ZUBÍA Monográfico	7	31-40	Logroño	1995

MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE VARIEDADES DE VID (*VITIS VINIFERA* L.) CULTIVADAS EN LA RIOJA (ESPAÑA)*

R. Tomás Las Heras**
M.J. Gil García***
E. Núñez Olivera**
J. Martínez Abaigar**

RESUMEN

Se presentan los resultados del uso de diferentes sistemas de micropropagación "in vitro" sobre algunas variedades de vid, algunas de ellas de cultivo generalizado y dominante en La Rioja. Se han utilizado cinco condiciones diferentes para el establecimiento de los cultivos. Los mejores resultados para todas las variedades usadas se obtuvieron utilizando medios de iniciación y multiplicación sólidos (6 g/l de agar) en condiciones de fotoperiodo de 16 h. El medio base usado fue MS suplementado con 30 g/l de sacarosa y 2 mg/l BA. Los brotes formados fueron transferidos a medios de enraizamiento suplementados o no con auxina (2 µM AIB) donde se valoró la emisión y crecimiento de raíces. Las plántulas obtenidas fueron transplantadas a macetas con tierra para su aclimatación y, posteriormente transferidas a cultivo en campo

Palabras clave: micropropagación, enraizamiento, in vitro, Vitis vinifera.

Five different "in vitro" micropropagation methods have been assayed on several grapevine (Vitis vinifera L.) varieties cultivated in La Rioja (Spain), either of prevailing or limited use. The utilization of solid initiation and multiplication media (6 g/l agar) under 16-hour photoperiod conditions yielded the best results for all varieties. MS supplemented with 30 g/l saccharose and 2 mg/l BA was utilized as basic medium. The grown stems were transferred to rooting media supplemented or non-supplemented with auxin (2 µM IBA), where root production and growth were measured. The seedlings obtained were acclimated in pots with peat and, afterwards, were transferred to field conditions.

Key words: micropropagation, rooting, in vitro, Vitis vinifera.

* Recibido el 19 de diciembre de 1994. Aprobado el 10 de marzo de 1995.

** Departamento de Agricultura y Alimentación. Área de Biología Vegetal. Universidad de La Rioja.
*** Departamento de Geología. Universidad de Alcalá de Henares (Madrid).

0. INTRODUCCIÓN

El cultivo "in vitro" de plantas podemos definirlo como el cultivo de todo tipo de células, tejidos u órganos vegetales bajo condiciones de esterilidad. Con este sistema de cultivo se pueden regular todos los factores que influyen en la producción y cultivo de especies vegetales, desde los requerimientos nutricionales, pasando por la luz, fotoperiodo, temperatura, humedad, etc.

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 bioquímico, genético-molecular, etc. El ámplio 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.

De todos es conocido que 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 (bacterias, hongos o virus), a la depredación por parte de insectos, etc. La selección de variedades resistentes a estos ataques ha sido un objetivo clásico de los viticultores, empleando en ello mucho tiempo y amplias zonas de cultivo donde experimentar con nuevas variedades o realizar cruzamientos entre las ya existentes.

Es en estos procesos de mejora donde el cultivo "in vitro" puede ayudar a la obtención, en un periodo de tiempo menor y en un menor espacio físico, de variedades resistentes o a mejorar las ya existentes mediante técnicas de manipulación genética.

Otro factor a tener en cuenta es la necesidad de preservar las variedades autóctonas de cada región ya que son, por lo general, las mejor adaptadas a las condiciones naturales de cultivo. Estas variedades están siendo desplazadas por variedades de mayor producción de uva y por tanto pueden llegar a perderse definitivamente. Es necesario mantenerlas ya que son portadoras de caracteres genéticos que pueden ser necesarios en el futuro, para mejorar las variedades o hacerlas resistentes a determinados ataques (Martínez de Toda, 1990).

Para poder utilizar el cultivo "in vitro" como herramienta, para la consecución de variedades resistentes de vid o para mantener las ya existentes, presentamos aquí un trabajo que trata de establecer las condiciones de cultivo adecuadas en cuanto a requerimientos nutricionales y ambientales de alguna de las variedades de *Vitis vinifera* cultivadas en La Rioja.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Genotipos

Para la realización de este trabajo se han utilizado las siguientes variedades o cultivares de *Vitis vinifera* L.: Garnacha, Tempranillo, Viura, Moscatel, Calagraño y Miguel de Arco. Las tres primeras entran dentro de las autorizadas por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen Calificada Rioja. Son las más cultivadas en la región y comunes a otras muchas zonas vitícolas. Las tres restantes son variedades particulares de esta zona estando en peligro de desaparición.

1.2. Material vegetal

El material de partida consistió en madera de poda recogida de cepas seleccionadas por su vigor y por no presentar síntomas de enfermedad. Este material fue tratado con un anti-

fúngico comercial y conservado en frío hasta su utilización. Fragmentos de esta madera con una o dos yemas se situaron en condiciones de brotación en una cámara de cultivo sobre perlita embebida en agua, manteniendo las adecuadas condiciones de asepsia. Se mantuvieron a una temperatura de 25 °C y con un fotoperiodo de 16 h. con iluminación fluorescente e incandescente.

Aproximadamente a las dos semanas se disponía de brotes de entre 10 y 15 cm ya con inflorescencias inmaduras. De estos brotes se tomaron explantos de nudo, entrenudo, meristemo apical, yemas axilares, peciolo e inflorescencias inmaduras. Se parafinaron los extremos de los fragmentos y se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% durante 1 min, hipoclorito sódico (lejía comercial al 10%) con 0,1% de Tween 20 durante 10 min y posteriormente con varios lavados con agua estéril.

1.3. Medios de cultivo y condiciones

El medio base que se ha usado en todos los casos es el medio MS (macronutrientes, micronutrientes y vitaminas) descrito por Murashige & Skoog (1962). Como se refleja en la Tabla I, se han utilizado diferentes hormonas y variado las condiciones ambientales, buscando en cada caso las más adecuadas para cada variedad y para cada fase de desarrollo.

Tabla I: Medios de cultivo y condiciones experimentales utilizadas para la iniciación y multiplicación "in vitro" de las diferentes variedades.

		Protocolo nº 1		Protocolo nº 2		Protocolo nº 3
INICIACIÓN	Explanto	Meristemo Apical y Axilar		Internodo, inflorescencia y peciolo		Meristemo Apical
	Medio Base	MS + Vit. MS		MS + Vit. MS		MS + Vit. MS
	Suplementos	30 g/l Sacarosa 2mg/l BA		30 g/l Sacarosa 1mg/l 2-4 D 0.1 mg/l BA		30 g/l Sacarosa 2 mg/l BA 6 g/l Agar
				-----	6 g/l Agar	
	Iluminación	Fotoperiodo	Oscuridad	Oscuridad		Fotoperiodo
MULTIPLICACIÓN	Explanto	Brotes		Fragmentos de callo		Brotes
	Medio Base	MS + Vit. MS		MS + Vit. MS		MS + Vit. MS
	Suplementos	30 g/l Sacarosa 2 mg/l BA 6 g/l Agar		30 g/l Sacarosa 2 mg/l BA 2 mg/l NAA 6 g/l Agar		30 g/l Sacarosa 2 mg/l BA 6 g/l Agar
	Iluminación	Fotoperiodo		Oscuridad		Fotoperiodo

Se han seguido tres protocolos principales para el establecimiento y multiplicación de los diferentes explantos. Hemos denominado como protocolo nº 1 al que utilizando explantos apicales y axilares se basa, con ligeras modificaciones, en lo descrito por Casal & Pais (1990). Se realizó el establecimiento en dos condiciones diferentes: con y sin iluminación.

En el protocolo nº 2 basado en Krul & Worley (1977), utilizamos explantos de entrenudo, inflorescencias y peciolo. Las variaciones sobre el protocolo original están en utilizar en la iniciación del cultivo dos tipos de medio: sólido y líquido.

El tercer protocolo se adaptó siguiendo las recomendaciones generales que sobre el cultivo "in vitro" de vid hacen Krul & Mowbray (1984) y George et al. (1987).

En todos los medios el pH antes de la esterilización en el autoclave oscilaba entre 5,4 y 5,6.

Para el enraizamiento de las plantulas obtenidas se utilizaron cuatro tipos de medio diferentes (Tabla II) donde se variaron las condiciones de fuerza iónica del medio, descritas como favorecedoras del desarrollo de raíces y el contenido en ácido indol-butírico (AIB) (Chee & Pool, 1983, 1987; Barlass & Skene, 1978, 1980). Se utilizó esta auxina ya que en trabajos previos para otros genotipos de vid y portainjertos (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitz, 1991) se ha puesto de manifiesto la actividad del AIB como inductor de raíces.

Tabla II: Resultados obtenidos en medios de multiplicación para cada variedad con los diferentes protocolos. (-) Sin crecimiento, (+) Crecimiento escaso con pocos brotes y pequeños (1-2 cm), (++) Desarrollo aceptable, brotes entre 2 y 5 cm, (+++) Buen desarrollo, con abundantes brotes de mayor tamaño (>5 cm).

		Protocolo nº 1		Protocolo nº 2		Protocolo nº 3
Condiciones		Luz	Oscuridad	Líquido	Sólido	Luz - Sólido
VARIEDAD	Garnacha	++	+	-	+	++
	Tempranillo	++	++	++	+++	+++
	Viura	+++	+++	++	+++	+++
	Moscatel	+	++	+	++	++
	Calagraño	+	-	+	-	+
	Miguel de Arco	+	-	+	-	+

Las plántulas obtenidas, cuyo tamaño oscilaba entre los 8 y los 10 cm, se traspasaron a macetas para iniciar su aclimatación a las condiciones naturales. Inicialmente se mantuvieron en macetas con turba humedecida y cubiertas con plástico, en un ambiente de alta humedad (90%), en cámara de cultivo, durante dos semanas. Finalizado este periodo se les retiró el plástico protector y se mantuvieron en la cámara con una humedad del 80% durante 15 días. Tras este tiempo se transplantaron a macetas con una composición del suelo adecuada, mantenidas en invernadero antes de su exposición al exterior.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Establecimiento e iniciación

En la Tabla III se presentan de forma resumida los resultados obtenidos con las diferentes variedades para cada una de las condiciones de cultivo utilizadas. La valoración se realizó a los 30 días desde la siembra de los explantos. Se valoró de forma global el crecimiento de los brotes o callos.

Entrando en el aspecto de las variedades, destaca la variedad Viura como la que mejor se adapta a cualquier condición de cultivo, dando una respuesta adecuada, ya que su crecimiento es mayor que el del resto de variedades, en todos los medios. En el protocolo nº 1

se aprecia un mayor crecimiento en oscuridad donde se obtienen brotes más grandes y mejor formados, mientras que en los otros protocolos no existen diferencias apreciables entre las diferentes condiciones probadas.

Tabla III: Medios de cultivo utilizados para la rizogénesis.

	Medio I	Medio II	Medio III	Medio IV
Macronutrientes	½ MS	½ MS	½ MS	½ MS
Micronutrientes	½ MS	MS	½ MS	MS
IBA	-	-	2 µM	2 µM
Otros	Vitaminas MS + 20 g/l Sacarosa + 6 g/l agar + Fotoperiodo 16 h			

La variedad Tempranillo crece bien en todos los medios pero sin llegar a alcanzar en ningun caso a Viura. Por el contrario, son las variedades Miguel de Arco, Calagraño y, en menor medida Garnacha, las que peores aptitudes muestran para el establecimiento y multiplicación de los cultivos.

En cuanto a los tres protocolos utilizados, es claramente el n° 3 el que da los mejores resultados para todas las variedades probadas.

2.2. Enraizamiento

Se determinó el número y longitud de las raíces formadas para cada variedad de las estudiadas y en cada medio. Las figuras 1 y 2 recogen estos datos de forma particular para cada variedad, mientras que las figuras 3 y 4 lo hacen de forma global.

De los seis genotipos estudiados todos emitieron raíces en los diferentes medios, aún en aquellos en los que no se había puesto AIB, si bien con diferencias importantes entre ellos.

En cuanto al número de raíces producidas, tres variedades exhiben un comportamiento similar en los cuatro medios probados. Garnacha, Tempranillo y Miguel de Arco alcanzan sus máximos valores en medios con auxina, siendo superiores en el IV. Por el contrario en medios sin auxina la producción de raíces fue muy inferior.

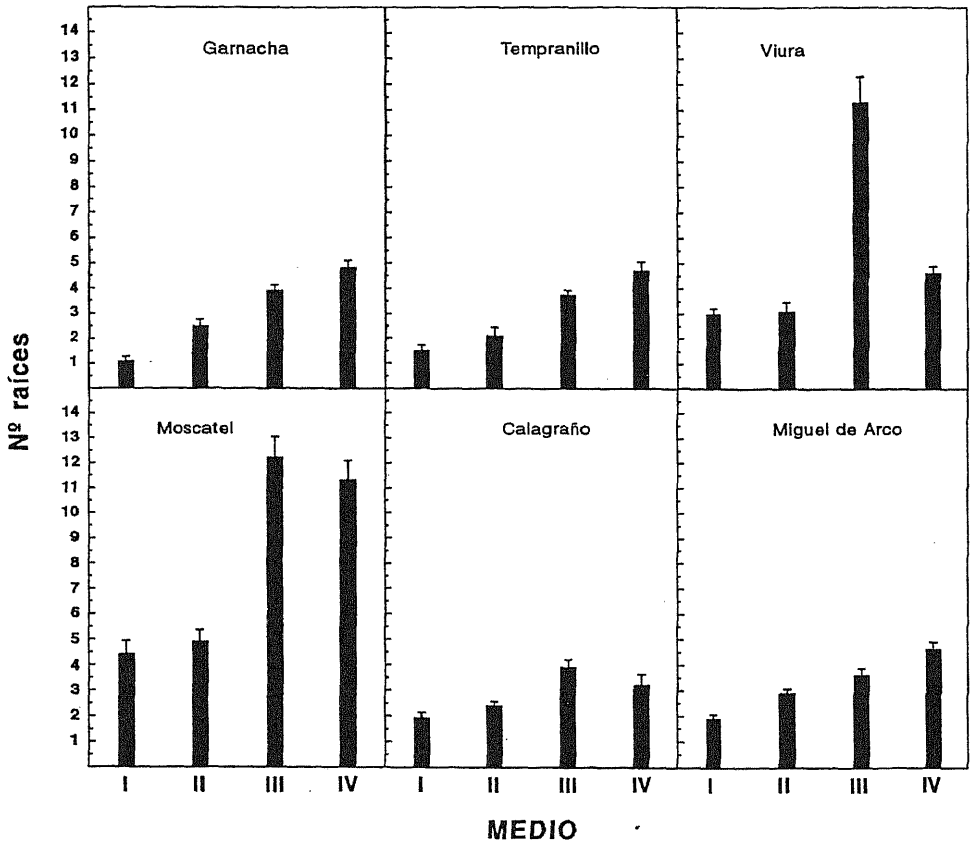
Las variedades Viura y Moscatel y, en menor medida, Calagraño, presentan el número máximo de emisión de raíces en el medio III, con valores muy altos.

Si hacemos esta comparación por medios de cultivo (fig. 3) en ellos las variedades Viura y Moscatel presentaron los máximos valores, superando en muchos casos al resto en más del 100%. Es de destacar la uniformidad de resultados en cada medio con las excepciones de Viura y Moscatel. Queda evidente la influencia de la auxina ya que el número de raíces por plántula aumenta progresivamente desde el medio I al medio IV.

En cuanto a la longitud de las raíces emitidas, existe una mayor variación entre los diferentes genotipos de la existente para el número de raíces.

Las variedades Garnacha y Tempranillo, muestran mayores longitudes para las raíces producidas en el medio II. Garnacha, destaca por la escasa longitud de las raíces en el medio I, medio en el que el resto de variedades alcanzan las mayores longitudes. Mientras que en el medio IV, presenta valores superiores al resto de los ensayos. También destacan con altos valores las variedades Viura y Moscatel.

Figura 1: Número de raíces emitidas por brote, en los cuatro medios por cada variedad. Las barras indican el error estándar.



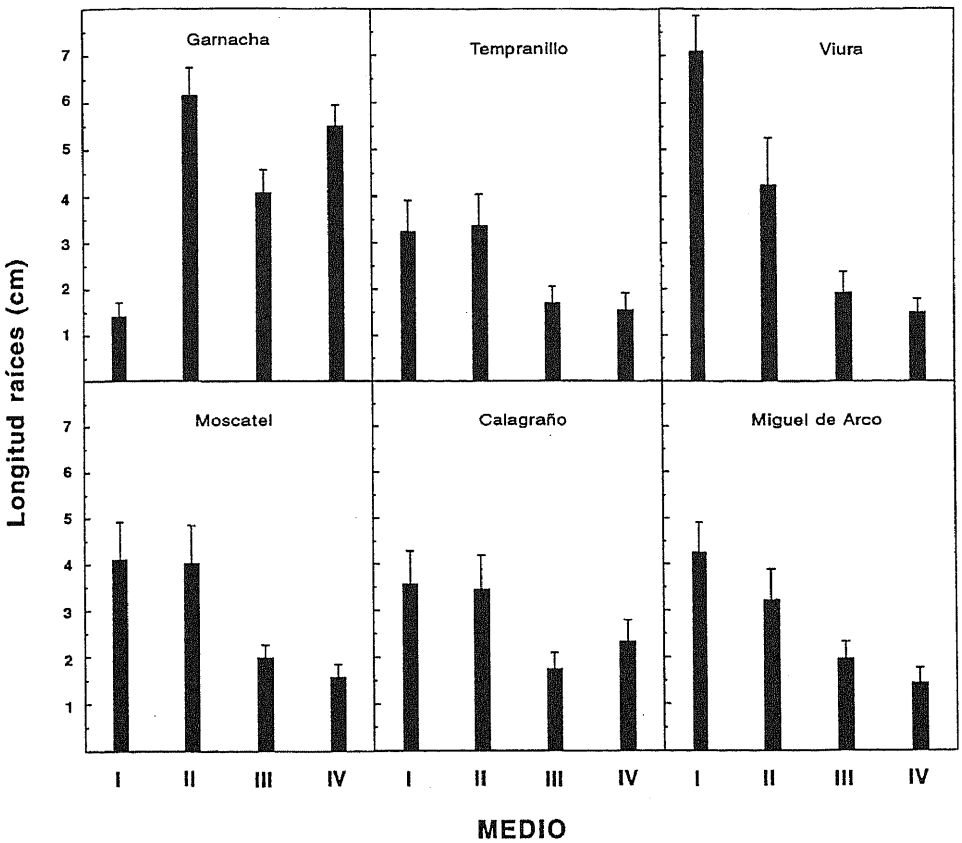
Salvo en los casos ya citados, en los ensayos realizados en el medio I se alcanzan las máximas longitudes, descendiendo posteriormente en los medios II, III y IV. Este descenso no es tan marcado como el que se obtenía para el número de raíces de forma inversa.

A semejanza de los valores obtenidos para el número de raíces, la homogeneidad de resultados para cada medio es notable con las excepciones ya citadas.

Teniendo en cuenta que estamos considerando valores medios, hay que destacar que cuando las variedades se mantuvieron en los medios I y II se producía una gran variación en las longitudes de las raíces emitidas por cada plántula, variación que no era tan acusada en las raíces emitidas en los medios III y IV.

También podemos añadir otras consideraciones acerca del aspecto y estructura de las raíces emitidas por las diferentes variedades en cada condición de cultivo. Podemos destacar que en los medios I y II apenas si aparecieron raíces secundarias, teniendo la raíz un aspecto normal. Por el contrario, los medios que contenian AIB, presentaban raíces secundarias abundantes y muy engrosadas en su base.

Figura 2: Longitud de las raíces emitidas por brote, en los cuatro medios por cada variedad. Las barras indican el error estándar.

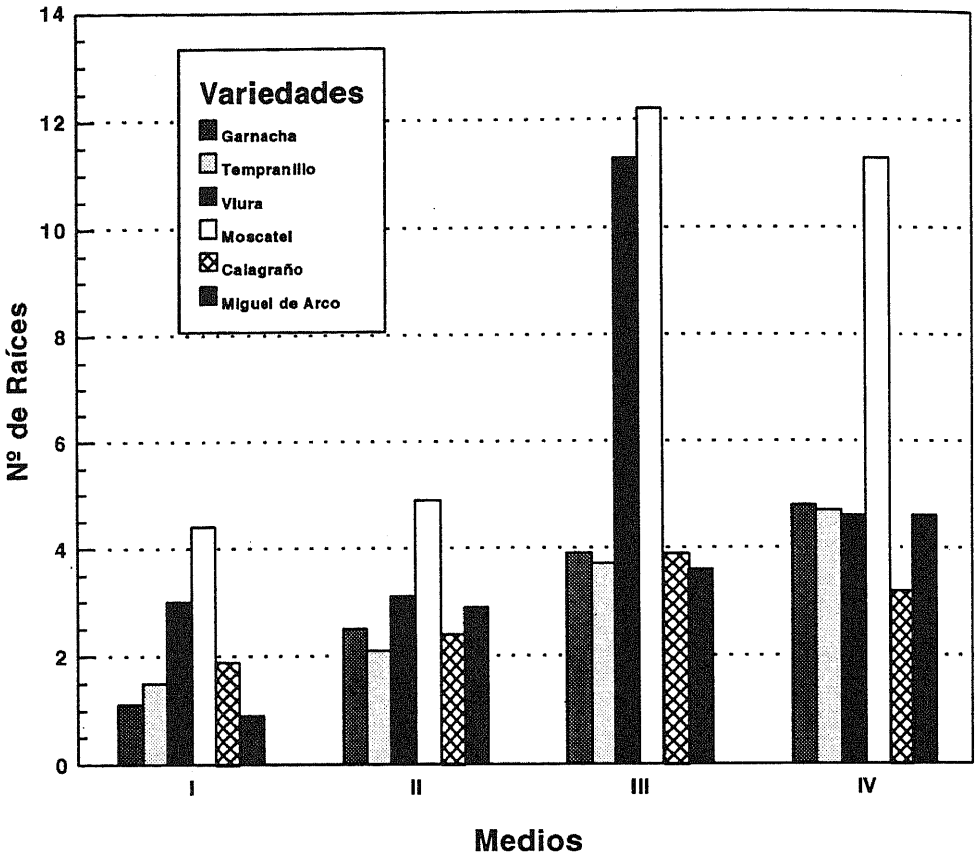


La conexión entre número de raíces emitidas y su longitud, según se desprende de nuestros resultados, está en relación directa con la presencia de auxina en el medio de cultivo. En los medios donde la emisión de raíces era escasa, no existía auxina, se producían raíces de gran longitud, por el contrario, allí donde se producía un gran número de raíces, por efecto de la auxina, eran de menor longitud, sin duda debido a la acción de la auxina como inhibidor de la elongación de raíces (Davies, 1988).

El efecto de la auxina sobre el número de raíces emitidas es claramente significativo. Se observa claramente en las figuras como en los medios de cultivo con hormona el aumento en el número de raíces es superior en un 100% al que se obtuvo en los medios sin hormona.

De nuestros resultados se desprende también, un menor número de emisión de raíces, si bien poco destacable, en aquellos medios que disponían de la mitad de micronutrientes, sin embargo, esta carencia no se manifestaba en otros parámetros de las plántulas que presentaban tasas similares de crecimiento. En cuanto a la longitud de las raíces emitidas, el efecto de esta carencia no es tan acusado ya que predomina el efecto de la auxina.

Figura 3: Número de raíces emitidas en cada medio, por las seis variedades.



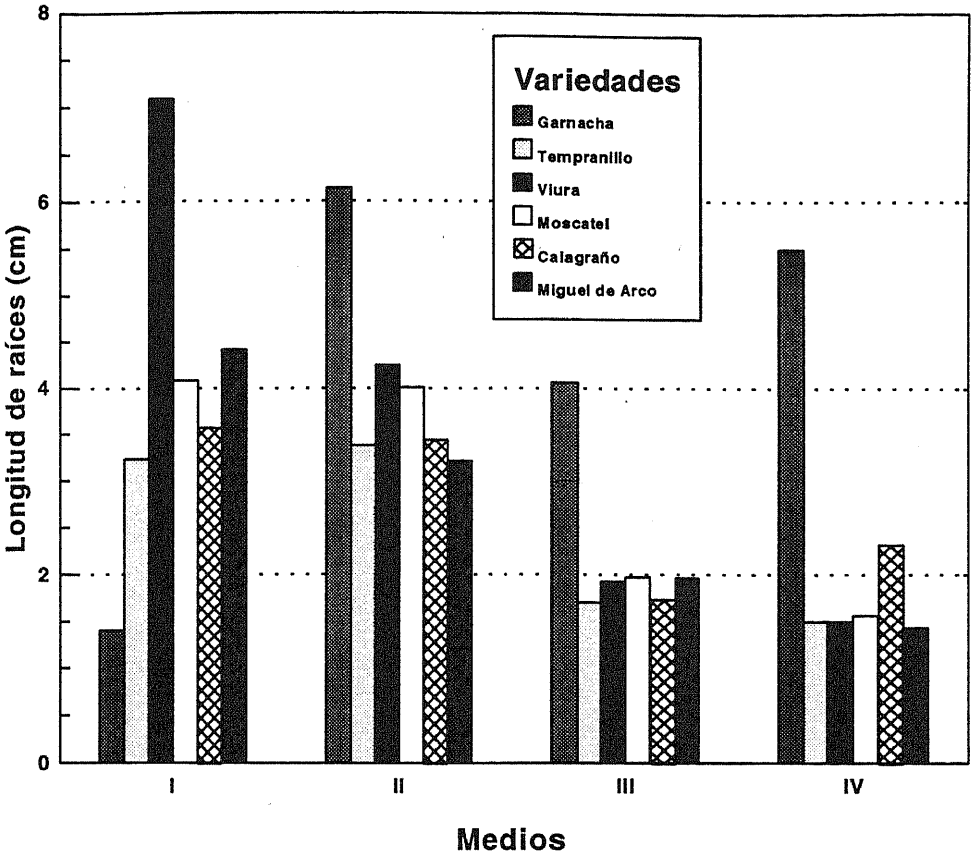
3. CONCLUSIONES

Trabajos previos habían propuesto el uso del medio de cultivo MS con total o media fuerza iónica para enraizamiento de diferentes genotipos del género *Vitis*, suplementado en cada caso con diferentes auxinas (Barlass & Skene, 1980; Rajasekaran & Mullins, 1981; Novak & Jukova, 1983; etc.). Comparado con estos trabajos, el nuestro presenta la novedad de tratar variedades hasta ahora no estudiadas en este aspecto, además de ensayar diferentes condiciones de cultivo.

El hecho de usar únicamente la mitad de macronutrientes descritos para el medio MS y que sean imprescindibles suplementos hormonales, hace que el medio que proponemos sea de menor coste que otros descritos.

Los medios y protocolos utilizados son válidos para todas las variedades estudiadas, sin embargo, existe una dependencia del genotipo, que va a condicionar las diferentes respuestas ante los medios y condiciones de cultivo. Estas diferencias se manifiestan, tanto en el establecimiento de los cultivos, como en la formación y elongación de raíces.

Figura 4: Longitud de las raíces emitidas en cada medio, por las seis variedades.



Estimamos que el medio descrito es válido para la rizogénesis "in vitro" de diferentes variedades de *Vitis vinifera*. La presencia o no de auxina en el medio no es determinante para la emisión de raíces, al menos en las variedades estudiadas, e incluso su presencia puede resultar limitante para la elongación de las mismas.

4. BIBLIOGRAFÍA

Barlass, M., Skene, K.G.M., 1978. In vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* (17), 335-340.

Barlass, M., Skene, K.G.M., 1980. Studies on the fragment shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation. *J. Exp. Bot.* (31), 489-495.

Casal, M., Pais, M.S., 1990. Micropropagation of *Vitis vinifera* from "Vinho Verde" region of Portugal: A method for grapevine leafroll virus elimination. En *Plant Aging: Basic and Applied Approaches* (Rodríguez et al. eds.) NATO ASI Ser. A: Life Sci. Vol. 186, 141-146.

Chee, R., Pool, R.M., 1983. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis* (22), 363-374.

Chee, R., Pool, R.M., 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Hort.* (32), 85-95.

Davies, P.J. (ed.), 1988. *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

George, E.F., Puttock, D.J.M., George, H.J. (eds.), 1987. *Plant Culture Media. Vol 1. Formulations and Uses.* Exegetics Limited. England.

Krul, W.R., Worley, J. F., 1977. Formation of adventitious embryos in callus cultures of 'Seyval', a french hybrid grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* (102), 360-363.

Krul, W.R., Mowbray, G.H., 1984. Grapes. En *Handbook of Plant Cell Culture* (Sharp et al. eds.) Vol. 2, 396-434.

Martínez de Toda Fernández, F., 1990. *Biología de la Vid. Fundamentos biológicos de la viticultura.* Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España.

Murashige, I., Skoog, F., 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* (15), 473-479.

Novak, F.J., Jukova, Z., 1983. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axilary bud culture. *Scientia Hort.* (18), 231-240.

Rajasekaran, K., Mullins, M.G., 1981. Organogenesis in internode explants of grapevines. *Vitis* (20), 218-227.

Roubelakis-Angelakis, K.A., Zivanovitz, S.B., 1991. A new culture medium for in vitro rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. *Hortscience* (26), 1551-1553.