

Rescate de embriones para la obtención de vitroplantas de vid (*Vitis vinífera* L.)

Embryos rescue for the obtaining of grapevine (*Vitis vinífera* L.) vitroplants

César Augusto Hernández Rendón*, Yesica Salazar Marín**, Luis Fernando Restrepo Betancur***

Resumen

Este trabajo es la primera fase de un macroproyecto sobre la optimización de un protocolo para la obtención de metabolitos secundarios de interés comercial mediante la utilización de suspensiones celulares de Vid (*Vitis vinífera* L.). Se investigó el rescate de embriones como alternativa para la obtención de vitroplantas de vid (*Vitis vinífera* L.). El material vegetal utilizado se obtuvo de frutos de vid variedad Red Globe comerciales. Las semillas se desinfectaron sumergiéndolas en 5 g/l de ácido dicloroisocianúrico (NaDCC) por 15 min y luego en 2 g/l de Benomyl® por 15 min, con una efectividad del 92%. Se realizaron diferentes tratamientos para la obtención de plántulas utilizando semillas como explantes, las cuales se cultivaron en el medio Murashige Skoog suplementado con diferentes concentraciones de ácido indolacético (AIA) en combinación con ácido giberélico (AG3) y kinetina (K) sin obtener respuesta favorable para la germinación. Como alternativa, se extrajeron semillas inmaduras de frutos de la planta y se colocaron en el mismo medio pero suplementado con 100 mg/l de polivinilpirrolidona (PVP), 0.35 mg/l de AG3 y 1.75 mg/l de AIA por un mes. Posteriormente, se abrieron las semillas y se realizó el rescate de embriones, sembrándolos bajo condiciones de oscuridad por ocho días en los medios de cultivo Murashige Skoog 1 y 2 modificados, encontrando la formación de vitroplantas en un 40% al mes de cultivo.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, reguladores de crecimiento, ácido dicloroisocianúrico, Red Globe.

Abstract

This work is the first phase of a macroproject about the optimization of a protocol for the obtaining of secondary metabolites of commercial interest by means of the use of cellular suspensions of *Vitis vinífera* L. The embryos rescue was investigated as alternative for the obtaining of grapevine (*Vitis vinífera* L.) vitroplants. The vegetable material used was obtained from commercial fruits of grapevine Red Globe variety. The seeds were disinfected submerging them in 5 g/l of dichloroisocyanuric acid (NaDCC) for 15 min, and then in Benomyl® 2 g/l for 15 min, with an effectiveness of 92%. Different treatments were performed to obtain plants using seeds as explants, which were cultured on Murashige Skoog medium supplemented with different concentrations of indole acetic acid (AIA) in combination with gibberellic acid (AG3) and kinetin (K) without obtaining favorable answer for the germination. As alternative, immature seeds were extracted from grape fruits and placed on Murashige Skoog medium supplemented with 100 mg/l polyvinyl pyrrolidone (PVP), 0.35 mg/l of gibberellic acid and 1.75 mg/l of indol acetic acid for a month. Seeds were then opened and performed embryo rescue, planting them under dark conditions for eight days in the culture media Murashige Skoog 1 and 2 modified, finding plants formation by 40% a month after growing.

Key words: *in vitro* culture, growth regulators, dichloroisocyanuric acid, Red Globe.

Recibido: diciembre 18 de 2012 **Aprobado:** noviembre 20 de 2013

* MSc en Biotecnología, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 58 No 27B- 125, cesaraugu@une.net.co.

** Técnica en Biotecnología Agraria, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Carrera 58 No 27B- 125, yequisa182@hotmail.com.

*** Especialista en Estadística y Biomatemáticas. Docente Universidad de Antioquia. Carrera 75 No 65- 87, frbstatistical@yahoo.com.es.

Introducción

La vid (*Vitis vinifera* L.) es originaria de la región de Caspio, en Asia menor desde donde se fue extendiendo hacia el este y el oeste. Se cultiva desde los años 6.000 a 4.000 A.C., lo que la hace una de las plantas más antiguamente cultivadas (Enjalbert, 1975). Se ubica dentro de los frutales, como uno de los de más alta tradición e historia en el mundo, siendo cultivado entre 50° latitud Norte y 45° latitud Sur. La superficie con viñedos en el mundo representa alrededor de 7.9 millones de hectáreas (Almanza, 2011).

El fruto de la vid es utilizado actualmente en postres, jugos, vinos y como uva pasa entre otros; adicionalmente la uva contiene una amplia cantidad de antioxidantes como el resveratrol, el cual ha sido positivamente ligado en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, enfermedades del corazón y nerviosas, infecciones virales y Alzheimer (Singh *et al.*, 2011).

En el año 2009 la producción mundial de vid fue de 66935199 t cultivadas en 7437141 ha, de las cuales Colombia tenía plantadas 2581 ha (FAO, 2011). El Departamento del Valle del Cauca (1000 msnm) es el mayor productor de uva de mesa; durante el año 2007 se tenían plantadas 2.045 ha, con producciones de 33.907 t, con rendimientos de 16.58 t/ha, aportando el 90.63% de la producción nacional (Agronet, 2011).

En el género *Vitis* se reconocen dos tipos de apirenia (variedades sin semilla): una que ocurre por partenocarpia, en la cual el fruto se forma sin polinización ni fertilización, y otra, más generalizada, que es producto de la estenospermia, es decir, del aborto de los embriones al inicio del desarrollo del fruto (Kanamadi *et al.*, 1999; Agüero *et al.*, 2000). Estos frutos estenospermocárpicos requieren de una fertilización normal, por lo que el polen de estas variedades debe ser viable (Perl *et al.*, 2000).

El método clásico de mejoramiento genético en variedades apirenas ha estado basado en el cruzamiento de un padre apireno con variedades semilladas usadas como madres (Perl *et al.*, 2000). Sin embargo, usando esta estrategia la probabilidad de obtener descendientes apirenos es inferior al 50%. El desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* ha posibilitado la producción de un mayor porcentaje de progenies apirénicas cuando ambos progenitores son no semillados. La técnica consiste en “rescatar” los embriones inmaduros antes de que aborten y cultivarlos en un medio de cultivo bajo condiciones artificiales posibilitándoles su desarrollo normal (Ramming, 1990).

El cultivo *in vitro* es una técnica extremadamente útil para la rápida introducción de nuevos clones, propagación y mantenimiento de plantas libres de virus, para la conservación de germoplasma y estudios fisiológicos (Pérez- Ponce, 1998). En la uva el primer trabajo de cultivo *in vitro* fue el realizado por Morel en 1948 (Bouquet y Torregrosa, 2003).

Debido a la dificultad que presenta la vid para ser obtenida a partir de semillas, se estudió la técnica de rescate de embriones de *Vitis vinifera* L. como método alternativo para obtener material sano y en menor tiempo, a partir del cual se obtendrán los callos friables para ser utilizados posteriormente (Fase II) en suspensiones celulares que permitan la adquisición de metabolitos secundarios de interés comercial e industrial.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, ubicado en el Centro de Laboratorios y Experimentación (CLE), Sede Bello, Medellín, Colombia, a 1.420 msnm con una temperatura ambiente promedio de 25°C.

Material vegetal

Se utilizaron como explantes semillas inmaduras de frutos de vid (*Vitis vinifera* L.) de la variedad Red Globe de uso comercial, previamente seleccionados, como material de inicio para la obtención de plántulas y el rescate de embriones.

Establecimiento *in vitro*

Desinfección

Para la siembra de semilla y el rescate de embriones, las semillas se lavaron con abundante agua y jabón Tego51® al 2% para remover los residuos de mucilago (pulpa). Posteriormente, se realizó un raspado suave a las semillas (escarificación) con el propósito de acelerar el proceso de germinación. Se llevaron a la cámara de flujo laminar para realizar la desinfección sumergiéndolas en etanol al 70% y luego en hipoclorito de sodio al 2.5% adicionando dos gotas de Tween20® en 100 ml de solución, realizando a continuación cuatro lavados con agua destilada estéril. Igualmente, se hicieron otros ensayos sumergiendo las semillas en 5 g/l de ácido dicloroisocianúrico (NaDCC) y 2 g/l de Benomyl® con diferentes tiempos de inmersión de la semilla; luego se realizó la siembra en la cámara de flujo laminar, colocando cuatro semillas por cada fras-

co utilizado en todos los experimentos. Para determinar el porcentaje de desinfección, se tuvo en cuenta la presencia o no, tanto de hongos como de bacterias en el medio de cultivo, pero sin entrar a su descripción y detalle taxonómico y morfológico.

En la tabla 1 se describen los diferentes experimentos realizados con sus respectivos tratamientos para el proceso de desinfección.

Obtención de plántulas a partir de semillas

Las semillas se sembraron una vez desinfectadas en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa (30 g/l), Phytigel® (2.7 g/l), el antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) (200 mg/l), al cual se le adicionó igualmente ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l vs ácido giberélico (AG3) en concentraciones de 0, 0.5 y 1.0 mg/l; se hizo otro ensayo con la adición de AIA en concentraciones de 0, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l vs kinetina (K) en concentraciones de 0, 0.5 y 1.0 mg/l. El pH fue ajustado a 5.6. El medio de cultivo se esterilizó a 121°C por 20 minutos. Se utilizaron 600 semillas debidamente desinfectadas las cuales se sembraron en la cámara de flujo laminar y posteriormente se colocaron bajo condiciones de luz blanca proveniente de lámparas fluorescentes de 40 w.

Obtención de plántulas a partir de rescate de embriones

Se realizó otro experimento en el cual las semillas inmaduras se extrajeron de los frutos de la vid en forma

aséptica y se sembraron cuatro semillas por frasco con 20 ml de medio de cultivo MS (1962), suplementado con 20 g/l de sacarosa, 2.7 g/l de Phytigel®, 100 mg/l de PVP, 0.35 mg/l de AG3 y 1.75 mg/l de AIA de acuerdo a lo descrito por Ponce *et al.* (2009). Posteriormente, los frascos se colocaron a 25±2°C. Al cabo de un mes, se abrieron las semillas y se extrajeron los embriones utilizando un estereomicroscopio, colocándolos en frascos con 20 ml de medio de cultivo MS 1 y MS 2 como se muestra en la tabla 2. Los frascos con los embriones permanecieron una semana en oscuridad y luego se llevaron a cámaras de cultivo a 25±2°C con un fotoperiodo de 12 horas con luz blanca proveniente de lámparas fluorescentes de 40w.

Diseño estadístico

Para todos los experimentos realizados se empleó un diseño de clasificación experimental completamente aleatorizado, efecto fijo de tipo balanceado, con igual número de replicaciones por tratamiento (10 frascos cada uno con 4 semillas), se trabajó con un nivel de confiabilidad del 95%. En el experimento en el cual se evaluó la acción de los medios de cultivo para el desarrollo del embrión, este se suplementó con la aplicación de análisis multivariante de la varianza MANOVA, con contraste canónico de tipo ortogonal, determinando por vía máxima de verosimilitud la dimensionalidad del contraste. Para todos los experimentos se empleó transformación de datos, debido a la naturaleza de las variables respuesta, utilizando la familia Box-Cox, obteniendo el lambda por el criterio de la máxima probabilidad. El proceso estadístico se realizó en el paquete estadístico SAS® versión 9.0.

Tabla 1. Ensayos realizados para la desinfección de la semilla de uva.

No. Experimento	No. Tratamientos	Dosis	No. Semillas utilizadas
Experimento No 1	5 (10 frascos x tratamiento)	Hipoclorito de sodio al 2.5 % x 2 min + Etanol al 70 % x 1 min + Tween20® + 2 g/l de Benomyl® x 5 min, 10 min, 15 min, 20 min y 25 min	200
Experimento No 2	5 (10 frascos x tratamiento)	5 g/l de NaDCC x 5 min, 10 min, 15 min, 20 min y 25 min	200
Experimento No 3	5 (10 frascos x tratamiento)	5 g/l de NaDCC x 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min + 2 g/l de Benomyl® x 5 min, 10 min, 15 min, 20 min y 25min	200

Tabla 2. Descripción de los medios de cultivo utilizados para el desarrollo del embrión.

Medio MS 1	Medio MS 2
NH ₄ NO ₃ , KNO ₃ , CaCl ₂ . 2H ₂ O, MgSO ₄ . 7H ₂ O, H ₃ BO ₃ , MnSO ₄ .H ₂ O, ZnSO ₄ . 7H ₂ O, KI a la mitad de su concentración	Sales completas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962)
KH ₃ PO ₄ a la mitad de su concentración	KH ₃ PO ₄ completo a su concentración
FeSO ₄ . 7H ₂ O, Na ₂ EDTA completos a su concentración	FeSO ₄ .7H ₂ O, Na ₂ EDTA completos a su concentración
Mioinositol y vitaminas completas a su concentración	Mioinositol y vitaminas completas a su concentración
Sacarosa 20 g/l	30 g/l
Phytigel® 2.7 g/l	
pH 5.6	
PVP 100 mg/L	PVP 200 mg/L

Resultados y discusión

Desinfección

Alvarado *et al.* (1993) y Alvarado *et al.* (1998) afirman que en la técnica del cultivo *in vitro*, los contaminantes que se encuentran más comúnmente son los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras, los cuales generan pérdidas considerables desde el punto de vista investigativo y económico. La contaminación puede tener dos orígenes: a- microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b- microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio (Debergh y Zimmerman, 1990).

En este estudio se evaluaron tres formas de desinfección de la semilla de uva, utilizando 200 semillas en cada uno de los tratamientos realizados, observando en cada uno de ellos la presencia o ausencia de microorganismos como hongos, bacterias y levaduras principalmente, como indicadores para evaluar el porcentaje de contaminación, pero sin entrar en un estudio detallado de su morfología y taxonomía.

Se encontró que al realizar un lavado con 5 g/l de NaDCC por 15 minutos y luego con Benomyl® por 15 minutos (experimento 3, tratamiento 3), se obtuvo el menor porcentaje de contaminación (8%) lo que corresponde a una muy baja presencia de hongos, bacterias y levaduras, comparado con los tratamientos 1, 2, 4 y 5 del mismo experimento, en los cuales se presentó el 14, 16, 18 y 20% de contaminación, respec-

tivamente, tal y como se observa en la tabla 3. En los experimentos 1 y 2 el porcentaje de contaminación en todos los tratamientos realizados, fue superior al 70%, por lo que no se hace un análisis muy detallado de ellos. En este estudio se reporta por primera vez, el uso de NaDCC para la desinfección de la semilla de la uva, mostrando que para esta especie no es necesaria la utilización de hipoclorito de sodio ni etanol al 70%.

De acuerdo con los análisis estadísticos, que se muestran en la tabla 4, se observó que para los experimentos 1 y 2 no se presentó diferencia estadística entre los tratamientos utilizados para la desinfección ($P > 0.05$). No así para el experimento 3, en el cual se presentó diferencia altamente significativa entre el tratamiento 3 con respecto a los demás tratamientos de dicho experimento ($P < 0.0001$) (tabla 3), por lo que se considera que este es el mejor tratamiento de desinfección de la semilla de uva.

En este estudio se encontró que la principal fuente de contaminación fueron bacterias de diferentes tipos; la incidencia de hongos en los diferentes tratamientos fue bastante baja, posiblemente debido a la acción antifúngica tanto del Benomyl® como del NaDCC.

Al igual que en los estudios realizados por Pasqual y Ferreira (2007), en este trabajo se encontró que el empleo de fungicidas de amplio espectro, mezclado con fungicidas de contacto y bactericidas previo al cultivo *in vitro*, mostraron resultados positivos para

Tabla 3. Resultados de desinfección de la semilla con los tratamientos del experimento 3. Letras distintas muestran diferencias estadísticas.

Tratamiento No.	No. semillas evaluadas	No. semillas contaminadas	% de contaminación
No 1. 5 g/L de NaDCC x 5 min + Benomyl® x 5 min	40	5.6	14b
No 2. 5 g/L de NaDCC x 10 min + Benomyl® x 10 min	40	6.4	16b
No 3. 5 g/L de NaDCC x 15 min + Benomyl® x 15 min	40	3.2	8a
No 4. 5 g/L de NaDCC x20 min + Benomyl® x 20 min	40	7.2	18b
No 5. 5 g/L de NaDCC x 25 min + Benomyl® x 25 min	40	8	20b

Tabla 4. Análisis de varianza para la variable desinfección en los experimentos 1, 2 y 3.

	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	P
Experimento 1	Tratamiento	4	2.6	0.65	0.27	0.89
	Error	45	109.4	2.43		
	Total	49	112.0			
Experimento 2	Tratamiento	4	2.6	0.64	0.26	0.88
	Error	45	109.3	2.44		
	Total	49	112.0			
Experimento 3	Tratamiento	4	956.7	239.1	61.3	0.0001
	Error	45	179.2	3.9		
	Total	49	1135.9			

el control de un amplio rango de microorganismos, sin generar efectos fitotóxicos ni daño en el material vegetal.

Efecto del AIA en combinación con diferentes concentraciones de AG3 y K para la obtención de plántulas a partir de semillas.

Los experimentos realizados en este estudio para la obtención de vitroplantas, no permitieron la germinación de la semilla, lo cual posiblemente se deba a las características morfológicas y fisiológicas de la semilla de la uva, y por lo tanto, se deben practicar ensayos de otro tipo a los realizados en este estudio. Luquez y Formento (2002) encontraron que en la semilla de uva el tegumento externo se alarga en

la zona de la micrópila para formar el pico, con grupos de esclereidas e idioblastos. La capa más externa papirácea tiene una gruesa cutícula. La capa media es parenquimatosa o colapsada. La capa interna dura presenta esclereidas con pared secundaria lignificada, cada una con un cristal. El tegumento interno tiene su capa más externa con engrosamientos espiralados y la capa más interna, rica en taninos y de paredes radiales con engrosamientos irregulares, características que posiblemente tengan relación con la nula germinación *in vitro* de la uva a partir de la semilla, lo cual nos llevó a utilizar la técnica biotecnológica del rescate de embriones.

Sin embargo, proponemos continuar realizando más estudios sobre la germinación *in vitro* a partir de semillas de *Vitis vinífera* L.

Efecto de los medios de cultivo MS 1, MS 2 y dos concentraciones diferentes de sacarosa para la obtención de plántulas a partir del rescate de embriones

Como se mencionó anteriormente, la técnica del rescate de embriones consiste en “salvar” los embriones inmaduros antes de que aborten y cultivarlos en un medio de cultivo bajo condiciones artificiales que permita su desarrollo normal (Ramming, 1990). El rescate de embriones está influenciado por varios factores (Ponce *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003), siendo uno de los más importantes el genotipo de la variedad usada como madre (Ji *et al.*, 2013) el medio de cultivo y el estado de maduración de la semilla (García *et al.*, 2000; Notsuka *et al.*, 2001; Valdez, 2005).

Son muy pocos los trabajos realizados con vid (*Vitis vinífera* L.) en los cuales se haya reportado la obtención de un alto porcentaje de vitroplantas a partir del rescate de embriones. Ponce *et al.* (2009), adaptaron para la vid la técnica del rescate de embriones, permitiendo la obtención de plantas por cruzamiento direc-

to entre cultivares sin semilla; el porcentaje promedio de plántulas obtenidas es bajo, alrededor del 10%. La presencia de taninos, fenoles u otras sustancias tóxicas que pueden acumularse en el medio de cultivo debido a la manipulación del explante, posiblemente conlleven al aborto *in vitro* de la semilla, disminuyendo de esta manera el porcentaje de plántulas en el cultivo (Valdez, 2005).

En este trabajo se evaluó el efecto de los medios de cultivo MS 1, MS 2 y la sacarosa para la obtención de plántulas a partir de los embriones rescatados. Se observó que en el medio MS 1, se presentó el mayor porcentaje de plántulas a los 30 días de 100 embriones rescatados (40%) y mayor longitud promedio del tallo de las plántulas (4.5 cm), comparado con el medio MS 2, el cual mostró un porcentaje de plántulas obtenidas del 21% y una longitud del tallo de 2.1 cm en el mismo periodo de tiempo (tabla 5, figura 1). Se encontraron diferencias significativas a los 15 y a los 30 días entre los medios MS 1 y MS 2 para las variables evaluadas (P<0.05).



Figura 1. Obtención de plántula a los 30 días a partir de la siembra de embriones: A: Medio MS 1; B: Medio MS 2.

Tabla 5. Porcentaje de plántulas obtenidas y longitud promedio del tallo a los 15 y 30 días después de sembrado el embrión con diferentes concentraciones de sacarosa. Letras distintas muestran diferencias estadísticas.

Tratamientos	% de plántulas obtenidas		Longitud promedio del tallo (cm)	
	15 días	30 días	15 días	30 días
Medio MS 1 con 20 g/l de sacarosa	24a	40a	1.4a	4.5a
Medio MS 2 con 30 g/l de sacarosa	10b	21b	0.8b	2.1b

De acuerdo con el análisis multivariado de la varianza realizado para el experimento, el efecto de los medios de cultivo MS 1, MS 2 y dos concentraciones diferentes de sacarosa para la obtención de plántulas a partir del rescate de embriones, se pudo detectar al evaluar de manera simultánea el porcentaje de plántulas obtenidas y el promedio de la longitud del tallo a los 15 y 30 días, diferencias altamente significativas entre los dos medios de cultivo utilizados ($P < 0.001$) tal y como se observa en la tabla 6.

Guiñazú *et al.* (2005) y Bouquet y Torregrosa (2003), mencionan que generalmente *in vitro* se emplea el medio MS, pero frecuentemente con los macronutrientes diluidos a la mitad. Péros *et al.* (1998) al cultivar *in vitro* 32 cultivares e híbridos intraespecíficos de *Vitis vinifera* determinaron que una reducción de los macronutrientes favorecía la formación de raíces mientras que Harris y Stevenson mencionados por el mismo, encontraron que la iniciación de raíces no fue afectada por la concentración de sales, pero el crecimiento de las mismas fue mayor al reducir el contenido de sales del medio.

Las plantas del medio de cultivo MS 1, se observaron con mejor vigor a nivel del tallo comparadas con las del medio MS 2, notándose así que el medio MS diluido a la mitad en esas sales (tabla 2), presentó mejores resultados, puesto que los requerimientos de minerales no son tan altos, provocando un mayor potencial hídrico que favorece su desarrollo vegetativo (Pedroza y Caballero, 2009). El éxito en el desarrollo y crecimiento de los propágulos, también se atribuye a que los medios de cultivo (tanto el MS 1 como el MS 2) fueron solidificados con Phytigel® y no con agar como suele hacerse en la mayoría de cultivos *in vitro*; debido posiblemente a que esta sustancia gelificante por su composición permite mejor crecimiento para el tejido cultivado, tiene una menor cantidad de impurezas, sumado igualmente a que permite ver más fácilmente las plantas y su proceso de crecimiento y la presencia

de contaminantes (Pedroza y Caballero, 2009; Kaçar *et al.*, 2010).

En este estudio igualmente se observó, que la sacarosa en una concentración de 20 g/l en el medio MS 1, comparada con 30 g/l del medio MS 2, posiblemente permita la germinación del embrión, al igual que el alargamiento del tallo y las raíces. Borges *et al.* (2005), señalaron que la mayor efectividad de la sacarosa en la multiplicación *in vitro*, puede atribuirse a que causa cambios en las fitohormonas endógenas, lo que conduce a la formación y el crecimiento de vástagos normales, quizás a través del ajuste osmótico del citosol de los tejidos o de la disponibilidad de ciertas enzimas asociadas con la utilización de la fuente de carbono. En estudios realizados por Miñano *et al.* (2004), se reporta que la producción de antocianinas aumenta a medida que se incrementa la concentración de sacarosa, lo cual es de suma importancia para tenerlo en cuenta en estudios futuros para la obtención de metabolitos secundarios.

Según Azofeifa (2009), el antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) ha sido utilizado en la prevención del oscurecimiento de tejidos (oxidación), ya sea aplicado como enjuague al explante o mediante su incorporación al medio de cultivo. En este estudio se estableció que una cantidad de 100 mg/l de PVP, es suficiente para evitar la presencia de fenoles, taninos y otros componentes endógenos presentes en la semilla de la uva en el medio de cultivo. Este es el primer reporte conocido acerca de la utilización de PVP para el control de la oxidación en semillas de uva, aunque Gupta *et al.* (1980) mencionan que el PVP se puede disolver en una solución de sacarosa a una concentración de 20 g/l, con el propósito de mejorar su acción antioxidante tal y como se observó en este trabajo.

Aunque se observó el crecimiento y la obtención de plántula a partir del embrión utilizando el medio MS modificado sin reguladores de crecimiento, es posible que estos estén de manera endógena dentro de la uva.

Tabla 6. Análisis multivariado de la varianza para obtención de plántula a partir del rescate de embriones con los medios MS1 y MS 2.

Estadística	Valor	Valor P
Wilks' Lambda	0.0046	<0.001
Pillai's Trace	0.9912	<0.001
Hotelling-Lawley Trace	215.62	<0.001
Roy's Greatest Root	215.62	<0.001

Sin embargo, es recomendable continuar los estudios para determinar de manera más exacta, si estos son requerimientos esenciales para el desarrollo y obtención de vitroplantas de *Vitis vinífera* L.

Conclusiones

Se estableció que para la desinfección de la semilla de *Vitis vinífera* L. el mejor tratamiento es lavar la semilla con 5 g/l de NaDCC x 15 min + Benomyl® x 15 min y cuatro enjuagues con agua destilada estéril.

La obtención de plántulas se logró mediante el rescate de embriones, pero no a partir de semillas.

A partir de los embriones rescatados se obtuvo a los 30 días el 40% de plántulas con una longitud promedio del tallo de 4.5 cm, en el medio MS modificado con sus sales a la mitad de su concentración.

La sacarosa en concentración de 20 g/l favorece la germinación del embrión, la elongación del tallo y la producción de raíces.

Se observó crecimiento del embrión en el medio MS modificado sin la adición de reguladores de crecimiento.

La polivinilpirrolidona (PVP) en una concentración de 100 mg/l, es efectiva para el control de la oxidación de la semilla de *Vitis vinífera* L.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a las directivas de la Facultad de Ciencias Agrarias del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, especialmente al programa Técnica en Biotecnología Agraria.

Referencias bibliográficas

Agronet. 2011. Uva. Disponible en: <http://agronet.gov.co>. Consultado en diciembre de 2011.

Agüero C., Vigliocco A., Abdala G., Tizio R. 2000. Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenospemcarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. *Plant Growth Regulation*. 30(1): 9-16.

Almanza P. 2011. Determinación del crecimiento y desarrollo del fruto de vid (*Vitis vinífera* L.) bajo condiciones de clima frío tropical. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados. Bogotá D.C., Colombia. pp 166.

Alvarado Y., Herrera Y., García A. 1993. Estudio preliminar sobre la contaminación microbiana en la biofábrica de Villa Clara. En: *Memorias del Tercer Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas*. Santa Clara, Cuba. p 15.

Alvarado Y., Herrera M., Suárez O., Rivero L., García A., Acosta M. 1997. Control de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. En: *Memorias del Seminario Científico In-*

ternacional de Sanidad Vegetal. Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba.

Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175.

Borges M., Portales S., Malaurie B. 2005. Influencia de diferentes concentraciones de sacarosa en el cultivo *in vitro* de coco (*Cocos nucifera* L.). *Taller Internacional de Biodiversidad, Biotecnología y Agricultura Sostenible. Convención UDC*. p 76- 84.

Bouquet A., Torregrosa L. 2003. Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). En: *Micropropagation of woody trees and fruits*. S. M. Jain and K. Ishii (eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p 319-352.

Debergh P., Zimmerman R. 1990. *Micropropagation technology an application*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands . 484 p.

Enjalbert, H. 1975. Histoire de la vigne et du vin. L'avènement de la qualité. Editorial Bordás, París. p 11- 22.

FAO. FAOSTAT. 2011. Área cosechada, producción y rendimiento de uva. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Consultado en agosto de 2011.

García E., Martínez A., García de la Calera E., Pérez L.J., Cenis J.L., Carreño J. 2000. *In vitro* culture of ovules and embryos of grape for the obtention of new seedless table grape cultivars. *Acta Horticulturae*. 528:663-666.

Gupta P., Nadgir A., Mascarenhas A., Jagannathan V. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (Teak) by tissue culture. *Plant Science Letters*. 17(3): 259-268.

Guiñazú M., Ponce M., Guzmán J., Juárez D., Cirrincione M. 2005. Micropropagación de vid. Protocolo para variedades "criollas". *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 37(2): 93-103.

Ji W., Li Z., Zhou Q., Yao W., Wang, J. 2013. Breeding new seedless grape by means of *in vitro* embryo rescue. *Genetics and Molecular Research*. 12 (1): 859-869.

Kaçar Y., Biçen B., Varol I., Mendi Y., Serçe S., Cetiner S. 2010. Gelling agents and culture vessels affect *in vitro* multiplication of banana plantlets. *Genetics and Molecular Research*. 9 (1):416-424.

Kanamadi V.C., Dharmatti P.R., Shankaragouda-Patil P., PM G., Patil B.C. 1999. Histological and histochemical status of embryo development in open pollinated stenospemcarpic grapes (*Vitis vinífera* L.). *Advances in Plant Sciencs Research India*. 10: 121-129.

Liu S., Sykes S., Clingleffer R. 2003. Improved *in ovulo* embryo culture for stenospemcarpic grapes (*Vitis vinífera* L.). *Crop and Pasture Science*. 54(9): 869-876.

Luquez C., Formento J. 2002. Flor y fruto de vid (*Vitis vinífera* L.) micrografía aplicada a viticultura y enología. *Revista FCA UNCuyo*. 34(1): 14.

Miñano A., Chico, J., López E., Sisniegas M., Bobadilla M. 2004. Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de antocianinas a partir de cultivos celulares de *Vitis vinífera* L. var. red globe. *Revista Peruana de Biología*. 11(2): 187-192.

Murashige T. y Skoog T. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15(3): 473-497.

Notsuka K., Tsuru T., Shiraishi M. 2001. Seedless grape hybridization via *in-ovulo* embryo culture. *Journal-Japanese Society For Horticultural Science*. 70:7-15.

Pasqual M., Ferreira E. 2007. Micropropagation of fig tree (*Ficus carica*). In: *Protocols for micropropagation of wood trees and fruits*. Jain S.M., Häggman H. eds. Springer. Chapter 37: 409-416 p.

- Pedroza J., Caballero M. 2009. Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchantia polymorpha* L. (Marchantiaceae) bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(2): 85-104.
- Pérez-Ponce J.N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. p 390.
- Perl A., Sahar N., Spiegel-Roy P., Gavish S., Elyasi R., Orr E., Bazak H. 2000. Conventional and biotechnological approaches in breeding seedless table grapes. *Acta Horticulturae*. 528: 607-612.
- Péros J., Torregrosa L., Berger G. 1998. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. *Journal of Experimental Botany*. 49 (319): 171-179.
- Ponce M., Agüero C., Gregori M., Tizio, R. 2000. Factors affecting the development of stenospemic grape (*Vitis vinifera*) embryos cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 528: 667-672.
- Ponce M., Ocvirk M., Agüero C. 2009. Efecto de la intensidad de la poda en el desarrollo *in vitro* de embriones de vides estenospermocárpicas. *Revista FCA UN Cuyo*. 41(1): 45-53.
- Ramming D. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. *Hort Science* 25(4): 393-398.
- Singh N, Singh S, Singh A. 2011. Standardization of embryo rescue technique and bio-hardening of grape hybrids (*Vitis vinifera* L.) using Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under sub-tropical conditions. *Journal of Grapevine Research*. 50 (3): 115-118.
- Valdez, J. 2005. Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L.) after an extended period of seed trace culture. *Vitis*. 44 (1): 17-23.