
NIVELES DE SACAROSA EN EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* Y ACLIMATIZACIÓN *EX VITRO* DE PLÁNTULAS DEL PORTAINJERTO DE VID R110 (*Vitis rupestris* × *Vitis berlandieri*)

Raquel Paz da Silva y Ángel Villegas Monter

RESUMEN

La concentración de sacarosa y el intercambio gaseoso del contenedor son factores que influyen en las características de las plántulas micropropagadas. Brotes apicales del portainjerto de vid R110 (*Vitis rupestris* × *Vitis berlandieri*) fueron cultivados *in vitro* en medio con 0; 43,8; 87,6; 131,4 y 175,2mM de sacarosa, en contenedores con o sin intercambio gaseoso complementario. Después de 13 días de cultivo las plántulas fueron trasplantadas y colocadas en invernadero, donde permanecieron por nueve semanas. El porcentaje de enraizamiento, número y tamaño de raíces, tamaño de brotes, peso de materia fresca y contenido de agua de los explantes *in vitro*, disminuyeron al

incrementar la concentración de sacarosa, en los contenedores con intercambio gaseoso. En la etapa de aclimatación, la concentración de sacarosa y tipo de contenedor influyeron en el número y tamaño de raíces. El tamaño de brotes, número de hojas y el contenido de agua fueron menores en las plántulas que crecieron con 175,2mM de sacarosa, en contenedores sin intercambio gaseoso. La supervivencia fue de 100% después de nueve semanas en plantas que se desarrollaron en medio con 43,8mM de sacarosa en contenedores sin intercambio; así como en 43,8 y 87,6mM en contenedores con intercambio gaseoso.

SUCROSE LEVELS IN THE *IN VITRO* ROOTING AND *EX VITRO* ACCLIMATIZATION OF PLANTLETS OF THE R110 (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*) GRAPEVINE ROOTSTOCK

Raquel Paz da Silva and Ángel Villegas Monter

SUMMARY

Sucrose concentration and container gas exchange are factors that influence the characteristics of micropropagated and acclimatized plantlets. Apical buds of the rootstock of the R110 (*Vitis rupestris* × *Vitis berlandieri*) grapevine were cultivated in media containing 0, 43.8, 87.6, 131.4, and 175.2mM sucrose, in containers with or without complementary gas exchange. After 13 days of growth, the plantlets were transplanted and placed in a greenhouse, where they remained for nine weeks. Percentage of rooting, number and length of the roots, bud size, weight of fresh material and water content *in vitro*, all decreased with the

increase in the concentration of sucrose, the change being more pronounced in containers with gas exchange. In the acclimatization stage, sucrose concentration and type of container did not influence the number and length of the roots. However, bud size, number of leaves, and water content were lower in the plantlets growing with 175.2mM sucrose in containers with gas exchange. The survival rate was 100% after nine weeks with 43.8mM of sucrose in containers without exchange, and with 43.8 and 87.6mM in containers with gaseous exchange.

Introducción

Aún cuando la micropropagación ha sido utilizada extensivamente para la multiplicación de numerosas especies, su uso a escala comercial es restringido debido a la pérdida de plántulas al ser transferidas a invernadero (Pospíšilová *et al.*, 1999),

debido a las diferencias que existen entre las condiciones, tales como intensidad luminosa, temperatura, humedad relativa, sustrato sin azúcar y condiciones no estériles, en que se desarrollan las plantas *in vitro* e *in vivo*. Además, las plántulas propagadas *in vitro* poseen características anatómicas

y fisiológicas diferentes de las cultivadas convencionalmente: cutícula más delgada en las hojas (Majada *et al.*, 2000), funcionamiento deficiente de los estomas (Shackel *et al.*, 1990), células en empalizada no uniformes (Fabbri *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1986), tejidos hiperhidratados (Majada *et al.*, 2000),

y modificación en el sistema vascular (Piccotino *et al.*, 1997), entre otras. Además, la condición fisiológica y las características intrínsecas de las plántulas cultivadas *in vitro* tienen influencia en la supervivencia en invernadero. Por ello se han utilizado algunas estrategias para que las plántulas producidas *in*

PALABRAS CLAVE / Adaptación *ex vitro* / Contenedor / Fuente de Carbono / Intercambio Gaseoso / Micropropagación / *Vitis* /

Recibido: 18/12/2007. Modificado: 20/11/2009. Aceptado 25/11/2009.

Raquel Paz da Silva. Ingeniera Agronómica, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil. M.C., Universidade Federal do Rio

Grande do Sul, Brasil. Doctora, Colegio de Postgraduados (COLPOS), México. Dirección: Vivero Cazones, Reforma 180, Cazones, Ver., México, CP

93970. Email: raquel_paz@hotmail.com

Ángel Villegas Monter. Ingeniero Agrónomo, Escuela Nacional de Agricultura, México.

M.C., COLPOS, México. Doctor, Universidad de Córdoba, España. Profesor Investigador, COLPOS, México.

NÍVEIS DE SACAROSE NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO *EX VITRO* DE PLANTAS DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA R110 (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*)

Raquel Paz da Silva e Ángel Villegas Monter

RESUMO

A concentração de sacarose e o intercâmbio gasoso do contenedor são fatores que influenciam nas características das plantas micropropagadas e aclimatizadas. Devido ao anterior, se cultivaram *in vitro* brotes apicais do porta-enxerto de videira R110 (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*), em medio de cultivo com 0, 43,8; 87,6; 131,4 e 175,2mM de sacarose, em contenedores com ou sem intercâmbio gasoso complementar. Depois de 13 dias de cultivo, as plantas foram transplantadas e colocadas em estufa onde permaneceram por nove semanas. *In vitro*, a porcentagem de enraizamento, número e tamanho de raízes, tamanho de brotos, peso de materia fresca e con-

teúdo de água diminuíram com o incremento da concentração de sacarose, de maneira más acentuada nos contenedores com intercâmbio gasoso. Na etapa da aclimatização, a concentração de sacarose e o tipo de contenedor não influenciaram no número e tamanho das raízes. Entretanto, o tamanho de brotos, número de folhas e o conteúdo de água foram menores nas plantas que cresceram com 175,2mM de sacarose em contenedores sem intercâmbio gasoso. A sobrevivência foi de 100%, depois de nove semanas, com 43,8mM de sacarose em contenedores sem intercâmbio e com 43,8 ou 87,6mM, em contenedores com intercâmbio gasoso.

in vitro se asemejen a las propagadas convencionalmente; tal es el caso de reducir o eliminar la fuente de azúcar en el medio de cultivo (Zobayed *et al.*, 2000), incrementar la intensidad luminosa en el cuarto de incubación (Wilson *et al.*, 2001) y elevar la concentración de CO₂ dentro de los contenedores (Heo *et al.*, 2001). También se disminuye la humedad relativa dentro de los contenedores para estimular cambios significativos en el crecimiento, anatomía y fisiología de las plántulas (Nguyen *et al.*, 2001). Las respuestas al enraizamiento y crecimiento de las plántulas varían con el genotipo, concentraciones de sacarosa y condiciones de cultivo. Así, el aumento en la concentración de sacarosa influyó de manera negativa en el enraizamiento y número de raíces en *Vitis*, híbrido 'Remaily Seedless' (Chée y Pool, 1988), por lo que se prefiere eliminar (Han *et al.*, 2003), reducir (Blazina *et al.*, 1991) o mantener la concentración de sacarosa utilizada en la etapa de multiplicación (Thomas, 2000). La aclimatización se puede mejorar si se incrementa la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, debido a la producción de biomasa durante el crecimiento *in vitro*, que persiste aún después del trasplante (Fila *et al.*, 1998); tras 30 días obtuvie-

ron 100% en la aclimatización del portainjerto de *Vitis vinifera* 'Chasselas' x *Vitis berlandieri* 41B, al emplear en medio con 18,3; 36,4; 73,0 y 109,6mM de sacarosa. Otro aspecto importante a considerar es el potencial osmótico. George (1993) comenta que el azúcar, además de actuar como fuente de carbohidratos, modifica el potencial osmótico del medio. En estas condiciones, el estrés causado por la reducción del potencial osmótico disminuye el crecimiento, debido a señales generadas en las raíces por las hormonas (Munns, 2002).

El uso de contenedores con intercambio gaseoso durante el cultivo *in vitro*, puede incrementar la tasa de supervivencia *ex vitro* en *Delphinium* y *Hosta* (Murphy *et al.*, 1998) y *Rehmannia glutinosa* (Cui *et al.*, 2000). Por su parte, Shim *et al.*, (2003) sugieren que el intercambio gaseoso es el factor clave para incrementar la supervivencia durante la aclimatización y permite la reducción del periodo de trasplante para la producción de portainjertos de *Vitis*. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del uso de diferentes concentraciones de sacarosa en contenedores con o sin intercambio gaseoso en el enraizamiento y aclimatización de plántulas del portainjerto de vid R110 enraizadas *in vitro*.

Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* del Programa de Fruticultura y en el invernadero de las instalaciones del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México, México.

Material vegetal, condiciones de incubación y aclimatización

Se utilizaron brotes apicales de ~15mm del portainjerto de vid R110 (*Vitis rupestris* x *V. berlandieri*) multiplicados *in vitro*. Los explantes se establecieron en dos tipos de contenedores de policarbonato de 7,62x7,62x10,16cm (Magenta GA-7, Sigma). El primer tipo consistió de contenedores intactos, sin intercambio gaseoso complementario, y el segundo grupo tenía una perforación de 1,33cm² a un lado del contenedor a 5cm de la base, cubierta con papel filtro Whatman N° 42 con poros de 2,5µm, para el intercambio gaseoso complementario. En los contenedores se depositaron 50ml del medio de cultivo utilizado por Villegas *et al* (1991), complementado con 0,1µM de ácido indolacético (AIA); 6,5g·l⁻¹ de agar agar (Merck) y cinco niveles de sacarosa Sigma (0; 43,8; 87,6; 131,4 y 175,2mM), que corresponden a potenciales osmóticos calculados de

-0,113; -0,218; -0,323; -0,428 y -0,534MPa, respectivamente. La sacarosa y el agar se incorporaron al medio antes de ajustar el pH a 5,7 y se procedió a la esterilización a 121°C y 20lb durante 15min. En condiciones asépticas, se sembraron nueve explantes por contenedor, que fueron mantenidos en cuarto de incubación con 25 ±2°C, 16h de fotoperiodo con intensidad luminosa de 76µmol·m⁻²·s⁻¹, producida a partir de lámparas fluorescentes blancas frías. Después de 13 días de cultivo *in vitro*, las plántulas se trasplantaron a vasos de unice N°6, que contenían mezcla de *peat moss* y agrolita en proporción 1:1 (v/v), cubiertos con vasos transparentes N° 12, utilizados como domos. Antes del trasplante, las raíces de todas las plántulas fueron podadas a 1cm, enjuagadas y posteriormente mantenidas durante 2min en solución de Captán (2g·l⁻¹). Los vasos con las plántulas fueron mantenidos en invernadero cubierto por malla sombra al 50%. A los siete días del trasplante se retiraron los domos, durante 10min en el primer día, 20min en el segundo, 30min en el tercero, 1h en el cuarto, 2h en el quinto, 4h en el sexto y 8h en el séptimo día. En el día ocho, se retiraron completamente los domos. A partir de esa fecha se encendieron lámparas fluorescentes blancas

frías de las 18:00 hasta las 22:00, para que el fotoperiodo fuera de 16h. Después que los domos fueron retirados, las plántulas se regaron cada tres días con agua destilada.

Variables evaluadas

In vitro. Después de 13 días de cultivo, se evaluó el porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces, tamaño de brotes, peso de materia fresca y seca de la parte aérea, así como contenido de agua en los tejidos.

In vivo. A las tres y nueve semanas del trasplante, se determinaron el número y longitud de raíces, número de hojas, tamaño de brotes, peso de materia fresca y seca, contenido de agua de la parte aérea, y tasa de supervivencia.

Análisis estadístico

Para el experimento *in vitro* se utilizó un diseño experimental con bloques completamente al azar con arreglo factorial 5x2. Los factores fueron concentración de sacarosa (0; 43,8; 87,6; 131,4 y 175,2mM) y tipo de contenedor (con o sin intercambio gaseoso complementario). Cada tratamiento estuvo compuesto por cuatro repeticiones de un contenedor Magenta con nueve explantes (36 explantes). Para las variables número y tamaño de raíces, se tomaron datos de las 360 plántulas. Para determinar el peso de materia fresca, seca y contenido de agua, se utilizaron tres plántulas de cada contenedor (120 plántulas). Las seis plántulas restantes de cada contenedor (240 en total) se utilizaron para la etapa de aclimatación. La respuesta *in vitro* fue analizada por regresión para determinar las tendencias, y para

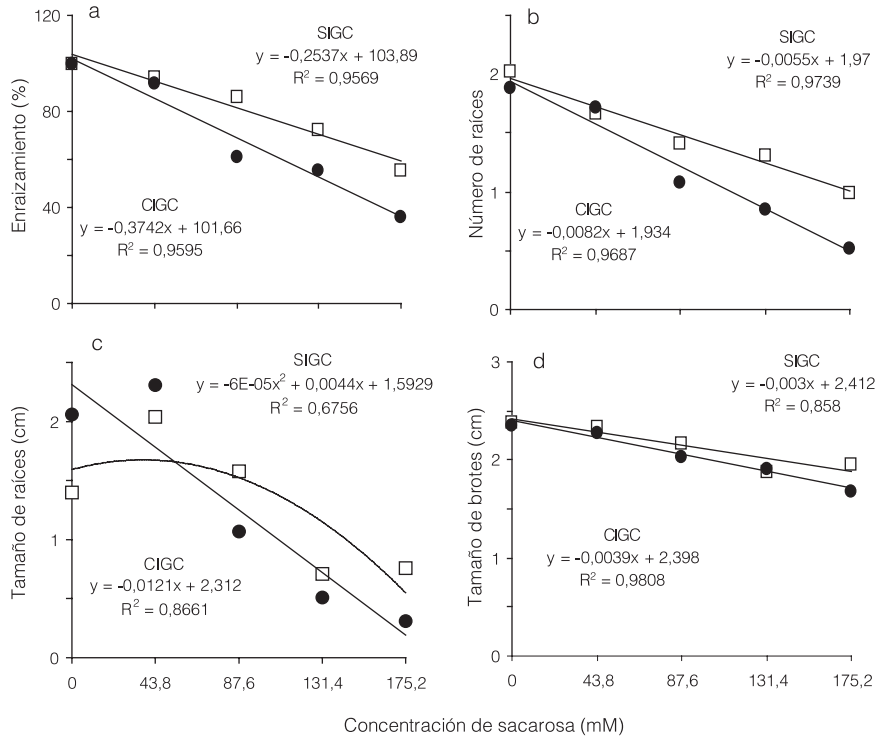


Figura 1. Efecto de la concentración de sacarosa y de contenedor sin (□) o con (●) intercambio gaseoso complementario, en el enraizamiento (a), número de raíces (b), tamaño de raíces (c) tamaño de brotes (d) del portainjerto de vid R110 cultivados *in vitro* durante 13 días.

la aclimatación mediante análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de la diferencia mínima significativa protegida por el procedimiento MIXED (SAS, 1999).

Resultados y Discusión

En general, para todas las variables evaluadas *in vitro*, la respuesta de los explantes que permanecieron en los contenedores sin intercambio complementario fueron mayores que en los contenedores con intercambio. Esta respuesta no coincide con lo encontrada por Smith *et al* (1992), donde el uso de contenedores con intercambio gaseoso favoreció el enraizamiento de *Vitis vinifera*.

La sacarosa influyó negativamente en el enraizamiento ($R^2= 0,95$), número y tamaño de raíces ($R^2= 0,97$ y $R^2= 0,86$, respectivamente), así como el tamaño de brotes ($R^2= 0,85$), para las plantas propagadas en contenedores con o sin intercambio gaseoso (Figura 1). Las mejores concentraciones de sacarosa

para las variables estudiadas fueron de 0 ó 43,8mM. La reducción del enraizamiento y crecimiento se debe a la disminución del potencial osmótico que dificulta la absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo (Aguilar *et al.*, 2000; Cárdenas y Villegas, 2002). El efecto negativo del potencial osmótico en el enraizamiento ha sido comprobado en *Vitis* (Dami y Hughes, 1995) y *Saintpaulia ionantha* (Sawwan *et al.*, 1998). Al utilizar contenedores con intercambio gaseoso complementario, la reducción en los valores de las variables estudiadas fue mayor que en los contenedores sin intercambio gaseoso; principalmente con 175,2mM de sacarosa (-0,534MPa), lo que se pudo corroborar con las regresiones (Figura 1). Las respuestas al enraizamiento y crecimiento de las plántulas varían con el genotipo y condiciones de cultivo, tal como se observó en este trabajo y por otros autores (Raya *et al.*, 2009), por lo cual es necesario definir las condiciones de enraizamiento para cada

especie y portainjerto.

El peso de la materia fresca de la parte aérea disminuyó con el incremento de la sacarosa, mientras que el peso de materia seca tuvo la tendencia de aumentar, tendencia que fue más clara en contenedores con intercambio gaseoso (Figura 2). Ha sido reportado que el incremento de sacarosa en el medio de cultivo aumenta tanto el peso de materia fresca como el de materia seca (Kubota *et al.*, 2002; Shim *et al.*, 2003); de igual forma, el peso se favorece al utilizar contenedores con intercambio gaseoso (Lucchesini *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2001). Lo anterior se debe a que al aumentar el contenido de sacarosa, el potencial osmótico del medio disminuye (Cárdenas y Villegas, 2002) y se limita

la absorción de agua, pero se favorece el ingreso de sacarosa y con ello el aumento de materia seca.

Otra alternativa para favorecer el crecimiento de las plántulas *in vitro*, es promover la fotosíntesis controlando niveles de luz y CO_2 , (Zobayed *et al.*, 2000; Heo *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001). Se observó que el contenido de agua no varió en ausencia de sacarosa, entre ambos tipos de contenedores. Sin embargo, cuando la concentración se incrementó hasta 175,2mM, esta variable disminuyó 16 y 23%, en contenedores sin y con intercambio gaseoso complementario (Figura 2). Calvete *et al.* (2002) al propagar plántulas de *Fragaria xananassa* 'Campinas' durante tres semanas *in vitro*, observaron disminución en el contenido de agua de 90 a 82%, en la parte aérea, cuando incrementó de 0 a 175,2mM la concentración de sacarosa. En el presente trabajo, tanto la materia fresca como el contenido de agua disminuyeron y el peso de la materia seca aumentó,

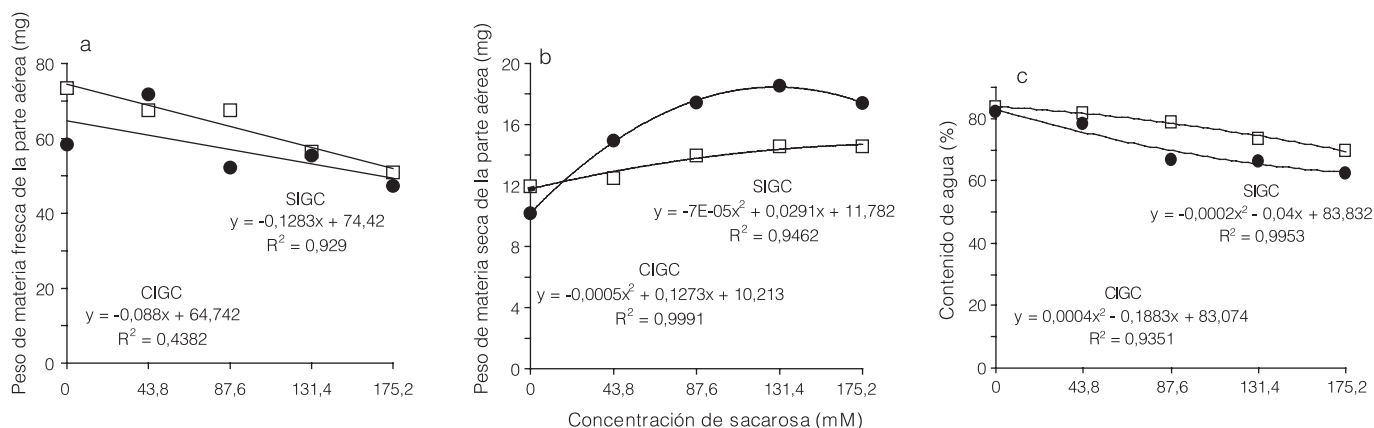


Figura 2. Efecto de la concentración de sacarosa y de contenedor sin (□) o con (●) intercambio gaseoso complementario en el peso de materia fresca (a) y seca (b) y en el contenido de agua (c) de plántulas del portainjerto de vid R110 cultivados *in vitro* durante 13 días.

TABLA I
EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SACAROSA Y TIPO DE CONTENEDOR UTILIZADOS *IN VITRO*, EN EL TAMAÑO DE BROTES Y NÚMERO DE HOJAS DE PLÁNTULAS DEL PORTAINJERTO DE VID R110, DESPUÉS DE TRES Y NUEVE SEMANAS EN INVERNADERO

Tratamientos	Tamaño de brotes (cm)		Número de hojas		
	Tres semanas	Nueve semanas	Tres semanas	Nueve semanas	
SIGC	0	2,50 a	4,43 ab	4,25 ab	6,57 a
	43,8	2,55 a	4,00 ab	4,25 ab	6,00 ab
	87,6	2,25 ab	3,56 ab	3,88 ab	5,25 ab
	131,4	1,96 ab	3,44 ab	3,75 ab	5,00 ab
	175,2	1,88 ab	2,86 b	3,00 b	4,43 b
CIGC	0	2,50 a	4,50 ab	4,13 ab	6,00 ab
	43,8	2,50 a	4,94 a	4,38 a	6,25 a
	87,6	2,13 ab	3,50 ab	3,75 ab	5,60 ab
	131,4	1,53 b	3,58 ab	3,63 ab	5,17 ab
	175,2	1,94 ab	3,70 ab	3,75 ab	5,20 ab
Significancia					
Cont. (B)	NS	NS	NS	NS	
Sac.(A)	**	**	**	**	
A x B	NS	NS	NS	NS	

SAC: sacarosa, CONT: contenedor, SIGC: sin intercambio gaseoso complementario, CIGC: con intercambio gaseoso complementario. Medias con la misma literal en la columna son iguales estadísticamente al 0,05 (prueba de Tukey). **: $p < 0,01$, NS: no significativo.

lo que pone de manifiesto el efecto de esta fuente de carbono como modificador del potencial osmótico del medio de cultivo, además de aportar energía a las plántulas.

La concentración de sacarosa y el tipo de contenedor utilizados durante el cultivo *in vitro*, no afectaron el número y tamaño de las raíces de las plántulas durante el establecimiento en invernadero. Por otra parte, el tamaño de brotes y el número de hojas disminuyeron al aumentar la concentración de sacarosa (Tabla I). Se observó, de ma-

nera general, que durante el período de adaptación de las plántulas a las condiciones *ex vitro* (tres semanas) prácticamente no hubo crecimiento. A partir de ese momento hasta las nueve semanas, con excepción del número de raíces, incrementaron todas las demás variables estudiadas (Tabla I). Se pudo observar que en las primeras semanas del trasplante a suelo, crecen más las raíces que la parte aérea. En las plantas crecidas en ausencia de sacarosa en contenedores sin intercambio gaseoso, la relación

parte aérea/raíz fue de 2,35 a las tres semanas y disminuyó a 0,31 a las nueve semanas. La mayor diferencia se observó al utilizar 175,2mM de sacarosa en contenedores sin intercambio gaseoso complementario, donde la relación fue de 5,69 a las tres semanas y disminuyó a 0,20 a las nueve semanas. Esto demuestra que de las cuatro a las nueve semanas crece más la parte aérea, tendencia que es mayor en las plantas que se desarrollaron en medios con concentraciones de sacarosa <87,6mM. Debido a que en los primeros días las plántulas no tienen actividad fotosintética, las reservas almacenadas en los explantes vienen a ser un factor importante durante la aclimatación. Por ello el trasplante se debe realizar cuando las

raíces tengan 1-1,5cm, situación que se logra antes de los 15 días, dependiendo de la especie y no a los 28 días como en muchos casos sucede (Raya *et al.*, 2009). Estos resultados son contrarios a los de Shim *et al.* (2003), quienes señalaron que el intercambio gaseoso fue más importante que la concentración de sacarosa para el crecimiento del portainjerto de *Vitis* '5BB' en condiciones *ex vitro*. El hecho que el tipo de contenedor no tenga influencia en las variables estudiadas puede ser debi-

do al poco tiempo que las plántulas permanecieron en cultivo *in vitro*. Se consideró hacer el trasplante a los 13 días porque la mayor parte de las plántulas ya tenían raíces >1cm; además, fue necesario podar las raíces para uniformizar esta variable y facilitar el trasplante. En estudios previos (datos no mostrados) se determinó que plántulas con raíces de 1cm, eran capaces de establecerse fácilmente en el suelo. Este método se implementó tomando en cuenta lo indicado por Thomas y Ravindra (1997), quienes para facilitar el trasplante y economizar tiempo en la etapa de aclimatación, utilizaron plántulas de *Vitis vinifera* 'Arka Neelamani' con raíces podadas.

El peso de materia seca de la parte aérea se incrementó a las tres semanas en invernadero en relación al cultivo *in vitro*; principalmente en las plántulas crecidas en ausencia de sacarosa y contenedores con intercambio gaseoso, donde aumentó 95% (Tabla II). Por otra parte, el contenido de agua disminuyó, lo cual implica que las plántulas cultivadas *in vitro* poseen mayor cantidad de agua. Estos resultados concuerdan con los de Fila *et al.* (1998) quienes comentan que la aclimatación se puede mejorar si se incrementa la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, debido a la mayor producción de materia seca *in vitro*.

TABLA II
EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SACAROSA Y TIPO DE CONTENEDOR UTILIZADOS *IN VITRO*, EN EL PESO DE MATERIA FRESCA (PMFA), SECA (PMSA) Y CONTENIDO DE AGUA, DE LA PARTE AÉREA Y SUPERVIVENCIA DE PLÁNTULAS DEL PORTAINJERTO DE VID R110, DESPUÉS DE TRES Y NUEVE SEMANAS EN INVERNADERO

Tratamientos	Peso de materia fresca (mg)		Peso de material seca (mg)		Contenido de agua (%)		Supervivencia (%)	
	Sac. (mM)	Tres semanas	Nueve semanas	Tres semanas	Nueve semanas	Tres semanas	Nueve semanas	
SIGC	0	65,41 ab	152,34 a	20,14 a	38,03 a	67,95 ab	74,90 ab	87,5
	43,8	56,40 ab	103,96 a	19,11 a	26,63 a	65,63 ab	74,54 ab	100,0
	87,6	55,63 ab	79,72 a	18,20 a	21,23 a	65,83 ab	72,99 ab	87,5
	131,4	60,13 ab	167,04 a	17,86 a	40,03 a	67,34 ab	75,93 ab	87,5
	175,2	42,00 b	129,08 a	19,34 a	33,33 a	53,81 b	70,23 b	87,5
CIGC	0	71,83 a	150,65 a	19,93 a	37,83 a	71,70 a	74,01 ab	75,0
	43,8	72,45 a	119,35 a	22,93 a	29,71 a	67,86 ab	74,78 ab	100,0
	87,6	66,96 ab	162,77 a	21,79 a	37,00 a	65,71 ab	76,87 a	100,0
	131,4	53,76 ab	105,72 a	18,25 a	24,76 a	63,20 ab	76,08 ab	75,0
	175,2	62,95 ab	106,36 a	23,06 a	26,18 a	62,91 ab	75,33 ab	62,5
Significancia								
Cont. (B)		*	NS	NS	NS	NS	NS	
Sac. (A)		NS	**	NS	**	*	NS	
A x B		NS	NS	NS	NS	NS	NS	

SAC: sacarosa, CONT: contenedor, SIGC: sin intercambio gaseoso complementario, CIGC: con intercambio gaseoso complementario.

Medias con la misma literal en la columna son iguales estadísticamente al 0,05 (prueba de Tukey). *: p < 0,05, **: p < 0,01, NS: no significativo.

A las nueve semanas de cultivo en invernadero, el peso de materia fresca y seca de la parte aérea de las plántulas no fueron influenciados por las condiciones de cultivo *in vitro*; sin embargo, el contenido de agua fue menor en las plántulas cultivadas en contenedores sin intercambio gaseoso y con 175,2mM de sacarosa (Tabla II). Ello implica que el efecto de los tratamientos *in vitro* es importante en las primeras semanas.

La supervivencia fue de 100% en contenedores con y sin intercambio gaseoso y 43,8mM de sacarosa y en contenedores con intercambio gaseoso y 87,6mM de sacarosa, mientras que los menores porcentajes se obtuvieron en ausencia de sacarosa o en concentraciones $\geq 131,4$ mM (Tabla II). Por lo tanto, se considera que estos tratamientos afectaron negativamente la supervivencia, aspecto que puede estar relacionado en el primer caso (sin sacarosa) a la falta de energía y en el segundo (niveles altos) al potencial osmótico. En los contenedores con intercambio

gaseoso, la supervivencia fue de 100% con 43,8 y 87,6mM de sacarosa. Sin embargo, al utilizarse 175,2mM la supervivencia se redujo a 62,5% (Tabla II). Esto significa que las plantas necesitan de una fuente de energía, durante la etapa de crecimiento *in vitro*, para poder sobrevivir en la etapa de aclimatización. Sin embargo, el exceso de sacarosa, disminuye el potencial osmótico del medio de cultivo y con eso la absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo (Calvete *et al.*, 2002). En este trabajo las plantas que tuvieron menor tamaño y reservas almacenadas, murieron en la etapa de aclimatización. Shim *et al.* (2003), al cultivar plántulas del portainjerto de *Vitis* '5BB' en medio sin o con 87,6mM de sacarosa en contenedores sin y con intercambio gaseoso, obtuvieron 100% de supervivencia en todos los tratamientos. Eso indica que los genotipos de vid responden de manera diferente a la aclimatización, dependiendo de la concentración de sacarosa y tipo de contenedores en que fueron cultivados.

Conclusiones

Las concentraciones de sacarosa utilizadas durante el cultivo *in vitro* del portainjerto R110 afectaron el tamaño de brote y número de hojas *in vitro* a las tres y nueve semanas.

Las plántulas aclimatizadas en invernadero en las tres primeras semanas desarrollan la raíz y a partir de la cuarta semana la parte aérea. Esta respuesta es mayor en las plantas desarrolladas *in vitro* en 43,8y 87,6mM de sacarosa.

El intercambio gaseoso del contenedor no afectó el porcentaje de supervivencia, pero sí la concentración de sacarosa, donde niveles superiores a 131,4mM fueron negativos.

REFERENCIAS

- Aguilar ML, Espadas FL, Coello J, Maust BE, Trejo C, Robert ML, Santamaría JM (2000) The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. *J. Exp. Bot.* 51: 1861-1866.
- Blazina I, Korosec-Koruza Z, Ravnikar M, Gogala N (1991)

Regeneration and Micropropagation of the grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Zelen') from shoot tip meristems. *Acta Hort.* 300: 123-126.

Calvete EO, Kämpf AN, Suzin M (2002) Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangoiro. *Hort. Bras.* 20: 186-191.

Cárdenas LA, Villegas MA (2002) Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex.* 25: 213-217.

Chée R, Pool RM (1988) Sucrose and NAA influence growth of subcultured shoots and *in vitro* production of roots in *Vitis*. *HortScience* 23: 776.

Cui YY, Hahn EJ, Kozai T, Paek K (2000) Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 62: 219-226.

Dami I, Hughes H (1995) Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 42: 179-184.

Fabbri A, Sutter E, Dunston SK (1986) Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. *Sci. Hort.* 28: 331-337.

Fila G, Ghashghaie J, Hoarau J, Cornic G (1998) Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. *Physiol. Plant.* 102: 411-418.

George EF (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 2. Exegetics. Londres, RU. 1361 pp.

Han DS, Niimi Y, Wu JY (2003) Micropropagation of *Vitis amurensis* Rupr.: an improved protocol. *Vitis* 42: 163-164.

Heo J, Wilson SB, Kozai T (2001) A forced ventilation Micropropagation system for photoautotrophic production of sweetpotato plug plantlets in a scaled-up culture vessel: I. Growth and uniformity. *Hort-Technology* 11: 90-94.

Kubota C, Ezawa M, Kozai T, Wilson SB (2002) *In situ* estimation of carbon balance of *in vitro* sweet potato and tomato plantlets cultured with varying initial sucrose concentrations in the medium. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 127: 963-970.

Lucchesini M, Mensuali-Sodi A, Massai R, Gucci R (2001) Development of autotrophy and

- tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration. *Biol. Plant.* 44: 167-174.
- Majada JP, Tadeo F, Fal MA, Sánchez-Tamés R (2000) Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 63: 207-214.
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Env.* 25: 239-250.
- Murphy KP, Santamaría JM, Davies WJ, Lumsden PJ (1998) Ventilation of culture vessels. I. Increased growth *in vitro* and survival *ex vitro* of *Delphinium*. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 73: 725-729.
- Nguyen QT, Kozai T, Heo J, Thai DX (2001) Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 66: 217-225.
- Piccotino D, Massai R, Dichio B, Unzo V (1997) Morphological and anatomical modifications induced by *in vitro* propagation of kiwifruit plants. *Acta Hort.* 444: 127-132.
- Pospíšilová J, Tichá I, Kadlecěk P, Haise ID, Plzáčková Š (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol. Plant.* 42: 481-497.
- Raya Montaña YA, Villegas Monter A, Arellano Ostoa G (2009) Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 111-117.
- SAS (1999) SAS. *OnlineDoc, version 8*. CD-ROM. SAS Institute. Cary, NC, EEUU.
- Sawwan J, Abu-Qaoud H, Hozain MI (1998) Effect of sucrose level on *in vitro* and *ex vitro* growth of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl). *Adv. Hort. Sci.* 12: 8-10.
- Shackel KA, Novello V, Sutter EG (1990) Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. *J. Am. So. Hort. Sci.* 115: 468-472.
- Shim SW, Hahn EJ, Paek KY (2003) *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 75: 57-62.
- Smith MA, Palta JP, McCown BH (1986) Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown asian white birch. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 11: 437-442.
- Smith EF, Gribaudo I, Roberts AV, Mottley J (1992) Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. *Hort-Science* 27: 111-113.
- Thomas P (2000) Microcutting leaf area, weight and position on the stock shoot influence root vigour, shoot growth and incidence of shoot tip necrosis in grape plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 61: 189-198.
- Thomas P, Ravindra MB (1997) Effect of pruning or removal of *in vitro* formed roots on *ex vitro* root regeneration and growth in micropropagated grapes. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 51: 177-180.
- Villegas MA, Mazuelos C, Troncoso A (1991) Influence of N-NO₃ and N-NH₄ on the mineral composition of grape-vine rootstocks cultured *in vitro*. *Acta Hort.* 300: 119-121.
- Wilson SB, Heo J, Kubota C, Kozai T (2001) A forced ventilation Micropropagation system for photoautotrophic production of sweetpotato plug plantlets in a scaled-up culture vessel: II. Carbohydrates status. *HortTechnology* 11: 95-99.
- Zobayed SMA, Afren-Zobayed F, Kubota C, Kozai T (2000) Water control and survival of *Ipomoea batatas* grown photoautotrophically under forced ventilation and photo-mixotrophically under natural ventilation. *Ann. Bot.* 86: 603-610.