prácticas comunes para contrarrestar la oxidación fenólica se encuentran la adición de soluciones antioxidantes, medios líquidos en sustitución de medios gelificados para diluir metabolitos tóxicos y cambios en el nivel de sacarosa.

Se mostró un bajo porcentaje de sobrevivencia del injerto y de plántulas injertadas en el tratamiento control sin solución antioxidante, en comparación con el tratamiento el cual consistió en la adición de 500 mg L^{-1} de ácido cítrico/ácido ascórbico, en el cual se obtuvieron 26 injertos vivos y turgentes a las 48 horas, después de 4 semanas después de la microinjertación se obtuvieron 17 plántulas microinjertadas, por lo tanto se infiere que el antioxidante influyo en la

sobrevivencia del tejido al corte, lo que es respaldado por George, (1993) que afirma que la producción de compuestos fenólicos en la superficie del explante después de realizado un corte o herida produce senescencia o muerte de algunas células repercutiendo en el reconocimiento celular y formación de células cicatrizantes.

. En la Tabla 7 se muestran los resultados para los homoinjertos de los genotipos referenciados como tratamiento control, se evaluó su porcentaje de prendimiento, en dos de los homoinjertos fue mayor al 60%, considerado aceptable para el éxito de la técnica, sin embargo para uno de los genotipos de portainjertos el porcentaje fue bajo, esto indica que el genotipo SO4 no presentó las mismas condiciones de unión, crecimiento y engrosamiento que el Dog Ridge y Rupestris du Lot.

Tabla 7 Eficiencia de la técnica de microinjertación *in vitro*, sobre homoinjertos, mostrados como tratamiento control, después de 4 semanas de incubación.

Homoinjertos	Microinjertos totales	Porcentaje de prendimiento
Dog Ridge /Dog Ridge	15	67
Rupestris / du Lot	15	79
SO4/ SO4	15	20

La experiencia en los homoinjertos indicó la modificación de aspectos técnicos y destreza manual en el desarrollo de la microinjertación de manera que se asegure un mayor contacto íntimo entre variedad y portainjerto evitando la separación física entre ambos, que impediría que tras la proliferación celular y la diferenciación de células del xilema se establezcan conexiones que aseguren el aporte de agua y nutrientes a la variedad y permitan el prendimiento del injerto (García *et al.*, 2010).

De las combinaciones de microinjertos de interés agronómico realizadas en este estudio entre variedad y portainjerto, se registró su porcentaje de prendimiento después de 4 semanas de cultivo y los resultados se muestran en la Tabla 8, para todas las combinaciones el porcentaje de prendimiento fue mayor al 50%, lo que sugiere un éxito en el desarrollo de la técnica.

Tabla 8 Eficiencia de la técnica de microinjertación *in vitro*, sobre las combinaciones de variedades comerciales y portainjertos de interés agronómico, después de 4 semanas de incubación.

Combinación	Microinjertos totales	Porcentaje de unión
Crimson / Dog Ridge (Cr-DR)	30	65
Tinta toro / Dog Ridge (Tt-DR)	30	78
Malbec / Dog Ridge (Ma-DR)	30	84
Red Globe / Rupestris du Lot (RG-RUP)	30	75
Tinta de toro / SO4 (Tt-SO4)	30	55

La eficiencia de microinjertación *in vitro* fue muy variable entre combinaciones, siendo el mayor Malbec/Dog Ridge, seguido por Tinta toro/ Dog Ridge y Red Globe /Rupestris du Lot, con un porcentaje de prendimiento de 84,78 y 75% respectivamente. Porcentajes superiores de la técnica implementada por Rodrigo *et al.*, 2006, donde le trabajo bajo una técnica de microinjerto *in vitro* de meristemas apicales de dos variedades productoras, obteniendo porcentajes de prendimiento del 40%porcentajes que pueden variar dependiendo del tamaño de explante microinjertado, utilización de plantas etioladas y destreza manual.



Figura 12. Plántula microinjertada *in vitro* de la variedad Tinta de toro sobre Dog Ridge, acercamiento del área de unión (unión en “V” y púa) del injerto, después de 4 semanas de cultivo.

Una de las combinaciones con mayor eficiencia de microinjertación fue la var. Tinta de toro sobre Dog Ridge mostrada en la Figura 12, donde se exhibe el área de unión observando las respuestas en el tejido, manifestando un aspecto normal, tejidos turgentes y pigmentación uniforme, son observables algunos residuos de tejido calloso, como mecanismo de cicatrización. En trabajos con microinjertos de plantas *in vitro* se han utilizado hormonas exógenas como el ácido indolacético (IAA) y la Zeatina para inducir la formación y número de haces vasculares y facilitar la unión entre las dos plantas, evaluando, el éxito del injerto dependiendo de la clase y concentración de hormona utilizada.



Figura 13. Plántulas microinjetadas *in vitro* (Tt-DR), a las 48 horas (a) y a las 4 semanas (b) después de la microinjertación.

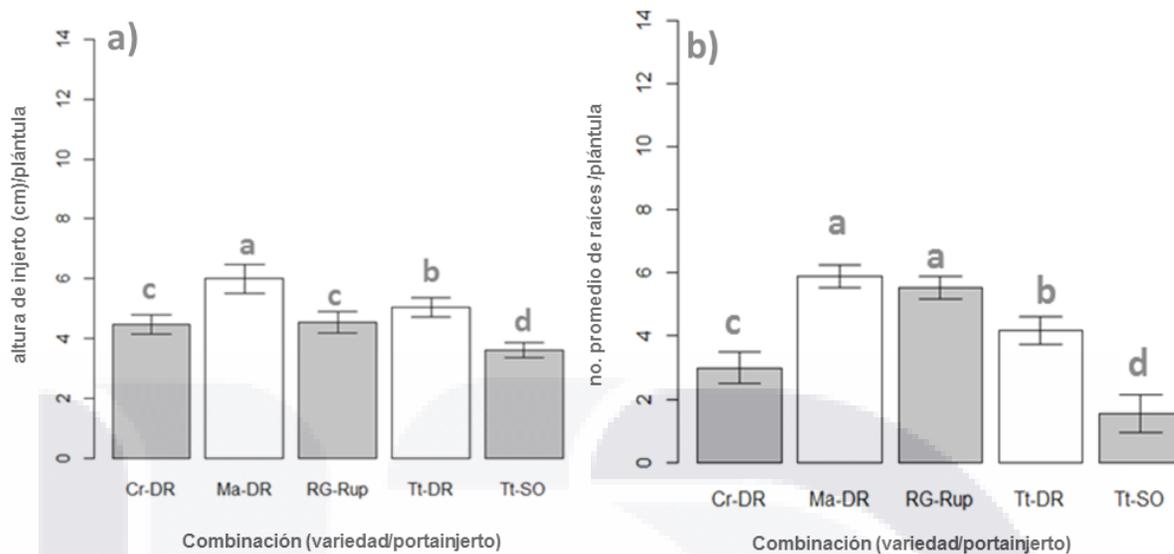


Figura 14. Crecimiento de plántulas microinjertadas expresado en promedio de altura del injerto o variedad (a) y número promedio de raíces producidas (b), después de 4 semanas de cultivo *in vitro*.

Los promedios de altura del injerto para todas las combinaciones oscilaron entre los 4.0 cm hasta los 6.8 cm, siendo la combinación Malbec- Dog Ridge la que presentó la mayor longitud en el injerto con 6.8 cm y también el mayor número de raíces, después de cuatro semanas (Figura 14) los promedios más bajos de altura y número de raíces fue para la combinación Tinta de toro- SO4 con 4.0 cm y 2 raíces por planta.

El análisis estadístico del promedio de altura del injerto con respecto a las combinaciones, mostro diferencias significativas ($P < 0.05$) excepción de la combinación Cr-DR y RG-Rup que resultaron iguales; el promedio mayor de altura y raíces fue para la combinación Malbec sobre Dog Ridge, para el análisis estadístico del promedio de raíces tuvo diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a las combinaciones excepto para Ma-DR y RG-Rup que fueron las combinaciones con mayor número de raíces en promedio, considerando la técnica de microinjertación exitosa debido a la obtención de plántulas completas de variedades sobre portainjertos de vid.

Según lo descrito por Winkler, (1965) existen múltiples factores que intervienen en el proceso de injertación, los factores más importantes que regulan o determinan el éxito del injerto son: la compatibilidad o la afinidad entre portainjerto e injerto; condiciones favorables de humedad, temperatura y aireación; contacto o estrecha proximidad de las capas del cambium; rigidez mecánica para mantener la posición de ambos hasta que se forme la unión; poca edad del injerto y el portainjerto y un alto grado de actividad vegetativa en ambos. Los anteriores resultados indican que la técnica de microinjertación desarrollada en este trabajo cumple con las condiciones reportadas por algunos autores para el éxito y obtención de plantas injertadas, obteniendo porcentajes mayores a los reportados en la literatura.

6.5 Adaptación a condiciones de suelo de plantas microinjertadas.

Las plántulas (Figura 15) obtenidas *in vitro* exitosamente fueron transferidas a sustrato (peatmoss-agrolita 6:1), observando la respuesta de aclimatación, definida como porcentaje de sobrevivencia, después de seis semanas, cabe mencionar que se mantuvo en observación el área de unión durante el crecimiento de la planta. Se observó que la morfología vegetal de las plántulas es semejante en la mayoría de las combinaciones de variedad /portainjerto, lo cual coincide con una metodología de microinjertación eficiente no definida por la afinidad de combinaciones.



Figura 15. Plántulas *ex vitro* microinjertadas variedad/ portainjerto, a) Tt-DR b) Ma-DR c) Tt-SO4 d) RG-Rup; Condiciones de microinjertación unión en “V” (portainjerto) y púa (injerto), corte y unión, Ac. Cítrico+ Ac. Ascórbico 500 mg L⁻¹.

La etapa III del proceso de micropropagación tiene como función desarrollar en la planta micropropagadas los mecanismos necesarios para subsistir sin suplementos externos de carbohidratos mediante el desarrollo y funcionamiento de un sistema radical eficiente. Aunque en la muchos casos se busca pasar directamente de la multiplicación a la transferencia *ex vitro* como una forma de ganar eficiencia (Lara *et al.*, 2003). Mhatre y Bapat (2007) mencionan que las plántulas microinjertadas *in vitro* deben tener mínimo 2-3 hojas desarrolladas en la planta injertada antes de la transferencia al suelo, condiciones para obtener un alto porcentaje de supervivencia.

Tabla 9. Eficiencia de adaptación a suelo de combinaciones de variedades comerciales y portainjertos de interés agronómico, obtenidas mediante el desarrollado de la técnica de microinjertación *in vitro*, después de 6 semanas.

Combinación (variedad/ genotipo) de microinjerto	Sobrevivencia a condiciones de suelo (%)
Tinta toro / Dog Ridge (Tt-DR)	84
Malbec / Dog Ridge (Ma- DR)	81
Crimson / Dog Ridge (Cr-DR)	76
Red Globe / Rupestris du Lot (RG-RUP)	60
Tinta de toro / SO4 (Tt-SO4)	40

El porcentaje máximo de sobrevivencia se obtuvo para la combinación Tinta de toro sobre Dog Ridge con un 84%, seguida de la combinación Malbec sobre Dog Ridge con un 81%, el porcentaje más bajo representando un 40% de sobrevivencia de la combinación Tinta de Toro/ SO4, no cumple con el porcentaje aceptable (Tabla 9). El aspecto general de las plántulas en las condiciones similares a las de suelo, mostraron un crecimiento anatómico y fisiológico normal a simple vista, tallos elongados pigmentados, endurecidos y vigorosos, las hojas mostraron pigmentación y pubescencia, el monitoreo del área de unión de la variedad con el portainjerto, demostró que el injerto de la variedad presenta mayor crecimiento, en contraste con lo observado para el segmento radicular de portainjerto donde el tamaño del tallo se ha mantenido, sin embargo si presenta un crecimiento en las raíces.

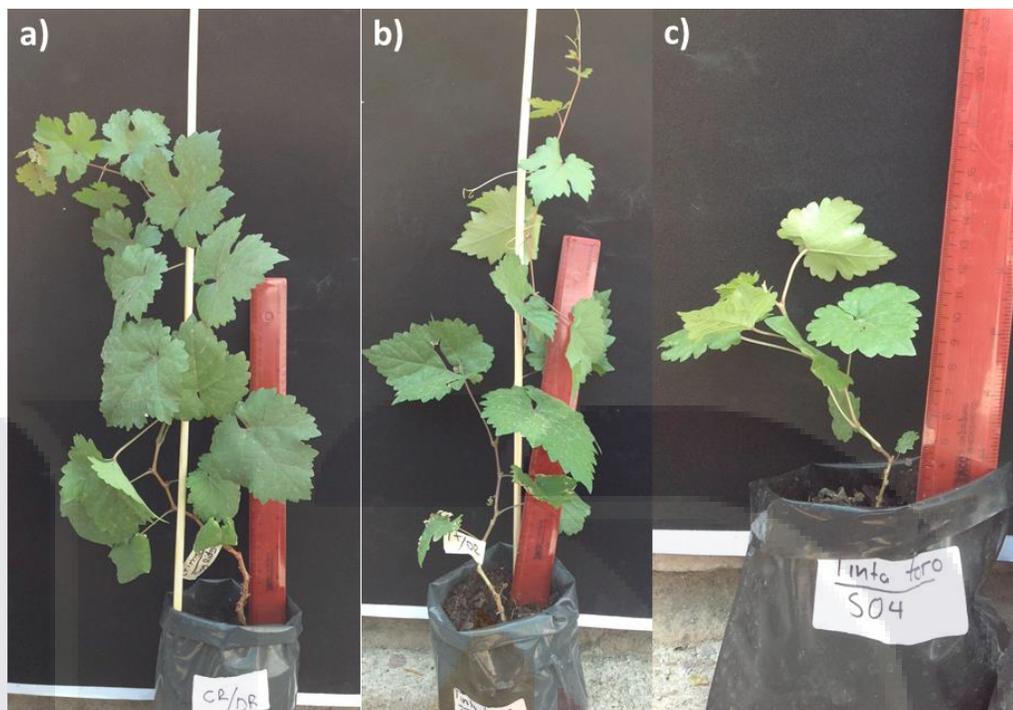


Figura 16. Plántulas *ex vitro* microinjertadas, después de 16 semanas en condiciones de suelo y sombra al 50% de Cr-DR (a), Tt-DR (b) y Tt-SO4 (c).

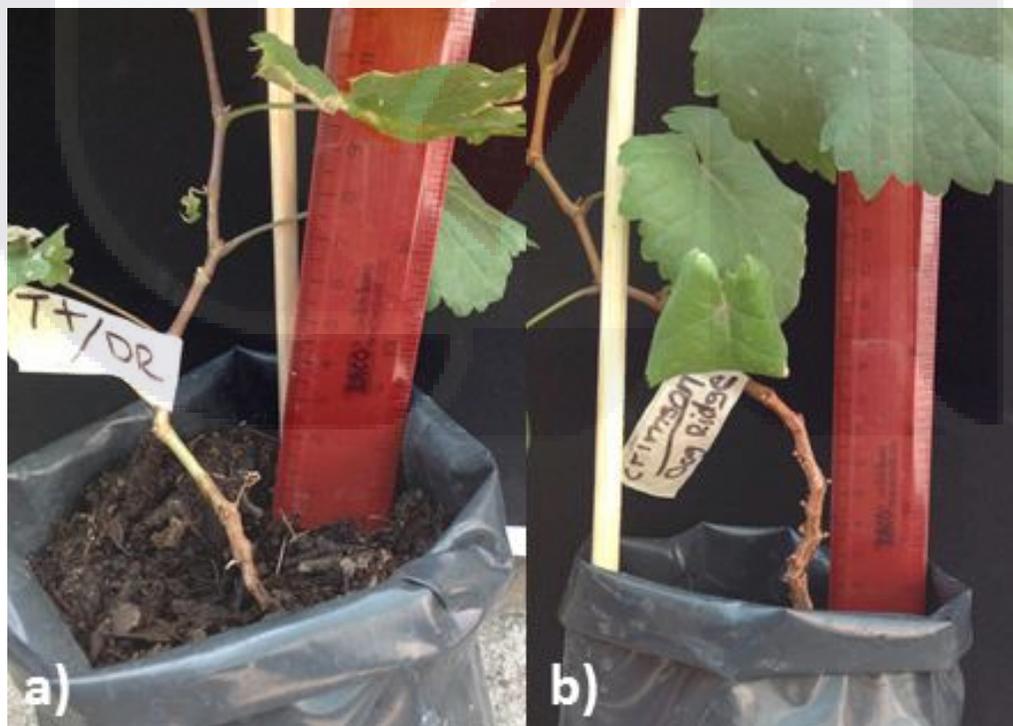


Figura 17. Área de unión del microinjerto en el tallo de las plántulas microinjertadas de Tt-DR (a) y Cr-DR (b).

Las plántulas microinjertadas obtenidas (Figuras 16 y 17) se desarrollaron satisfactoriamente bajo condiciones de suelo a sombra del 50%, produciendo hojas nuevas, desarrollo de coloración verde intenso y lignificación de tallo después de 16 semanas de evaluación. En el caso de las combinaciones Crimson sobre Dog Ridge y Tinta de toro sobre Dog Ridge se observó un crecimiento fisiológico y anatómico normal, alcanzando alturas de hasta 50 cm. Para la combinación Tinta de toro sobre SO4 el crecimiento fue menor, el tallo era muy delgado y la plántula no alcanzó los 30 cm. La combinación Malbec sobre Dog Ridge presentó ramificación y brotación lateral de las yemas axilares, observando un crecimiento vegetativo superior a las otras combinaciones. Los resultados de la combinación Red Globe fueron similares a las dos primeras combinaciones, las plantas crecieron y exhibieron aspectos anatómicos y fisiológicos normales. Sugiriendo las combinaciones vinícolas con el portainjerto Dog Ridge las de mejor repuesta, compatibilidad y desarrollo. Investigadores como Borghezán *et al.*, realizaron estudios sobre la densidad de estomas de plantas *in vitro*, las cuales fueron comparables con plantas *ex vitro*, indicando que no es un parámetro limitante para la fase de aclimatación; esta fase realizada en cajas de plástico cubiertas con vidrio (formando una atmósfera saturada) aumentó el porcentaje de plantas vivas. Según Martínez *et al.*, (2010) un callo malformado entre el portainjerto y la variedad podría conducir a la defoliación, a la reducción del crecimiento de las variedades y a la baja supervivencia de las plantas injertadas. Por lo tanto, la conexión vascular en la interfase de raíz-tallo puede determinar el agua y la translocación de nutrientes, afectando otros rasgos fisiológicos.

6.6 Detección isotérmica rápida en plantas de vid, por AmplifyRP® Acceler8® para GRBaV.

Una vez obtenidas las plántulas microinjertadas, se consideró evaluar el estado fitosanitario de estas, con la finalidad de asegurar su estado aséptico y

axénico. Para esto se determinó la posible presencia de uno de los principales virus, que afectan a la vid, a través de pruebas diagnósticas comerciales. No hubo detección de virus GRBaV a partir de las hojas de plantas evaluadas (Figura 20) como se puede observar en las tiras de detección de amplicones, la ausencia de la línea positiva para dicho virus, comparando con la tira de detección control, donde se observan ambas líneas representadas como línea control y línea de test (Figura 19). La prueba de amplicones confirmó la ausencia del virus GRBaV en las plantas madre, en los cultivos que se establecieron *in vitro* y en las plántulas microinjertadas obtenidas.

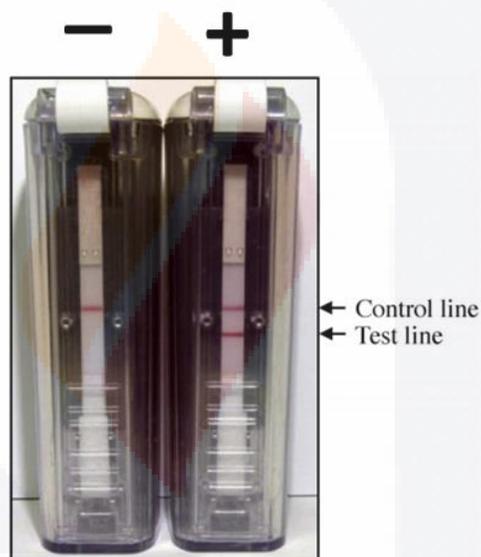


Figura 18. Detección de GRBaV en los extractos crudos no infectados (izquierda), hojas de vid infectadas con GRBaV (derecha) usando AmplifyRP® Acceler8™. La prueba negativa y los resultados positivos para GRBaV se muestran con los símbolos (-) y (+).



Figura 19. Detección de GRBaV en los extractos crudos de hojas de portainjertos y variedades, usando AmplifyRP® Acceler8™. Las pruebas resultaron negativas para todas las muestras procesadas de izquierda a derecha: Malbec (planta madre), Malbec (*in vitro*), Tinta de toro (planta madre), Tinta de toro (*in vitro*), Dog Ridge (*in vitro*), Rupestris du Lot (*in vitro*), Malbec/Dog Ridge (*ex vitro*), Red Globe (*in vitro*).

AmplifyRP® Acceler8™ es un ensayo de producto final más rápido y más simple que la PCR tradicional. AmplifyRP® es una plataforma desarrollada recientemente para detección isotérmica de ácidos nucleicos en plantas (Zhang *et al.*, (2014). Está basado en una tecnología de detección isotérmica avanzada relativamente nueva de amplificación de la recombinasa polimerasa (RPA) (Piepenburg *et al.*, 2006). En esta tecnología, toda la recombinación específica por un ADN recombinasa y una amplificación por una ADN polimerasa ocurren rápidamente a una temperatura constante única (Hoff, 2006; Piepenburg *et al.*, 2006), por tal motivo fue utilizada esta técnica de detección para complementar este estudio.

El virus Grapevine red blotch associated virus (GRBaV) es un virus recientemente identificado de vides y un miembro putativo de un nuevo género dentro de la familia Geminiviridae (Mysore *et al.*, 2015). Este virus está asociado

con la enfermedad de la mancha roja que se informó por primera vez en California en 2008. Afecta la rentabilidad de los viñedos al reducir sustancialmente la calidad de la fruta y la maduración. En los cultivares de vid de bayas rojas, los síntomas de la enfermedad foliar consisten en manchas rojas al principio de la temporada que pueden expandirse y fusionarse a lo largo de la mayor parte de la hoja más adelante en la temporada (Rwahnih, *et al.*, 2013). Esto es de gran interés por la potencialidad dentro del cultivo *in vitro*, ya que el material vegetal a multiplicar son plantas libres de patógenos y enfermedades, para su posible certificación.

Debido a que las vides se propagan comercialmente en forma vegetativa, enfermedades se han difundido ampliamente, produciendo importantes pérdidas económicas en todas las regiones productoras del mundo. Para hacer frente a esta problemática, los países de viticultura ha implementado, por medio de sus organismos técnicos, programas de certificación de material de propagación libre de virus. (Turturo *et al.*, 2005), lo que hace rentable una inversión e importante el diagnóstico de virus principalmente durante el manejo del material vegetal.

6.7 Histología de plántulas microinjertadas.

Se realizó un análisis histológico de las plántulas microinjertadas obtenidas, para confirmar su conexión vascular a través de cortes histológicos del área de unión en los tallos, realizando pruebas preliminares de procesamiento del material vegetal, cortes histológicos (Figura 20) y tinción. Las evaluaciones histológicas y los parámetros del crecimiento vegetativo se utilizan para proporcionar información temprana acerca de la compatibilidad o incompatibilidad de la combinación injertada (Ives *et al.*, 2012), lo que proporcionó información importante para el entendimiento del desarrollo del microinjerto.

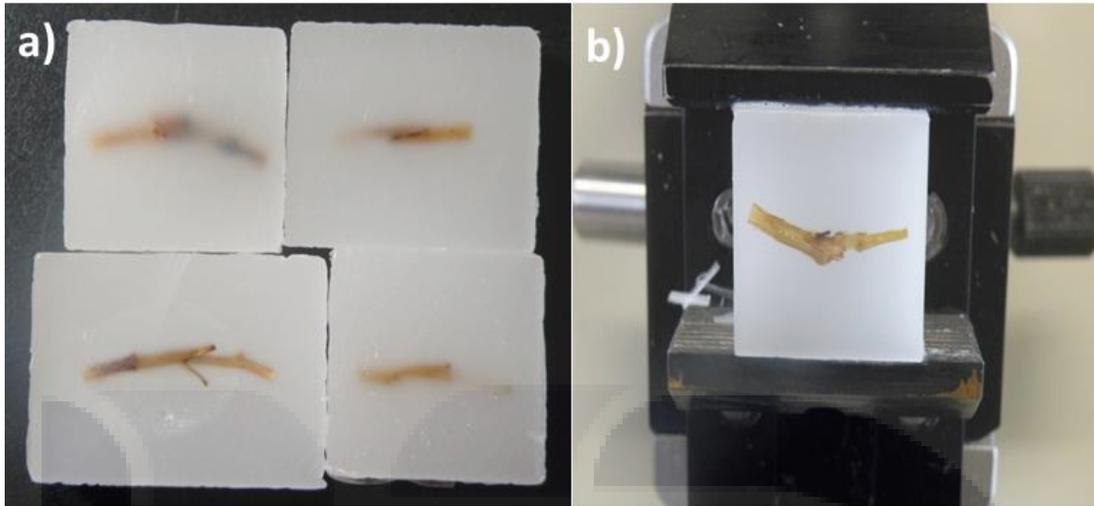


Figura 20. Inclusiones de parafina de segmentos de tallo de plántulas microinjertadas. a) cubos de parafina. b) corte longitudinal (8µm) de área de unión en micrótopo.

El examen histológico de la zona de unión permitió ver la evolución interna del microinjerto, observando una proliferación celular identificada como TC (Tejido Calloso) en la Figura 22b. El tejido calloso se produce a partir de células del parénquima que se dividen rápidamente en la capa necrótica. A medida que estos tejidos de callo se multiplican, comienza la absorción de la capa necrótica, formando así un puente de callo entre los miembros del injerto. Estos puentes de callo permiten que el flujo de exudados del xilema entre los tejidos de portainjertos y la variedad, lo que aumenta la sobrevivencia en los injertos (Ives *et al.*, 2012). Identificando lo descrito por Miguel *et al.*, (2007) donde define el desarrollo de un injerto compatible en tres procesos: cohesión del patrón y la variedad; proliferación del callo en la unión, y diferenciación vascular entre ambas partes. Lo observado en la figura 21a se identifica como el primer proceso de un injerto que es la cohesión ya existe un reconocimiento celular, que lo descrito por la literatura Jeffree y Yeoman, (1983) es considerado una comunicación intracelular por canales de célula a célula llamados plasmodesmos secundarios que comienzan la difución de agua a las 4 semanas de realizada la microinjertación, esto mantiene vivo y turgente el injerto, a las 8 semanas después de la microinjertación *in vitro*

(Figura 22b), se observa un engrosamiento y mayor presencia de tejido calloso en el parenquima medular observando algunas células del xilema.

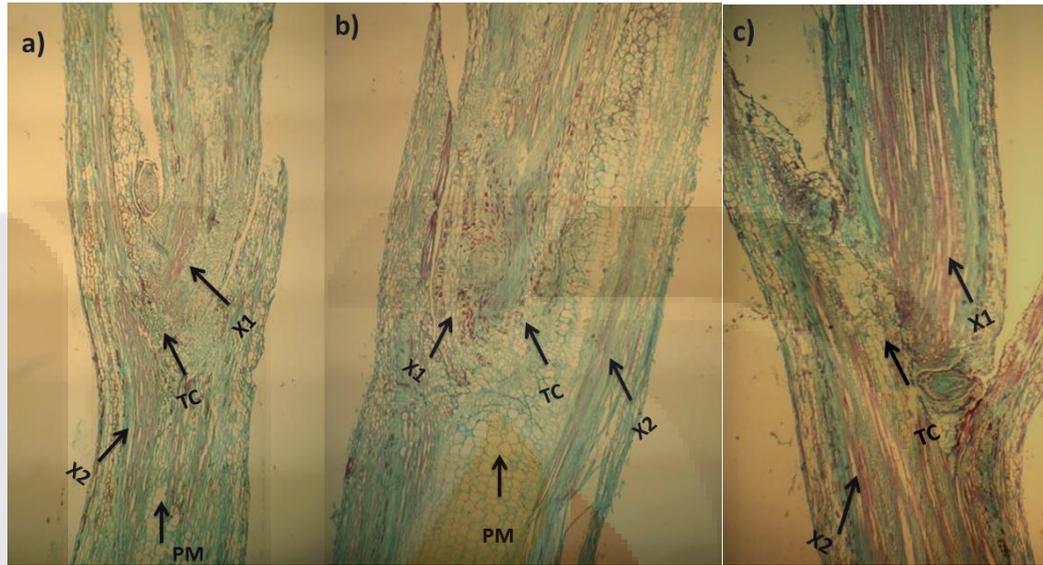


Figura 21. Cortes longitudinales de tallos de plántulas microinjertadas de Tt / DR, cuatro semanas después de la microinjertación *in vitro* (a) y (c), cuatro semanas después de la aclimatación de plántulas microinjertadas (b). Tinción Safranina-Verde rápido. 40X.

Estos tejidos fueron tomados en dos etapas tempranas del desarrollo de la plántula microinjertada a las cuatro semanas tras realizar el injerto *in vitro* y a las cuatro semanas de aclimatación, por lo tanto estas pruebas preliminares fueron destructivas para el tejido, es probable que muchas de las plántulas microinjertadas evolucionaron hacia una diferenciación y mayor conexiones vasculares. El injerto debe permitir la continuidad en la circulación de la savia (Jagdev *et al.*, 2005) para considerarlo exitoso.

7. CONCLUSIONES

El sistema de desinfección fue eficiente, ya que se obtuvo más del 50 % de explantes asépticos para las variedades y portainjertos de vid. El medio MS modificado por Chee y Pool resultó adecuado para el establecimiento *in vitro*.

Se logró desarrollar un sistema de multiplicación para portainjertos y variedades de vid, en medio MS modificado por Roubelakisy Zivanovitch adicionado con 0.2 mg L^{-1} de IBA, con el que se alcanzó la brotación, elongación y rizogénesis simultánea de explantes nodales.

Se obtuvieron plantas microinjertadas de variedades vinícolas y de mesa sobre portainjertos de gran importancia agronómica regional, mediante la unión de segmentos apicales sobre segmentos nodales, con potencial para la producción de plantas clonales libres de enfermedades.

Las condiciones adecuadas para la microinjertación fue el uso de Ac. Cítrico /Ac. Ascórbico (500 mg L^{-1}) durante el corte y unión en forma de "V", propiciando porcentajes de prendimiento de 84 para Malbec/Dog Ridge y 78 para Tinta de Toro /Dog Ridge

Se logró un porcentaje de sobrevivencia a condiciones de suelo por arriba del 80% para la mayoría de las combinaciones de variedades y portainjertos

La prueba molecular para el virus GRBaV, mostró resultados negativos en comparación con su control positivo en todas las muestras procesadas, importante resultado para la posible certificación de plantas.

El análisis histológico de área de unión en el tallo, ofreció la observación del reconocimiento celular y cicatrización que permite que se establezcan conexiones que aseguran el aporte de agua y nutrientes a la variedad y permitan el prendimiento y crecimiento del injerto.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Almanza, P., (2011). El cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) En: Manual de frutales. Tomo 2. Editor: G. Fischer. Ed. Produmedios, 166.
- Alvarado, Y., (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez, J.N, (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba, 81–104.
- Atkinson, C. y Else, M., (2001). Understanding how rootstocks dwarf fruit trees. *Compact Fruit Tree*, 34(2), 46-49.
- Barlass, M., Skene, K.G.M. (1978). *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* 17, 335-340.
- Borja-Bravo, Mercedes, García-Salazar, José A., Reyes-Muro, Luis, & Arellano-Arciniega, Sergio. (2016). Rentabilidad de los sistemas de producción de uva (*Vitis vinifera*) para mesa e industria en Aguascalientes, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 13(1), 151-168
- Botti, C., Garay, L., Reginato, G., (1993). The influence of culture dates, genotype and size and type of shoot apices on *in vitro* shoot proliferation of *Vitis vinifera* cvs Thompson Seedless, Ribier and Black Seedless. *Vitis*. 32, 125-126.
- Bouquet, A. y Hevin, M., (1978). Green grafting between Muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) and bunch grapes (*Euvitis* spp.) as a tool for physiological and pathological investigations. *Vitis* 17, 134– 138.
- Bundschuh, J., Holländer, H., Qiying Ma, L., (2000). *Plant-Environment Interactions*. CRC Press, 302-309.
- Cantos, M., Alés, G., Troncoso, A., (1995). Morphological and anatomical aspects of cleft micrografting of grape explants *in vitro*. *Acta Horticulturae*.388, 135- 139
- Castro, D.; Díaz, J. y Murillo, M. (1999). Estrategias de trabajo para la multiplicación clonal *in vitro* de árboles adultos de Teca (*Tectona grandis*),

Melina (*Gmelina arborea*) y Roble (*Tabebuia rosea*). Universidad Católica de Oriente, Rionegro, 16- 51.

- Cavazos G., J., Alvarado G., Omar G., Santos, J., Moreno D., Rodríguez F. G., y Ojeda Z., M. (2018). Propagación clonal de dos cultivares adultos de vid (*Vitis vinifera* L.) para su conservación *in vitro*. Polibotánica, (45), 181-190. <https://dx.doi.org/10.18387/polibotanica.45.13>
- Chee R & Pool RM (1982) The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. Scientia Hort. 16: 17–27
- Cookson S.J., Moreno M.J., Hevin C., Mendome L.Z., Delrot S., Trossat-Magnin C., Ollat N., (2013). Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signaling, and secondary metabolism. Journal of Experimental Botany, 64, 297-308.
- Crespan M., (2004). Evidence on the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. Theoretical and Applied Genetics 108, 231-237.
- Deloire, A., Charpentier, M., Berlioz, G., Colin, A., Gimonet, G., (1995). Micropropagation of the grapevine: results of 10 years of experiments in the Champagne Vineyard and results of the first vinification. Journal of Enology Viticulture, 46, 571-578.
- Duque, M. C., y Barrau. Y. F., (2005). Origen Historia y Evolución del cultivo de la vid. Revista enólogos. Instituto de la Vid y del Vino de castilla-La Mancha. IVICAM, 38, 44-47.
- Estrada L. A., López C. y Cárdenas-Soriano E., (2002). *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). Scientia Horticulturae14: 317-327.
- Galet P., (1979). Practical Ampelography grapevine identification. Cornell Universit. Press. USA.

- Galzy, R. (1961). Confirmation de la nature virale du court-noué de la vigne par des essais de thermothérapie sur des cultures "in vitro". C.R. Academy Seances. Soc. Biol. Paris, 253: 706-708.
- García de Luján (2004). *Los parásitos de la vid: estrategias de protección razonada* Mundi-Prensa (5a. Ed.). Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com>, 165.
- García, E., Lorente, P., Marín, J. A., Arbeloa, A., y Andreu, P., (2010). Micropropagación e injerto *in vitro* de pistacho. *Información Técnica Económica Agraria*, 106 (4), 294-302.
- George, E. (1993). Plant propagation by tissue culture; part 1. The technology. 2 ed. Exegetics Limited. England. 574 .
- González, H., (2007). Nemátodos fitoparásitos que afectan a frutales y vides en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, 176.
- Gravina, A., Piestun, D., (1991). Formación de un banco de variedades de Citrus libre de virus. En: Obtención de plantas mediante la técnica de microinjerto. Boletín de Investigación Facultad de Agronomía de Montevideo, 28, 15.
- Guerrero J., Moriana A., Couceiro J., (2004). La operación de injerto en pistachero (*Pistacia vera* L.). Condicionantes en Castilla La Mancha. *Fruticultura Profesional*, 140, 41-53.
- Guerrero, D. R., Mroginski, L. A., Krivenky, M. A., y Domínguez, M. C., (2010). Micropropagación de portainjertos de vid de interés para la provincia de Misiones. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 42 (2), 143–159.
- Hartmann, H.T.; D.E. Kester (1990). *Plant propagation. Principles and practices*. Fifth edition. Prentice Hall. New Jersey, U.S.A. 647.
- Hedberg, P., (1980). Increased wine grape yields with rootstocks. *Farmers Newsletter* , 147, 22-24.
- Hidalgo L., (2002). *Tratado de Viticultura General*. 3ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid

- Hoff, M., (2006). DNA amplification and detection made simple (relatively). PLoS Biology. (4), 1099–1100
- Howell, H., (1987). *Vitis* rootstocks. Rootstocks for fruit crops. Ed., Rom, R.C. and Carlson, R. F. (14), 451-472.
- INFOCIR, (2005). La vid: características y variedades. Boletín quincenal de Inteligencia Agroindustrial, 10, (1), 1-5.
- Ives, L., Brathwaite, R., Barclay, G., Isaac, W. A., Bowen-O'Connor, C., y Bekele, I. (2012). Graft Compatibility of Scotch Bonnet (*Capsicum chinense* Jacq) with Selected Salt-Tolerant Solanaceous. Journal of Agricultural Science and Technology, (2), 81-92.
- Jagdev, S. D., Shikhamany, R. K. Singh y Raghupathi H. B., (2005). Diagnosis of Nutrient Imbalance in Thompson Seedless Grape Grafted on Dog Ridge Rootstock by DRIS, Communications in Soil Science and Plant Analysis, (36):19-20, 2823-2838, DOI: 10.1080/00103620500305991
- Jaskani, M. J., H. Abbas, R., Sultana, M., Khan M., Qasim, M., and I. A. Khan. (2008). Effect of Growth Hormones on Micropropagation of *Vitis Vinifera* L. cv. Perlette. Pakistan Journal of Botany, (40), 105-109.
- Jeffree C., E., Yeoman M., M., (1983). Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. New Phytologist, 93, 491–509.
- Jiménez M., J., Gutiérrez-M., M., Franco M., O, González H., A, y Gutiérrez I., A., (2013). Micropropagación de vides silvestres (*Vitis* spp.) del centro de México. Phytón (Buenos Aires), 82(1), 107-112. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572013000100015&lng=es&tlng=es.
- Jimenez, E., (1999). Aplicaciones de la biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba. Programa Nacional de Semillas Bolivia. Santa Clara- Cuba, 16.

- Jonard R., (1986). Micrografting and its applications to tree improvement. In: Bajaj YPS (eds.) Biotechnology in agriculture and forestry. Trees I. Springer, Berlin Heidelberg. New York, (1), 31-48.
- Keller, M. (2015). The science of grapevines: anatomy and physiology. Academic Press, 454-461.
- Khurana, E. y Singh, J. S., (2004). Germination and seedling growth of five tree species from tropical dry forest in relation to water stress: Impact of seed size. Journal of Tropical Ecology, (20), 385-396.
- King, S. R.; Davis, A. R.; Zhang, X. and Crosby, K. (2010). Genetics, breeding and selection of rootstock for solanaceae and cucurbitaceae. Scientia Horticulturae 127:106-111.
- Lara, A.; Valverde, R.; Gómez, L. y Hidalgo A. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psycotria acuminata* L. Agronomía Costaricense 27:7-20
- Litz, R. Y Jarret, R. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos, embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, 143-172
- López, M. A., Ocete, R., Pérez, M. A., (2001). El impacto antrópico sobre las poblaciones de vides silvestres: características sanitario-agronómicas y aprovechamiento de este recurso. Vine and Wine in European Culture. II International Symposium of the History and Civilisation of Vine and the Wine. Porto- Lamego-Vila Real, Portugal, Press.
- Loreti, F., and Massai, R.. (2006). "State of the Art on Peach Rootstocks and Orchard Systems." Acta Horticulture [ISHS] 713: 253-68.
- Martelli, G.P., (1993) Leafroll. In: Graft transmissible diseases of grapevines. Ed., Food & Agriculture Org. of the United Nations, Rome, 37–44.
- Martelli, G.P., Savino, V. and Walter, B., (1993). Indexing on *Vitis* indicators. In: Graft transmissible diseases of grapevines. Martelli, G.P. (Ed.) Food & Agriculture Org. of the United Nations, Rome, 137–162.

- Martin, J.P., (2003) Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers. *Genome* 46, 10–18.
- Martínez, D. T. F., (2011). Claves de la viticultura de calidad: nuevas técnicas de estimulación y control de la calidad de la uva en el viñedo (2a. ed.). Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com>
- Martinez, E. A., Tizio, R., (1989). Grapevine micropropagation through shoot tips and minicuttings from in vitro cultured one-node cuttings. *HortScience* 24(3): 513.
- Martínez, M. C., Alcaraz, C., Muries, B., Mota, C., y Carvajal, M., (2010). Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Scientia Horticulture*, 127 (2), 112-118. doi:10.1016/j.scienta.2010.08.002
- Martínez-Ballesta M C, C Alcaráz-López , B Muries, C Mota-Cadenas, M Carvajal. (2010) Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Scientia Horticulturae*. 127: 112-118.
- Melyan, G., Sahakyan, A., & Harutyunyan, A. (2015). Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) seedless cultivar “Parvana” through lateral bud development. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 54(Special Issue), 253-255
- Meng B.Z., Rebelo A.R., Fisher H., (2006). Genetic diversity analyses of grapevine Rupestris stem pitting-associated virus reveal distinct population structures in scion versus rootstock varieties. *Journal of General Virology*, 87, 1725-1733.
- Mhatre M., Bapat V.A., (2007). Micrografting in Grapevine (*Vitis* spp.). In: Jain S.M., Häggman H. (eds) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, Dordrecht.
- Mhatre, M.; Salunkhe, C. K. and Rao, P. S., (2000). Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol. *Scientia Horticulturae* , 84,357-363.

- Miguel, A., De la Torre, F., Baixauli, C., Maroto, J.V., Jordá, M. C., López, M.M., y García J.(2007). Injerto de Hortalizas (Ministerio de Agricultura Ed.) España.
- Monette P., L., Godkin S., E., and James D., (1988). Mechanical sap transmission of a closterovirus from *in vitro* shoot tip cultures of a leafroll-affected grapevine to *Nicotiana benthamiana*. *Vitis*, 29, 49-55.
- Munns, R. y Tester, M., (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Muñoz, D. M., (2012). *Biología* (2a. ed.). Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com>
- Muñoz, I., (1999). Uso de portainjertos en vides para vino. Aspectos Generales. INIA. La Platina Chile. Informativo la Platina, 193-196.
- Mysore R. Sudarshana, K., y Marc F., (2015). Grapevine Red Blotch-Associated Virus, an Emerging Threat to the Grapevine Industry *Phytopathology* (105), 7, 1026-1032.
- Navarro L., (1988). Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species *Acta Horticulturae*, 227, 43-55.
- Navarro L., Pina J.A., Juárez J., Ballester-Olmos J.F., Arregui J.M., Ortega C., Navarro (2002). The Citrus variety Improvement program in Spain in the period 1975–2001 *Proceedings of 15th Conference International Organization Citrus Virologists*, Riverside, 306-316.
- Navarro L., Roistacher C.N., Murashige T. (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 100 (5) 471-479.
- Nookaraju, A., Barreto, S. M., & Agrawal, D. C. (2008). Rapid *in vitro* propagation of grapevine cv . Crimson Seedless - Influence of basal media and plant growth regulators, *Journal of Applied Horticulture*. 10(1), 44-49.
- Novak, F.J., Jukova, Z., (1983). Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. *Scientia Horticulturae*, (18), 231-240.

- Ocete R. M. A., (2004). La vid silvestre en el país Vasco y territorios limítrofes: ecología, distribución y riesgos para su conservación. Servicios Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, San Sebastián, 179.
- Ocete, R., López M. A., Lara M. and Del Tío R., (1997). The sanitary state of a phylogenetic resource: the Spanish wild grapevine, *Vitis vinifera sylvestris Gmelin* (Hegi), populations. Plant Genetic Resources Newsletter. (FAO),110, 5-12.
- Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E., (2004). Micropropagación. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. eds.). Ediciones INTA, 163-172.
- Onay, A., Piriñç, V., Işıkalın, Ç. Adıyaman, F., Tilkat, E., Başaran, D., (2003). *In vivo* and *in vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. cv. 'Siirt'. Turkish Journal Biology, 27, 95–100.
- Osman, F., Rowhani, A., (2006). Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). Journal Virology Methods, (133), 130–136.
- Parkinson, Michael & M. YEOMAN, M. (1982). Graft formation in cultured, explanted internodes. New Phytologist - NEW PHYTOLOGIST. 91. 711-719. 10.1111/j.1469-8137.1982.tb03350.x
- Pathirana, R. and McKenzie, M. J., (2005). Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (81), 11–18.
- Pérez M. J. (2004). *Los parásitos de la vid: estrategias de protección razonada* Mundi-Prensa (5a. Ed.). Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com>
- Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L., Armes, N.A., (2006). DNA detection using recombination proteins. PLoS Biology, (4), 1115–1121.

- Pliego A. F., Murashige T. (1987). Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. Horticulturae Science, 22 (6) 1321-1324.
- Rehman HU, Gill MIS. (2015). Micrografting of Fruit Crops-A Review. Journal Horticulture, 2:151. doi:10.4172/2376-0354.1000151
- Reyes, F., Monteverde, E. E., Laborem, G., (1992). Programa de certificación de plantas cítricas en Venezuela FONAIAP Divulga. 9 (41): 6-9.
- Reynolds, A.G. and Wardle, D.A. (2001). Rootstocks impact vine performance and fruit composition of grapes in British Columbia. Journal of American Science HortTechnol. 11:419-427.
- Roca, W. M. y Mroginski, L. A., (1991). Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas. (Roca, W. M.; Mroginski, L. A. eds.). CIAT. Cali, 19-40.
- Rodrigo, C.A.; Azcarrunz, M.E.; Quezada. J. (2006). Microinjerto *in vitro* de vid (*Vitis vinifera*). Biofarbo. 15: 43-49.
- Rodríguez I. y Chaves J., (2003). Variedades de vid. Registro de variedades comerciales. Centro de Publicaciones. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Rodríguez, J., Matus, S., Catania, C., y Avagnina de Del Monte, S., (1999). El Malbec, cepaje emblemático de los vinos tintos argentinos. Vinífera Año IV N° Extraordinario, 61-64.
- Roubelakis-Angelakis, K.A., Zivanovitch, S.B. (1991) .A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. Hortscience, (26), 151-153.
- Rwahni, M. A., Dave, A., Anderson, M. M., Rowhani, A., Uyemoto, J. K., y Sudarshana, M. R., (2013). Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. Phytopathology, 103(10), 1069-1076.

- Salunkhe, C. K., Rao, P. S. and Mhatre, M., (1999). Introduction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera*. Plant Cell Reports. 17, 65–67.
- Sanjaya, Muthan, B., Rathore, T. *et al.* J For Res (2006) 11: 147. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1007/s10310-005-0208-1>
- Schmid, J., Manty E., Rühl, H., (2003). Utilizing the complete *phylloxera* resistance of *Vitis cinerea* Arnold in rootstock breeding. Acta Horticulturae 603, 393-400.
- SEDRAE (Secretaría de Desarrollo Rural y Agroempresarial) (2014). Vitivinicultura. Resurgir de una tradición. Agrosfera: la nueva visión agroalimentaria. 1(2): 6-18.
- Sellés Van G., Ferreyra , R., Pinto ,M., Ruiz , R., (2012). Portainjertos en uva de mesa: experiencias en el Valle de Aconcagua. Revista Chilena de Agricultura. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Cruz, La Cruz, Chile.110-112.
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W., (2015). *Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Retrieved from <https://ebookcentral.proquest.com>
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2018). Cierre de la producción agrícola por estado: producción agrícola. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&layout=full&id=351 (Consultado: 30 de Julio de 2018).
- Silvetrioni, O. (1981). Prime esperienze sulla micropropagazione della vite europea. Vigne Vini, 10: 31-37.
- Smith, R., (2013). Hoja Informativa de Viticultura Condado de Sonona.
- Tandonnet, J. P., Cookson, S. J., Vivin, P., & Ollat, N. (2010). Scion genotype controls biomass allocation and root development in grafted grapevine. Australian Journal of Grape and Wine Research, 16(2), 290-300.

- Tanne, E., Shlamovitz, N. y Spiegel-Roy, P. (1993) Rapidly diagnosing grapevine corky-bark by *in vitro* micrografting. Horticulturae Scientia. 28, 667–668.
- Thimmappaiah, G. T., Raichal S., (2002). *In vitro* grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). Scientia Horticulturae, (92), 177-182.
- This P., Lacombe T. y Thomas M. R., (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. Trends in Genetics (9), 22.
- Torregrosa L., Bouquet A., Goussard P. G., (2001). *In Vitro* Culture and Propagation of Grapevine. En: Roubelakis-Angelakis K.A. (eds) Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine. Springer, Dordrecht.
- Turturo C., Salderelli P., Yafeng D., Digiario M., Minafra A., Savino V., (2005). Genetic variability and population structure of grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. Journal of General Virology , 86, 217–224.
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network – (GRIN). [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland
- 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.
- Vieira, A., (1979). Resistencia aparente de algunos portainjertos de la vid al ataque de nemátodos del nudo de la raíz (*Meloidogyne* spp.). Investigación Agrícola 5(2): 93-95.
- Villalobos, V. M. y García, V. A., (1982). Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos. Agrociencia, (48), 107-118.
- Villalobos, V. M. y Thorpe, T. A., (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. 90 Fundamentos y aplicaciones prácticas. (Roca, W. M.; Mrogrinski, L. A. eds.). CIAT, 127-141.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Walker M. A., Golino D. A., (1999). Rapid propagation of grape planting stock, In: Practical Winery and Vineyard Journal, 20, 29–38.
 - Wang, Y., (2011). Plant grafting and its application in biological research. Chinese Science Bulletin, 56 (33), 3511–3517. doi:10.1007/s11434-011-4816-1
 - Winkler, A. J., (1965). Viticultura. Primera edición. Ed. Continental. MEXICO. C.E.C.S.A., 38-39.
 - Wu H.C., du Toit E.S, Reinhardt C.F., (2007) Micrografting of Protea cynaroides. Plant Cell Tissue Org. Cult., 89, 23-28.
 - Yıldırım H, Onay A., Süzerer V, Tilkat E., Ozden-Tokatli Y., Akdemir H. (2010). Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars “Ferragnes” and “Ferraduel”, Scientia Horticulturae, 125, (3), 361-367.
 - Zhang, S., *et al.*, (2014), Rapid diagnostic detection of plum pox virus in *Prunus* plants by isothermal AmplifyRP® using reverse transcription-recombinase polymerase amplification. Journal Virology Methods <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.06.026>.
 - Zhao, X.; Guo, Y.; Huber, D. J. and Lee, J. (2011). Grafting effects on postharvest ripening and quality of 1-methylcyclopropene-treated muskmelon fruit. Scientia Horticulturae 130-581-587.

9. ANEXOS

9.1 Descripción del material vegetal

9.1.1 Dog Ridge (*V. x champinii*).

Fue descubierto en Texas, Estados Unidos de América en las montañas conocida como Dog Ridge. Este portainjerto es muy vigoroso y debido a ello los injertos frecuentemente muestran síntomas por deficiencia de zinc. Se recomienda su uso en suelos arenosos poco fértiles y ligeros. Es apropiado para variedades de vino altamente productoras y para los casos en que las prácticas culturales se adaptan para el aprovechamiento de un crecimiento vigoroso (Hidalgo, 2002). En la región Norte-Centro de México, se ha adaptado a condiciones desfavorables como la presencia del hongo que causa la pudrición texana (*Pymatotrichum omnivorum*), así como a los suelos calcáreos. Las estacas enraízan con dificultad pero los barbados brotan y se injertan con facilidad.

9.1.2 SO4 (*V. riparia X V. berlanderi*).

Este portainjerto fue en la escuela de viticultura de Oppenheim Alemania, es una abreviación de Selección Oppenheim No. 4. Presenta la misma resistencia a la clorosis que el 5BB Téléki, respondiendo mejor al estaquillado y al injerto que el 161-49 C y el 5BB Téléki, aunque es menos sensible a la sequía y tolera los subsuelos húmedos. Confiere al injerto un desarrollo rápido, un gran vigor y una fuerte producción, pero un retraso de la maduración, siendo a veces el grado alcohólico de los vinos insuficiente, con acidez elevada, taninos duros y gustos herbáceos (Muñoz, 1999). Este exceso de vigor en tierras de fertilidad media o alta favorece la podredumbre gris. Manifiesta asfixia radicular y tilosis durante los primeros años en tierras fuertes y a la salida de los otoños e inviernos lluviosos,

siendo sensible a la carencia de magnesio y al desecamiento del raspón (López *et al.*, 2001).

9.1.3 Rupestris du Lot

Produce un gran vigor al principio del crecimiento vegetativo. Buena respuesta al estaquillado y al injerto. Poco resistente a la clorosis: hasta un 14 por 100 de caliza activa o 20 de IPC. Muy resistente a la sequía en terrenos superficiales, aunque su sistema radicular le permite explorar en profundidad, siendo sensible a la humedad y adaptándose bien a los terrenos salinos de menos de 0,8 ppm. Puede provocar corrimiento y retrasar la fecundación. Muy adaptado a suelos pedregosos, pobres, pero profundos. Es adecuado para obtener buenos rendimientos o aprovechar los terrenos poco fértiles y profundos (Ocete, 2004).

9.1.4 *Vitis vinífera* cv. Red Globe

Obtenida en 1958 por H. P. Olmo y A. Koyoma en Davis, California. Es el resultado de un cruce múltiple (Hunisia x Emperor) x (Hunisia x Emperor x Nocera). Forma racimos muy grandes, cilíndricos cónicos, de longitud media a larga y de semisuelto a semicompacto, formado por bayas esféricas, grande y de color rojo vino de diferente intensidad. La pulpa es abundante y la piel gruesa, resistente y fácil de desprender. La variedad Red Globe va camino de convertirse en la variedad de uva de mesa favorita a nivel mundial entre las que tienen pepita. Posee gran atractivo visual por su color y tamaño, lo que le hace muy solicitada en el mercado. Además, su vigor es muy alto y se ha tenido control sobre sus problemas fitosanitarios. Resiste bien el transporte y aguanta bien en la cámara frigorífica (Rodríguez y Chaves, 2003).

9.1.5 *Vitis vinífera* cv. Crimson seedles.

Variedad bastante nueva, en California se cultiva desde 1980. Fue desarrollada por David Ramming y Ron Tarailo, en Fresno California, resultó del cruzamiento de Emperor y selección No. C33-199. El cultivar produce racimos de tamaño mediano (0.5 kg), cónicos, bien llenos a ligeramente compactos con un hombro. Crimson Seedless es la uva de mesa sin semillas de última generación actualmente producida en California. Madura a mediados de octubre y si el clima lo permite, se puede llevar a cabo en la vid hasta mediados de noviembre. Las bayas son de tamaño mediano y tienen forma cilíndrica u ovalada y no tiene pepita. La piel tiene un grosor medio y la pulpa es translúcida y firme. El sabor se describe como dulce, neutro y muy bueno y el cultivar ha sido recibido favorablemente por el comercio minorista debido a sus excelentes características de consumo y disponibilidad para el final de la temporada. Crimson Seedless se ha convertido en uno de los cultivares de uva de mesa más importantes cultivados en California y en la actualidad hay más de 6.300 hectáreas del cultivar en producción comercial (INFOCIR, 2005)

9.1.6 *Vitis vinífera* cv. Malbec

La variedad Malbec (*Vitis vinífera* L.) es considerada la uva tinta emblemática de la Argentina y se caracteriza por ser un cultivar (cv.) exigente, respecto a las condiciones agroecológicas de las zonas de producción y al manejo del viñedo, al momento de expresar todo su potencial. Según diversos autores sería originaria de las zonas de Cahors, Quercy o la Touraine, en el suroeste de Francia. Allí se la conoce principalmente con el nombre de "Côt", aunque posee varios sinónimos tales como Auxerrois, Côt de Bordeaux, Pressacn y Luckens, entre otros. La denominación "Malbec", por la cual se la conoce en Argentina, proviene de "Malbeck", el nombre del viticultor húngaro que habría introducido esta variedad en Burdeos (Rodríguez *et al.*, 1999).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Su cultivo fue muy extendido en los viñedos franceses, representando gran parte de las cepas dominante. Fue una variedad importante hasta la época de la filoxera, donde resultó muy afectada, quedando relegada hasta su reimplantación a partir del año 1940. Productivamente interviene al menos en una proporción del 70% en los vinos producidos a nivel mundial, complementados con otras variedades como Merlot (Rodríguez *et al.*, 1999).

Además en la actualidad esta uva es muy valorada y apreciada en Inglaterra, Pero donde esta uva se asienta y se hace importante es en Mendoza (Argentina). Así, Malbec da nombre a Argentina en el mundo del vino, y Argentina es la que le da ese toque de elegancia y diferenciación a la uva Malbec. Hoy en día es muy común encontrarla en los vinos de Australia, Nueva Zelanda y EEUU, pero es Argentina la que posee la mayor extensión de cultivo de esta uva, siendo Mendoza con el 86% de extensión la región con mayor producción. Su característica más sobresaliente es su color: oscuro, su aroma es a cereza, y en la boca es suave y dulce, ofrece una explosión de fruta. Produce mostos de elevada intensidad de colores, muy tánicos, poco aromáticos, pero con aromas muy peculiares y agradables. Adecuada para vinos jóvenes (INFOCIR, 2005).

9.1.7 *Vitis vinifera* cv. Tinta de toro

La variedad Tempranillo es una de las variedades de vid autóctonas más importantes de España cultivada desde tiempos antiguos en la Rioja, aunque se ha extendido a todo el país. En España hay más de 200.000 hectáreas plantadas (2007) de la uva tempranillo o Tinta de toro como es conocida. Sus racimos son de tamaño grande, con hombros marcados, compactos, uniformes en el tamaño y en el color de las bayas. Con pedúnculo de tamaño medio y poco lignificado, excepto en la base. Las bayas, son de tamaño medio a grande, con epidermis negroazulada. Perfil circular y difícil desprendimiento de su pedicelo, presentan pulpa no pigmentada, blanda, muy jugosa y carnosas. En general da vinos tintos óptimos para crianza con buen cuerpo, finura, intensidad y complejidad aromática. Color rojo rubí estable. Su mosto es de color rojo intenso, y con acidez bastante

baja, con pocos taninos y por ello es base de vinos tintos suaves, ligeros pero muy aromáticos. Se utiliza, entre otras cosas, para la elaboración de vinos jóvenes. La Tinta de toro se complementa muy bien con variedades como el Cabernet Sauvignon o Merlot (Rodríguez y Chaves, 2003).

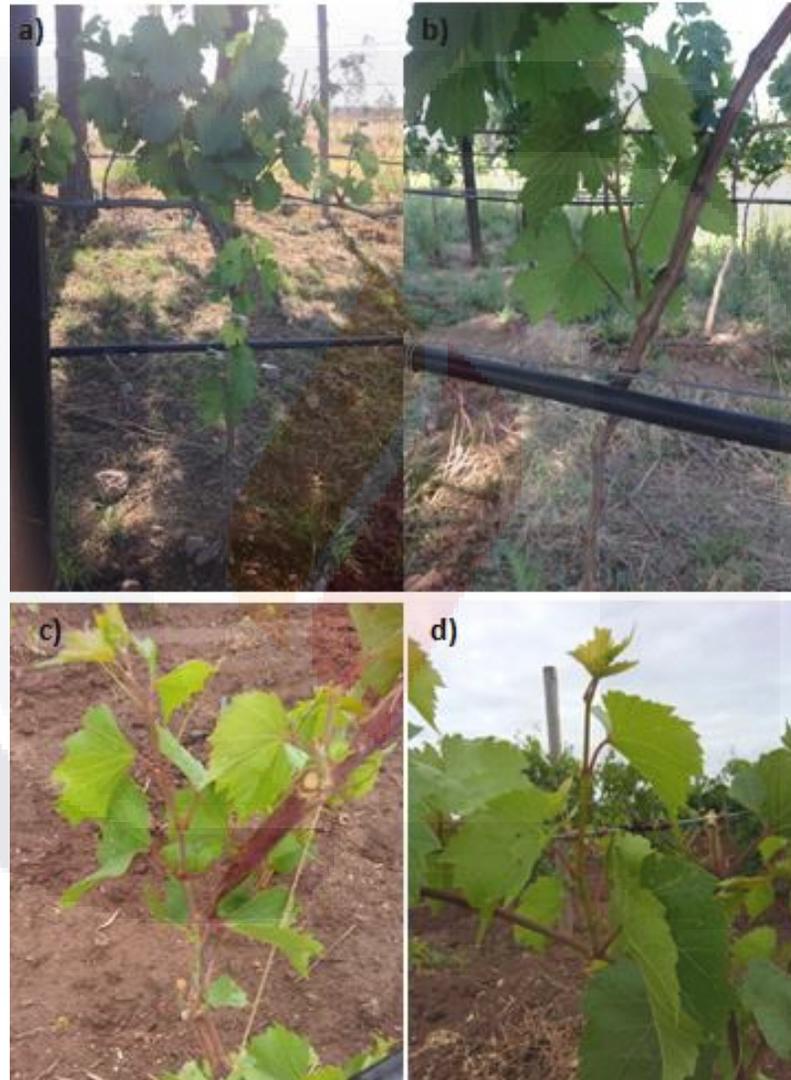


Figura 1. Brotes juveniles de plantas adultas establecidas en campo, de *V. vinífera* L. Malbec (a), Tinta de toro (b), SO4 (c), 110-Ritcher (d).

9.2 MEDIO MS MODIFICADO (Chee y Pool, 1982).

Reactivos Sólidos Pesables	
Reactivo	Cantidad (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	180.6
KH ₂ PO ₄	170
Ca(NO ₃) ₂	4923
Fe.EDTA Na ₂ .EDTA	43
Sacarosa	30000

Solución	Reactivo	1000X Cantidad mg L ⁻¹
A	MnSO ₄	15.0
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
B	KI	0.83
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
C	H ₃ Bo ₃	6.2
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
Vitaminas	Ácido nicotínico	5
	Pirridoxina	5
	Tiamina	5
	Myo-inositol	100

9.3 MEDIO MS MODIFICADO (Roubelakis y Zivanovitc, 1991).

Reactivos Sólidos Pesables	
Reactivo	Cantidad (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	500
KNO ₃	1000
MgSO ₄ .7H ₂ O	180
KH ₂ PO ₄	100
CaCl ₂ .2H ₂ O	200
Fe.EDTA Na ₂ .EDTA	43
Sacarosa	30000

Solución	Reactivo	1000X Cantidad mg L ⁻¹
A	MnSO ₄	15.0
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
B	KI	0.83
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
C	H ₃ Bo ₃	6.2
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
Vitaminas	Biotina	0.1
	Ácido nicotínico	5
	Pirridoxina	5
	Tiamina	5
	Myo-inositol	100