

**ADAPTACION DE TECNICAS PARA LA MICROPROPAGACION**

**A PARTIR DE MERISTEMOS DE *Vitis vinifera* L. (Vid) cv.**

**Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner)**

**CAROLINA PEÑA GUZMAN**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BIOLOGIA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**Bogotá, D.C.**

**Noviembre, 2000**

**ADAPTACION DE TECNICAS PARA LA MICROPROPAGACION**

**A PARTIR DE MERISTEMOS DE *Vitis vinifera* L. (Vid) cv.**

**Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner)**

**CAROLINA PEÑA GUZMAN**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar el título de**

**BIOLOGA**

**DIRECTORA**

**CLAUDIA RAMIREZ**

**Unidad de Biotecnología Vegetal**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BIOLOGIA**

**Bogotá, D.C.**

**Noviembre, 2000**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

**Artículo 23 de la resolución número 13 de julio de 1946:**

**“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus  
alumnos en sus tesis de grado**

**ADAPTACION DE TECNICAS PARA LA MICROPROPAGACION**

**A PARTIR DE MERISTEMOS DE *Vitis vinifera* L. (Vid) cv.**

**Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner)**

**CAROLINA PEÑA GUZMAN**

**APROBADO:**

---

**CLAUDIA RAMÍREZ**  
**Directora del Trabajo de Grado**  
**Unidad de Biotecnología Vegetal**  
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

---

**LUZ MERCEDES SANTAMARIA**  
**Directora de la Carrera de Biología**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

---

**Dr. CARLOS CORREDOR P., Ph.D**  
**Decano Académico**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

---

**SANDRA CONSTANTINO**  
**Jurado**  
**Unidad de Biotecnología Vegetal**  
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

---

**JAIME PEDROZA**  
**Jurado**  
**Unidad de Biotecnología Vegetal**  
**UNIVERSIDAD DISTRITAL**  
**FRANCISCO JOSE DE CALDAS**

*A Dios y a mi familia... por su amor,*

*A Alejandro...mi ángel.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A María Eugenia y Jorge Rodríguez por su colaboración prestada en la fase campo y por brindarme sus conocimientos acerca del cultivo de vid.

A todas las personas integrantes de la UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL por su acogida y enseñanzas, en especial a Claudia Ramírez, por la dirección del trabajo y su constante apoyo.

A María Susana Carrizosa por la asesoría durante la realización del trabajo y su colaboración en la aclaración de dudas. A la doctora Elizabeth Hodson, por su hospitalidad, continua ayuda y sugerencias a la investigación, recibidas durante la realización del mismo.

A Sandra Constantino, por la colaboración en la toma de fotografías, a Emma Lucía Rivera y Gustavo Gongóra por la asesoría en la escritura del anteproyecto.

A Julian, Jorge y Camilo por su colaboración en la etapa de laboratorio,

A la corporación BIOTEC, especialmente al Doctor Jorge Cabra "Director científico", Raúl Salazar, y Armando Muñoz por su colaboración científica en la realización de pruebas para la detección de virus y por su asesoría para el registro en la toma de datos de campo.

Al profesor Ricardo Martínez, por su asesoría y realización del análisis estadístico.

A Andrea y su mamá, por su hospitalidad

A Liz Dey Mora por su amistad y a Luza, Moni, Didian, y Anita por estar en los momentos precisos brindándome su apoyo y consejos,

A la familia Arango Bohórquez por su generosidad y colaboración en la realización del trabajo,

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional,

A Alejandro, por su alegría e inocencia,

A Dios y a mis amigos (a) por estar siempre conmigo,

A todos aquellos que hicieron posible la realización de este proyecto en mi vida.

26 de Octubre del 2000

## TABLA DE CONTENIDOS

### RESUMEN

1	INTRODUCCION	17
2.	MARCO TEORICO	18
2.1.	<i>Vitis vinifera</i> l.	18
2.1.1.	Clasificación botánica	18
2.1.2.	Descripción botánica y características generales	18
2.1.3.	Origen, distribución y usos	21
2.1.4.	Ciclo de vida	22
2.1.5.	La vid en Colombia	24
2.1.6.	Variedad Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner)	24
2.1.7.	Enfermedades	25
2.1.7.1	Técnicas para la detección de virus	27
2.2.	CRECIMIENTO Y DESARROLLO	29
2.2.1.	Zonas de crecimiento-meristemas-	30
2.2.2.	Reguladores del crecimiento	32
2.2.2.1	. Citoquininas	33
2.2.2.2.	Auxinas	36
2.3.	CULTIVO <i>in vitro</i> DE MERISTEMOS	38
2.3.1.	Etapas del cultivo de meristemas <i>in vitro</i>	42
2.3.1.1.	Establecimiento	42
2.3.1.2.	Proliferación	44
2.3.1.3.	Enraizamiento	44



2.3.1.4.	Endurecimiento	46
2.3.2.	Problemas asociados al cultivo <i>in vitro</i>	47
2.3.2.1	Contaminación y oxidación	47
2.3.2.2	Vitrificación	49
2.3.2.3	Necrosis apical y fasciación	51
2.3.3	Antecedentes de micropropagación en vid	52
<b>3.</b>	<b>FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION</b>	<b>57</b>
3.1	FORMULACION DEL PROBLEMA	57
3.2	PREGUNTA DE INVESTIGACION	57
3.3.	JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION	57
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>59</b>
4.1.	OBJETIVO GENERAL	59
4.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	59
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>60</b>
5.1.	POBLACIÓN DE ESTUDIO	60
5.2.	MATERIAL VEGETAL	60
5.3.	ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	60
5.3.1.	Desinfección	63
5.3.2.	Obtención y siembra del explante	63
5.3.3.	Medio y condiciones físicas del cultivo	64
5.3.4.	Reguladores de crecimiento	64
5.4	ETAPA DE PROLIFERACION	65
5.5	ETAPA DE ENRAIZAMIENTO Y ACÑIMATACION	65

5.6	DETECCION DE PARTICULAS VIRALES	67
5.7	DISEÑO EXPERIMENTAL	67
5.7.1	ESTABLECIMIENTO	68
5.7.2	PROLIFERACION	69
5.7.3	ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACION	71
5.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
5.8.1	ESTABLECIMIENTO	72
5.8.2	PROLIFERACION	73
5.8.3	ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACION	74
6.	RESULTADOS	75
6.1	EFEECTO DE LA ADICION DE CITOQUININAS, LA CONCENTRACIÓN Y LA CONSISTENCIA DEL MEDIO DURANTE LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	76
6.1.1.	Número de explantes que desarrollan brotes	76
6.1.2.	Longitud del explante (mm )	80
6.1.3.	Oxidación (%)	83
6.1.4.	Número de explantes vitrificados	86
6.2	EFEECTO DE LA ADICION DE BA DURANTE LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	89
<b>6.3.</b>	<b>EFEECTO DE LA ADICION DE CITOQUININAS DURANTE LA ETAPA DE PROLIFERACION</b>	<b>90</b>
6.3.1.	Número de brotes por explante	90
6.3.2.	Número de nudos por brote	96
6.3.3.	Longitud del brote (cm)	99
6.3.4.	Oxidación (%)	102
6.3.5.	Número de brotes vitrificados	104

6.4.	EFECTO DE LA ADICION DE AUXINAS DURANTE LAS ETAPAS DE ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACION	107
6.4.1	Brotos que desarrollan raíces (%)	107
6.4.2	Peso seco de la raíz y de la parte aérea (g)	108
6.4.3	Supervivencia (%)	108
6.5.1	IDENTIFICACION DE PARTICULAS VIRALES EN MATERIAL DE CAMPO	112
7.	DISCUSION	113
7.1.	ESTABLECIMIENTO	113
7.2.	PROLIFERACION	116
7.3.	ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACION	120
8.	CONCLUSIONES	123
9.	RECOMENDACIONES	125
10.	BIBLIOGRAFIA	
	ANEXOS	

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Tratamientos hormonales evaluados en la etapa de establecimiento	64
<b>Tabla 2.</b>	Tratamientos hormonales evaluados en la etapa de proliferación.	64
<b>Tabla 3.</b>	Tratamientos hormonales evaluados en la etapa de enraizamiento y aclimatación	66
<b>Tabla 4.</b>	Resultados de contaminación en la etapa de establecimiento	75
<b>Tabla 5.</b>	Efecto de los tratamientos evaluados sobre el número de explantes que desarrollaron brotes durante la etapa de establecimiento	77
<b>Tabla 6.</b>	Efecto de los tratamientos evaluados sobre la longitud del explante durante la etapa de establecimiento.	81
<b>Tabla 7.</b>	Efecto de los tratamientos evaluados sobre la oxidación en los explantes durante la etapa de establecimiento.	84
<b>Tabla 8.</b>	Efecto de los tratamientos evaluados sobre la vitrificación de los explantes durante la etapa de establecimiento.	87
<b>Tabla 9.</b>	Efecto de la adición de BA sobre las variables evaluadas durante la etapa de establecimiento	89
<b>Tabla 10.</b>	Resultados del ANOVA para el efecto del BA y TDZ (factorial 2x5) sobre las variables evaluadas en la etapa de proliferación.	92
<b>Tabla 11.</b>	Resultados del ANOVA para el efecto del BA, TDZ y tiempo (factorial 2x5x7) sobre las variables evaluadas en la etapa de proliferación	92
<b>Tabla 12.</b>	Efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de raíces (%) a los 20 días de iniciada la etapa de enraizamiento	108

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Corte transversal de una yema latente axilar compuesta por varios conos vegetativos.	20
<b>Figura 2.</b> Ciclo vegetativo y reproductivo de la vid en clima templado y tropical.	23
<b>Figura 3.</b> <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Müller thurgau (Riesling x Sylvaner)	26
<b>Figura 4:</b> Meristemo apical.	31
<b>Figura 5.</b> Plantas de <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner), utilizadas como fuente de material vegetal para la micropropagación .	61
<b>Figura 6.</b> Metodología utilizada para la obtención de plantas de <i>Vitis vinifera</i> L. a partir de meristemos	62
<b>Figura 7</b> Respuesta de meristemos de <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) en medio MS con 2.25 o 4.5 $\mu$ M de BA y 0.01 $\mu$ M de TDZ en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> .	78
<b>Figura 8</b> Efecto de los tratamientos evaluados sobre el número de explantes que desarrollaron brotes durante la etapa de establecimiento	79
<b>Figura 9.</b> Efecto de los tratamientos evaluados sobre la longitud de los explantes durante la etapa de establecimiento	82
<b>Figura 10.</b> Efecto de los tratamientos evaluados sobre la oxidación (%) de los explantes durante la etapa de establecimiento	85
<b>Figura 11.</b> Efecto de los tratamientos evaluados sobre el número de explantes vitrificados durante la etapa de establecimiento	88
<b>Figura 12.</b> Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes por explante durante la etapa de proliferación	93
<b>Figura 13.</b> Respuesta de los brotes cultivados en medio MS sólido suplementado con 3.15, 4.5 o 5 $\mu$ M de BA, a los 55 días de iniciada la etapa de proliferación	94
<b>Figura 14</b> Fasciación y callo de los brotes adventicios desarrollados en medio MS sólido suplementado con BA y TDZ durante la etapa de proliferación.	95

<b>Figura 15.</b> Efecto de los tratamientos sobre el número de nudos por brote durante la etapa de proliferación	97
<b>Figura 16.</b> Necrosis apical en brotes de <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Müller Thurgau después de 76 días de cultivo <i>in vitro</i> durante la etapa de proliferación	98
<b>Figura 17.</b> Efecto de los tratamientos sobre la longitud de los brotes durante la etapa de proliferación	100
<b>Figura 18</b> Brotes con entrenudos cortos cultivados en medio MS sólido suplementado con 4.5 y 5 $\mu$ M de BA durante la etapa de proliferación.	101
<b>Figura 19.</b> Efecto de los tratamientos sobre la oxidación de los brotes durante la etapa de proliferación	103
<b>Figura 20.</b> Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes vitrificados durante la etapa de proliferación	105
<b>Figura 21.</b> Respuesta en vitrificación de los brotes cultivados en medio MS sólido suplementado con BA y TDZ, a los 35 días de iniciada la etapa de proliferación.	106
<b>Figura 22</b> Efecto de los tratamientos sobre la inducción de raíces <i>in vitro</i> durante la etapa de enraizamiento-aclimatación	109
<b>Figura 23</b> Peso seco (g) a los 17 y 34 días de la etapa de endurecimiento.	110
<b>Figura 24.</b> Distribución de materia seca durante la etapa de endurecimiento.	110
<b>Figura 25.</b> Planta de $\pm$ 20 cm. de altura obtenida por cultivo <i>in vitro</i> de meristemos de <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner), a los 34 días de iniciada la etapa de endurecimiento.	111

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Composición del medio nutritivo Murashige & Skoog. (MS) (1962) utilizado
- Anexo 2.** Especificaciones propuestas por la Corporación BIOTEC 2000 para la recolección de muestras vegetales para su indización.
- Anexo 3.** Análisis de varianza (ANOVA) para las variables evaluadas en la etapa de establecimiento, tomando como factores; consistencia del medio, BA y TDZ
- Anexo 4.** Análisis de varianza (ANOVA) para las variables evaluadas en la etapa de establecimiento, tomando como factor los tratamientos.
- Anexo 5.** Prueba de comparación de medias (LSD Fisher) para las variables evaluadas en la etapa de establecimiento
- Anexo 6.** Porcentaje de explantes que presentaron 25% y 100% de oxidación durante la etapa de establecimiento.
- Anexo 7.** Porcentaje de explantes que presentaron oxidación en un 25, 50, 75 y 100%, en los tratamientos evaluados a los 12, 26, 46, 61, 76, 91 y 105 días en la etapa de proliferación.
- Anexo 8.** Análisis de varianza (ANOVA) para las variables evaluadas en cada tiempo (12, 26, 46, 61, 76, 91 y 105 días) de la etapa de proliferación.
- Anexo 9.** Análisis de varianza para las variables evaluadas en la etapa de proliferación tomando el tiempo como fuente de variación.
- Anexo 10.** Análisis de los efectos lineales y cuadráticos de BA para las variables evaluadas en la etapa de proliferación.
- Anexo 11.** Análisis de varianza (ANOVA) para las variables evaluadas en la etapa de enraizamiento-aclimatación, tomando como factor los tratamientos.
- Anexo 12.** Resultados de las pruebas realizadas por la Corporación BIOTEC 2000 para la detección de partículas virales

## RESUMEN

El potencial morfogenético de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) observado en condiciones de cultivo *in vitro*, permitió desarrollar una metodología para la micropropagación a partir de meristemos caulinares. Para todas las etapas del proceso se utilizó medio (MS) Murashige & Skoog básico (1962). Con el fin de determinar el medio más adecuado para el establecimiento *in vitro* de meristemos de esta variedad se evaluaron dos consistencias de medio MS (sólida y líquida) suplementado con las citoquininas bencil-adenina (BA) 0, 1, 2,25, y 4,5  $\mu\text{M}$  y thidiazuron (TDZ) 0, 0.001 y 0.01  $\mu\text{M}$  solas y combinadas. El medio MS sólido suplementado con 2.25  $\mu\text{M}$  de BA fue el más adecuado para el establecimiento de meristemos. Para la proliferación masiva de brotes, se evaluaron las concentraciones de BA 0, 1, 3.15, 4.5 y 5  $\mu\text{M}$  y TDZ 0 y 0.001  $\mu\text{M}$  solas y combinadas. El mayor número de brotes se obtuvo con 5  $\mu\text{M}$  de BA, con un promedio de 2.6 brotes por explante. Durante la etapa de inducción de raíces, se evidenció la capacidad rizogénica de la variedad, en los brotes transferidos a medio con macronutrientes diluidos a la mitad, sin reguladores de crecimiento y con 15g/l de sacarosa. Para la aclimatación se utilizó turba como sustrato y se redujo gradualmente la humedad relativa, lo que permitió una aclimatación del 90% de las plantas de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de meristemos. Durante esta investigación se obtuvieron plantas aclimatadas de 20-30 cm. de altura a partir de meristemos, en un período de tiempo de 210 días (siete meses), tiempo similar al obtenido por otros autores con otras variedades. Así, con el presente estudio se logró obtener el primer acercamiento del comportamiento de esta variedad en condiciones *in vitro*, y desarrollar una técnica para una eventual limpieza de virus.



## INTRODUCCION

Este trabajo surge como respuesta a la inquietud de viticultores con relación al desarrollo de protocolos dirigidos a la propagación clonal masiva de la variedad Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) cultivada para la industria vitícola en el departamento de Boyacá., debido a que en esta región el cultivo de vides se ha convertido en una alternativa de producción y los métodos de propagación vegetativa tradicionales no permiten el suministro de material vegetal en cantidades suficientes y en condiciones fitosanitarias adecuadas.

La propagación a partir de meristemas, es una de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales basadas en la totipotencia celular y aplicadas en la micropropagación de plantas. Mediante el cultivo de meristemas es posible multiplicar masivamente especies de interés agronómico, ecológico y económico, y contribuir al desarrollo de procedimientos para la limpieza de virus. Adicionalmente, esta técnica ofrece una alternativa que puede complementar los sistemas de propagación tradicional.

Este método ha sido ampliamente aplicado a la propagación clonal a gran escala de especies de *Vitis* económicamente importantes, como *Vitis vinifera* L. La estandarización de los medios y condiciones de cultivo *in vitro* en esta especie, es importante debido a los requerimientos nutricionales y hormonales específicos para las diferentes variedades.

Se logró adaptar y desarrollar técnicas para el cultivo *in vitro* de meristemas de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner), evaluando las condiciones requeridas para el establecimiento, proliferación masiva, enraizamiento y aclimatación del material obtenido *in vitro*.

2.

## MARCO TEORICO

### 2.1. *Vitis vinifera* L.

#### 2.1.1 Clasificación botánica

CLASE: Dicotiledoneas

SUBCLASE: Archichlamydeae

ORDEN: Rhamnales

FAMILIA: Vitaceae

GENERO: *Vitis*

SUB-GENERO: *Euvitis*

ESPECIE: *Vitis vinifera*

VARIEDAD: Müller Thurgau (Sylvaner x Riesling)

(Bhattacharyya & Jhory, 1998)

Nombre científico: *Vitis vinifera* L.

Nombres comunes: Vid, uva, uva común para vino, uva europea, vid europea, "vigne rouge" (Francia), "grapevine" (Inglaterra) (Alonso, 1999)

#### 2.1.2 Descripción botánica y características generales

*Vitis vinifera* L. es una liana perenne y leñosa, que llega a medir entre 1 y 3 metros de largo. Presenta hojas alternas circulares u ovaladas, margen dentado o ligeramente aserrado, con 4 y 7 lóbulos, de textura delgada y con un tamaño que varía entre 5 a 23 cm de diámetro. Las flores, dispuestas en inflorescencias de racimo, se encuentran en posición opuesta a las hojas, presentan cáliz con 4-5 lóbulos y pétalos de color verde pálido. Las semillas generalmente 2 a 4, ovoides o piriformes, pueden estar ausentes.

Los frutos son pulposos, pequeños y su tamaño varía entre 6 y 12 mm de diámetro cada uno (Chauvet *et al.*, 1984; Winkler, 1987).

Al nivel de cada nudo y en la axila de cada hoja, se encuentra una yema que se desarrolla rápidamente después de su formación sobre el sarmiento, y una latente que se desarrollará en el futuro sarmiento. Las yemas son pubescentes y protegen los conos vegetativos (puntos de crecimiento donde se encuentran meristemas). La yema latente está compuesta por varios conos vegetativos un cono principal rodeado por uno o varios conos secundarios más pequeños (Figura 1) (Hidalgo, 1979; Chauvet *et al.*, 1984).

El desarrollo de una yema en un brote conlleva el desarrollo de uno o dos primordios y posteriormente el crecimiento del brote; las yemas juegan un papel primordial en la producción vitícola, pues son el lugar de la iniciación floral (Chauvet *et al.*, 1984).

La propagación tradicional de la vid es vegetativa, y se realiza por injerto o por estacas. Las estacas presentan sistema radicular fasciculado y a partir de ellas se desarrollan raíces secundarias y pelos radicales (Winkler, 1987).

En general, la vid posee una amplia capacidad de adaptación a diferentes tipos de suelo, pero requiere que estos sean profundos para la penetración de la raíz. *Vitis vinifera* L. es tolerante a suelos calcáreos y a limos, lo que hace que sea ampliamente utilizada como portainjerto (Rivera, 1995; Pearson & Goheen, 1998).

En el trópico, los cultivos de vid pueden mantenerse en crecimiento continuo. Sin embargo, en períodos secos, la planta detiene parcialmente el crecimiento “descanso” en los lluviosos lo reinicia. Bajo tales condiciones, la práctica de la poda regula la sucesión de los ciclos de crecimiento (Rivera, 1995).

**Figura 1.** Corte transversal de una yema latente axilar caulinar compuesta por varios conos vegetativos.

### 2.1.3 Origen, distribución y usos

La vid es originaria de Asia menor, principalmente de la región del Mar Caspio. Fue introducida inicialmente en Europa y más tarde al resto de los continentes. Una de las especies más utilizadas, por las antiguas civilizaciones era *Vitis vinifera* L. En los jeroglíficos egipcios que datan de 2.400 a.C. se hacía mención al vino, y en los siglos XVI y XVII, el cultivo de vid cobró auge en Europa. En América, fue introducida en México a comienzos del siglo XVI, y luego en la costa este de los Estados Unidos en 1.616. Actualmente, el cultivo de la vid esta ampliamente distribuído (Winkler, 1987).

Los cultivos de vid en el ámbito mundial se encuentran ubicados en las zonas más calientes de las regiones templadas, localizados entre los 50° LN y los 35° LS. La temperatura es considerada como el factor más limitante en la distribución del cultivo de la vid, el cual se desarrolla en zonas de temperatura media diaria entre 10° y 42°C. En zonas tropicales donde la temperatura media diaria se encuentra por encima de los 10°C durante todo el año, la vid ha sido cultivada con éxito (Krul & Mowbray, 1984; Rivera, 1995).

Los frutos frescos se caracterizan por tener un importante valor nutricional ya que proveen cerca de 700 cal/Kg. y son ricos en calcio, fósforo y vitaminas; al vino se le han atribuido propiedades diuréticas y antioxidantes, entre otras. Los compuestos fenólicos como los polifenoles abundantes en las semillas y frutos principalmente, han despertado gran interés por sus propiedades protectoras en el sistema cardiovascular humano. Así mismo, las procianidinas (taninos condensados) han mostrado actividad antimutagénica, lo que es de gran utilidad en el tratamiento quimiopreventivo de las enfermedades crónicas degenerativas. (Winkler, 1987; Liviero *et al.*, 1994).

#### 2.1.4. **Ciclo de vida**

La vid, planta perenne leñosa, presenta dos fases durante su ciclo de vida; una fase juvenil y una fase madura o adulta. La fase juvenil, definida como el período inicial de crecimiento cuando el meristemo apical no responde a estímulos internos o externos para el inicio del periodo de floración, se caracteriza por la ausencia de potencial para cambiar de una etapa vegetativa a una reproductiva, por una morfología específica y por una habilidad para la regeneración de tallos y raíces adventicias (Hartmann *et al.*, 1997). Durante esta etapa la planta desarrolla brotes y crece activamente, por lo que se sugiere realizar podas de formación o despunte, en las cuales se retiran algunas ramas de la parte superior. (Chauvet, 1984). La fase adulta se caracteriza por un ciclo continuo entre etapa reproductiva y vegetativa y empieza después de su primera producción (cosecha) 1 a 7 años después de su plantación (Winkler, 1987).

En las zonas templadas, tanto en la etapa juvenil como en la etapa vegetativa de la fase adulta, la planta disminuye su crecimiento sin detenerlo, y comienza un periodo conocido como agostamiento, o maduración de los sarmientos, en el cual estos cambian de color y textura y se presenta abscisión de hojas. La etapa de reposo invernal de la planta es una fase posterior a la cosecha; al final del reposo se realiza una poda en la base del sarmiento (poda de producción) para inducir la formación de brotes. En condiciones tropicales, posterior a la maduración de los sarmientos, se poda y la planta se somete a tratamientos con compensadores de frío como requisito para la inducción de brotes (Rivera, 1995).

El crecimiento de los brotes lleva consigo la formación de flores y frutos, dando origen a la primera cosecha; a partir de ésta comienza una sucesión de ciclos vegetativos y reproductivos, interdependientes entre sí, enmarcados en una fase adulta. Los eventos en

los ciclos son los mismos en clima templado y tropical y lo que los diferencia es el tiempo de duración (Figura 2) (Winkler, 1987).

**Figura 2.** Ciclo vegetativo y reproductivo de la vid en clima templado y tropical.

### **2.1.5 La vid en Colombia**

El género *Vitis* se introdujo en Colombia entre los años 1920 y 1930 a través de la Granja Agrícola Experimental, de la Secretaria de Agricultura en el municipio de Bolívar (Valle). Actualmente, la región de mayor producción y tecnificación de vid es el Valle del Cauca en donde se cultivan aproximadamente 400 Ha. de Isabella (*V. labrusca*), 800 Ha. de Queen (*V. vinifera* L.), 330 Ha. de Italia (*V. vinifera* L.) y 770 Ha. de otras seis variedades (Muñoz, 1997).

*Vitis vinifera* L., también es cultivada en Boyacá, donde se producen vinos de alta calidad. El primer viñedo experimental en esta región fue el de Punta Larga. La primera cosecha se obtuvo en 1986 con las variedades importadas de Alemania Pinot noir, Riesling y Müller Thurgau. Variedades de Francia como Syrah, Chardonay, Cavernet Sauvignon y Pinot Noir, fueron sembradas entre 1984 y 1987, y en 1988 se obtuvo la primera cosecha (Zambrano & Alonso, 1991).

### **2.1.6. Variedad Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner)**

La variedad se caracteriza por ser vigorosa, crecer bien en suelos profundos, aireados y no muy secos. Las puntas de sus ramas son verdes con un tinte rojizo, sus hojas presentan entre 5 y 7 lóbulos fuertemente marcados, vellosidades y bordes muy dentados (Figura 3) (Winkler, 1987). Sus bayas son sueltas, lo que les proporciona una mayor aireación entre ellas; presenta capacidad rizogénica, maduración temprana y de su fruto (con aroma a nuez moscada) se produce vino blanco afrutado con una fina acidez. Esta variedad es susceptible a enfermedades como Mildeo polvoso causada por el hongo *Oidium* sp. (Bayona & Sánchez, 1992)

La variedad Müller Thurgau debe su nombre y su origen a Müller (1982), quien realizó el cruzamiento de la variedad Riesling x la variedad Sylvaner en Thurgau (Alemania); en 1913 se le denominó a este híbrido, Müller Thurgau y en 1945 comenzó su siembra extensiva y su comercialización en este país. Actualmente, en el mundo cerca de 50.000 Ha. sembradas con esta variedad (Zambrano & Alonso, 1991).

### **2.1.7 Enfermedades**

Los cultivos de vid establecidos en el trópico están más expuestos a enfermedades fungosas, debido a las lluvias continuas, alta humedad y temperatura, factores que proporcionan un clima propicio para la proliferación y permanencia de los hongos en los cultivos (Villar., 1996). Las enfermedades más comunes en el cultivo de la vid en el Valle del Cauca, han sido causadas por hongos: Mildeo veloso (*Plasmopara viticola*), Mildeo polvoriento (*Uncinula necator*) y podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) (Villar, 1996). En la región de Boyacá, el hongo *Oidium* sp. ha tenido mayor incidencia sobre el cultivo de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner). Otros como *Plasmopora* sp., *Calternaria* sp. y *Botrytis* sp., también han afectado el cultivo de vides en esta región (Bayona & Sanchez, 1992).

En el mundo, los cultivos de vid han sido atacados por virus que han contribuido a incrementar la variabilidad fenotípica presente dentro de las poblaciones (Mannini *et al.*, 1999). En Colombia, Chávez en 1994 (citado por Muñoz, 1997) identificó los virus de la corteza corchosa o "Corky bark"(GVA) y "Stempitting"o de la acanaladura del tallo. Actualmente se han detectado los virus del enrollamiento foliar de la vid (GLRV), y el virus de la hoja en abanico también conocido como "cort-noué" o nudo corto (GLFV).





**Figura 3.** *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) **A.** Planta de 18 meses con inflorescencias **B.** frutos

Las vides afectadas por el virus GLFV (hoja en abanico de la vid, o "Grapevine Fanleaf Virus"), presentan en sus hojas asimetría del limbo con modificaciones en las nervaduras, ensanchamiento de los lóbulos y amarillamiento o decoloración del limbo; en los tallos se presentan entrenudos cortos, nudos dobles, fasciación y sus racimos son pequeños con un bajo contenido de azúcar. (Galet, 1977; Chauvet *et al.*, 1984; Forrest & Nutter, 1997).

El virus GLRV (enrollamiento foliar o "Grapevine Leafroll Virus") se detectó en Alemania en 1939 en Francia y California en 1946. Fue aislado en 1960 y al parecer se transmitió por injerto hacia 1970 (Galet 1977). En la actualidad se encuentra en todos los países donde se cultiva la vid, y cada año se pierde entre un 20 y 70% de las cosechas en los viñedos por causa de esta enfermedad, convirtiéndose en un problema económico a escala mundial. El virus del enrollamiento foliar es causado por cinco closterovirus diferentes, comúnmente asociados con el floema (Forrest & Nutter, 1997; Wilcox *et al.*, 1998; Pearson & Goheen, 1998). Se caracteriza, como su nombre lo indica, por un enrollamiento hacia abajo de los bordes de las hojas, reducción en el tamaño de los órganos, color y contenido de azúcar del fruto, causando una disminución en la productividad y vigor de la planta (Winkler, 1987; Pearson & Goheen, 1998).

El virus GVA (tallo corchoso o "Corky bark") se caracteriza por un retraso en la apertura de la yema, por una corteza débil, agrietada, rugosa y esponjosa (Salazar, 2000).

#### **2.1.7.1 Técnicas para la detección de virus**

La detección de partículas virales y microorganismos se puede realizar por varias técnicas, una de ellas es la microscopía electrónica, con la cual se logran

amplificaciones hasta de un millón de veces, siendo posible visualizar organismos que presentan un tamaño de  $0.003\mu\text{m}$  (Brock & Madigan, 1993).

Las pruebas serológicas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizan para la detección de infecciones virales y antígenos microbianos. La reacción antígeno-anticuerpo ocurre cuando una proteína extraña (antígeno) asociado con un virus, ingresa en el cuerpo de un animal y este produce proteínas (anticuerpos) que se unen al antígeno para prevenir la invasión, inactivando y previniendo la replicación del virus. Los anticuerpos son específicos para cada tipo de virus (Schumann, 1998).

Una de las pruebas serológicas utilizadas comercialmente para la detección de virus, uno de ellos es el ensayo de inmunoabsorbancia enzima-ligando (ELISA). Uno de los tipos de test ELISA es el de doble anticuerpo en sandwich ELISA (DAS-ELISA), llamado así porque involucra dos anticuerpos diferentes producidos contra el mismo virus. El fundamento del método ELISA se basa en que los anticuerpos y algunos antígenos se pueden fijar a placas de poliestireno (u otros materiales sólidos) conservando intacta su capacidad de reacción inmunespecífica y que los antígenos y anticuerpos se pueden unir a enzimas, formando complejos totalmente funcionales desde el punto de vista inmunológico y enzimático (Schumann, 1998).

El test de ELISA incluye varios pasos: el primero consiste en la adsorción del anticuerpo en un pozo plástico pequeño, el segundo en la unión del virus con el anticuerpo; un tercer paso consiste en la formación de un "sandwich", al adherirse al virus un nuevo anticuerpo con una enzima; finalmente la reacción de un sustrato con la enzima ocasiona un cambio de color. El test de ELISA puede detectar pequeñas cantidades de virus; la concentración de virus puede ser cuantificada por medición de la intensidad de color. En esta técnica se utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales, los policlonales son aquellos que tienen muchos sitios de unión al virus y los monoclonales poseen un solo sitio de unión (Habibi & Nutter, 1997; Schumann, 1998;).

Otras técnicas para la detección de virus, consisten en la hibridación de ácidos nucleicos, en donde la presencia de cadenas de dsRNA se utiliza como indicador de la presencia de virus (Monette *et al.*, 1989; Namba *et al.*, 1991)

## 2.2 CRECIMIENTO Y DESARROLLO

La suma total de eventos celulares que originan un organismo se denomina **desarrollo**. Este involucra tres procesos: crecimiento (se manifiesta por un incremento irreversible en tamaño), morfogénesis (adquisición de una forma particular) y diferenciación (las células difieren entre sí y de las células meristemáticas de las cuales se originaron) (Raven *et al.*, 1999)

El incremento irreversible en tamaño (**crecimiento**), esta dado por la combinación de expansión y división celular. La expansión celular puede considerarse como un equilibrio entre fuerzas de empuje y reacción. El protoplasto ejerce una presión sobre la pared celular (presión de turgencia) y ésta a su vez constituye una barrera física, por su rigidez (Azcon-Bieto & Talon, 1996). La relajación de la pared hace que se reduzca el potencial hídrico y la presión de turgencia, permitiendo la toma de agua y la expansión física (Cosgrove, 1997). La tasa de expansión de una célula está controlada por la presión de turgencia dentro de la célula, por la extensibilidad de la pared celular (Raven *et al.*, 1999) y por estímulos externos como luz, temperatura y disponibilidad de agua, e internos como hormonas (Cosgrove, 1997).

La suma de división y expansión celular permiten la adquisición de una forma en la planta (**morfogénesis**). La organogénesis en plantas, puede continuar indefinidamente después de la embriogénesis, en zonas de crecimiento que se mantienen en constante división denominadas meristemas. (Randall & Hake 1997; Taiz & Zeiger, 1998).

### 2.2.1 Zonas de crecimiento -meristemos-

El término meristemo hace referencia a la zona de la planta en crecimiento activo, que contiene células que crecen y se multiplican por mitosis y de la cual se originan otros tejidos maduros y diferenciados (Font Quer, 1993).

Los meristemos se pueden clasificar por su origen, posición y la estructura que originan. Los meristemos primarios localizados en el ápice del tallo y de la raíz generan el cuerpo de la planta y se forman durante la embriogénesis. Los meristemos secundarios como los axilares tienen una estructura y desarrollo similar a los meristemos primarios, poseen un potencial para formar raíces o tallos secundarios; sin embargo, su actividad se puede ver disminuida cuando los meristemos primarios están activos (Sussex, 1989; Kerstetter & Hake, 1997; Randall & Hake, 1997; Taiz & Zeiger, 1998).

Se presentan otros tipos de meristemos como los encargados del crecimiento secundario y, de la morfología particular en la hoja. Adicionalmente, los meristemos se pueden formar *de novo* en tejidos diferenciados y se denominan adventicios (Margara, 1988; Sussex, 1989; Luttge *et al.*, 1993).

En los meristemos ocurren procesos morfogenéticos que contribuyen directamente a la forma específica de la planta; la iniciación de un nuevo primordio foliar está determinada por un cambio en el plano de división. Usualmente una división periclinal en la túnica o en el corpus (Figura 4) indica que el primordio se está formando (Kerstetter & Hake, 1997).

El meristemo apical se divide en zonas o regiones de desarrollo:

- Zona central (ZC): presenta células con grandes vacuolas; las divisiones celulares que allí ocurren mantienen la población de células indeterminadas mientras se diferencian en primordios foliares o tallo.

- Zona periférica o morfogénica (ZP): presenta células con pequeñas vacuolas y mayor división celular; es la principal fuente de nuevas células en el meristemo, y sus primeras divisiones dan lugar a la formación de primordios.
- Zona Interna (ZI): incluye las células de la base del meristemo, que también se dividen y expanden rápidamente, y originan los tejidos del tallo (dérmico, vascular y fundamental).
- Zona subapical de maduración (ZM): origina el engrosamiento del tallo y la elongación rápida de los meristemas.

**Figura 4:** Meristemo apical: Zona central (ZC), periférica (ZP), interna (ZI). Bajo la zona central se encuentra la zona de maduración (ZM). La p1 corresponde al primer primordio y p2 al segundo. La Túnica o tejido histogénico contribuye con la epidermis y el Corpus al tejido central de hojas y tallo. (Tomado de Kerstetter & Hake, 1997).

En los procesos de diferenciación es muy importante la posición de las células en el meristemo. En este proceso es fundamental la regulación génica ya que cada tejido se caracteriza por la expresión de un grupo de genes en el genoma de la planta. Adicionalmente, el meristemo es un sitio de integración de factores ambientales como longitud del día, temperatura, estado nutricional, y señales endógenas. Adicionalmente, cambios en la filotaxia y la forma que puede adoptar un meristemo pueden ocurrir durante el ciclo de vida (Kerstetter & Hake, 1997).

### 2.2.2 Reguladores del crecimiento

Entre los principales factores internos que regulan el crecimiento y desarrollo de una planta se incluyen las hormonas. Algunas se producen en un tejido y son transportadas a otro en el cual ocurre una respuesta fisiológica, otras actúan en el mismo sitio donde se producen. Se conocen cinco grupos principales de hormonas: Auxinas, Giberelinas, Citoquininas, Acido abscísico y Etileno. Los reguladores de crecimiento son compuestos químicos sintéticos que presentan actividad similar a las hormonas (Hartmann *et al.*, 1997; Kende & Zeevart, 1997; Taiz & Zeiger, 1998).

Las células reconocen las hormonas por medio de proteínas receptoras en las membranas, las cuales contienen un sitio de unión específico para cada una. Los receptores, al unirse la hormona, involucran directamente la expresión génica (estimulan la transcripción de genes específicos activadores de hormonas) o reconocen una señal en la parte externa de la membrana que se traduce en un importante sistema celular vía segundos mensajeros, los cuales transfieren información desde el complejo hormona-receptor hasta la célula blanco y amplifican señales producidas por las hormonas activando bombas y canales de iones (Kulaeva, 1995; Raven *et al.*, 1999).

Diferentes tipos de células pueden tener los mismos receptores de membrana, sin embargo pueden responder diferente a la misma hormona, porque tienen complementos diferentes, (proteínas kinasas y proteínas blanco), por alteraciones en la respuesta de los segundos mensajeros, o por diferente sensibilidad (Weyers *et al.*, 1995; Raven *et al.*, 1999).

Las hormonas pueden cambiar el potencial eléctrico de las membranas por activación de  $H^+$ -ATPasas, o por apertura de canales iónicos. El cambio puede ser transitorio pero cuando hay una "cascada de transducción de señales", esta puede conducir a la activación de proteínas y genes específicos.

### 2.2.2.1 Citoquininas

Las citoquininas fueron descubiertas en estudios dirigidos a identificar factores de estimulación de la división celular. La primera citoquinina natural identificada fue la zeatina, a partir del endospermo del maíz; desde entonces se han identificado otras citoquininas, y se ha encontrado que tienen efectos en procesos fisiológicos (Taiz & Zeiger, 1998).

Las citoquininas naturales se sintetizan en los ápices de la raíz y se transportan a través del xilema hacia los brotes, frutos, semillas y hojas, donde se produce una rápida absorción. Esta absorción se lleva a cabo por la acción de una enzima adenina fosforibosil transferasa (Azcon-Bieto & Talon, 1996).

Las citoquininas se pueden dividir en dos grupos: las derivadas de la adenina y las derivadas de la úrea (Mok *et al.*, 1982). En las derivadas de la adenina se encuentran citoquininas naturales como 6-4-hidroxi-3-metilbut-*trans*-2-enilamino (Zeatina) y 6-benzil-aminopurina (Benciladenina; BA), y citoquininas sintéticas como 6-furanosil aminopurina (Kinetina). Sin embargo, frecuentemente se presentan analogías entre estas con respecto a su síntesis, actividad y metabolismo (Van Staden & Crouch, 1996).

En las citoquininas tipo adenina pueden ocurrir tres procesos metabólicos: perder irreversiblemente su actividad biológica por degradación oxidativa de la cadena lateral en la posición N<sup>6</sup>, reducir o perder su actividad por conjugaciones irreversibles con alaninas o glucosas formando N-conjugados, o que ocurra una conjugación reversible (o interconvertirse) a compuestos activos o de almacenamiento, los cuales se pueden convertir en citoquininas activas (Van Staden & Crouch, 1996; Kende & Zeevaart 1997).



Las citoquininas derivadas de la úrea, son compuestos sintéticos que a su vez se dividen en dos grupos, las piridylureas y las thidiazolureas. En el grupo de las thidiazolureas se encuentra N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (Thidiazuron), un compuesto con actividad de citoquinina (Mok & Mok 1985).

Entre los efectos fisiológicos reportados para las citoquininas, se encuentran el aumento de los niveles de Ca-calmodulina, la producción de etileno, el incremento de la relación tallo/raíz y expansión foliar (Van Staden & Crouch, 1996; Taiz & Zeiger, 1998; Raven *et al.*, 1999). Durante la estimulación de la citocinesis por parte de las citoquininas, se produce una disminución en la duración de la fase S del ciclo celular, al estimular la transición de G2 a mitosis incrementando la síntesis de proteínas. Este incremento se puede deber a una acción específica de las citoquininas sobre la traducción de las proteínas en el citosol (Houssa *et al.*, 1992. citado por Azcon-Bieto & Talon, 1996). El funcionamiento y activación de las kinasas dependientes de ciclinas (CDK mitóticas) requiere asociación de las mismas con una subunidad activadora, y la remoción de un grupo fosfato inhibitorio. Las citoquininas estimulan la defosforilación (Mironov *et al.*, 1999).

A pesar de que los dos tipos de citoquininas (derivados de adenina y de úrea) pueden producir la misma respuesta fisiológica, estudios han reportado una mayor actividad del TDZ respecto a citoquininas tipo adenina. Esto se puede deber a: 1.-El TDZ en el tejido permanece en forma de glucósido y en esta forma puede resistir la degradación (Mok & Mok, 1985). 2.-El TDZ puede influir en el metabolismo, en la biosíntesis endógena de citoquininas, o puede ejercer un efecto directo en el sitio de acción de las citoquininas (Mok *et al.*, 1987). 3.- Unidades estructurales y funcionales en la membrana de los cloroplastos (tilacoides), pueden tener afinidad por derivados de la úrea como sucede en el guisante (Kulaeva, 1995). 4.- Un aumento de TDZ, puede conducir a la acumulación de iones minerales y predisponer a la planta a un estrés, induciendo una modificación en

los procesos fisiológicos, conduciendo a incrementos en la actividad metabólica y a cambios en las rutas bioquímicas (Murch *et al.*, 1997).

La combinación de dos citoquininas puede ser más eficiente para la proliferación de brotes (Singha & Bhatia, 1988; Sudarsono & Goldy, 1991). Esto puede indicar diferencias en la incorporación, en el reconocimiento por las células o en los mecanismos de acción (Huetteman & Prece, 1993)

La aplicación de citoquininas puede promover la síntesis de citoquininas endógenas. El BA es rápidamente metabolizado y la ruptura del grupo bencil puede conducir a la formación de adenina (Kataeva *et al.*, 1991). En micropropagación las citoquininas son utilizadas principalmente para lograr la producción de tallos múltiples y el desarrollo de yemas laterales, por inducir división y expansión celular. La concentración óptima de citoquinina para lograr inducir una respuesta depende del genotipo (Wang & Hu, 1980; George, 1996; Weyers *et al.*, 1995).

Estudios realizados en el género *Vitis* demuestran que tanto las citoquininas derivadas de la adenina, como de la úrea, favorecen la propagación de yemas apicales y promueven el crecimiento de meristemas; adicionalmente, estimulan la proliferación de brotes axilares, e inducen la formación de brotes adventicios. Sin embargo, la variabilidad en los resultados sugiere que la concentración óptima para la proliferación de brotes debe ser ajustada para cada especie y variedad (Barlass & Skene, 1978; Chee & Pool, 1983; Ribeiro *et al.*, 1985; Gribaudo & Fronda, 1991; Sudarsono & Goldy, 1991; Heloir *et al.*, 1997)

#### **2.2.2.2 Auxinas**

El término auxina proviene del griego *auxein*, que significa incrementar. Este término fue utilizado en 1926 haciendo referencia a un compuesto que causaba la curvatura de

coleóptilo de avena hacia la luz. En la actualidad se sabe que esta auxina es el Acido Indolacético (IAA) (Salisbury & Ross, 1994; Raven *et al.*, 1999).

La auxina IAA se sintetiza en yemas apicales y coleóptilos, hojas, frutos jóvenes y semillas inmaduras; se transporta en forma basipétala. El transporte a través de las células de parénquima, se puede inhibir por carencia de oxígeno, inhibidores de la síntesis de ATP, antiauxinas y flavonoides (Raven *et al.*, 1999).

Se ha propuesto como precursor del IAA al L-triptófano, el indol se convierte al L-triptófano (reacción catalizada por la enzima  $\beta$  triptófano sintetasa); posteriormente la conversión en IAA puede tomar dos vías, la vía del Indol-3-acetamida (IAM), o la vía del indol 3-ácido pirúvico. Además de la vía del triptófano, se ha sugerido la presencia de una vía independiente, donde el indol o el indolglicerol puede ser el precursor del IAA (Kawaguchi & Syono, 1996).

El IAA se almacena en forma conjugada. El IAA es fácilmente convertido en IAA esterificado por azúcares o amidas. La degradación implica la participación o no de la IAA oxidasa (Kende y Zeevaart, 1997).

En las plantas se encuentran otros compuestos estructuralmente similares al IAA, uno de los cuales es el Acido Indolbutírico (IBA). Este forma conjugados para una liberación gradual, manteniendo su concentración en un nivel adecuado, especialmente en los estadios finales de la formación de la raíz (Salisbury & Ross, 1994). Otros compuestos químicos son el ácido naftalenacético (NAA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA). Las auxinas sintéticas al parecer persisten un mayor tiempo dentro del tejido ya que no son destruidas por las IAA oxidasas (Kawaguchi & Syono, 1996; Azcon-Bieto & Talon, 1996).

Entre los efectos fisiológicos de las auxinas se encuentran la formación de raíces adventicias, participación en la dominancia apical, promoción de biosíntesis del etileno, extensión y elongación celular, inducción de división celular, y regulación de cambios en el citoesqueleto (Geneve & Heuser, 1982; Matoo & Aharoni, 1988; Gribaudo *et al.*, 1995; Gaspar *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Hutchinson *et al.*, 1997; Mironov *et al.*, 1999).

Las auxinas pueden regular la tasa y dirección de la expansión celular, por incrementar la extensibilidad de la pared. La alteración de la extensibilidad de la pared puede ocurrir por una acidificación o por la expresión de genes específicos (Raven *et al.*, 1999). La acidificación de la pared se produce al estimular el flujo de iones hidrógeno desde el citosol hacia la pared, lo cual puede causar una ruptura en los puentes de hemicelulosa, o en los enlaces de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa al activar proteínas de crecimiento (expansinas). Esta modificación en el pH intracelular conduce a disminuir la rigidez de la pared. Adicionalmente, intervienen en la orientación de los microtúbulos afectando directamente la orientación y deposición de las microfibrillas de celulosa de forma oblicua/longitudinal a transversal (Grabski & Schindler, 1996; Cosgrove, 1997; Kende y Zeevaart, 1997).

La inducción de raíces puede ser resultado de la estimulación de la mitosis en las células del periciclo de la raíz, degradación de proteínas inhibitorias del ciclo celular (CKLs), o del aumento en los niveles de proteínas kinasas y mRNA de ciclinas (Azcon-Bieto & Talon, 1995; Kende & Zeevart, 1997; Mironov *et al.*, 1999).

Con la adición de auxinas en cultivo de meristemos se busca principalmente estimular el crecimiento y favorecer la formación de raíces. Sin embargo, la respuesta del explante al aplicar auxinas depende de la edad fisiológica del material vegetal, la naturaleza de la auxina, tiempo de aplicación y de la superficie de contacto (Moncousin, 1991; George, 1996). Adicionalmente, se presenta una relación entre la habilidad para

estimular la división celular y las concentraciones de auxinas. Una concentración alta de auxinas, puede conducir a la acumulación de los metabolitos degradados de las citoquininas, puesto que las auxinas incrementan la actividad oxidasa. Una baja proporción de auxina / citoquinina determina la morfogénesis de brotes y una alta proporción promueve la formación de raíces (Kende & Zeevaart, 1997).

En el género *Vitis*, la aplicación de auxinas como IBA y ANA, han producido altos porcentajes de enraizamiento. Sin embargo, por la variabilidad genotípica, no ha sido posible establecer una concentración particular de auxina necesaria para el enraizamiento de este género (Li & Eaton, 1984; Chee & Pool, 1988, Lewandowski, 1991; Baptista *et al.*, 1993; Büyükdemirci & Read, 1997)

### **2.3 CULTIVO *in vitro* DE MERISTEMOS**

El desarrollo histórico de las técnicas de cultivo *in vitro* va ligado a los intentos por demostrar experimentalmente la totipotencia celular, es decir, la capacidad de las células para regenerar el genotipo de la planta de la que se derivan (Azcon-Bieto & Talon, 1996).

El material inicial (explante) para dar inicio a un programa de micropropagación, puede aislarse de una planta seleccionada (donadora) por algunas características particulares. El explante, es una porción de tejido o de un órgano que se retira del resto de la planta donadora con fines de cultivo. Su elección constituye el primer paso para el establecimiento *in vitro* y debe realizarse teniendo en cuenta su capacidad morfogénica. Sin embargo, la selección depende del objetivo perseguido y de la especie vegetal utilizada. En el caso de propagación a gran escala o limpieza del material vegetal de agentes patógenos se pueden utilizar meristemas (Trippi, 1990; Debergh & Read, 1991).

La técnica de cultivo de meristemas fue aplicada por primera vez por Morel & Martin en 1952, para la limpieza de virus en dalias. En el cultivo de meristemas *in vitro*, el tejido utilizado, es el tejido meristemático, cuyas células crecen y se dividen continuamente; por tal razón la posibilidad de encontrar partículas virales es baja debido a que el tejido vascular (tejido por el cual se movilizan los virus) no presenta conexiones directas. Por otro lado, la tasa metabólica alta y la concentración endógena de auxinas, pueden inhibir la multiplicación del virus al interferir con el metabolismo de ácidos nucleicos del virus (Wang & Hu, 1980; Lizarraga *et al.*, 1991).

La respuesta del explante en condiciones de cultivo *in vitro* depende entre otros factores de su posición en la planta donadora, edad ontogenética y del estado fisiológico de la misma. En plantas herbáceas y leñosas se presenta un gradiente de juvenilidad que disminuye desde la base hacia el ápice. Un tejido en estado juvenil presenta una mayor capacidad morfogenética, la cual se manifiesta en crecimiento, proliferación y capacidad para el enraizamiento; a diferencia de un tejido maduro en el cual es más difícil desdiferenciar e inducir crecimiento (Trippi, 1990, Pierik, 1990; De Klerk *et al.*, 1997).

El medio de cultivo es muy importante para la regeneración y crecimiento del explante, puesto que además de suministrar un soporte, proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta; es por ello que para su elección se debe tener en cuenta la especie que se va a propagar y el objetivo del cultivo (Lizarraga *et al.*, 1991; Roca & Mroginski, 1991; George, 1996).

Un medio de cultivo generalmente contiene macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre), micronutrientes (boro, cobalto, manganeso, hierro, zinc, molibdeno y cobre), compuestos orgánicos (vitaminas), reguladores de crecimiento, una fuente de carbono (generalmente sacarosa) y materiales de soporte. Entre los medios de cultivo ya formulados y evaluados en micropropagación, uno de los

más utilizados es el medio Murashige & Skoog, (1962), con modificaciones dependiendo de los requerimientos de las especies (Krul & Mowbray, 1984; George, 1996; Kyte & Kleyn, 1996).

Los materiales de soporte pueden influir en el crecimiento del explante. El agente gelificante más utilizado es el agar, cuyo componente es la agarosa, proveniente de algas. Otros agentes gelificantes incluyen el Gelrite® y el Phytigel® cuyos componentes son producto de un sustrato bacteriano compuesto por ácido glucorónico, ramanosa y glucosa (Sigma® 1994 ). Estos agentes gelificantes que utilizan sustitutos del agar son transparentes, lo cual permite visualizar la contaminación más fácilmente. Adicionalmente, poseen un bajo potencial mátrico con respecto al agar, lo que permite mayor disponibilidad de agua para el explante cultivado *in vitro*. Sin embargo, esto puede inducir problemas de vitrificación (Pasqualetto, 1990; George, 1996).

Para algunas especies y dependiendo del objetivo del trabajo, el cultivo de meristemas se puede realizar sobre medio líquido en agitación o con la utilización de un puente como soporte para el explante (papel filtro). En estas condiciones se puede presentar vitrificación y mayor crecimiento (Páques & Boxus, 1987; Ziv, 1991a; George, 1996).

Generalmente, el pH del medio se ajusta entre 5.7 - 5.8 antes de autoclavar. Es importante tener en cuenta los requerimientos de la especie y el sustrato utilizado, puesto que el pH influye en la gelificación de estos. Adicionalmente, altas concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) pueden disminuir la gelificación del sustrato (Owens & Wozniak, 1991; Lizarraga *et al.*, 1991; Brian & Grout, 1999)

Adicional a lo anterior, durante el cultivo *in vitro* se presentan condiciones físicas que influyen en la regeneración y el crecimiento del explante. Se ha comprobado que al modificar las condiciones de luz, por cambios en la irradiancia (cantidad de luz), el fotoperíodo (duración de luz) y la longitud de onda; se puede regular el tamaño de las hojas y brotes, así como la morfogénesis (Jeong *et al.*, 1995).

La duración del período de luz se denomina fotoperíodo, y este puede variar de acuerdo con los requerimientos y respuestas de la especie y variedad en estudio (Jeong *et al.*, 1995; Armitage & Garner, 1999). Para el cultivo *in vitro* de ápices de *Vitis* spp., se ha observado que el fotoperíodo de 15 horas/luz produce oxidación y disminución del crecimiento de brotes y que períodos de oscuridad inducen la formación de callo y disminuyen la longitud de brotes (Chee & Pool, 1982)

La temperatura en el cuarto de incubación, influye en la respuesta de crecimiento y desarrollo del explante *in vitro* (Lizarraga *et al.*, 1991). El rango óptimo de temperatura para la mayoría de las especies varía entre 24 y 28°C. La temperatura influye en la tasa de crecimiento: las temperaturas bajas (6°C) pueden reducir significativamente el crecimiento, mientras que las altas temperaturas (30°C) pueden inhibir la multiplicación de brotes. Para algunas especies utilizar una misma temperatura para los períodos de luz y de oscuridad favorece la organogénesis. Sin embargo, la temperatura puede ser modificada de acuerdo con el fotoperíodo o con la intensidad lumínica. (Chee & Pool, 1982; Roca & Mroginski, 1991).

El resultado de la relación entre la humedad relativa en el recipiente de cultivo y la temperatura a la que se somete el cultivo, es importante para el crecimiento de los explantes e influye en la aclimatación a condiciones *ex vitro* (Jeong *et al.*, 1995). En una planta que se encuentre en condiciones *in vitro* en un ambiente sellado, la humedad relativa es cercana al 100% y el potencial hídrico del aire y el sustrato es menos negativo o cercano a 0. Por lo tanto no se presenta un gradiente de potencial hídrico suficiente para dirigir un proceso de transpiración; esta situación contribuye a la vitrificación de los tejidos cultivados *in vitro* (Ziv, 1991b; Jeong *et al.*, 1995).

### 2.3.1 Etapas del cultivo de meristemas *in vitro*



El cultivo de meristemos *in vitro*, comprende las siguientes etapas:

- Etapa 0: Selección y preparación de la planta donadora del explante
- Etapa I: Establecimiento del explante
- Etapa II: Elongación y multiplicación de brotes
- Etapa III: Enraizamiento de plantas
- Etapa IV: Aclimatación del material obtenido *in vitro*.

Para la etapa inicial (etapa 0), debe seleccionarse material en condiciones fisiológicas y fitosanitarias adecuadas. Cuando el objetivo del estudio es la eliminación de partículas virales, usualmente las plantas donadoras de explantes se tratan mediante el uso de termoterapia. (Cassells, 1991; Hartmann *et al.*, 1997).

### **2.3.1.1 Establecimiento**

Las plantas donadoras de explantes, presentan en su superficie microorganismos, principalmente hongos y bacterias que podrían competir con el crecimiento y desarrollo del explante en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, es necesario después de seleccionar el explante, desinfectarlo superficialmente, con productos químicos que sean tóxicos para los microorganismos (Pasqualetto, 1990; Debergh & Zimmerman 1991; Roca & Mroginski, 1991).

Entre los productos químicos más utilizados se encuentran etanol (alcohol), el cual posee una baja tensión superficial y puede fácilmente humedecer el tejido; hipoclorito de sodio (NaClO) y el hipoclorito de calcio (CaClO). La sal de calcio es menos fitotóxica. Sin embargo, es más utilizado el hipoclorito de sodio como producto activo en productos comerciales como el clorox®. Para su aplicación se utilizan diluciones en concentraciones y tiempos de desinfección que no afecte el tejido. Adicional al uso de desinfectantes se recomienda el uso de un agente surfactante que

facilite la penetración de los mismos; el más utilizado es Tween 20® (polioxietileno sorbitan monolaurato) (Pierik, 1990).

Para aumentar el éxito de la transferencia aséptica, este procedimiento debe realizarse dentro de una cámara de flujo laminar. Se recomienda realizar lavados (3 a 5 veces) con agua destilada estéril. El lavado es muy importante para eliminar residuos de los desinfectantes los cuales pueden inhibir el crecimiento del explante (Cassells, 1991).

Uno de los principales problemas que se pueden presentar durante el establecimiento, es la secreción de fenoles, los cuales pueden fomentar la oxidación del explante. Uno de los procedimientos utilizados para la disminución y control de la oxidación consiste en realizar un pretratamiento con antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico, entre otros), durante la desinfección o pueden añadirse al medio de cultivo (Préstamo & Manzano, 1993; Dixon & Paiva, 1995). Después de la desinfección, el explante es inoculado en el medio de cultivo apropiado.

Durante la etapa de establecimiento, el explante pasa por un período inicial, donde se estabiliza (las células adquieren competencia), después del estrés ocasionado por el aislamiento de la planta donadora y por los tratamientos de desinfección. Así mismo, se espera que ocurra crecimiento producto de la división y elongación celular (De Klerk *et al.*, 1997).

### **2.3.1.2 Proliferación**

El objetivo de esta etapa es multiplicar los brotes obtenidos a partir del meristemo. El medio de cultivo generalmente es similar al de la fase de establecimiento y es común utilizar citoquininas con el fin estimular la división celular e inhibir la dominancia apical para lograr el crecimiento de brotes axilares (Pasqualetto, 1990).

Durante esta etapa se puede presentar formación de brotes adventicios, directamente a partir del meristemo e indirectamente a partir de un callo.

La estabilidad genética y la tasa de multiplicación de las plantas obtenidas puede ser afectada por el número de subcultivos, la edad fisiológica del explante, vía de regeneración (elongación de brotes axilares y/o formación de brotes adventicios), y las condiciones del medio de cultivo (Debergh & Zimmerman, 1991, Hartmann *et al.*, 1997).

### **2.3.1.3 Enraizamiento**

En esta etapa se procede a enraizar los brotes y prepararlos para ser transplantados *ex vitro* (aclimatación). Los brotes obtenidos se transfieren por unos días a medio sin reguladores de crecimiento y posteriormente se subcultivan en medio para la inducción de raíces *in vitro*. Para la inducción de raíces se puede retirar o disminuir la adición exógena de citoquininas y adicionar auxinas exógenas. Adicionalmente, se recomienda disminuir la fuente de carbono y en algunos casos la reducción en la concentración de sales favorece la inducción de raíces. La duración de esta etapa de enraizamiento puede variar según la especie o variedad y el tipo y concentración del regulador de crecimiento (Debergh & Zimmermann, 1991; George, 1996).

El crecimiento de la raíz primaria de una plántula y de las ramificaciones radicales requiere la actividad de meristemos apicales; las raíces laterales o adventicias se originan en el periciclo y crecen hacia afuera a través de la corteza y la epidermis (Luttge *et al.*, 1993; Taiz & Zenger, 1998; Raven *et al.*, 1999). En algunas plantas, la formación de callo puede ser un factor que influya en la producción de raíces adventicias, y algunas veces puede ser un requisito para la iniciación de estas (Schwarz *et al.*, 1999).

Para la inducción de raíces adventicias en los brotes obtenidos se pueden realizar pulsos en condiciones *in vitro* en medios con auxinas y cultivos en medios sin reguladores de crecimiento para favorecer el crecimiento y desarrollo de raíces. Para el desarrollo de raíces *ex vitro* las plantas se transfieren a sustrato y se mantienen en condiciones controladas de humedad relativa, temperatura e iluminación (Pasqualetto, 1990).

En el cultivo *in vitro* de vid se ha reportado enraizamiento *in vitro*, aunque también se han descrito resultados de enraizamiento *ex vitro*. En "muscadine" (*Vitis rotundifolia*), el porcentaje de enraizamiento fue mejor *in vitro* que *ex vitro*, con o sin pretratamiento de reguladores de crecimiento. (Gray & Benton, 1991). Las raíces formadas *in vitro* contribuyen sustancialmente al crecimiento de vid durante la aclimatación (Chee & Pool, 1982; Harris & Stevenson, 1982; Lewandowski, 1991; Gribaudo *et al.*, 1995; Thomas & Ravindra, 1997a).

#### **2.1.3.4 Endurecimiento**

El endurecimiento es un proceso mediante el cual las plantas producidas en condiciones *in vitro* se transfieren progresivamente a un ambiente en condiciones climáticas naturales (*ex vitro*), de forma que se disminuya al máximo el estrés ocasionado por este proceso (Da Silva *et al.*, 1995).

En muchas especies la aclimatación de plantas cultivadas *in vitro*, a ambiente *ex vitro*, es un paso crítico, debido a que se presentan deficiencias en los mecanismos para mantener el balance hídrico. Estas deficiencias están asociadas con una delgada cutícula, mal funcionamiento de estomas, malformación en la raíz y bajas

concentraciones de CO<sub>2</sub>, (presumiblemente por un bajo flujo de fotones y la concentración molar dentro del recipiente de cultivo) (Ziv, 1991a; Fila *et al.*, 1998).

Uno de los sustratos utilizados para el desarrollo de raíces *ex vitro* es la turba. Este sustrato es una mezcla que contiene fragmentos del musgo *Sphagnum*, perlita, vermiculita fina, macro y micronutrientes, teso, cal dolomita y un agente humificante. Este sustrato tiene una alta capacidad para retener agua;. El pH se ajusta entre 5.0 y 5.5. Se adapta a un amplio rango de necesidades de crecimiento, en particular donde la frecuencia de riego debe ser mayor (Sun-Gro Horticulture, 1999).

Durante esta etapa de endurecimiento, es importante aumentar la intensidad lumínica y reducir gradualmente la humedad relativa que rodea a la planta, con el fin lograr que la planta controle la transpiración y logre adaptarse a un sustrato en condiciones de campo. Adicionalmente, es necesario que la biomasa y la reserva de carbohidratos sean apropiadas para producción de nuevos órganos y tejidos en condiciones *ex vitro* (Lewandowski, 1991; Jeong *et al.*, 1995; Fila *et al.*, 1998).

## **2.3.2 Problemas asociados al cultivo *in vitro***

### **2.3.2.1 Contaminación y Oxidación**

La respuesta durante el cultivo *in vitro* varía con la especie. Durante el establecimiento, la supervivencia del tejido está relacionada con la oxidación y la contaminación; la contaminación ocasionada por microorganismos superficiales o endógenos y la oxidación atribuida a los procedimientos de desinfección y aislamiento del explante (Pasqualetto, 1990; Debergh & Zimmerman, 1991).

La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales es debida a microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora, como hongos, levaduras, mohos o bacterias situados en la superficie de tallos y hojas. Una forma de controlar la contaminación superficial es descartar individuos donadores en mal estado fitosanitario y contar con un proceso de desinfección adecuado, utilizando productos químicos como desinfectantes superficiales, surfactantes y fungicidas entre otros, que sean tóxicos para los microorganismos. La contaminación también se puede atribuir a microorganismos sistémicos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes pueden tratarse con el uso de antibióticos o de termoterapia (Cassells, 1991).

La oxidación, caracterizada en cultivo *in vitro*, se caracteriza por un oscurecimiento de los tejidos vegetales causado al parecer por una condición de estrés a la que se ha sometido el explante, ya sea por estrés mecánico o por las características del cultivo *in vitro* (como la composición del medio de cultivo). En algunas especies, los altos contenidos de compuestos fenólicos pueden ser responsables de la oxidación de los tejidos (Dixon & Paiva, 1995).

Cuando se realiza un corte al explante, las polifenol oxidasas son activadas por el  $\text{Cu}^{+2}$  presente en el medio (Ramírez, 1989). Estas enzimas son las encargadas de catalizar la oxidación del grupo hidroxil de los fenoles a quinonas que además de actuar para la protección del tejido, pueden acumularse y ser altamente tóxicas en el mismo (Zaid, 1987; Radi *et al.*, 1997). Otros compuestos formados tras la oxidación y polimerización de algunos fenoles son las cumarinas, las cuales pueden activar las IAA oxidasas e inhibir la elongación celular (Ramírez, 1989). Sin embargo, se pueden presentar algunos compuestos fenólicos como los difenoles que son protectores de auxinas al inhibir la acción de las peroxidasas (Debergh & Read, 1991; Préstamo & Manzano, 1993).

Las peroxidases pueden actuar como catalizadores de la oxidación del IAA, dejándolo inactivo (Debergh & Read, 1991). Todas estas enzimas contienen grupos idénticos hemo y se diferencian por la composición de las glucoproteínas; y están asociadas con la biosíntesis de lignina, plasticidad de la pared celular, respuesta a daño mecánico y resistencia de enfermedades (Hirsh, 1990; Prestamo & Manzano, 1993).

Los sustratos para las enzimas fenolasas (mono o polifenol oxidasas) varían en diferentes tejidos y son normalmente tirosina u O-hidroxifenoles tales como el ácido clorogénico (Dixon & Paiva, 1995; Radi *et al.*, 1997). Estos sustratos pueden ser retenidos en las vacuolas e integrados a las enzimas cuando el tejido es herido o cuando se inician procesos de senescencia (Zaid, 1987).

Las citoquininas han sido reportadas como estimuladores de la síntesis de compuestos fenólicos (Zaid, 1987). Sudarsono & Goldy (1991), asociaron el oscurecimiento de brotes en *Vitis rotundifolia* con la adición de TDZ al medio de cultivo para promover la proliferación de tallos.

El efecto de la oxidación se puede controlar realizando transferencias periódicas a medio fresco (Thomas & Ravindra, 1997b), disminuyendo luz en los primeros estadios del desarrollo (Dixon & Paiba, 1985; Zaid, 1987), utilizando medios de consistencia líquida (dilución de sustancias tóxicas), o mediante la incorporación de antioxidantes en el medio de cultivo (Debergh & Zimmerman 1991; Thomas & Ravindra, 1997b; Brian & Grout, 1999).

Entre los compuestos utilizados para el control de la oxidación, se encuentran el ácido ascórbico y ácido cítrico. El ácido ascórbico se oxida por acción de la ascorbato oxidasa y evita la oxidación de otros compuestos; la acción de la ascorbato oxidasa es controlada por el citrato, el cual inhibe la enzima que oxida al ácido ascórbico que es

el antioxidante propiamente dicho. Por lo anterior, se recomienda combinar los dos compuestos citrato y ascorbato para prolongar la acción antioxidante del ácido ascórbico que a su vez propicia la reducción de compuestos oxidados (Ramírez, 1989). Los antioxidantes también pueden actuar inhibiendo las peroxidasas las cuales inactivan el IAA al catalizar su oxidación. (Debergh & Read, 1991; Prestamo & Manzano, 1993).

### **2.3.2.2 Vitrificación**

Las plantas vitrificadas se caracterizan por una apariencia succulenta y translúcida, generalmente en hojas y tallos. Fisiológicamente, se atribuye a un exceso en la toma de agua e inhibición de síntesis de lignina y celulosa. La susceptibilidad a la hiperhidratación varía con la especie o cultivar (Debergh, *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1997).

Las causas de la vitrificación son algunas veces difíciles de identificar, pero las altas concentraciones de hormonas (citoquininas, auxinas, etileno entre otras), la concentración de sales en el medio, la concentración y el tipo de sustrato utilizado, y la alta humedad relativa están relacionados con este evento (Ziv, 1991a).

Los reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas, pueden conducir al incremento en la vitrificación. Uno de los mecanismos puede estar relacionado con la estimulación del S-adenosilmetionina (SAM), intermediario en la síntesis del etileno a partir del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Matoos & Aharoni, 1988). El etileno acumulado en el recipiente del cultivo, puede favorecer la hiperhidratación al disminuir los niveles de fenoles por una disminución en la acción de la fenil alanina amoniasa (PAL), enzima que cataliza la formación de fenoles como la lignina (Ziv, 1991b). Adicionalmente, puede producir cambios en las



propiedades elásticas de la pared, disminuyendo la presión de turgencia e incrementando la toma de agua por el tejido (Van Staden *et al.*, 1988; Sudarsono & Goldy, 1991; Gaspar *et al.*, 1996).

Por otra parte, la concentración del agente gelificante puede influir en la vitrificación, puesto que la disponibilidad de agua depende de la fuerza con la cual el agua es retenida por la fase sólida en el gel (potencial mátrico del agente gelificante); al aumentar la concentración del agente gelificante disminuye la disponibilidad de agua para el explante cultivado (Owens & Wozniak, 1991).

Respecto a la concentración de sales, Matsushashi (1990), citado por Owens & Wozniak (1991), afirma que el nitrato puede disminuir la gelificación del sustrato. Adicionalmente, las altas concentraciones de sales pueden desestabilizar los coloides y una alta concentración de cationes monovalentes pueden disminuir la “dureza” del gel (Owens & Wozniak, 1991)

Con una concentración alta de nitrógeno se puede disminuir la relación C/N en la planta produciendo una disminución en la biosíntesis de lignina y celulosa, disminuyendo la rigidez de la pared y permitiendo una mayor entrada de agua, lo que finalmente produce un alargamiento en los tejidos (Pasqualetto, 1990).

La disminución en la relación C/N puede además, estar atribuida a las condiciones del cultivo *in vitro*, ya que por baja actividad metabólica y asimilación de carbohidratos asociada con baja fotosíntesis, se puede disminuir la concentración de clorofila y la actividad de la enzima rubisco (Phan & Hegedus, 1986; Jeong *et al.*, 1995).

La hiperhidratación ha sido reportada en cultivo de vid por Cancellier & Cossio (1985), Morini *et al.* (1985), y Heloir *et al.* (1997), en cuyas investigaciones

observaron que al disminuir la concentración de BA y de sales se disminuía la hiperhidratación en *Vitis rotundifolia*. De igual manera Muñoz (1997), reportó para *Vitis vinifera* L. inducción de vitrificación al adicionar BA en concentraciones mayores 5  $\mu\text{M}$  de BA, Ivana & Gribaudo (1991), reportaron para *Vitis vinifera* L. un aumento en la vitrificación al suplementar el medio con concentraciones iguales o mayores de 0.1  $\mu\text{M}$  de TDZ.

### **2.3.2.3 Necrosis apical y fasciación**

Otros problemas asociados con las condiciones del cultivo *in vitro* son la necrosis apical en los tallos, la cual se presenta por deficiencias de elementos como calcio y boro (Barghichi & Alderson, 1996). Los síntomas característicos de deficiencia de calcio incluyen necrosis de regiones meristemáticas de las puntas de las raíces y hojas jóvenes donde la división celular y la formación de pared celular es muy rápida (Taiz & Zeiger, 1998). La deficiencia de boro puede alterar el metabolismo de las auxinas, incrementar la lignificación e inducir la acumulación de fenoles (Winkler, 1987; Barghichi & Alderson, 1996). Las deficiencias se pueden presentar en cultivo *in vitro*, puesto que una humedad relativa del 100%, hace que el movimiento de nutrientes se vea disminuído debido a la baja transpiración. Además, elementos como el calcio y el boro son de baja movilidad (Winkler, 1987; Sanders *et al.*, 1999).

Otro problema asociado con los niveles de citoquininas es la fasciación o malformación de tallos, un fenómeno relativamente común en cultivo *in vitro* cuando se trabaja con TDZ por períodos de tiempo prolongados. Los tallos aparecen fusionados y deformes. Este fenómeno se ha reportado en cultivos de tallos de manzana, arce, nogal y fresno. Es posible que el grupo fenil del TDZ pueda ser la causa de la fasciación, sin embargo, esto no se ha comprobado. Por otra parte,

estudios en manzana sugieren que el genotipo puede estar relacionado con el efecto del TDZ en este fenómeno (Huetteman & Preece, 1993).

### **2.3.3 Antecedentes de micropropagación en vid**

Los primeros trabajos de cultivo *in vitro* de vid fueron realizados por Morel en 1944, quien determinó la concentración óptima de auxinas para la proliferación de células, y describió el origen de los callos a partir de explantes de tallo (Krul & Mowbray, 1984). Posteriormente en 1964, Galzy (citado por Martínez & Tizio 1989) cultivó *in vitro* brotes apicales usando termoterapia, para reducir la presencia de agentes virales en *V. vinifera* L.

Barlass & Skene (1978), fueron los primeros en cultivar meristemos de *V. vinifera* L (cv. Cavernet Sauvignon), fraccionarlos y obtener brotes adventicios. Para el establecimiento se utilizó medio MS líquido suplementado con 10  $\mu$ M de BA y medio sin reguladores de crecimiento para la etapa de enraizamiento. Se determinaron cuatro eventos a partir del fraccionamiento de los meristemos: formación de agrupaciones celulares; agrupación de primordios foliares; formación de brotes adventicios y enraizamiento. Posteriormente Galzy (1979), cultivó ápices meristemáticos de *V. rupestris* en medio suplementado con NAA, para obtener plantas libres el virus “Fanleaf”.

Barlass & Skene en 1980, realizaron tres estudios en *V. vinifera* L.. En el primero (1980a) determinaron que al fraccionar primordios foliares se podía regenerar una planta. En el segundo (1980b) concluyeron que el cultivo en medio sólido se presentaba mayor proliferación que en medio líquido y determinaron requerimientos de luz y BA (5 y 10  $\mu$ M); en el tercer estudio (1980c) por medio de microscopía electrónica, determinaron que los brotes formados durante el cultivo de ápices

meristemáticos fraccionados se originaban *de novo*. En este mismo año, Aranciba (1980) logró el crecimiento de ápices meristemáticos de *V. vinifera* L. en medio MS suplementado con BA.

En 1982 Barlass *et al.*, regeneraron plantas libres de virus de *V. vinifera* L. cv. Cabernet Franc, utilizando cultivo de meristemas apicales. Chee & Pool (1982) encontraron que para el cultivo de meristemas de "Rougeon" se requiere un fotoperiodo de 10 horas luz y concluyeron que el BA y las auxinas son reguladores necesarios para lograr una proliferación e inducción de raíces adventicias. Harris & Stevenson (1982); Chee & Pool (1983); Galzy *et al.* (1990); y Peros *et al.* (1998), concluyeron que se presenta variabilidad genotípica en el género *Vitis* en cuanto a los requerimientos de los reguladores de crecimiento en condiciones *in vitro*

Li & Eaton en 1984, evaluaron el efecto de auxinas y citoquininas en la promoción del crecimiento y concluyeron que en algunas ocasiones, cuando se suple el medio de cultivo con BA para promover el desarrollo de tallos, es necesario adicionar auxinas para promover enraizamiento.

Ribeiro Da Silva *et al.*, en 1985 concluyeron que con las concentraciones 2 y 5  $\mu\text{M}$  de BA se presentaba crecimiento de brotes en el híbrido "Dona". En el mismo año Chee & Pool evaluaron el efecto del BA y sustancias orgánicas como la tiamina, mioinositol y aminoácidos en la multiplicación del híbrido "Remaily seedless".

Casal & Pais en 1990 cultivaron meristemas de *V. vinifera* L. cv. "Loureiro", con el fin de obtener plantas libres de los virus del enrollamiento de la hoja ("Leafroll") y hoja en abanico ("Fanleaf"). De igual manera, Thies & Graves en 1992, cultivaron ápices meristemáticos para la eliminación de *Agrobacterium tumefaciens* en *Vitis rotundifolia*.

Gray & Benton en 1991, describen el efecto positivo de dos citoquininas, BA y TDZ en el establecimiento de meristemos de *V. rotundifolia*. De igual manera Baptista et al. (1993), evaluaron el efecto del BA, kinetina y adenina en el cultivo *in vitro* de meristemos de siete variedades de *Vitis* spp. Posteriormente Muñoz (1997), realizó un estudio con "Isabella" (*V. rotundifolia*), "Queen" e "Italia" (*V. vinifera* L.) y determinó la efectividad del medio WPM y de la adición de BA e IAA para la inducción de brotes y raíces respectivamente.

Roubelakis-Angelakis & Zivanovite (1991) concluyeron que la respuesta rizogénica del género está fuertemente influenciada por el genotipo. Se han realizado estudios varios para evaluar la inducción de raíces adventicias en brotes de vid. Chee & Pool (1988) concluyeron que la concentración de sacarosa afecta el vigor de los tallos, (medido en nudos por explante), siendo 1% la concentración en la cual se produjeron tallos con una mayor cantidad de nudos. Lewandowski (1991) determinó que la combinación de auxinas como NAA e IBA, estimulaba hasta en un 95% la producción de raíces en *V. labrusca* cv. "Delaware".

Referente a la aclimatación de plantas de vid propagadas *in vitro* se encuentran los estudios realizados por Gribaudo *et al.* (1995) quienes determinaron que las raíces formadas *in vitro* prevalecían y eran funcionales al transferir la planta a condiciones *ex vitro*; Thomas & Ravindra (1997b), elaboraron una metodología para la aclimatación de *V. vinifera* L. propagada *in vitro*. Fila *et al.* (1998) evaluaron la fotosíntesis, la conductancia en la hoja y las relaciones hídricas durante la aclimatación de estacas cultivadas *in vitro* del híbrido "41B" (*V. vinifera* "Chasselas" x *V. berlandieri*, Mill. De Gr.). Estos autores evidenciaron que la tasa máxima de fotosíntesis fue mucho más alta durante la aclimatación, debido tal vez a la mayor actividad de enzimas fotosintéticas.

Para la micropropagación de diferentes variedades de vid se han utilizado otros explantes diferentes a los meristemas; entre estos trabajos se encuentran los realizados por Jona & Webb (1978), quienes cultivaron brotes axilares de la variedad "Riesling x Sylvaner" (*V. vinifera* L.) para promover el desarrollo o la multiplicación de brotes. Harris & Stevenson (1982) y Martínez & Tizio (1989), describen una metodología para la micropropagación a partir de yemas apicales y segmentos nodales. Lee & Wetzstein (1990), utilizando segmentos nodales, lograron la propagación de *V. rotundifolia* L. cv. "Summit"; y Gribaudo & Fronda (1991), al aplicar TDZ al medio de cultivo concluyeron que este regulador estimula el crecimiento y desarrollo de brotes.

Robacker & Chang (1992) cultivaron yemas apicales de 1- 3 mm de longitud para la obtención de plantas libres de la bacteria *Xylella fastidiosa* que produce la enfermedad de Pierce en cultivos de vid. Trabajos posteriores realizados en 1997 por Büyükdemirci & Read y por Heloir *et al.*, condujeron a la obtención de protocolos para la micropropagación de la variedad "Pinot Noir" (*V. vinifera* L.) y "Valiant" (*Vitis* spp.) a partir de brotes axilares.

Por otra parte, aspectos como sensibilidad a antibióticos (Peros *et al.*, 1998), inducción de caracteres juveniles por la realización de subcultivos continuos y enriquecimiento con CO<sub>2</sub> (Diaz *et al.*, 1995 y Thomas, 1999), efecto de la luz y el CO<sub>2</sub> en la fotorespiración, fotosíntesis y relaciones hídricas en microestacas han sido evaluados durante la micropropagación de *V. vinifera* L. (During & Harst, 1996).

### **3. FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION**

#### **3.1 FORMULACION DEL PROBLEMA**

No existe información acerca de los requerimientos hormonales, comportamiento en cultivo *in vitro*, y viabilidad de un sistema de micropropagación a partir de meristemos de la variedad Müller Thurgau (*Vitis vinifera* L) cultivada para la industria vitícola en el departamento de Boyacá, y con la cual se le pueda dar respuesta a la inquietud de los viticultores de esta región con relación al desarrollo de estrategias alternativas a los sistemas de propagación vegetativa tradicional que permitan el suministro de material vegetal en cantidades suficientes y en condiciones fitosanitarias adecuadas para el establecimiento de cultivos.

#### **3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿ Cuáles son las condiciones adecuadas para la micropropagación de *Vitis vinifera* L. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) a partir de meristemos ?

#### **3.3 JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION**

*Vitis vinifera* L. es la especie que provee uno de los frutos mundialmente más cosechados y apetecidos y de los cuales se extraen diversos productos como vinos, uvas pasas, concentrados y colorantes industriales entre otros. Se ha descrito que la vid presenta compuestos a los cuales se les atribuye diversos usos medicinales e industriales. La cultivariedad Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) presenta características agronómicas importantes como una alta productividad, capacidad

morfogenética, plasticidad , vigor y por el vino blanco que se produce a partir del fruto.

El cultivo de esta especie de vid y la producción de vinos en nuestro país, es realmente innovadora si se compara con otras regiones del mundo, donde su aprovechamiento data de miles de años. Desde 1986, en la región de Boyacá se ha producido vino que tiene gran acogida entre la población y el cultivo de vid se ha convertido en una alternativa de producción en esta región.

El protocolo para el cultivo de meristemas de *Vitis vinifera* L. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) se desarrolló por el interés de los cultivadores en la adaptación de procedimientos dirigidos a la propagación clonal de la especie a partir de material seleccionado por sus características de interés agronómico y contribuye con el desarrollo de técnicas para una eventual limpieza de virus.



4.

## OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Adaptar y desarrollar una metodología para el cultivo de meristemos *in vitro* de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar las condiciones para el establecimiento *in vitro* a partir de meristemos caulinares de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner), seleccionada en campo.
- Evaluar las condiciones para la proliferación masiva de brotes, a partir de meristemos caulinares cultivados *in vitro*
- Evaluar condiciones para el enraizamiento y pre - endurecimiento del material vegetal propagado *in vitro*.
- Obtener plantas aclimatadas de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) a partir de meristemos.

5.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 POBLACION DE ESTUDIO**

La población de estudio la constituyeron plantas de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) de 16 meses de edad, provenientes de un cultivo localizado en la vereda Tenería (16°C, 2450 m.s.n.m.) municipio de Floresta, Departamento de Boyacá, Colombia. (Figura 5).

### **5.2 MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal utilizado para todos los experimentos del presente trabajo de investigación se recolectó en época de poda de formación o despunte (tallos de la parte superior de la planta). A los sarmientos recolectados, se les agregó una solución de fungicida (Benlate® y Orthocide® al 0.2%) y además una solución de antioxidante (ácido cítrico y ácido ascórbico al 10%) preparado en agua desionizada estéril, con el fin de disminuir la oxidación causada por los desinfectantes y por el corte. Posteriormente, se envolvieron en papel periódico y se transportaron al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá D.C.

### **5.3 ETAPA DE ESTABLECIMIENTO**

La metodología utilizada durante el cultivo *in vitro* de meristemos de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner), se describe en la Figura 6. Se cortaron las hojas de cada sarmiento, se les retiró el extremo apical y el extremo distal que contenía dos nudos, lo cuales no se utilizaron, debido a que en muchos casos el extremo apical presentó oxidación y para obtener un material más uniforme. Los nudos cortados midieron de 2-3 cm.

**Figura 5.** Plantas de *Vitis vinifera* L.cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner), utilizadas como fuente de material vegetal para la micropropagación

**Figura 6.** Metodología utilizada para la obtención de plantas de *Vitis vinifera* L. a partir de meristemas

### 5.3.1 Desinfección

Los nudos fueron colocados en recipientes estériles, manteniéndolos en constante agitación con diferentes sustancias de acuerdo con el siguiente protocolo de desinfección:

1. 15 ml de detergente Woolite® en 750 ml de agua durante 10 minutos.
2. Fungicida (Benlate® y Orthocide® 1 gr./l c/u) durante 45 minutos.
3. Solución de Hipoclorito de sodio al 2.5% con 5 gotas de Tween 20® y solución de antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico 0.0625 g/l c/u) durante 10 minutos.
4. Cinco lavados con agua destilada, desionizada estéril, dentro de la cámara de flujo laminar.

### 5.3.2 Obtención y siembra del explante

Para la extracción del meristemo, el nudo desinfectado se colocó sobre una toalla de papel absorbente estéril, en una caja de petri bajo el estereoscopio. A cada yema (meristemo y conjunto de primordios de hoja que lo envuelven) se le retiró el mayor número de primordios posibles utilizando un alfiler y cuchilla número 11 competamente estériles, hasta dejar el meristemo del cono primordial con 2-4 primordios (Figuras 1 y 6). El explante (meristemo más 2-4 primordios foliares) de un tamaño aproximado de 0.7-1 mm, se retiró con la punta del alfiler y se inoculó en medio de cultivo.

Para todas las etapas del cultivo *in vitro* se utilizó el medio Murashige y Skoog (1962) (Anexo 1), el cual se autoclavó por 25 minutos a 120°C y a 15 libras de presión por pulgada cuadrada. Durante el desarrollo del trabajo en todos los casos el pH del medio se ajustó a 5.8. Luego de la inoculación los recipientes de cultivo se sellaron Vinilpel®, y los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y fuente de luz proporcionada por tubos de luz fluorescente PHILIPS® blanca de 39 W, con un fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas oscuridad.

### 5.3.3 Medio y condiciones físicas del cultivo

Durante la fase de establecimiento se evaluó la consistencia del medio (Tabla 1). Para el medio líquido se utilizaron puentes de papel filtro como soporte para el explante; y para el medio sólido se utilizó como agente gelificante Phytigel® (SIGMA cd. P-8169) al 0.25%. Para las dos consistencias evaluadas, el medio fue suplementado con sacarosa comercial al 3%.

El medio basal (10 ml) se dispensó en recipientes de vidrio con una capacidad de 25 ml (3 cm x 6 cm), en cada recipiente se estableció un meristemo y posteriormente se incubaron durante 20 días.

### 5.3.4 Reguladores de crecimiento

De acuerdo con referencias bibliográficas se evaluaron diferentes concentraciones de 6-Benciladenina (SIGMA cd. B3408), BA (0, 1, 2.25, y 4.5  $\mu\text{M}$ ) solas y combinadas con Thidiazuron (SIGMA cd. 6186), TDZ (0, 0.001 y 0.01  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 1).

**TABLA 1.** Tratamientos hormonales evaluados en la etapa de establecimiento. **L** medio MS líquido, **S**: medio MS sólido.

BA( $\mu$ M) TDZ( $\mu$ M)	0		1		2.25		4.5	
	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido
0	T6 <sub>L</sub>	T18 <sub>S</sub>	T5 <sub>L</sub>	T17 <sub>S</sub>	T4 <sub>L</sub>	T16 <sub>S</sub>	T3 <sub>L</sub>	T15 <sub>S</sub>
0.001	T2 <sub>L</sub>	T14 <sub>S</sub>	T12 <sub>L</sub>	T24 <sub>S</sub>	T11 <sub>L</sub>	T23 <sub>S</sub>	T10 <sub>L</sub>	T22 <sub>S</sub>
0.01	T1 <sub>L</sub>	T13 <sub>S</sub>	T9 <sub>L</sub>	T21 <sub>S</sub>	T8 <sub>L</sub>	T20 <sub>S</sub>	T7 <sub>L</sub>	T19 <sub>S</sub>

L: Tratamiento en medio líquido

S: Tratamiento en medio sólido

#### 5.4 ETAPA DE PROLIFERACION

El material proveniente de la fase de establecimiento con el procedimiento descrito anteriormente, se utilizó para iniciar la fase de proliferación masiva. Para tal fin se evaluaron cinco concentraciones de BA (0, 1, 3.15, 4.5 y 5  $\mu$ M) solas y combinadas con TDZ (0 y 0.001  $\mu$ M) (Tabla 2).

**TABLA 2.** Tratamientos hormonales evaluados en la etapa de proliferación.

BA ( $\mu$ M) TDZ( $\mu$ M)	0	1	3.15	4.5	5
	0	T1	T2	T3	T4
0.001	T6	T7	T8	T9	T10

Se emplearon recipientes de vidrio con una capacidad de 50 ml (6 cm x 8 cm), en los cuales se dispensó 15 ml de medio MS sólido. Se inocularon dos explantes por recipiente.

Los subcultivos se realizaron a los 47 y 92 días después de iniciar la fase de proliferación, estos se realizaron a medios con las concentraciones descritas anteriormente. Los brotes fueron cortados cada dos nudos.

Debido a la presencia de oxidación, vitrificación y necrosis apical, los explantes fueron sometidos a tratamiento por inmersión en solución antioxidante (ácido cítrico y ácido ascórbico 0.0625 g/l c/u), y se subcultivaron en medio con macronutrientes diluidos a la mitad (MS/2) y 0.2% de Phytigel®.

## 5.5 ETAPA DE ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACION

En esta fase se utilizó el material proveniente de la etapa de proliferación, el cual se inoculó durante 28 días en medio MS sólido, con macronutrientes diluidos a la mitad (MS/2), sacarosa al 1.5% y sin reguladores de crecimiento. Posteriormente, para inducir la formación de raíces *in vitro* durante la etapa de enraizamiento (pre-endurecimiento), se evaluaron, en medio MS/2 sólido con sacarosa al 1.5 %, cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de auxinas, NAA (0 y 0.5  $\mu$ M) e IBA (0 y 0-5  $\mu$ M) solas y combinadas (Tabla 3). Los brotes para la etapa de pre-endurecimiento se seleccionaron con una longitud entre 2 y 3 cm, de largo y con tres a cuatro nudos.

**Tabla 3.** Tratamientos hormonales evaluados en la etapa de enraizamiento

IBA ( $\mu$ M)	0	0.5
NAA( $\mu$ M)	0	0.5
0	T1	T2
0.5	T3	T4

Después de 20 días de cultivo en el medio de enraizamiento (pre-endurecimiento), con el fin de aclimatar las plantas propagadas *in vitro*, se redujo la humedad interna de los recipientes haciendo orificios pequeños al vinilpel®; dos días después las plantas fueron retiradas de los recipientes y lavadas con agua para eliminar residuos de Phytigel®. Posteriormente se transfirieron a condiciones *ex vitro* en vasos plásticos de 12 onzas,

con turba como sustrato y se mantuvieron en condiciones de humedad relativa alta en cámara húmeda.

Cada planta se expuso gradualmente al medio ambiente exterior al realizar orificios en el vaso que las cubría. Cuando las plantas alcanzaron una altura promedio de 20 cm, se les retiró el vaso que las cubría.

## 5.6 DETECCION DE PARTICULAS VIRALES

Debido a la inquietud de algunos viticultores de la región de Boyacá con relación a la realización de pruebas para la detección de posibles agentes virales en el material de estudio, en el presente trabajo se quisieron mostrar resultados de algunas pruebas. Todas las pruebas para la detección de virus fueron realizadas por el grupo de investigadores de la Corporación BIOTEC<sup>1</sup>, constituido por el Doctor Jorge Cabra Martínez, director científico, Luis Armando Muñoz y Raúl A. Sálazar.

El material vegetal proveniente de plantas de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner), cultivadas en campo, fue sometido a técnicas de microscopía electrónica (prueba de “Leaf Dip”), pruebas serológicas “DAS-ELISA” (inmunoensayo de enzima-ligando en “sandwich” de doble anticuerpo), con anticuerpos policlonales de SANOFI (“Phyto Diagnostic Lacoquete France Laboratory”) para la detección del virus del enrollamiento foliar de la vid GLRV de tipo 1 (GLRaV-1), el virus de la corteza corchosa de la vid (GVA), y el virus de la hoja en abanico (GFLV), y análisis de dsRNA.

El material vegetal fué seleccionado de tejido foliar, sin sintomatología aparente y de acuerdo con las especificaciones propuestas por la Corporación BIOTEC (Anexo 2).

## 5.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los tratamientos evaluados durante el proceso de micropropagación se aplicaron bajo un diseño completamente al azar

<sup>1</sup> Corporación BIOTEC sede CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia

### 5.7.1 Establecimiento

Se evaluaron 24 tratamientos cada uno con tres repeticiones, presentando un arreglo factorial de 2 x 4 x 3, descrito de la siguiente manera:

- Dos consistencias de medio (líquido y sólido)
- Cuatro concentraciones (niveles) de BA (0, 1, 2.25 y 4.5  $\mu\text{M}$ )
- Tres concentraciones (niveles) de TDZ (0, 0.001 y 0.01  $\mu\text{M}$ ).

La unidad experimental estuvo constituida por cinco frascos cada uno con un meristemo, para un total de 15 frascos con meristemas por tratamiento.

Luego del análisis estadístico de los resultados obtenidos durante la fase de establecimiento, se procedió a establecer material *in vitro* para incrementar el material vegetal requerido para las evaluaciones de las otras etapas del proceso. Se estableció un meristemo por frasco para un total de 400 meristemas. Se evaluó una concentración de BA (2.25  $\mu\text{M}$ ), con 380 repeticiones y un control sin reguladores de crecimiento con 20 repeticiones.



Las variables registradas fueron:

#### **Número de explantes contaminados**

Se determinó como contaminación la presencia de levaduras, hongos y/o bacterias.

#### **Oxidación (%)**

Se definió como oxidación, el oscurecimiento de los tejidos en un 25%, 50%, 75% o 100% y se determinó el porcentaje promedio de oxidación en los explantes.

#### **Número de explantes vitrificados**

Para la evaluación de esta variable se tomaron en cuenta los explantes que presentaban una apariencia vidriosa acompañada de una malformación y coloración verde oscura brillante en las hojas. Se determinó el promedio de explantes vitrificados por tratamiento.

#### **Número de explantes que desarrollan brotes**

Para esta variable se tomaron en cuenta los explantes que desarrollaron brotes y se determinó el promedio de explantes que desarrollan brotes por tratamiento.

#### **Longitud del explante (mm)**

Se tomó como longitud del explante, la distancia en milímetros desde la base del brote meristemático (zona donde se realizó el corte) hasta el ápice del mismo y se determinó el promedio por tratamiento.

La evaluación de estas variables se realizó a los 20 días de cultivo.

### **5.7.2. Proliferación**

Se evaluaron diez tratamientos cada uno con cuatro repeticiones, presentando un arreglo factorial de 2 x 5, con siete lecturas a lo largo del tiempo. El arreglo factorial se describe de la siguiente manera:

- Dos concentraciones (niveles) de TDZ (0 y 0.001 $\mu$ M).
- Cinco concentraciones (niveles) de BA (0, 1, 2.25, 3.15 y 4.5  $\mu$ M)

Durante esta etapa se realizaron siete evaluaciones a los 12, 26, 46, 61, 76, 91 y 105 días después de la siembra en el medio de cultivo.

Para el análisis estadístico se tuvo en cuenta el tiempo como otro factor, para lo que se generó un segundo arreglo factorial de 2 x 5 x 7, descrito a continuación:

- Dos concentraciones (niveles) de TDZ (0 y 0.001 $\mu$ M).
- Cinco concentraciones (niveles) de BA (0, 1, 2.25, 3.15 y 4.5  $\mu$ M)
- Siete tiempos (niveles) en los que se realizaron las evaluaciones (12, 26, 46, 61, 76, 91 y 105 días después de la siembra en medios para proliferación).

La unidad experimental de cada tratamiento estuvo constituida por siete meristemos, dos en cada recipiente de cultivo, para un total de 14 frascos con meristemos por tratamiento.

Las variables registradas fueron:

### **Oxidación (%)**

Esta variable se registró con el mismo criterio descrito para la etapa de establecimiento.

### **Número de brotes vitrificados**

Para la evaluación de esta variable se tomaron en cuenta los brotes que presentaban una apariencia vidriosa acompañada de una malformación y coloración verde oscura brillante en las hojas. Se determinó el promedio de brotes vitrificados por tratamiento.

#### **Número de brotes por explante**

Para esta variable se contabilizó el número de brotes desarrollados por explante (crecimiento de un brote, de brotes adventicios y/o brotes axilares). Para el análisis estadístico de esta variable no se diferenció el origen del brote y se tomó como el total de número de brotes formados por explante, determinando el promedio por tratamiento.

#### **Longitud del brote (cm)**

Se tomó como longitud del explante, la distancia en centímetros desde la base del brote hasta el ápice del mismo y se determinó el promedio por tratamiento.

#### **Número de nudos por brotes**

Para el análisis de esta variable se contabilizó el número de nudos presentes en cada brote y se determinó el promedio por tratamiento.

### **5.7.3 Enraizamiento y aclimatación**

Se evaluaron cuatro tratamientos cada uno con cuatro repeticiones, presentando un arreglo factorial de 2 x 2 descrito de la siguiente manera:

- Dos concentraciones (niveles) de NAA (0 y 0.5  $\mu\text{M}$ )
- Dos concentraciones (niveles) de IBA (0 y 0.5  $\mu\text{M}$ ).

La unidad experimental fue de seis individuos

Las variables registradas en función de los cuatro tratamientos descritos fueron:

**Para el enraizamiento (en condiciones *In vitro*)**

**Brotos que desarrollan raíces**

De cada tratamiento se evaluó los brotes que desarrollaron raíces

Esta variable fue evaluada a los 20 días de iniciada la fase de enraizamiento.

**Para la aclimatación (en condiciones *Ex vitro*)**

**Peso seco de la raíz (g)**

Se registró el peso en gramos de la raíz posterior al secado en horno a 80°C durante 72 horas.

**Peso seco de la parte aérea (g)**

Se registró el peso en gramos de tallos y hojas posterior al secado en horno a 80°C durante 72 horas.

Para estas variables, la unidad muestral la constituyeron tres plantas por tratamiento. Las evaluaciones fueron realizadas a los 17 y 34 días desde el inicio de la fase de aclimatación.

**Durante la etapa de aclimatación se registro la supervivencia (%) de las plantas.**

Para el análisis de esta variable se determinó el número de plantas que sobreviven del total de las plantas sembradas. Durante esta fase se realizaron observaciones cualitativas de la apariencia de la planta.

La evaluación de esta variable se realizó a los 34 días desde el inicio de la fase de aclimatación.

## 5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 5.8.1 Establecimiento

La evaluación de los resultados obtenidos en esta etapa se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) realizado con el programa estadístico “Statgraphics”. Posteriormente, se realizó una prueba de rango múltiple (LSD´FISHER) para obtener un análisis comparativo de las medias de cada tratamiento. Adicionalmente, se realizó un ANOVA incluyendo como fuente de variación la consistencia del medio (sólida o líquida) y los reguladores de crecimiento (BA y TDZ).

Con respecto a los dos tratamientos de BA evaluados (0 y 2.25  $\mu$ M), se realizó un análisis a partir del porcentaje, para las variables **Contaminación (%)**, **Oxidación (%)**, **Número de explantes vitrificados**, **Número de explantes que desarrollan brotes**, y a partir del promedio para la variable **Longitud del explante (mm)**

### 5.8.2 Proliferación

Para el análisis de los resultados obtenidos en esta etapa, con el procedimiento “SAS SYSTEM” se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con datos transformados  $\sqrt{y+0.5}$  tomando como fuente de variación los reguladores de crecimiento (para el factorial 2 x 5) y el tiempo (para el factorial 2 x 5 x 7). Posteriormente, se examinaron las relaciones entre las variables con un análisis de regresión simple.

En el análisis de regresión se relacionaron las variables dependientes (Y) en función del factor independiente BA (X), por medio del modelo matemático  $Y=\alpha+\beta X$  donde  $\alpha$  es

el punto de intersección con Y; y el parámetro  $\beta$  es la pendiente de la recta de regresión y se denomina coeficiente de regresión de la población; representa el valor de la variable Y (variable dependiente) para cada unidad de incremento de X (variable independiente).

Para el análisis estadístico de número de brotes por explante no se diferencié el origen del brote y se tomó como el total de número de brotes formados por explante, para determinar el promedio por tratamiento de la siguiente manera:

A los 12, 26 y 46 días después la siembra:

$$\frac{\text{Sumatoria del número de brotes formados por explante}}{\text{Total de explantes sembrados al inicio de la etapa}}$$

A los 61, 76 y 91 días después de la siembra:

$$\frac{\text{Sumatoria del número de brotes formados por explante}}{\text{Total de explantes sembrados en el primer subcultivo}}$$

A los 105 días después de la siembra:

$$\frac{\text{Sumatoria del número de brotes formados por explante}}{\text{Total de explantes sembrados en el segundo subcultivo}}$$

### **5.8.3 Enraizamiento y aclimatación**

Los datos de la variable **brotos que desarrollan raíces** evaluados en condiciones *in vitro*, y la variable **supervivencia (%)** tomados en condiciones *ex vitro*, se evaluaron mediante el cálculo de porcentajes.

Los datos de las variables **peso seco de la raíz (g)** y **peso seco de la parte aérea (g)** tomados en condiciones *ex vitro*, se evaluaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA).

## 6.

**RESULTADOS**

El protocolo de desinfección utilizado fue eficiente para el control de la contaminación superficial y permitió el establecimiento *in vitro* de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner). El material vegetal contaminado no superó el 15% en cada consistencia de medio evaluada, en medio líquido se obtuvo un 12.7% de explantes contaminados y en medio sólido un 7.7% (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados de contaminación presentada en la etapa de establecimiento

Tratamiento	Explantes Contaminados		Tratamiento	Explantes Contaminados	
	NUMERO	PORCENTAJE		NUMERO	PORCENTAJE
T1 <sub>L</sub>	1	6	T13 <sub>S</sub>	0	0
T2 <sub>L</sub>	3	20	T14 <sub>S</sub>	1	6
T3 <sub>L</sub>	3	20	T15 <sub>S</sub>	2	13
T4 <sub>L</sub>	3	20	T16 <sub>S</sub>	1	6
T5 <sub>L</sub>	2	13	T17 <sub>S</sub>	1	6
T6 <sub>L</sub>	3	13	T18 <sub>S</sub>	1	6
T7 <sub>L</sub>	0	0	T19 <sub>S</sub>	2	13
T8 <sub>L</sub>	4	26	T20 <sub>S</sub>	2	13
T9 <sub>L</sub>	0	0	T21 <sub>S</sub>	2	13
T10 <sub>L</sub>	0	0	T22 <sub>S</sub>	2	13
T11 <sub>L</sub>	2	13	T23 <sub>S</sub>	1	6
T12 <sub>L</sub>	2	13	T24 <sub>S</sub>	1	6
TOTAL	23 <sup>a</sup>		TOTAL	14 <sup>b</sup>	

L: medio líquido S: medio sólido

<sup>a</sup>: 23 explantes contaminados de 180 cultivados en medio líquido corresponden al 12.7%

<sup>b</sup>: 14 explantes contaminados de 180 cultivados en medio sólido corresponden al 7.7%

### **6.1 EFECTO DE LA ADICION DE CITOQUININAS, LA CONCENTRACION Y LA CONSISTENCIA DEL MEDIO DURANTE LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO**

#### **6.1.1 Número de explantes que desarrollan brotes**



Los tratamientos evaluados presentaron diferencias significativas para la variable número de explantes que desarrollan brotes (Anexo 3 y 4). En la mayoría de los casos se observó elongación de primordios foliares y desarrollo de brotes (Figura 7).

La consistencia del medio (líquida o sólida) no incidió sobre el número de explantes que desarrollaron brotes (Anexo 3). Los tratamientos sin reguladores de crecimiento (T6<sub>L</sub> y T18<sub>S</sub>) no difirieron entre ellos. De igual manera, todos los tratamientos con igual concentración hormonal fueron iguales entre sí (Tabla 5; Anexo 4 y 5)..

El TDZ en ambas consistencias, no afectó de manera significativa el número de explantes que desarrollaron brotes (Anexo 3). Los tratamientos con 0.01  $\mu\text{M}$  y 0.001  $\mu\text{M}$  de TDZ (T1<sub>L</sub>, T2<sub>L</sub> y T13<sub>S</sub> y T14<sub>S</sub>) no presentaron diferencias con su respectivo control (T6<sub>L</sub> y T18<sub>S</sub>) (Tabla 5; Figura 8). De igual manera, los tratamientos con 0.01  $\mu\text{M}$  de TDZ (T1<sub>L</sub> y T13<sub>S</sub>) no presentaron diferencias significativas en la formación de brotes con respecto a los tratamientos con 0.001  $\mu\text{M}$  del mismo regulador (T2<sub>L</sub> y T14<sub>S</sub>) (Figura 8; Anexo 4 y 5).

Es evidente que en los rangos evaluados, a medida que se aumenta la concentración de BA, se incrementa el número de explantes que desarrollan brotes (Figura 8). En medio sólido suplementado con 4.5  $\mu\text{M}$  de BA (T15<sub>S</sub>), se incrementó significativamente el número de explantes que formaron brotes, con respecto al tratamiento sin reguladores de crecimiento (T18<sub>S</sub>) y con 1  $\mu\text{M}$  (T17<sub>S</sub>). Los tratamientos con 4.5 y 2.25  $\mu\text{M}$  de BA no presentaron respuestas significativamente diferentes (Tabla 5; Figura 8).

En cuanto al efecto sobre el número de explantes que desarrollaron brotes, en ninguna de las dos consistencias, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con las concentraciones combinadas de BA y TDZ evaluadas (Anexo 4 y 5). Sin embargo, en medio líquido se observó un aumento significativo en el

número de explantes que desarrollaron brotes en los tratamientos con 0.001  $\mu\text{M}$  de TDZ combinado con 4.5 y 2.25  $\mu\text{M}$  de BA (T10<sub>L</sub> y T11<sub>L</sub>, respectivamente), respecto al tratamiento con 0.001  $\mu\text{M}$  de TDZ únicamente (T2<sub>L</sub>) (Tabla5; Figura 8).

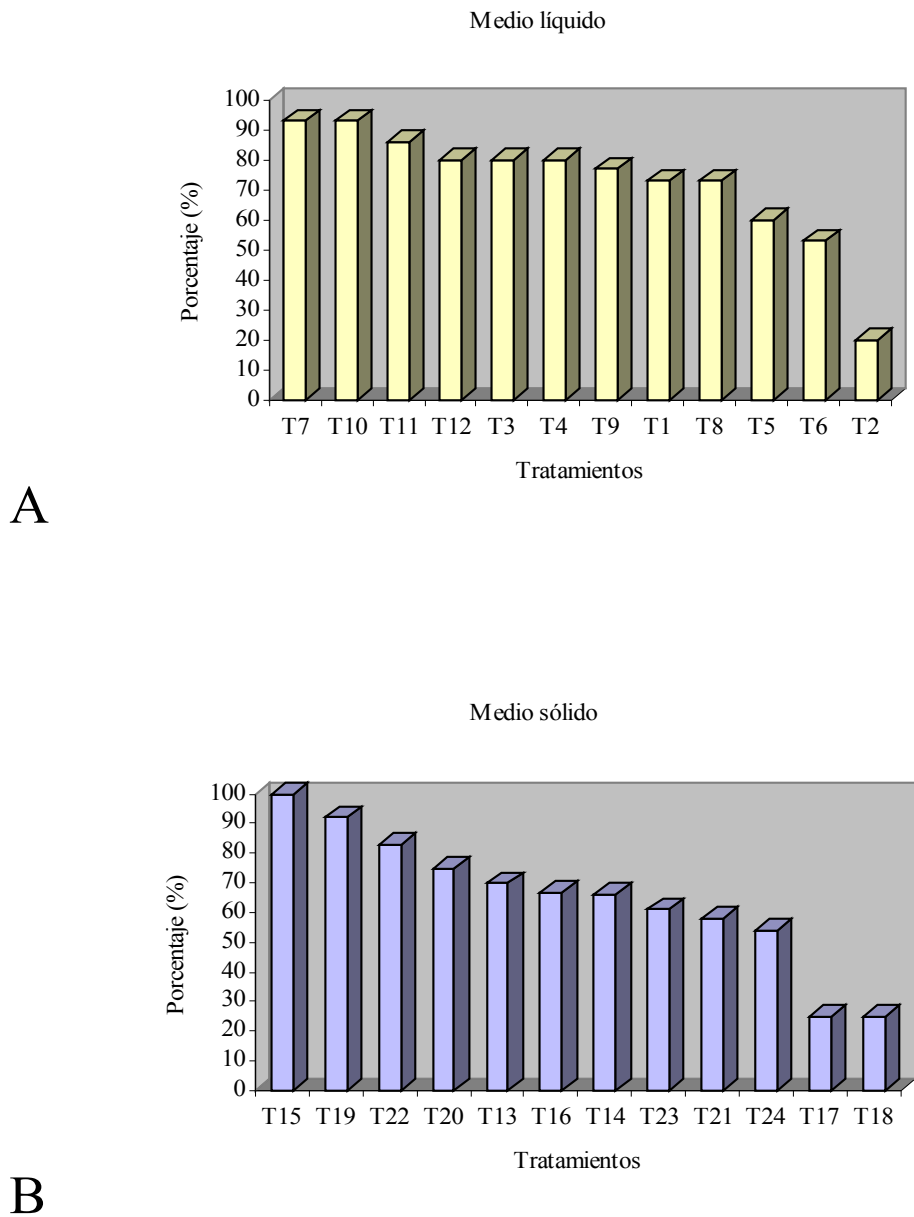
**Tabla 5.** Efecto de los tratamientos evaluados sobre el número de explantes que desarrollaron brotes durante la etapa de establecimiento.

Tratamiento	Explantes que desarrollan brotes		Tratamiento	Explantes que desarrollan brotes	
	Promedio	Porcentaje		Promedio <sup>a</sup>	Porcentaje
T1 <sub>L</sub>	0.733 abc	73	T13 <sub>S</sub>	0.70 abc	70
T2 <sub>L</sub>	0.20 a	20	T14 <sub>S</sub>	0.66 abc	66
T3 <sub>L</sub>	0.80 bc	80	T15 <sub>S</sub>	1 c	100
T4 <sub>L</sub>	0.80 bc	80	T16 <sub>S</sub>	0.666 abc	66.7
T5 <sub>L</sub>	0.60 abc	60	T17 <sub>S</sub>	0.25 ab	25
T6 <sub>L</sub>	0.533 abc	53	T18 <sub>S</sub>	0.25 ab	25
T7 <sub>L</sub>	0.933 c	93	T19 <sub>S</sub>	0.916 c	92
T8 <sub>L</sub>	0.733 abc	73	T20 <sub>S</sub>	0.75 abc	75
T9 <sub>L</sub>	0.766 abc	77	T21 <sub>S</sub>	0.583 abc	58
T10 <sub>L</sub>	0.933 c	93	T22 <sub>S</sub>	0.833 c	83
T11 <sub>L</sub>	0.866 c	86	T23 <sub>S</sub>	0.615 abc	61
T12 <sub>L</sub>	0.80 bc	80	T24 <sub>S</sub>	0.538 abc	54

<sup>a</sup>: Las letras representan los grupos homogéneos formados por LSD fisher al 95%

L: medio líquido S: medio sólido

**Figura 7.** Respuesta de meristemas de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) en medio MS con 2.25 o 4.5  $\mu\text{M}$  de BA y 0.01  $\mu\text{M}$  de TDZ en la etapa de establecimiento *in vitro*. **A.** Elongación y desarrollo de primordios foliares a los 12 días después de la siembra. **B.** Desarrollo de brote a los 20 días después de la siembra.



**Figura 8.** Efecto de los tratamientos evaluados sobre el número de explantes que desarrollaron brotes durante la etapa de establecimiento **A.** En medio líquido **B.** En medio sólido

### 6.1.2 Longitud del explante (mm)

La consistencia de medio (líquida y sólida) no causó diferencias significativas en la longitud de los explantes (Anexo 3). Los tratamientos sin reguladores de crecimiento (T6<sub>L</sub> y T18<sub>S</sub>) no presentaron diferencias significativas en las respuestas de longitud obtenidas (Tabla 6; Anexo 4 y 5). Sin embargo, en medio sólido en los tratamientos con 2.25 μM de BA y 1 μM de BA combinado con 0.01 μM de TDZ (T16<sub>S</sub> y T21<sub>S</sub>) se presentaron longitudes significativamente mayores con respecto a los tratamientos con las mismas concentraciones hormonales pero en medio líquido (T4<sub>L</sub> y T9<sub>L</sub>) (Figura 9; Anexo 4 y 5).

El TDZ no influyó en la longitud de los explantes (mm) (Anexo 3). Para las dos consistencias, los tratamientos con 0.01 y 0.001 μM de TDZ (T1<sub>L</sub>, T2<sub>L</sub> y T13<sub>S</sub> y T14<sub>S</sub>) no presentaron resultados diferentes entre sí, ni con el respectivo control (T6<sub>L</sub> y T18<sub>S</sub>) (Tabla 6; Figura 9).

Por otra parte, el BA tuvo un efecto significativamente diferente en el crecimiento en longitud de los explantes en las dos consistencias de medio evaluadas (Anexo 3). En los tratamientos suplementados con 2.25 y 4.5 μM de BA (T3<sub>L</sub>, T4<sub>L</sub> y T15<sub>S</sub> y T16<sub>S</sub>, repectivamente) se presentaron mayores longitudes, con respecto a los tratamientos sin reguladores de crecimiento (T6<sub>L</sub> y T18<sub>S</sub>) y suplementados con 1 μM de BA (T5<sub>L</sub> y T17<sub>S</sub>). (Tabla 6; Figura 9).

Los tratamientos en los cuales se utilizaron combinaciones de TDZ y BA fueron diferentes entre si en su efecto sobre el crecimiento en longitud de los explantes. En medio líquido en el tratamiento con 4.5 μM de BA y 0.01 μM de TDZ (T7<sub>L</sub>) se observan menores longitudes con respecto a los tratamientos con 4.5 μM de BA solo

(T3<sub>L</sub>) y 4.5  $\mu$ M de BA combinado con 0.001  $\mu$ M de TDZ (T10<sub>L</sub>). Entre los tratamientos con 1  $\mu$ M de BA (T5<sub>L</sub>, T12<sub>L</sub> y T9<sub>L</sub>) y con 2.25  $\mu$ M de BA (T4<sub>L</sub>, T11<sub>L</sub> y T8<sub>L</sub>) no se presentaron diferencias significativas (Tabla 6; Figura 9).

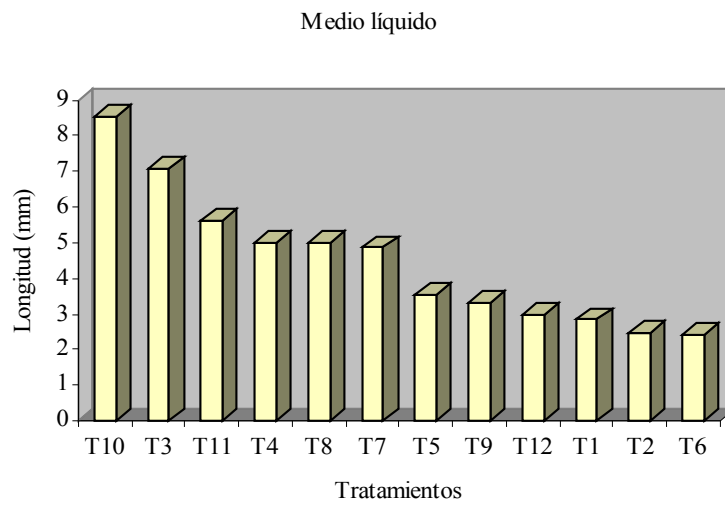
De igual manera, en medio sólido, en el tratamiento con 2.25  $\mu$ M de BA combinado con 0.01  $\mu$ M de TDZ (T20<sub>S</sub>) se presentaron menores longitudes con respecto al tratamiento con 2.25  $\mu$ M de BA (T16<sub>S</sub>). En los tratamientos con 1  $\mu$ M de BA combinado con TDZ (T21<sub>S</sub> y T24<sub>S</sub>) se presentaron mayores longitudes con respecto al tratamiento con 1 $\mu$ M de BA únicamente (T17<sub>S</sub>) (Tabla 6; Figura 9).

**Tabla 6.** Efecto de los tratamientos evaluados sobre la longitud del explante (mm) durante la etapa de establecimiento.

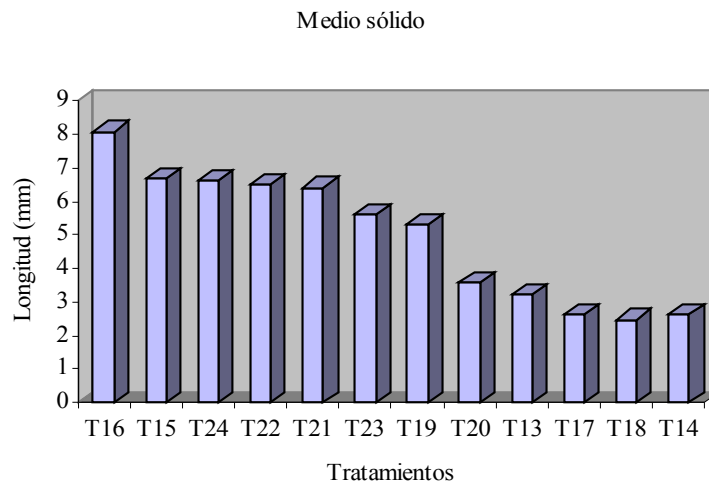
TRATAMIENTO	LONGITUD DE LOS EXPLANTES	TRATAMIENTO	LONGITUD DE LOS EXPLANTES
T1 <sub>L</sub>	2.8333 ab	T13 <sub>S</sub>	3.2 abc
T2 <sub>L</sub>	2.4666 a	T14 <sub>S</sub>	2.6 ab
T3 <sub>L</sub>	7.0666 efg	T15 <sub>S</sub>	6.6666 efg
T4 <sub>L</sub>	5.0 abcde	T16 <sub>S</sub>	8.0833 fg
T5 <sub>L</sub>	3.5333 abc	T17 <sub>S</sub>	2.625 ab
T6 <sub>L</sub>	2.4333 a	T18 <sub>S</sub>	2.5 ab
T7 <sub>L</sub>	4.8666 abcde	T19 <sub>S</sub>	5.2916 bcdef
T8 <sub>L</sub>	5.2 bcde	T20 <sub>S</sub>	3.5833 abcd
T9 <sub>L</sub>	3.3333 abc	T21 <sub>S</sub>	6.4166 defg
T10 <sub>L</sub>	8.5333 g	T22 <sub>S</sub>	6.5 efg
T11 <sub>L</sub>	5.6333 def	T23 <sub>S</sub>	5.6153 cdef
T12 <sub>L</sub>	3.4 abc	T24 <sub>S</sub>	6.6153 efg

<sup>a</sup>: Las letras representan los grupos homogéneos formados por LSD al 95%

<sub>L</sub>: medio líquido <sub>S</sub>: medio sólido



**A**



**B**

**Figura 9.** Efecto de los tratamientos evaluados sobre la longitud de los explantes durante la etapa de establecimiento **A.** En medio líquido **B.** En medio sólido

### 6.1.3 Oxidación (%)

La consistencia del medio (líquida o sólida) no incidió sobre la oxidación de los meristemos (Anexo 3). Los tratamientos sin reguladores de crecimiento en ambas consistencias (T6<sub>L</sub> y T18<sub>S</sub>) no presentaron diferencias significativas en el promedio de oxidación de los explantes (Figura 10; Anexo 5). De igual manera, los tratamientos con la misma concentración hormonal y diferente consistencia no presentaron diferencias significativas (Tabla 7; Anexo 4 y 5).

La oxidación en la mayoría de los tratamientos hormonales no produjo muerte de los explantes; estos en su mayoría presentaron oxidación del 25% (principalmente en el punto de corte) (Figura 8; Anexo 6).

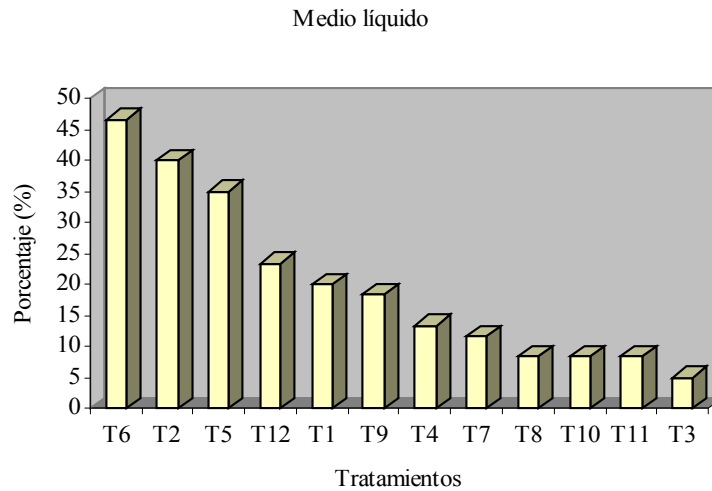
Tanto en medio líquido como en medio sólido, los mayores porcentajes de oxidación se presentaron en los tratamientos sin reguladores de crecimiento (T6<sub>L</sub> y T18<sub>S</sub>) (Figura 10). En el medio líquido, el tratamiento sin reguladores de crecimiento (T6<sub>L</sub>) presentó diferencias con la mayoría de los tratamientos excepto con T2<sub>L</sub> y T5<sub>L</sub> (0.001 μM de TDZ solo y combinado con 1 μM de BA, respectivamente). En el medio sólido, el tratamiento sin reguladores de crecimiento (T18<sub>S</sub>) presentó diferencias significativas con todos los tratamientos de esta consistencia (Tabla 7; Anexo 4 y 5).

**Tabla 7.** Efecto de los tratamientos evaluados sobre la oxidación de los explantes durante la etapa de establecimiento

TRATAMIENTO	MEDIA (%) <sup>a</sup>	TRATAMIENTO	MEDIA (%) <sup>a</sup>
T1 <sub>L</sub>	20 abcd	T13 <sub>s</sub>	7.5 ab
T2 <sub>L</sub>	40 ef	T14 <sub>s</sub>	7.5 ab
T3 <sub>L</sub>	5 a	T15 <sub>s</sub>	6.25 ab
T4 <sub>L</sub>	13.33 abc	T16 <sub>s</sub>	8.33 ab
T5 <sub>L</sub>	35 def	T17 <sub>s</sub>	31.25 cdef
T6 <sub>L</sub>	46.66 fg	T18 <sub>s</sub>	58.33 g
T7 <sub>L</sub>	11.66 abc	T19 <sub>s</sub>	12.5 abc
T8 <sub>L</sub>	8.33 ab	T20 <sub>s</sub>	16.66 abc
T9 <sub>L</sub>	18.33 abcd	T21 <sub>s</sub>	8.33 ab
T10 <sub>L</sub>	8.33 ab	T22 <sub>s</sub>	4.16 a
T11 <sub>L</sub>	8.33 ab	T23 <sub>s</sub>	5.76 a
T12 <sub>L</sub>	23.33 bcde	T24 <sub>s</sub>	21.15 abcd

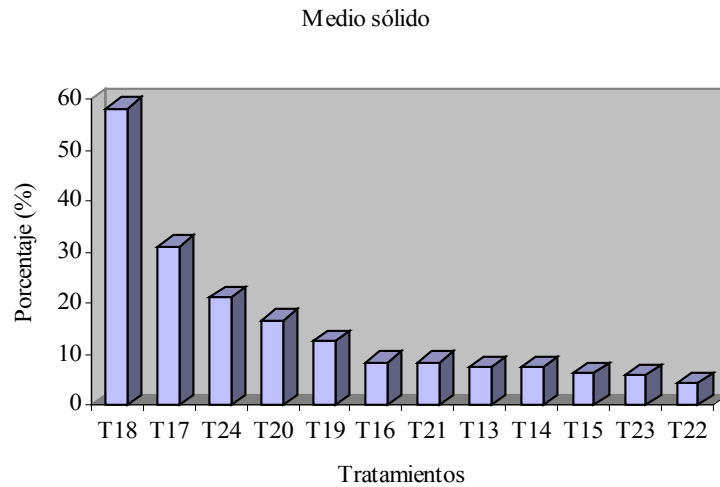
<sup>a</sup>: Las letras representan los grupos homogéneos formados por LSD Fisher al 95%

L: medio líquido S: medio sólido



A





**B**

**Figura 10.** Efecto de los tratamientos evaluados sobre la oxidación (%) de los explantes durante la etapa de establecimiento **A.** En medio líquido **B.** En medio sólido

#### 6.1.4 Número de explantes vitrificados

Observaciones realizadas durante esta etapa sugiere que el medio líquido produce mayor vitrificación. Sin embargo, la consistencia del medio no influyó de manera significativa sobre la vitrificación de los explantes (Anexo 3). Los tratamientos sin reguladores de crecimiento (T6<sub>L</sub> y T18<sub>S</sub>) no difirieron entre ellos (Tabla 8; Anexo 4 y 5). Sin embargo, en los tratamientos con 4.5  $\mu$ M de BA (T3<sub>L</sub> y T15<sub>S</sub>) se presentó mayor número de explantes vitrificados cuando se utilizó medio sólido, y en los tratamientos con 1  $\mu$ M de BA (T5<sub>L</sub> y T17<sub>S</sub>) se presentó mayor vitrificación cuando se utilizó medio líquido (Tabla 8; Figura 11).

Se observó un efecto de los reguladores de crecimiento en medio sólido en el cual las mayores concentraciones de TDZ y BA (T13<sub>s</sub> y T15<sub>s</sub>) causaron un incremento significativo en el número de explantes vitrificados con respecto al control sin reguladores de crecimiento (T18<sub>s</sub>) (Figura 11; Anexo 4 y 5). Sin embargo, el TDZ no afectó significativamente la vitrificación (Anexo-3).

La combinación de los tres factores (BA, TDZ, y consistencia del medio) afectó de manera significativa la vitrificación en los explantes (Anexo 3). En medio sólido, se presentó menor vitrificación de los explantes en el tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de BA (T17<sub>s</sub>) en relación a los tratamientos con 2.25 y 4.5  $\mu\text{M}$  del mismo regulador (T16<sub>s</sub> y T15<sub>s</sub>, respectivamente). Sin embargo, en medio líquido con las mismas concentraciones no se observaron diferencias en la respuesta de vitrificación (Tabla 8; Figura 11).

De igual manera, en medio líquido, el tratamiento con la combinación 0.01  $\mu\text{M}$  de TDZ y 4.5  $\mu\text{M}$  de BA (T7<sub>L</sub>) presentó mayor vitrificación que los tratamientos con la mismas concentraciones pero sin combinar (T1<sub>L</sub> y T3<sub>L</sub>). En medio sólido por el contrario, el tratamiento con la combinación 0.01  $\mu\text{M}$  de TDZ y 4.5  $\mu\text{M}$  de BA (T19<sub>s</sub>) no presentó diferencias significativas con los tratamientos T13<sub>s</sub> y T15<sub>s</sub> (0.01  $\mu\text{M}$  de TDZ y 4.5  $\mu\text{M}$  de BA, respectivamente). (Tabla 8; Figura 11).

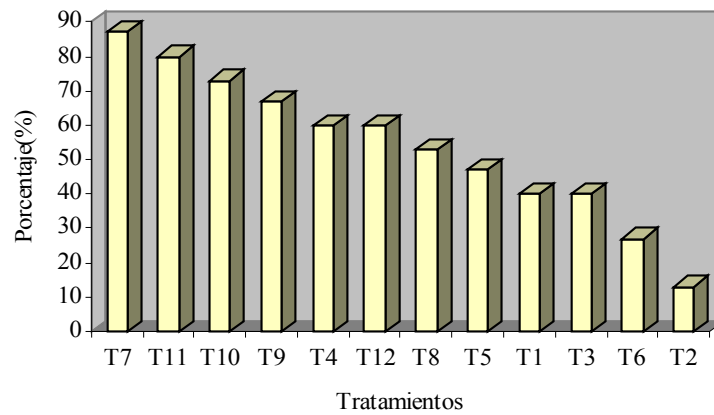
**Tabla 8.** Efecto de los tratamientos evaluados sobre la vitrificación de los explantes durante la etapa de establecimiento

Tratamiento	Explantes vitrificados		Tratamiento	Explantes vitrificados			
	Promedio	Porcentaje		Promedio	Porcentaje		
T1 <sub>L</sub>	0.40	abcde	40	T13 <sub>S</sub>	0.70	efgh	70
T2 <sub>L</sub>	0.133	a	13	T14 <sub>S</sub>	0.50	bcdefgh	50
T3 <sub>L</sub>	0.40	abcde	40	T15 <sub>S</sub>	0.833	gh	83
T4 <sub>L</sub>	0.60	defgh	60	T16 <sub>S</sub>	0.50	cdefg	50
T5 <sub>L</sub>	0.466	bcdef	47	T17 <sub>S</sub>	0.8.34	a	8
T6 <sub>L</sub>	0.266	abcd	27	T18 <sub>S</sub>	0.166	abc	17
T7 <sub>L</sub>	0.866	h	87	T19 <sub>S</sub>	0.582	defgh	58
T8 <sub>L</sub>	0.533	defgh	53	T20 <sub>S</sub>	0.25	abcd	25
T9 <sub>L</sub>	0.666	efgh	67	T21 <sub>S</sub>	0.416	abcde	42
T10 <sub>L</sub>	0.733	efgh	73	T22 <sub>S</sub>	0.50	cdefg	50
T11 <sub>L</sub>	0.80	fgh	80	T23 <sub>S</sub>	0.615	defgh	62
T12 <sub>L</sub>	0.60	defgh	60	T24 <sub>S</sub>	0.461	bcdef	46

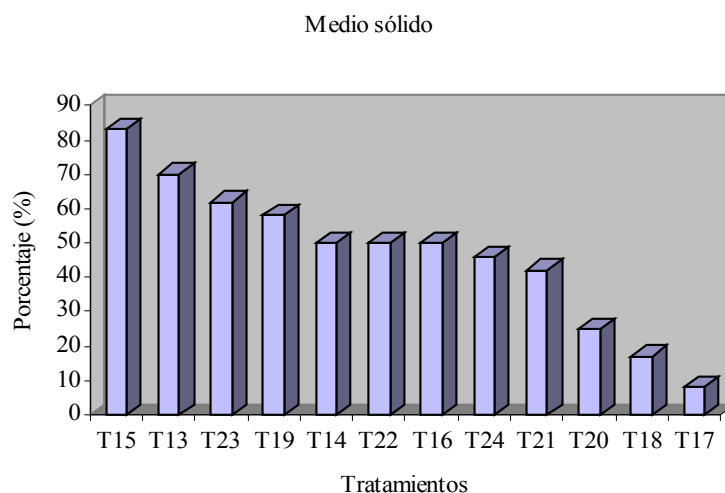
<sup>a</sup>: Las letras representan los grupos homogéneos formados por LSD fisher al 95%

L: medio líquido S: medio sólido

Medio líquido



A



**B**

**Figura 11.** Efecto de los tratamientos evaluados sobre el número de explantes vitrificados durante la etapa de establecimiento **A.** En medio líquido **B.** En medio sólido

### **6.1 EFECTO DE LA ADICION DE BA DURANTE LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO**

Para el establecimiento *in vitro* de nuevo material vegetal requerido para las evaluaciones de las otras etapas del proceso, y de acuerdo con los resultados anteriormente descritos, se seleccionó el medio MS sólido suplementado con 2.25  $\mu\text{M}$  de BA, por presentar desarrollo de brotes, mayor longitud de los explantes y menor vitrificación.

Las condiciones definidas permitieron establecer con éxito los meristemas de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) (Tabla 9)

**Tabla 9.** Efecto de la adición de BA sobre las variables evaluadas durante la etapa de establecimiento

VARIABLES DE RESPUESTA	TRATAMIENTO	
	0 (0 MM DE BA)	1 (2.25 MM DE BA)
Explantes contaminados (%)	5	12.8
Oxidación (%)	68.4	7.4
Explantes vitrificados(%)	17	37,7
Explantes que formaron brotes (%)	33	56.25
Longitud del explantes (mm)	2.7	5.5

## PROLIFERACION

Durante esta etapa del cultivo se evidenció la capacidad morfogenética de la variedad y se presentaron diferencias en el tiempo para todas las variables evaluadas. Se observó que el número de brotes por explante varió de acuerdo con los tratamientos hormonales evaluados y se presentaron algunos problemas de fasciación y necrosis apical.

### 6.3 EFECTO DE LA ADICION DE CITOQUININAS DURANTE LA ETAPA DE PROLIFERACION

#### 6.3.1 Número de brotes por explante

El número de brotes por explante estuvo influenciado por el tiempo y la concentración de los reguladores de crecimiento evaluados (Tabla 10 y 11; Figura 12; Anexo 8 y 9). Durante esta etapa se obtuvo desarrollo de brotes axilares y adventicios en los tratamientos con 3.15, 4.5 y 5  $\mu$ M de BA solo y combinado con 0.001  $\mu$ M de TDZ (T3, T4 y T5 y T8, T9 y T10, respectivamente). Sin embargo, predominó la formación de brotes adventicios (Figura 13).

A partir de los 26 días de cultivo a medida que se aumentaba la concentración en los rangos evaluados de BA, se presentó un aumento gradual en el número de brotes por explante (Tabla 10; Figura 12A; Anexo 8 y 10). A los 46 días de cultivo, en los tratamientos con 3.15, 4.5 y 5  $\mu\text{M}$  de BA solo y combinado con TDZ, se observó un aumento en la proliferación de brotes, presentándose el mayor número de brotes en el tratamiento con 5  $\mu\text{M}$  de BA (T5) (Figura 12).

La aplicación de TDZ en concentración de 0.001  $\mu\text{M}$  (T6) produjo un incremento significativo en el número de brotes por explante con respecto al tratamiento control sin reguladores de crecimiento (T1) a los 61 días de cultivo (posterior al primer subcultivo) (Tabla 10; Figura 12). Sin embargo, siempre se presentaron valores inferiores para la variable número de brotes por explante a los obtenidos en los tratamientos con BA.

En ningún tiempo específico se presentó un efecto significativo de la combinación de BA y TDZ (Tabla 10; Anexo 8). Sin embargo, a partir de los 61 días se observó un menor número de brotes por explante en los tratamientos con las combinaciones de reguladores de crecimiento (BA y TDZ) con respecto a los tratamientos con BA (Tabla 12).

En cuanto a las características morfológicas de los brotes, es importante mencionar que a los 26 días de haber comenzado el cultivo, algunos de los brotes adventicios se desarrollaron fusionados y deformes presentando el problema de fasciación. Adicionalmente, en la base de estos brotes se presentó formación de callo (Figura 14).

**Tabla 10.** Resultados del ANOVA para el efecto del BA y TDZ (factorial 2x5) sobre las variables evaluadas en la etapa de proliferación

Días	FACTOR	Número de brotes por explante	Número de nudos por brote	Longitud del brote (cm)	Oxidación (%)	Número de brotes vitrificados
12	BA					
	TDZ					
	BA x TDZ					
26	BA	7.74**(L)		5.77**(L)		
	TDZ					
	BA x TDZ					
46	BA	10.92**(L)	4.25**(L)	6.54**(L)		
	TDZ					
	BA x TDZ		2.56*			
61	BA	9.08**(L)	9.09**(L)	5.19**(L,C)		
	TDZ	4.72*	5.21*			
	BA x TDZ					
76	BA	9.97**(L)	8.92**(L)	5.44**(L,C)		
	TDZ					
	BA x TDZ					
91	BA	9.46**(L)	7.34**(L)	9.30**(L)	3.05*(-L)	7.54**(L,C)
	TDZ					
	BA x TDZ					
105	BA	16.24**(L)	9.72**(L)	8.39**(L)	7.15**(-L,C)	12.85**(L,C)
	TDZ					
	BA x TDZ					

\* : menor a 0.05. Significativo con un nivel de confiabilidad del 95%

\*\* : menor a 0.01. Altamente significativo con un nivel de confiabilidad del 99%

L :respuesta lineal

L,C: respuesta lineal y cuadrática

**Tabla 11.** Resultados del ANOVA para el efecto del BA, TDZ y tiempo (factorial 2x5x7) sobre las variables evaluadas en la etapa de proliferación

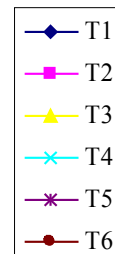
FACTOR	Número de brotes por explante	Número de nudos por brote	Longitud del brote (cm)	Oxidación (%)	Número de brotes vitrificados
TIEMPO	23.13**	15.79**	28.25**	98.81**	33.85**
TDZ	0,55	4,85	0,09	1,78	5.81*
TIEMPO x TDZ	1,55	0,63	0,06	0,53	0,21
BA	53.31**	30.41**	37.92**	4.23**	11.63**
TIEMPOx BA	1.75*	1.87*	1,09	1,15	1.71*
TDZ x BA	2.71*	5.02**	1,85	2.81*	1,81
TIEMPOxTDZxBA	0,36	0,56	0,51	0,81	0,86

\* : menor a 0.05. Significativo con un nivel de confiabilidad

\*\* : menor a 0.01. Altamente significativo con un nivel de confiabilidad del 99%

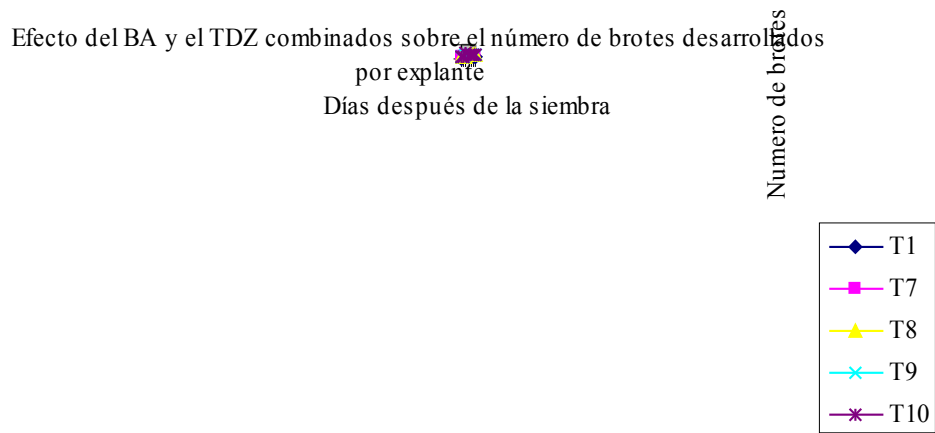
Efecto del BA y el TDZ sobre el número de brotes desarrollados por explante  
Días después de la siembra

Número de brotes



A





**B**

**Figura 12.** Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes por explante durante la etapa de proliferación **A.** Tratamientos con los reguladores sin combinar **B.** Tratamientos con los reguladores combinados

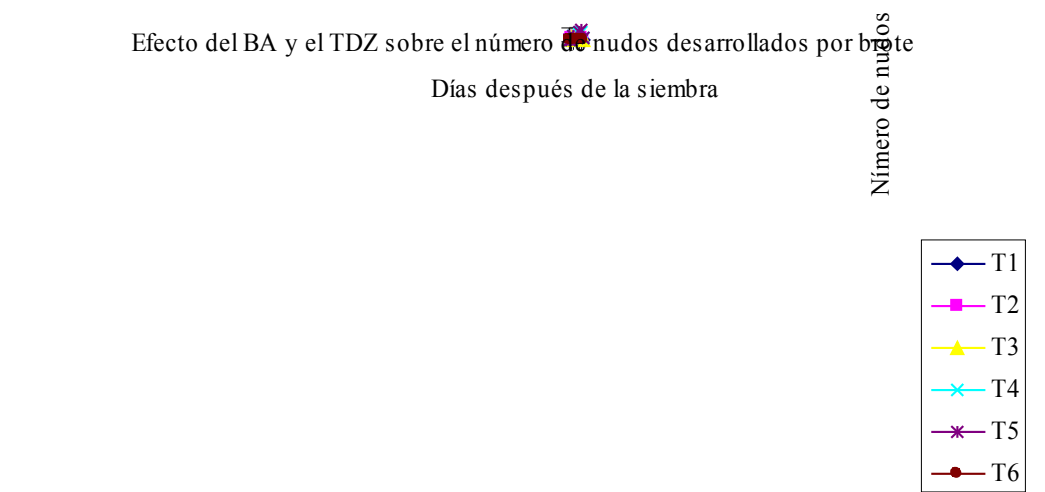
**Figura 13.** Respuesta de los brotes cultivados en medio MS sólido suplementado con 3.15, 4.5 o 5  $\mu\text{M}$  de BA, a los 55 días de iniciada la etapa de proliferación.

**Figura 14.** Fasciación y callo en brotes adventicios desarrollados en medio MS sólido suplementado con BA y TDZ durante la etapa de proliferación.

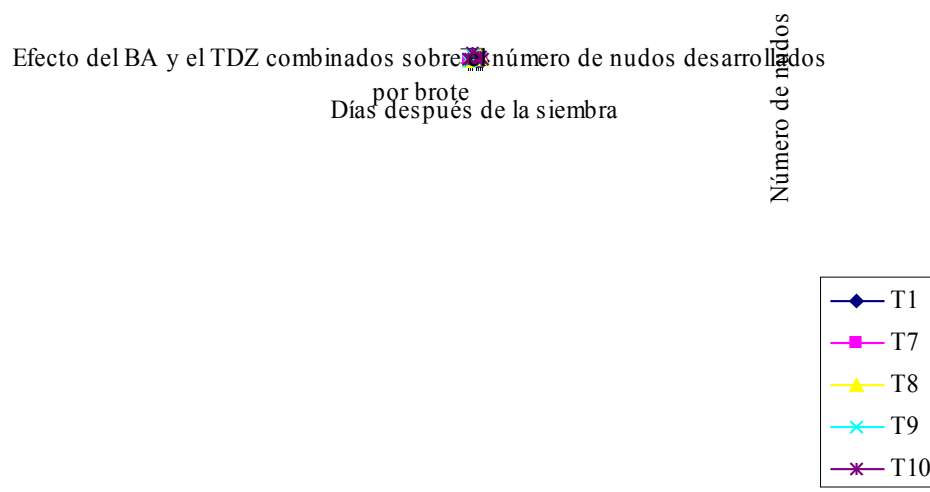
### **6.3.2 Número de nudos por brote**

El número de nudos por brote, en cada tratamiento varió a través del tiempo, estas variaciones se presentaron a partir de los 46 días de evaluación y fueron producto del efecto del BA solo y combinado con TDZ (Tabla 10, Anexo 8). Se observó un incremento en el número de nudos por brote en relación con la concentración de BA (Tabla 10; Figura 15; Anexo 8 y 10). Así mismo, a los 46 días de cultivo se presentó un incremento significativo en el número de nudos por brote en los tratamientos con 3.15, 4.5 y 5  $\mu\text{M}$  de BA y 0.001  $\mu\text{M}$  de TDZ (T8, T9 y T10), con respecto a los tratamientos con las mismas concentraciones de BA únicamente (T3, T4 y T5) (Figura 15).

Después de 76 días de cultivo, se observó una coloración café oscura en nudos y hojas apicales de algunas brotes, posiblemente atribuido a una deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y boro (Figura 16).



A



B

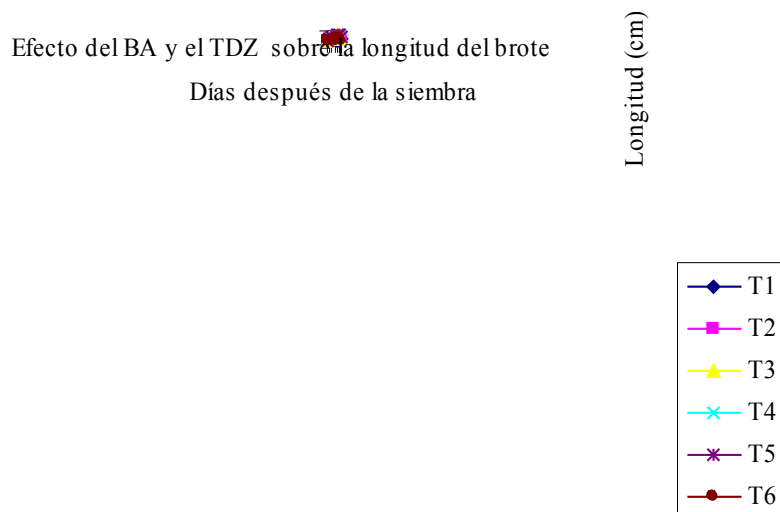
**Figura 15.** Efecto de los tratamientos sobre el número de nudos por brote durante la etapa de proliferación **A.** Tratamientos con los reguladores sin combinar **B.** Tratamientos con los reguladores combinados

**Figura 16.** Necrosis apical en brotes cultivados *in vitro* de la variedad Müller Thurgau (Rieslig x Sylvaner) durante la etapa de proliferación.

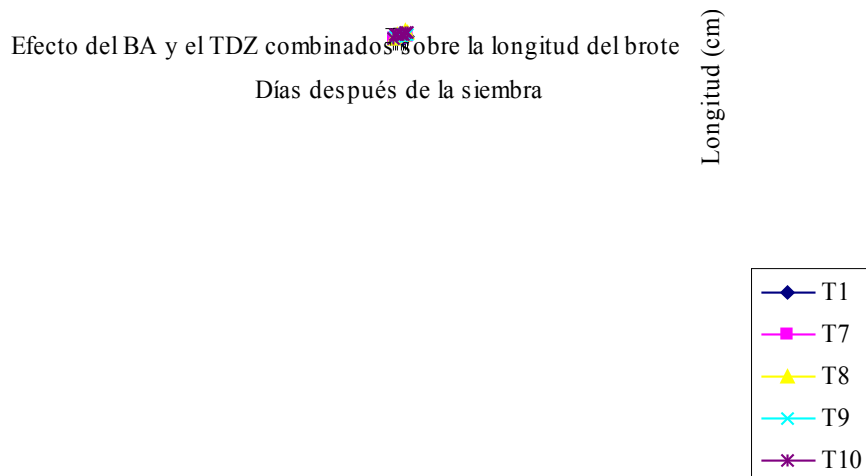
### 6.3.3 Longitud del brote

En esta etapa se observaron efectos del tiempo y del BA sobre la longitud de los brotes. Por el contrario, el TDZ y la combinación de BA y TDZ no presentaron efecto significativo sobre esta variable (Tabla 10 y 11; Anexo 8 y 9).

El BA (0, 1, 3.15, 4.5 y 5  $\mu\text{M}$ ), presentó diferencias en su efecto a partir de los 26 días de cultivo (Tabla 10). Se observa una tendencia al aumento gradual en la longitud del brote con el incremento de la concentración de BA (Tabla 10; Figura 17). Sin embargo, a los 61 y 76 días se presentaron longitudes menores en los tratamientos con 4.5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  de BA (T4 y T5) con respecto a los tratamientos con 3.15  $\mu\text{M}$  (T3) (Figura 17). Así mismo, después del segundo subcultivo se observó que en los tratamientos con 4.5  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  de BA solo y combinado con TDZ (T4, T5 y T9 y T9), se desarrollaron brotes con entrenudos cortos lo que dificultó su propagación (Figura 18).



A



## B

**Figura 17.** Efecto de los tratamientos sobre la longitud de los brotes durante la etapa de proliferación **A.** Tratamientos con los reguladores sin combinar **B.** Tratamientos con los reguladores combinados

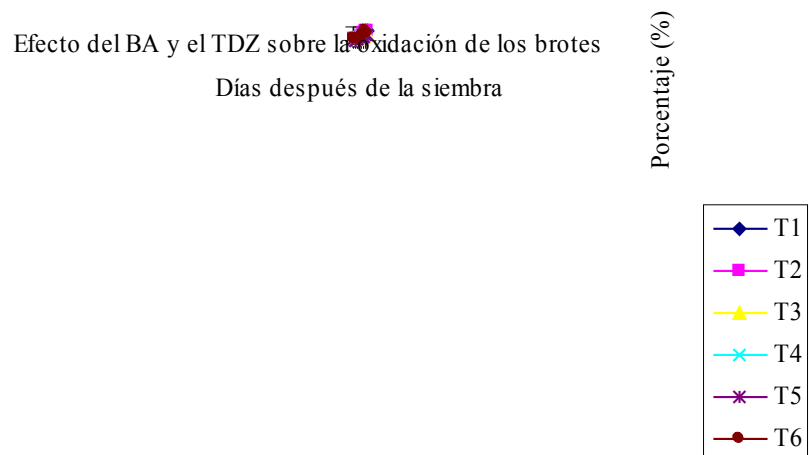
**Figura 18.** Brotes con entrenudos cortos cultivados en medio MS sólido suplementado con 4.5 y 5  $\mu\text{M}$  de BA durante la etapa de proliferación.

### 6.3.4 Oxidación (%)

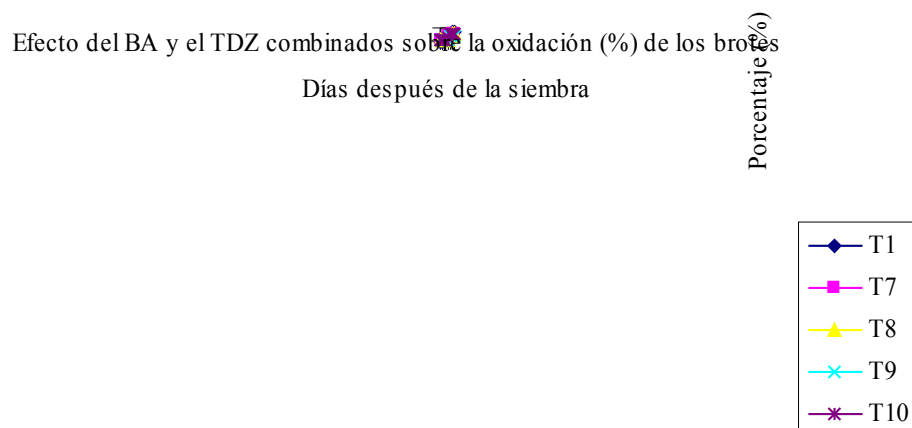
El porcentaje de oxidación en los brotes varió a través del tiempo. A los 12 y 26 días de inicio de la etapa, en todos los tratamientos se presentó oxidación en los brotes en un 25% (principalmente en el sitio de corte). De igual manera, en todos los tratamientos a los 46 días, los brotes presentaron oxidación en más de un 50%, y a los 61 días (posterior al primer subcultivo), en la mayoría de los tratamientos se observó un aumento en el porcentaje de oxidación. A los 105 días (después del segundo subcultivo), no se presentó aumento en el número de brotes oxidados (Figura 19; Anexo7).

Con relación a los factores evaluados, el BA presentó un efecto significativo sobre la oxidación de los brotes, el cual se observó a los 91 y 105 días de cultivo (Tabla 10 y 11; Anexo 8 y 9); donde la aplicación de BA en las concentraciones 3.15, 4.5 y 5  $\mu\text{M}$  (T3, T4 y T5) produjeron un menor porcentaje de oxidación con respecto al tratamiento sin reguladores de crecimiento y con 1  $\mu\text{M}$  de BA (T1 y T2) (Figura 19A).

No hubo diferencias estadísticas en el efecto del TDZ solo y combinado con BA sobre la oxidación en cada tiempo evaluado (Tabla 10; Figura 19B; Anexo 8). Sin embargo, cuando se toma el tiempo como una fuente de variación se presentan diferencias en la respuesta (Tabla 11, Anexo 9).



A



## B

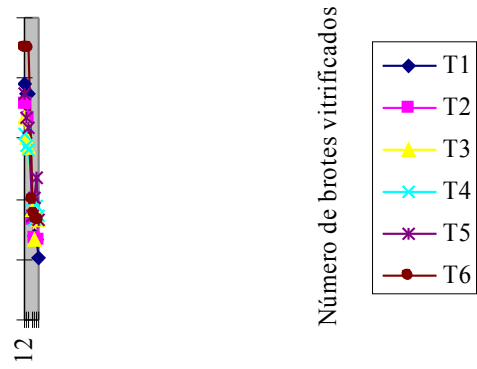
**Figura 19.** Efecto de los tratamientos sobre la oxidación de los brotes durante la etapa de proliferación **A.** Tratamientos con los reguladores sin combinar **B.** Tratamientos con los reguladores combinados

### 6.2.5 Número de brotes vitrificados

La presencia de brotes vitrificados fue una constante durante la etapa de proliferación (Figura 20; Figura 21). Se observó una disminución en el número de brotes vitrificados después del primer subcultivo.

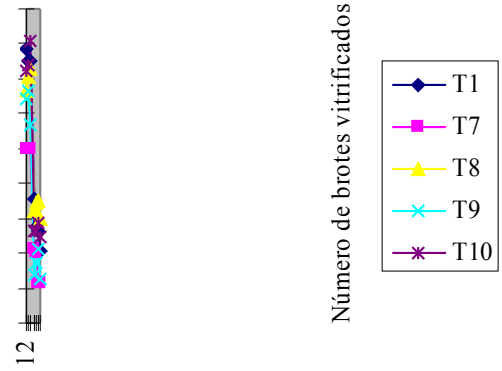
El BA presentó un efecto significativo sobre la vitrificación de los brotes, el cual se observó a los 91 y 105 días de cultivo (Tabla 10; Anexo 8) con un incremento gradual en el número de brotes vitrificados en contraste con el tratamiento sin reguladores de crecimiento (T1) (Figura 20A; Anexo 10). El TDZ solo y combinado con BA no presentó efecto significativo sobre la vitrificación de los brotes cultivados *in vitro* (Tabla 10; Figura 20B; Anexo 8).

Efecto del BA y el TDZ sobre el número de brotes vitrificados



A

Efecto del BA y el TDZ combinados sobre el número de brotes vitrificados



B

**Figura 20.** Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes vitrificados durante la etapa de proliferación **A.** Tratamientos con los reguladores sin combinar **B.** Tratamientos con los reguladores combinados



**Figura 21.** Respuesta de vitrificación en los brotes cultivados en medio MS sólido suplementado con BA y TDZ, a los 35 días de iniciada la etapa de proliferación.

## **ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACION**

### **6.4 EFECTO DE LA ADICION DE AUXINAS DURANTE LAS ETAPAS DE ENRAIZAMIENTO Y PRE -ACLIMATACION**

Para las etapas de enraizamiento y aclimatación, se tomaron los brotes previamente cultivados (durante 28 días) en medio MS sólido con macronutrientes diluïdos a la mitad (MS/2), sin reguladores de crecimiento y 15% de sacarosa. Los brotes seleccionados procedentes de la etapa de proliferación en los tratamientos con 3.15, 4.5 y 5  $\mu$ M de BA solo y combinado con TDZ, presentaba 2 - 4 cm de largo y 3 - 4 nudos.

Durante los 28 días de cultivo en medio MS/2 sólido, sin reguladores de crecimiento y 15% de sacarosa (posterior a la etapa de proliferación), en algunos brotes se obtuvo formación de raíces y elongación de entrenudos.

#### **6.4.1 Brotes que desarrollan raíces.**

En los cuatro tratamientos evaluados durante esta etapa, se presentaron brotes con desarrollo de raíces (Tabla 12). En el tratamiento sin reguladores de crecimiento (T1) se desarrollaron raíces largas y delgadas; características diferentes a las observadas en los tratamientos con 0.5  $\mu$ M de NAA e IBA solas y combinadas (T2, T3 y T4), puesto que en estos tratamientos hubo formación de callo y las raíces fueron gruesas con respecto a las del control (Figura 22).

**Tabla 12.** Efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de raíces (%) a los 20 días de iniciada la etapa de enraizamiento.

Tratamiento	Brotos que desarrollan raíces (%)
T1	79
T2	87
T3	83
T4	87

#### **6.4.2 Peso seco de raíz y de parte aérea (g)**

En todos los tratamientos evaluados se incrementó la biomasa a través del tiempo, tanto en la raíz como en la parte aérea (Figura 23). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Anexo 11).

La distribución de materia seca no difirió entre los tratamientos. La mayor parte del peso seco total corresponde al peso seco de la parte aérea (Figura 24).

#### **6.4.3 Supervivencia (%)**

Las condiciones suministradas durante la etapa de pre-aclimatación y aclimatación favorecieron la supervivencia *ex vitro* en un 90% de las plantas de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner). Se observó crecimiento de las plantas con longitudes de 20 a 30 cm, los tallos fueron delgados con nudos de color rojizo. Las hojas presentaron lóbulos característicos de la variedad y coloraciones verde claro a amarillas (Figura 25).

**Figura 22.** Efecto de los tratamientos sobre la inducción de raíces *in vitro* durante la etapa de enraizamiento-aclimatación. **A:** Brote enraizado en medio MS sólido sin reguladores de crecimiento. **B:** Brote enraizado en medio MS sólido suplementado con NAA y/o IBA.

**Figura 23** Peso seco (g) a los 17 y 34 días de la etapa de endurecimiento.

**Figura 24.** Distribución de materia seca durante la etapa de endurecimiento.

**Figura 25.** Planta de  $\pm$  25 cm de altura obtenida por cultivo *in vitro* de meristemos de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner), a los 34 días de iniciada la etapa de aclimatación.

## **6.5 IDENTIFICACION DE PARTICULAS VIRALES EN MATERIAL DE CAMPO**

**Las pruebas descritas para la detección de virus fueron realizadas por investigadores de la corporación BIOTEC sede CIAT. Colombia 2000.**

Bajo las condiciones en las cuales se realizó esta prueba y de acuerdo con la información suministrada por los investigadores de BIOTEC, las pruebas de “Leaf Dip” y “DAS-ELISA” fueron negativas (Anexo 12) para los virus GLRaV-1 (Virus del enrollamiento foliar del tipo 1), GVA (Corky bark o virus de la corteza corchosa) y GFLV (virus de la hoja en abanico) en las muestras de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) analizadas.

Los resultados de la prueba “Leaf Dip” no permiten asegurar que las muestras estuvieran libres de contaminación viral, ya que esta observación se pudo deber a que la concentración de las partículas virales en las muestras analizadas, pueden no ser suficientes para su observación bajo el microscopio. Por otra parte, los resultados de la prueba serológica “DAS-ELISA” (Anexo 12A) no permiten asegurar que no se presenten otros virus en el material estudiado; por lo tanto para la detección de virus pertenecientes a otros grupos, se requiere utilizar anticuerpos diferentes.

En cuanto al análisis de dsRNA, este proporcionó un resultado positivo para dos de las muestra enviadas, evidenciando dos bandas (Anexo 12B). Las dos bandas observadas indican presencia de dsRNA. Sin embargo, no se puede afirmar que haya posible contaminación viral porque las bandas son muy tenues (Anexo 12C) y no corresponden a ningún patrón viral conocido.

## 7.

## DISCUSION

### 7.1 ESTABLECIMIENTO

El bajo porcentaje de contaminación puede deberse al uso de fungicidas en el momento de recolectar el material vegetal en campo, los cuales pudieron haber eliminado contaminantes superficiales contribuyendo con el protocolo de desinfección utilizado en el laboratorio. En otros estudios de micropropagación en *Vitis* se han obtenido resultados similares a los descritos en este trabajo (Muñoz, 1997).

La contaminación observada puede ser atribuída a las características del material vegetal como son las pubescencias de las yemas, las cuales pueden reducir la eficiencia de los productos utilizados para la desinfección (Winkler, 1987; George, 1996).

El uso de ácido ascórbico y ácido cítrico durante el procedimiento de desinfección permitió reducir pérdidas por oxidación. De acuerdo con Debergh & Zimmermann (1991), el ácido ascórbico se oxida fácilmente por lo que disminuye el oxígeno aprovechable y evita la oxidación de otros compuestos, y el citrato prolonga la acción antioxidante del ácido ascórbico al inhibir la enzima que lo oxida (Ramírez, 1989).

Barlass & Skene (1980a); Thies & Graves (1992) y Baptista (1993), describen que la oxidación es una respuesta de hipersensibilidad de la planta en condiciones *in vitro*. Según Zaid (1987); Pierik (1990) y Debergh & Zimmerman (1991), la oxidación de los tejidos está relacionada con una reacción de resistencia por la acción de las polifenol oxidasas; es probable que el corte promueva la liberación de ácido clorogénico y ésteres fenólicos, los cuales sirven de sustrato a las enzimas polifenol oxidasas, que catalizan a su vez la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas; estas junto con lignina y suberina forman una barrera en las zonas de corte que impiden la invasión por microorganismos (Ramírez, 1989; Dixon & Paiba, 1995; Radi *et al.*, 1997).

La consistencia del medio no presentó diferencias en cuanto a oxidación, vitrificación, número de explantes que desarrollan brotes y longitud del explante. En contraste con estos resultados, George (1996) describe que la oxidación en cultivo *in vitro* se puede ver disminuída con la utilización de un medio de cultivo líquido, el cual puede facilitar la difusión de fenoles. Adicionalmente, Paques & Boxus (1987) en cultivos de manzana y Heloir *et al.* (1997) en cultivo de vid, obtuvieron mayor vitrificación en medio líquido que en medio sólido. Adicionalmente, varios autores mencionan que en medio líquido o en medio sólido con bajas concentraciones de agente gelificante se presenta hiperhidratación y mayor crecimiento de los explantes por una mayor disponibilidad de agua, nutrientes y reguladores de crecimiento (Pasqualetto, 1990; Ziv, 1991a;. Kataeva, 1991; Wetzstein *et al.* 1994 y Beruto *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en este trabajo con *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) se pueden atribuir a la concentración y tipo de agente gelificante utilizado (Phytigel®). De acuerdo con Owens & Wozniak (1991), este sustrato presenta un potencial mátrico más bajo con respecto a agentes gelificantes como el agar, haciendo más fácil y rápida la toma de nutrientes proporcionando características físicas similares a las de un medio líquido.

También, la concentración de sales en el medio de cultivo pudo afectar los resultados obtenidos; de acuerdo con Owens & Wozniak (1991), los coloides están sujetos a una desestabilización por altas concentraciones de sales, puesto que el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) disminuye la gelificación del sustrato, lo cual puede contribuir a reducir su dureza.

Adicional a los resultados relacionados con el efecto de las citoquininas sobre el crecimiento y desarrollo, se puede sugerir que estos reguladores de crecimiento pueden contribuir al incremento en la juvenilidad, lo cual conduce a una reducción en la

oxidación de tejidos de la variedad Müller Thurgau (*Vitis vinifera* L.) cultivados *in vitro* (Van Staden *et al.*, 1988).

Es probable que la adición de BA conduzca a un incremento en los niveles endógenos de citoquininas, proceso observado por Kataeva *et al.* (1991) en cultivos de brotes de diferentes especies en un medio con 4.4 y 22.1  $\mu\text{M}$  de BA. Varios autores han descrito en *Vitis* spp. el efecto del BA en la estimulación del crecimiento (Barlass & Skene, 1980; Ribeira *et al.*, 1985; Martinez & Tizio, 1989 y Heloir *et al.* (1997). Este proceso puede ser resultado de la movilización de iones  $\text{Ca}^{++}$  inducida por citoquininas, lo que genera un incremento en el transporte iónico hacia la pared, produciendo un descenso en la presión de turgencia y en el potencial hídrico; lo cual favorece la toma de agua y conduce a la expansión de la pared celular (Grabski & Schindler, 1996; Cosgrove, 1997; Poovaiah, 1988; Raven *et al.*, 1999).

En cuanto al efecto del TDZ solo y combinado con BA, en resultados obtenidos por Gray & Benton (1991) con *Vitis rotundifolia* y Guohua (1998) con *Casava* spp., se encontró que la aplicación de TDZ, a diferencia del BA, no presentó un efecto sobre la formación de brotes. Así mismo, la combinación puede incrementar el nivel endógeno de citoquininas favoreciendo la división celular más que la elongación. Chee & Pool (1985); Weyers (1996) y Peros *et al.*, (1998), afirman que las concentraciones, requerimientos y la sensibilidad a los reguladores varía según la especie y/o variedad. De igual manera, Blakesly & Constantine (1992) y Klerk *et al.* (1997) describen que las diferencias en la respuesta a dos citoquininas en condiciones idénticas de cultivo de brotes, se puede presentar por una variación en el metabolismo y en la incorporación de citoquininas al medio de cultivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las mayores concentraciones de BA causaron un incremento en la vitrificación;. Kataeva *et al* (1991) han reportado un aumento en la vitrificación por el uso de citoquininas, Cancellier & Cossio (1985), y Heloir *et al* (1997), observaron que al disminuir la concentración de BA se disminuía la

hiperhidratación en cultivo *in vitro* de vid. De igual manera, Gribaudo & Fronda (1991) observaron vitrificación en *Vitis vinifera* L. "Barbera" al suplementar el medio con TDZ.

De acuerdo con Phan & Hegedus (1986) y Matoo & Aharoni (1988), las citoquininas estimulan la producción de etileno, que al acumularse en el frasco de cultivo, disminuye los niveles de fenoles por una disminución de la acción de la fenil alanina amoniasa (PAL), enzima que cataliza la formación de polifenoles como la lignina, proceso que favorece la hiperhidratación al producir cambios en las propiedades elásticas de la pared por disminución de la presión de turgencia e incremento en la toma de agua por el tejido (Van Staden *et al.*, 1988; Sudarsono & Goldy, 1991; Gaspar, 1996).

La combinación de los tres factores (BA, TDZ y consistencia del medio), presentó un efecto significativo sobre esta variable, resultado similar al presentado por\_Ziv (1991a), quien afirma que las causas de la hiperhidratación son difíciles de explicar debido a que es el producto de varios factores, entre los cuales están la concentración del agente gelificante, los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y las altas concentraciones de citoquininas.

## 7.2 PROLIFERACION

El aumento del porcentaje de oxidación a través del tiempo en todos los tratamientos puede ser atribuido a que los subcultivos se realizaron con intervalos de tiempo prolongados (cinco a seis semanas). Thies & Graves (1992), encontraron en *Vitis rotundifolia*, que el tejido empieza a deteriorarse después de 4 semanas sin subcultivo; los autores sugieren que para prevenir la oxidación del tejido se deben hacer transferencias cada 3 semanas. Harris & Stevenson (1982) proponen un intervalo de 15 días para realizar subcultivos y Sudarsono & Goldy (1991), afirman que el tiempo de cultivo en un medio con TDZ puede ser crítico para la proliferación de tallos, ya que si



estos no se transfieren regularmente pueden presentar oxidación y senescencia atribuída a la producción de etileno. Se afirma que los subcultivos pueden producir un cambio gradual en la capacidad morfogénica de los explantes reflejando alteraciones en las condiciones de cultivo (Peros *et al.* 1998).

El control de la oxidación puede ser producto del uso de antioxidantes en solución durante la transferencia, y de la reducción de macronutrientes en el medio de cultivo (Ramírez, 1989 y Deberg & Zimmermann, 1991). Trabajos en *Pinus sylvestris* con la mitad de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ), y cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) en el medio de cultivo MS contribuyeron a disminuir la oxidación de los explantes cultivados *in vitro* (Hothola, 1988, citado por George, 1996).

Los desórdenes fisiológicos como la vitrificación se presentan en la hoja y en menor grado en tallos y raíces (Ziv, 1991a). Este fenómeno involucra un exceso en la toma de agua y una inhibición de síntesis de lignina y celulosa (Hartmann *et al.*, 1997) Adicionalmente, la susceptibilidad a la hiperhidratación puede variar con la especie o cultivar (Debergh *et al.*, 1992); esto se confirma por un estudio realizado en la variedad Riesling (*Vitis vinifera* L.) en las mismas condiciones del presente trabajo, en el cual se presentó un menor porcentaje de vitrificación (Mora, 2000).

En relación con el efecto de las citoquininas en el aumento de la vitrificación a través del tiempo, varios autores sugieren que una reducción en la concentración de BA puede disminuir la vitrificación pero en algunos casos afectar negativamente la proliferación (Cancellier & Cossio, 1985; Moncousin, 1991 y Heloir *et al.*, 1997).

El incremento del nivel endógeno de citoquininas puede mantener las células meristemáticas en continúa división (Van Standen & Crouch, 1996) sin la protección de la pared celular ya que esta no se sintetiza en forma adecuada; lo cual puede favorecer la difusión de agua dentro de las células e inducir elongación y vacuolización en la zona

meritemática, produciendo apariencia hiperhidratada y cambios estructurales en los brotes apicales (Kataeva *et al.*, 1991).

En cuanto al tiempo requerido para el inicio de la proliferación de brotes, autores como Lee & Wetzstein (1990) describen una tasa de proliferación baja durante los primeros 60 días de cultivo. Lewandowski (1991), obtuvo proliferación de brotes después de 2 meses en medio de cultivo con 4.5  $\mu\text{M}$  de BA, y sugiere que en este tiempo se presentan cambios morfológicos y reducción en el contenido endógeno de auxinas.

Las respuestas obtenidas con TDZ en las concentraciones evaluadas pueden ser atribuidas a diferencias en requerimientos y sensibilidad a este regulador de crecimiento y efecto del genotipo (Weyers *et al.*, 1996). Otros autores reportan efectos del TDZ en *Vitis vinifera* L. y *Vitis rotundifolia* sobre la formación de brotes múltiples y el número de nudos por brote en medios suplementados con este regulador en concentraciones de 0.01, 0.5 y 5  $\mu\text{M}$  (Gribaudo & Fronda, 1991 y Sudarsono & Goldy, 1991).

Durante la etapa de proliferación se observó un aumento gradual en el número de brotes formados con incrementos en la concentración de BA. Resultados similares fueron descritos por otros autores en *Vitis* spp., los cuales sugieren que la concentración óptima para la proliferación de brotes debe ser ajustada para cada especie y/o variedad (Barlass & Skene, 1980b; Chee & Pool, 1985; Gray & Benton, 1990; Büyükdermireci & Read, 1997 y Heloir *et al.*, 1997).

Las concentraciones de BA (3.15, 4.5 y 5  $\mu\text{M}$ ) tuvieron efecto sobre la formación de brotes axilares y adventicios. Otros autores han reportados resultados similares con otras variedades de *Vitis vinifera* L. (Barlass & Skene, 1978; Gribaudo & Fronda, 1991, Thies & Graves, 1992 y Heloir *et al.*, 1997). Adicionalmente, estas concentraciones indujeron la formación de callo. De acuerdo con Chee & Pool (1982), Guohua (1998) y

Zimmerman & Scarza (1994), el aumento en las divisiones celulares sin aumentó en la frecuencia de organogénesis induce la formación de callo.

La reducción en el número de brotes por explante con la combinación de BA y TDZ, se puede atribuir a un efecto del TDZ en la inhibición de la conversión del IAA en conjugados, resultando en un aumento de IAA libre, lo cual puede incrementar los niveles de etileno, reportado para varias especies como inhibidor del crecimiento (Hutchinson *et al.*, 1997).

En algunos casos se presentaron anomalías estructurales en los brotes apicales (fasciación), lo cual se puede atribuir a concentraciones de citoquininas y al uso de TDZ por períodos de tiempo prolongados (Van Nieuwkerk *et al.*, 1986; Huettman & Preece, 1993; Salisbury & Ross, 1994 y Bhagwat *et al.*, 1996;).

Lee & Wetztein (1990) en *Vitis rotundifolia* y Muñoz (1997) en *Vitis vinifera* L., mencionan que la adición de BA al medio de cultivo favorece la elongación de brotes. Esta respuesta se debe posiblemente al aumento en los niveles endógenos de citoquininas, producto de la aplicación exógena del BA (Kataeva *et al.*, 1991), que al inducir disminución de la presión de turgencia y del potencial hídrico favorecen la toma de agua y conducen a la expansión celular (Grabski & Schindler, 1996; Cosgrove, 1997; Poovaiah, 1998; Raven *et al.*, 1999).

El incremento en el número de nudos con la combinación de BA y TDZ a los 46 días de cultivo se pudo deber a la acción de las citoquininas y su efecto sobre la división celular (Miranov *et al.*, 1999; Raven *et al.*, 1999). Estos resultados son similares a los descritos por Sudarsono & Goldy (1991) en evaluaciones de la combinación de TDZ con BA, determinando su efectividad para el desarrollo de brotes de *Vitis rotundifolia*. Así mismo, este efecto sobre la división celular pudo incrementar gradualmente el número

de nudos durante esta fase en la medida que se aumentaba la concentración de BA en el rango evaluado.

Chee & Pool (1985) en el híbrido "Remaily Seedless", Büyükdemirci & Read (1997) en "Valiant" (*Vitis* spp.) y Peros *et al.* (1998) en híbridos de vid, describen el desarrollo de brotes con entrenudos cortos, en medios con la adición de 4.5 y 5  $\mu$ M de BA. Se afirma que la expansión del entrenudo es una consecuencia de un balance hormonal adecuado.

La necrosis observada en los brotes apicales puede ser un síntoma de deficiencia de calcio y boro (Winkler, 1987, Barghchi & Alderson, 1996; Taiz & Zeiger, 1998), y puede estar relacionado con una baja transpiración (condición del cultivo *in vitro*), lo cual conduce a un bajo flujo de nutrientes produciendo una deficiencia de minerales poco móviles (Taiz & Zeiger, 1998; Sanders *et al.*, 1999). Harris & Stevenson (1982) y Chee & Pool (1982), atribuyeron la necrosis apical en *Vitis* spp. a deficiencias nutricionales y sugirieron realizar subcultivos periódicos. Barghchi & Alderson (1996), al adicionar boro y cloruro de calcio disminuyeron la necrosis apical en *Pistacia vera* L.

### 7.3 ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACION

La capacidad para la producción de raíces espontáneamente, puede estar relacionada con la juvenilidad de la planta donadora de explantes, puesto que los tejidos juveniles tienen mayor capacidad de enraizamiento debido posiblemente a mayor contenido de auxinas (Moncousin, 1991 y De Klerk *et al.*, 1997). Adicionalmente, es importante considerar que los tejidos meristemáticos son los sitios de síntesis y liberación de auxinas, por lo cual pueden contener niveles adecuados para la producción de raíces.

Resultados contrarios a los obtenidos en este trabajo, indican requerimientos de auxinas exógenas para la producción de raíces adventicias en brotes de *Vitis* spp. Galzy, 1979;

Chee & Pool, 1982; Li & Eaton, 1984 y Gray & Benton 1991). Por otro lado, Harris & Stevenson (1982), Chee & Pool (1983) y Roubelakis-Angelakis & Zivanovite (1991), concluyen que la variabilidad en los resultados obtenidos en el enraizamiento de brotes en especies de vid depende del genotipo.

La producción de raíces *in vitro* pudo ser un factor que contribuyó al éxito durante la etapa de endurecimiento. Gribaudo *et al.* (1995), en un estudio realizado en Kober 5BB (*V. berlandieri* x *V. riparia*) concluyeron que más del 80% de las raíces formadas *in vitro* permanecieron después de la transferencia a suelo y continuaron su crecimiento, lo que favoreció la supervivencia de la planta en condiciones *ex vitro*.

Las condiciones utilizadas para el pre-endurecimiento favorecieron la inducción de raíces en *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner). Chee & Pool (1988), y Galzy *et al.* (1990), determinaron la efectividad de la reducción en la concentración de sacarosa al 1.5 % en la inducción de raíces, al obtener un 80-90% de brotes enraizados del híbrido “Remaily Seedless” y de la variedad “Pinot noir” (*V. vinifera* L.), respectivamente. De acuerdo con Fila *et al.* (1998) las altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo puede causar una futura inhibición en la fotosíntesis.

La reducción gradual en la humedad relativa, pudo favorecer el establecimiento de brotes de la variedad Müller Thurgau en condiciones *ex vitro*. Lewandowski (1991), afirma que durante la aclimatación ocurre una deposición gradual de pared celular, que junto con la respuesta de los estomas produce una disminución en la pérdida de agua, que conduce a la abscisión de hojas producidas *in vitro*. Sin embargo, esta disminución en la humedad relativa permite un desarrollo de hojas normales capaces de regular las relaciones hídricas de la planta (Chee & Pool 1982).

Otro factor que contribuyó al éxito durante el endurecimiento es la capacidad morfogenética de la variedad Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) en condiciones

naturales. Peros *et al.* (1998) afirman que las variedades que presentan un crecimiento vigoroso en campo pueden llegar a presentar altas tasas de proliferación y capacidad rizogénica *in vitro*.

## 8. CONCLUSIONES

- El proceso de desinfección superficial utilizado permitió el establecimiento de meristemos caulinares de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner).
- La utilización de antioxidantes (ácido ascórbico y ácido cítrico preparado en solución por filtración), durante la desinfección del material vegetal controló la oxidación de los explantes en la fase de establecimiento.
- El medio MS de consistencia sólida suplementado con 2.25  $\mu\text{M}$  de BA, es el más adecuado para el establecimiento de meristemos de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) cultivados *in vitro*.
- El medio MS de consistencia sólida suplementado con 5  $\mu\text{M}$  de BA es el más adecuado para la proliferación de brotes de la variedad Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) cultivados *in vitro*, obteniéndose la mayor tasa de proliferación: 2.6 brotes/meristemo/46 días
- El TDZ en las concentraciones evaluadas no estimula el crecimiento de brotes de la variedad Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner). Sin embargo, su combinación con BA puede incrementar el número de nudos.
- El medio MS con macronutrientes reducidos a la mitad, sacarosa al 1.5% y sin reguladores de crecimiento es apropiado para estimular elongación y enraizamiento de brotes de la variedad Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) cultivados *in vitro*.

- La turba utilizada como sustrato suministró las condiciones favorables para el endurecimiento de plantas de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) obtenidas por cultivo de meristemas caulinares.
- Se evidenció la capacidad morfogenética de la especie *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) y se diseñó un protocolo para la propagación clonal de plantas de esta variedad seleccionadas en campo por características agronómicas.
- En un tiempo de siete meses es posible obtener plantas aclimatadas micropropagadas a partir de meristemas.
- El BA es indispensable para estimular el crecimiento y desarrollo de explantes (meristemas y brotes) de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) cultivados *in vitro*.
- La variedad Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) es sensible a la vitrificación en condiciones *in vitro*.
- Se determinó mediante pruebas serológicas que el material de campo de la especie *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner), no presenta virus del enrollamiento foliar del tipo 1 (GLRaV-1), virus de la corteza corchosa (GVA) ni el virus de la hoja en abanico (GFLV).



## 9. RECOMENDACIONES

- Debido a la vitrificación observada se recomienda evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Phytigel® en el cultivo *in vitro* de meristemas de *Vitis vinifera* L., así como también mezclas de agentes gelificantes y diluciones de medios basales.
- Desarrollar experimentos con otras concentraciones de Thidiazuron durante la etapa de proliferación de meristemas de vid con el fin de optimizar la tasa de proliferación.
- Evaluar diferentes tiempos de subcultivo durante la fase de proliferación con el fin de encontrar intervalos de tiempo apropiados para lograr una mayor proliferación y mayor supervivencia de los explantes de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner).
- Diseñar experimentos para el endurecimiento de las plantas con el fin de optimizar el proceso de aclimatación de brotes de *Vitis vinifera* L. cv. Müller Thurgau (Riesling x Sylvaner) obtenidos *in vitro*.

## 10. BIBLIOGRAFIA

Alonso, J. 1999. La uva (*Vitis vinifera* L.). Monografía (Online). España. 7 dec. <URL:www.sinectis.com.ar/u/fitomedicina/RevMonografia.html> (consulta: 16 dec. 1999)

Arancibia M. A. 1980. Identificación de los virus asociados al enrollamiento de la hoja de la vid (*Vitis vinifera* L.) presentes en cv. Black Seedless y obtención de plantas limpias mediante termoterapia y cultivo de meristemos. Universidad de Chile.

Armitage, A. M. & J. M. Garner. 1999. Photoperiod and cooling duration influence growth and flowering of six herbaceous perennials. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 74:170-174.

Azcon-Bieto, J. & M. Talon. 1996. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana. España 1996. 555p.

Bhagwat B., L. G. E. Vieira & L. R. Erickson. 1996. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberelic acid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 46:1-7

Baptista, C. R., H. Kuniyuki, G. W. Muller & J.A. Betti. 1993. Obtencao de clones livres de virus de sete variedades de videira através da cultura de meristema em Sao Paulo. *Summa Phytopathological*. 19:96-98

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

Barlass, M. & K. G. M. Skene. 1980a. Studies on the fragment shoot apex of grapevine. I. The regenerative capacity of leaf primordial fragments *in vitro*. Journal of experimental botany. 31(121):489-495.

Barlass, M. & K. G. M. Skene. 1980b. Studies on the fragment shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation *in vitro*. Journal of Experimental Botany. 31(121):489-495.

Barlass, M., K. G. M. Skene & P. R. Clingeffer. 1980c. Studies on the fragment shoot apex of grapevine. III. A scanning electron microscope study of adventitious bud formation *in vitro*. Journal of Experimental Botany. 32(130):1079-1083.

Barlass, M., K. G. M. Skene, R. C. Woodham & L. R. Krake. 1982 Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. Annu. Appl. Biol. 101: 291-295.

Barghchi, M. & P. G. Alderson. 1996. The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L. *in vitro*. Plant Growth Regulation. 20:31-35.

Bayona, M. A. & X. Sánchez. 1992. Hongos fitopatógenos de importancia económica en plantas de *Vitis vinifera* L. variedad Riesling x Sylvaner en Boyacá. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. 135 p

Beruto M., D. Beruto & P. Debergh. 1999. Influence of agar on *in vitro* cultures: I. Physiochemical properties of agar and agar gelled media. In Vitro Cell. Dev Biol. Plant 35: 94-101.

Bhattacharyya, B. & B. M. Jhory. 1998. Flowering Plants Taxonomy and Phylogeny. Springer-Verlog. First edition. New Delhi. India 727 pp.

Blakesly, D., & D. Constantine. 1992. Uptake and metabolism of 6-Benzyladenine in shoot cultures of a range of species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28:183-186.

Brian, W. & W. Grout. 1999. Meristem tip culture for propagation and virus elimination. In: *Methods in Molecular Biology* Ed.: Hall, R.D., Vol. 111: *Plant Cell Culture Protocols*, Totowa, NJ 415 p.

Brock, T. D. & M. T. Madigan. 1993. *Microbiología*. 6ª Edición. Prentice Hall. México. 465p.

Büyükdemirci, H. & P. E. Read. 1997. The effects of growth regulators on shoot propagation and rooting of *Vitis* following *in vitro* axillary bud and shoot apex culture. *HortScience*. 32(3):515.

Cancellier, S. & F. Cossio. 1985. Field observations on three clones of "Corvinia veronese" (*Vitis vinifera* L.) multiplied by *in vitro* culture. En: *Symposium on in vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants*. Gembloux (Belgium)

Casal, M. & M. S. Pais. 1990. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. from "Vinho Verde" region of Portugal: A method for grapevine leafroll virus elimination. En: *Plant Aging. Basic and Applied Approaches*. Ed.: Rodriguez, R, R. Sanchez & D. J. Durzan.. Plenum Press. N.Y. 450 p.

Cassells, A. C., 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In: *Micropropagation technology and application*. Ed.: Debergh, P.C. & Zimmerman, R.H.,.. Kluwer Academic Publishers. USA. 479 p.

Chauvet, M., A. Reynier & V. Sotes. 1984. Manual de viticultura. Tercera edición. Ediciones Mundi prensa Madrid. 273 p.

Chee, R. & R. M. Pool. 1982. The effects of growth substances and photoperiod on development of shoot apices of *Vitis* cultures in vitro. *Scientia Horticulturae*. 16:17-27.

Chee, R., & R. M. Pool. 1983. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of previously defined cultured conditions to a selection of Genotypes. *Vitis*. 22:363-374

Chee, R. & R. M. Pool. 1985. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: The effect of organic substances on shoot multiplication. *Vitis*. 24:106-118.

Chee, R. & R. M. Pool. 1988. Sucrose and NAA influence growth of subcultured shoot and *in vitro* production of roots in *Vitis*. *HortScience*. 23(4):776.

Chen, J. G., H. Y. Zhao, X. Zhou, L. S. Mao & X. X. Chen. 1997. Changes in leaves of endogenous hormones in azalea released from apical dominance. *Journal of Horticultural Science*. 72 (4):583-591.

Cosgrove, D. J., 1997. Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell*. 9:1031- 1041.

Da Silva, A.T., M. Pasqual, J. S. & L. E. Correa. 1995. Aclimatao de plantas provenientes de cultura in vitro. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasilia, 30 (1): 49-53.

Debergh, P. C. & P. E. Read. 1991. Micropropagation. In: *Micropropagation Technology and Application*. Ed.: Debergh, P. C. & R. H. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. USA. 479 p.

Debergh, P. C. & R. H. Zimmerman. 1991. Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. USA. 479 p.

Deberg, P., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. Von Arnold, R. Zimmerman & M. ziv.1992. Reconsideration of the term "Vitrification" as used in micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 30:135-140.

De Klerk, G. J., B. Arnold-Schmitt, R. Lieberei & K.H. Newmann. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. Biologia Plantarum 29 (1):53-66.

Diaz, T., E. Gonzalez & M. V. Mosquera. 1995. The production of tendrils on shoots of *Vitis vinifera* L. cv. albariño cultivated *in vitro*. International Journal of Experimental Botany. 57(1):77-80

Dixon, R. A. & N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell. 7: 1085-1097.

During, H. & M. Harst. 1996. Stomatal behaviour, photosynthesis and photorespiration of *in vitro*-grown grapevines: Effects of light and CO<sub>2</sub>. Vitis. 35(4):163-167

Fila, G., J. Ghashghaie, J. Hoarau & G. Cornic., 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultures grapevine rootstock in relation to acclimatisation. Physiologia Plantarum. 102:411-418

Font Quer, P. 1993. Diccionario de Botánica. Tomo II. Editorial Labor S.A Barcelona España. 1244 p.

Forrest, W., F. W. Nutter. 1997. Temporal and spatial analysis of grapevine leafroll-associated Virus 3 in Pinot Noir grapevines in Australia. The American Phytopathological Society. Plant Disease. 81:625-628

Galet, P. 1977. Les maladies et les parasites de la Vigne. Tome I. 4<sup>e</sup> édition Pisan Du Midi. Montpellier 687 p.

Galzy, R. 1979. La culture *in vitro* des apex de *Vitis rupestris*. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 274. serie D: 210-214.

Galzy, R., V. Haffner & D. Compan. 1990. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings. Journal of experimental botany. 41(224):295-301

Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid & T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell Developmental Biology Plant. 32:272-289.

Geneve, R. L. & C.W. Heuser. 1982. The effect of IAA, IBA, NAA, and 2,4-D on root promotion and Ethylene Evolution in *Vigna radiata* cuttings. Journal American Society Horticultural Science. 107(2):202-205.

George, E. F. 1996. Plant propagation by tissue culture. Parte II. Exegetic Limited. Great Britain.

Guohua, Ma., 1998. Effects of Citoquinins and auxins on Cassava shoot organogenesis and somatic embriogenesis from somatic embryo explants. Plant cell Tissue and Organ Culture. 54:1-7

Grabski, S. & M. Schindler. 1996. Auxins and citoquinins as antipodal modulators of elasticity within the actin network of plant cells. *Plant Physiology*. 110:965-970

Gray D.J. & C. M. Benton. 1991. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 27:7-14.

Gribaudo, I., & A. Fronda. 1991. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. *HortScience*. 26(8):1083

Gribaudo, I., M.A. Morte & A. Schubert. 1995. Use of gential violet to differentiate *in vitro* and *ex vitro* formend roots during acclimatization of grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 41:187-188.

Guerrier-Julien, J., A. Deloir, & A. Coudret. 1996. Water relations in grapevine mivro-cuttings grown *in vitro*. *Biologia Plantarum*. 38(1):149-152.

Habili, N. & F. W. Nutter, Jr. 1997. Temporal and spatial analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in pinot noir grapevines in Australia. *Plant Disease*. 81:625-628.

Harris, R. E. & J. H. Stevenson. 1982. *In vitro* propagation of *Vitis*. *Vitis* 21:22-32.

Hartmann, H., D.E. Kester, F.T. Davies & R. Geneve. 1997. *Plant propagation principles and practices*. 6<sup>th</sup> edition. Prentice Hall Inc. New Jersey. 747 p.

Heloir, M. C., J. C. Fournioux, L. Oziol, & R. Bessis. 1997 An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary-bud microcuttings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 49:223-225



Hidalgo, L. 1979. Poda de la vid. 2ª edición, Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 365 p.

Hirsh, A. M. 1990. Interaction between genotype and developmental factors modifying peroxidase expresión. En: Plant aging: basic and applied approaches. Ed.: Rodriguez, R., R. Sanchez & D. J. Durzan. Plenum press, New York. 500 p

Huetteman, C. A. & J. C. Preece. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 33:105-119

Hutchinson, M. J., D. Murr, S. Krishnaraj, T. Senaratna, & P. K. Saxena. 1997. Does ethylene play a role in thidiazuron-regulated somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures?. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 33:136-141.

Jeong, B. R., K. Fujiwara & T. Kosai. 1995. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. En: *Horticultural Reviews* Ed.: Janick, J. John Wiley & Sons, Inc. 17: 125-172

Jona, R. & K. J. Webb. 1978. Callus and axillary-bud culture of *Vitis vinifera* "Sylvaner Riesling. *Scientia Horticulturae*.9:55-60.

Kataeva, N. V., I. G. Alexandrova, R. G. Butenko & E. V. Dragavtceva. 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Organ and Culture*. 27:149-154.

Kawaguchi, M. & K. Syono. 1996. The excessive production of indole-3-acetic acid and its significance in studies of the biosynthesis of this regulator of plant growth and developmental. *Plant Cell Physiology*. 37(8):1043-1048.

Kende, H. & J. A.D. Zeevaart. 1997. The Five "Classical" plant hormones. *The Plant Cell*. 9:1197-1210.

Kerstetter, R. A., & S. Hake. 1997. Shoot meristem formation in vegetative development. *The Plant Cell*. 9:1001-1010

Kyte, L. & J. L. Kleyn. 1996. *Plants from test tubes. An introduction to micropropagation*. 3<sup>rd</sup> edition. 239 p.

Krul, W. R., & G. H. Mowbray. 1984. Grapes. In: *Handbook of plant cell culture*. Ed. Sharp, W.R., P. A. Evans, P. V. Ammirato. Vol 2. Crop Species. (pp 396-434). Editorial Macmillan, N.Y. 641 pp.

Kulaeva, O. N. 1995. Perception and transduction of hormonal signals in plants: General survey of the topic and introduction to publication of the proceedings of the International Symposium "Plant Hormone Signal perception and transduction" (Moscow, 1994). *Russian Journal of Plant Physiology*. 42(5):585-594

Lee, N. & H. Y. Wetzstein. 1990. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. *Journal American Society Horticultural Science*. 115(2):324-329

Lewandowski, V. T. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* "Delaware". *HortScience*. 26(5):586-589

Li, J. R. & G. W. Eaton. 1984. Growth and rooting of grape shoot apex *in vitro*. *HortScience*. 19(1):64-66

Lizarraga, R., A. Panta, U. Jayasinghe, & J. Dodds. 1991. Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos. Guía de Investigación CIP (Centro Internacional de la Papa) Lima, Perú. 21 p.

Liviero, L., P. P. Puglisi, P. Morazzoni, & E. Bombardelli. 1994. Antimutagenic activity of procyanidins from *Vitis vinifera* L. Fitoterapia. 115(3):203:209.

Luttge, U., M. Kluge, G. Bauer. 1993. Botanica. Mc.GrawHill/Interamericana. España. 573 p.

Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Ediciones Mundi-Prensa. 2 edición. Madrid. 232 p.

Mannini, F., N. Argamente & R. Credi. 1999. Contribution of virus infections to clonal variability of some *Vitis vinifera* L. cultivars. Bulletin de l'O.I.V. 72(817-818):144-160.

Martinez, E., & R. Tizio. 1989. Grapevine micropropagation through shoot tips and minicuttings from *in vitro* cultures one-node cuttings. HortScience. 24 (3):513

Matoo, A. K., & N. Aharoni. 1988. Ethylene and plant senescence. En: Senescence and aging in plants. Ed.: L.D. Nooden & A. C. Leopold. Academic Press Inc. First edition. London. 242-461.

Mironov, V., L. De Veylder, M. Van Montagu, & D. Inze. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants-the nexus. The Plant Cell. 11:509-521.

Monis, J. & R. K. Bestwick. 1997. Serological detection of grapevine associated closteroviruses in infected grapevine cultivars. Plant Disease. 81:802-808.

Monette, P. L., D. James & S. E. Godkin. 1989. Comparison of RNA extracts from *in vitro* shoot tip cultures of leafroll-affected and leafroll-free grapevine cultivars. *Vitis*. 28: 229-235.

Moncousin, Ch. 1991. Rooting of microcuttings: general aspects. *Acta Horticulturae* 289: 301-327

Mok, M. C., & D. W. S. Mok. 1985. The metabolism of [<sup>14</sup>C]thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. *Physiology Plant*. 65:427-432

Mok, M. C., D. W. S. Mok, D. J. K. Armstrong, K. Shudo, Y. Isogai & T. Okamoto. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry*. 21:1509-1511

Mok, M. C., D. W. S. Mok, J. E. Turner, & C. V. Mujer. 1987 Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*. 22:1194-1196

Mora, L. D. 2000. Adaptación de técnicas del cultivo de meristemos para la micropropagación de *Vitis vinifera* L. v. Riesling. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. 101 p.

Muñoz, L. A. 1997. Estandarización de un método de limpieza y propagación *in vitro* de variedades promisorias de uva para el Valle del Cauca. Tesis de Pregrado. Universidad del Valle. 101 p.

Murashige, T & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plntarum*, 15:473-497

Murch, S. J., S. Krishnaraj & P. K. Saxena. 1997. Thidiazuron-induced morphogenesis of Regal Geranium (*Pelargonium domesticum*): A potential stress response. *Physiologia Plantarum*. 101:183-191

Namba, S., D. Boscia, O. Azzam, M. Maixner, J. S. Hu, D. Golino & D. Gonsalves. 1991. Purification and properties of closterovirulike particles associated with grapevine corky bark disease. *Phytopathology*. 81: 964-970.

Nieuwkerk, J. P., R. H. Zimmerman, & I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *HortScience*. 21(3):515-518

Owens, L. D. & C. A. Wozniak. 1991. Measurement and effect of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultures sugarbeet leaf disc. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 26:127-133.

Pasqualetto, P. L. 1990. Vitrification in plant tissue culture. En: *Plant Aging and Applied Approaches*. Ed.: Rodríguez, R., R. Sánchez & D. J. Durzan. Plenum Press. N.Y. 133-140 p.

Paques, M. & P. H. & Boxus. 1987. Vitrification: review of literature. *Acta Horticulturae*. 212, 155-164p.

Pearson, R. C. & A. C. Goheen. 1998. *Compendium of grape diseases*. The American Phytopathological Society. Fourth edition. 93 p.

Peros, J. P., L. Torregrosa, & G. Berger. 1998. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. *Journal of experimental Botany*. 49 (319):171-179.

Phan, C. T. & P. Hegedus. 1986. Possible metabólic basis for the developmental anomaly observed in in vitro culture, called "vitreous plants". *Plant Cell Tissue Organ Culture Culture*. 6:83-94.

Pierik, R. L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores Editorial Mundi Prensa. España. 151p.

Poovaliah, B. W. 1988. Calcium and senescence. En: *Senescence and aging in plants*. Ed.: L.D. Nooden & A.C. Leopold. Academic Press Inc. 1 edición. Londres. 369-385.

Préstamo, G., & P. Manzano. 1993. Peroxidases of selected fruits and vegetables and possible use of ascorbic acid as an antioxidant. *HortScience* 28 (1):48-50.

Radi, M., M. Mahrouz, A. Jaouad, M. Tacchini, S. Aubert, M. Hugues, & M. J. Amiot. 1997. Phenolic composition, browning susceptibility, and carotenoid content of several apricot cultivars at maturity. *HortScience*. 32(6):1087-1091.

Ramírez, A. 1989. Estudios preliminares para la propagación clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus*). Tesis maestria. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía 134p.

Randall, A. K. & S. Hake. 1997. Shoot meristem formation in vegetative developmental. *The Plant Cell*.: 9:1001-1010.

Raven, P. H., R. F. Evert, & S. E. Eichhorn. 1999. *Biology of plants*. Sixth edition. W. H. Freeman and Company Worth Publishers. N.Y. 944p.

Ribeiro Da Silva, I., M. R. Sondahl, I. J. Riveiro, M. Monteiro, & E. Paioli. 1985. Cultura in vitro de meristemas de videira. I. Concentrações do Hormônio 6-BA em meio primário. *Bragantia*. Campinas. 44(1):473-479

Rivera, W. 1995. Efecto de la aplicación de un compensador de frío (Cianamida hidrogenada) en el cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) variedad Italia en las condiciones del Norte del Valle. Tesis pregrado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional. Bogotá Colombia. 71p.

Robacker C. D. & C. J. Chang. 1992. Shoot tip culture of Muscadine grape to eliminate Pierce's disease bacteria. *HortScience*. 27(5):449-450.

Roca, W. M. & L. A. Mroginski. (eds.). 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 397 p. Cali. Colombia.

Roubelakis-Angelakis, K. A., & S. B. Zivanovitch. 1991. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. *HortScience*. 26(12):1551-1553.

Salazar, R. 2000. Sondeo de posibles agentes causales de enfermedades de etiología viral de la vid. Tesis en preparación. USI. Unidad de sistemas de información, Corporación BIOTEC. Cali. Colombia.

Salisbury, F. & C. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Segunda edición. Grupo Editorial Iberoamericana. México 759p.

Sanders D., C. Brownlee, & J. F. Harper. 1999. Communicating with calcium. *The Plant Cell*. 11:691-706

Schumann, G. L. 1998. Plant diseases: their biology and social impact. Third edición. APS PRESS. U.S.A. 397 pp.

Schwars, J.L., P.L. Glocke & M. Sedgley. 1999. Adventitious root formation in *Acacia baileyana* F. Muell. Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 74(5):561-565

Singha, S., & S. K. Bhatia. 1988. Shoot proliferation of pear cultures on medium containing thidiazuron and benzilamino purine. HortScience. 23:803.

Sudarsono, & R. G. Goldy. 1991. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment on *Vitis rotundifolia*. HortScience. 26:304-307

Sun-Gro Horticulture. 1999. Boletín de información- Mezclas profesionales SUNSHINE 15 p.

Sussex, I. M. 1989. Developmental programming of the shoot meristem. Cell. 56:225-229

Taiz, L., & E. Zeiger. 1998. Plant Physiology. Second Edition. Sinauer Associates.Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 792 p.

Thies, K. L., & H. C. Graves. 1992. Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia* michx. HortScience. 27(5):447-449

Thomas, P. 1999. Relation between tissue growth, CO<sub>2</sub> level and tendril formation during *in vitro* culture of grape (*Vitis vinifera* L.) Vitis. 38(1):25-29

Thomas, P., & M. B. Ravindra. 1997a. Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic



exudation, explant survival and axenic culture establishment. *Journal of Horticultural Science*. 72(5): 713-722

Thomas, P. & M. B. Ravindra. 1997b. Effect of pruning or removal of *in vitro* formed roots on *ex vitro* root regeneration and growth in micropropagated grapes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 51:177-181.

Trippi, V. S. 1990. Aging of meristems and morphogenetic potentialities. In: *Plant aging and applied approaches*. Ed.: Rodriguez, R., R. Sanchez & D. J. Durzan. Plenum Press. N.Y. 500 p.

Van Huhlenbroeck, J. M. & J. De Riek. 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "Petite plantlets. *Plant Science* 111:19-25.

Van Nieuwkerk, J. P, R. H. Zimmerman & I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *HortScience*. 21(3):516-518.

Van Staden, J., E. L. Cook & L. D Nooden. 1988. Cytokinins and senescence. In: *Senescence and aging in plants*. Ed.: L. D. Nooden & A. C. Leopold. Academic Press Inc. Primary edición. Londres. 282-312

Van Staden, J., & N. R. Crouch. 1996. Benzyladenine and derivatives-their significance and interconversion in plants. *Plant Growth Regulation*. 19:153-175

Villar, J. J. 1996. Efecto de elementos climáticos en diferentes estados fenológicos con productividad en la vid *Vitis vinifera* L. variedad Queen en condiciones de la Union

Valle del Cauca. Tesis de pregrado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional. Colombia 70pp.

Wang, P. J. & C. Y. Hu. 1980. Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. In: Advances in biochemical engineering. Ed.: Fiechter. Springer Berlin.

Weyers, J. D. B., N. W. Paterson, R. A'Brook & Z-Y. Peng. 1995. Quantitative analysis of the control of the physiological phenomena by plant hormones. *Physiologia Plantarum*. 95: 486-494.

Wetzstein, H. Y., C. Kim & H. E. Sommer. 1994. Vessel volume, gelling agent, and basal salts affect pH and gel strength of autoclaved tissue culture media. *HortScience*. 29(6):683-685.

Wilcox, W. F., Z. Y. Jiang, & D. Gonsalves. 1998. Leafroll virus is common in cultivated american grapevines in western New York. *Plant Disease*. 82(9):1062

Winkler, A. J. 1987. *Viticultura moderna*. Editorial Cecsá. México. 769pp.

Zaid, A. 1987. *In vitro* browning of tissues and media with especial emphasis to datepalm cultures-a review. In: *In vitro* problems related to mass propagation of horticultural plants. *Acta Horticulturae* 212: 561-566.

Zambrano, C. M. & J. C. Alonso 1991. Rentabilidad de la producción de vinos en Punta Larga. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia 142 p.

Zimmerman, T. W. & R. Scorza. 1994. Benzyladenine and shortened light/dark cycles improve *in vitro* shoot proliferation of peach. *HortScience*. 29(6):698.

Ziv, M. 1991a. Quality of micropropagated plants. Vitrification. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.* 27:64-69

Ziv, M. 1991b. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: *Micropropagation Technology and Application*. Ed.: Debergh, P. C. & Zimmerman, R. H. Kluwer Academic Publishers. USA. 479 p.

**ANEXO 1:** Composición del medio nutritivo Murashige & Skoog (MS) (1962) utilizado

(mg/l)

**Macronutrientes**

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370

**Micronutrientes**

KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.2
Na <sub>2</sub> .EDTA	37.3

**Sustancias orgánicas**

Myo-Inositol	100
Tiamina-HCL	0.1
Acido Nicotínico	0.5
HCL-Pyridoxina	2
Glicina	30

## ANEXO 2.



### RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS

1. Identificación de plantas en campo o *in vitro* de posible contaminación viral.
2. Relacionar la sintomatología observada con la que se encuentra referenciada bibliográficamente.
3. Cada muestra debe ser marcada, igual que la fuente (planta contaminada), fotografiando sus síntomas más característicos.
4. El tejido debe ser preferiblemente joven, entre 8 a 15 días después de la poda. Si fuese el caso que el cultivo no se encontrara en poda se deben tomar los tejidos meristemáticos (y posteriormente se deben tomar tejidos después de la poda), estos tejidos son ideales para la indización viral y para la extracción de partículas virales.
5. Los tejidos con síntomas son ideales para el estudio citopatológico bajo la técnica de microscopía electrónica.

Los virus deben extraerse de las partes de las plantas donde se encuentren en mayor concentración. Las virosis que se localizan en los tejidos parenquimatosos generalmente se purifican a partir de las hojas, mientras que para las virosis localizadas en tejidos de conducción, como el floema, se purifican desde raíces y tallos.

Las plantas con síntomas sistémicos a la infección viral son más adecuadas para los procesos de purificación que las que manifiestan lesiones locales.

6. El corte de los tejidos se puede realizar manual o con ayuda de cuchilla (en caso, de la utilización de cuchilla, se debe desinfectar después de cada corte con hipoclorito de sodio al 60%), e introducirlo en bolsa de polietileno con su respectiva etiqueta y mantenerla a 6°C (cámara con hielo). En el laboratorio se puede mantener refrigerada por 72 horas.

**ANEXO 3. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LAS VARIABLES EVALUADAS EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO, TOMANDO COMO FACTORES; CONSISTENCIA DEL MEDIO, BA Y TDZ.**

**Oxidación (%)**

SOURCE	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- ration	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Consistencia del medio	1562.22	1	1562.22	2.80	0.0956
B: BA	24158.8	3	8052.93	14.41	0.000
C: TDZ	9661.62	2	4830.81	8.64	0.0002
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	1881.24	3	627.081	1.12	0.3403
AC	1971.59	2	985.793	1.76	0.1732
BC	183117.9	6	3052.99	5.46	0.0000
ABC	5568.25	6	928.042	1.66	0.1304
RESIDUAL	166541.0	298	558.862		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	230658.0	321			

Los valores P menores 0.05, son factores que tienen un efecto significativo estadísticamente sobre la oxidación, con un 95.0 % de confiabilidad

**Número de explantes vitrificados**

SOURCE	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- ration	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Consistencia del medio	0.402875	1	0.402875	1.81	0.1790
B: BA	3.70499	3	1.235	5.56	0.0010
C: TDZ	1.25301	2	0.626506	2.82	0.0611
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	2.28013	3	0.760042	3.42	0.0176
AC	0.132423	2	0.066211	0.30	0.7424
BC	2.99838	6	0.49973	2.25	0.0386
ABC	3.12684	6	0.52114	2.35	0.0314
RESIDUAL	66.1744	298	0.222062		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	80.4876	321			

Los valores P menores 0.05, son factores que tienen un efecto significativo estadísticamente sobre la vitrificación, con un 95.0 % de confiabilidad.

### Número de explantes que desarrollan brotes

SOURCE	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- ration	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Consistencia del medio	1.12044	1	1.12044	1.97	0.1614
B: BA	25.3455	3	8.44849	14.86	0.0000
C: TDZ	0.884681	2	0.442341	0.78	0.4603
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	0.915012	3	0.305004	0.54	0.6577
AC	0.003359	2	0.001679	0.00	0.9971
BC	6.80388	6	1.133973	1.99	0.0663
ABC	4.04773	6	0.674622	1.19	0.3133
RESIDUAL	169.449	298	0.56862		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	210.388	321			

Los valores P menores 0.05, son factores que tienen un efecto significativo estadísticamente sobre la formación de brotes con un 95.0 % de confiabilidad

### Longitud del explante (mm)

SOURCE	Sum of Squares	DF	Mean Square	F- ration	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A: Consistencia	13,7324	1	13,7324	1,07	0.3012
B: BA	621,058	3	207,019	16,17	0.000
C: TDZ	33,7012	2	16,8506	1,32	0.2697
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	61,5745	3	20.5248	1,60	0.1887
AC	1,16389	2	0,5819	0.5	0.9556
BC	171,77	6	28,6284	2,24	0.0398
ABC	165,406	6	27,5677	2,15	0.0475
RESIDUAL	3814,9	298	12,8017		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	4909,1	321			

Los valores P menores 0.05, son factores que tienen un efecto significativo estadísticamente sobre la longitud con un 95.0 % de confiabilidad.

**ANEXO 4. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LAS VARIABLES EVALUADAS EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO, TOMANDO COMO FACTOR LOS TRATAMIENTOS.**

VARIABLES dependientes: Oxidación (%), Número de explantes vitrificados, Número de explantes que desarrollan brotes y longitud del explante (mm).

Factor: tratamiento

Niveles: 24

Observaciones: 322

La prueba ANOVA descompone la variabilidad de los tratamientos en las contribuciones de los diferentes factores, es decir de las diferentes concentraciones de BA y TDZ. El valor P, prueba la significancia estadística de cada uno de estos factores. Si este valor es  $\leq 0.05$ , el factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre cada una de las variables, con un intervalo de confianza

**Oxidación (%)**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	64160.3	23	2789.58	4.99	0.0000
Within groups	166568.0	298	558.952		
Total (Corr.)	230728.0	321			

**Número de explantes vitrificados**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	14.3132	23	0.622314	2.80	0.0000
Within groups	66.1744	298	0.222062		
Total (Corr.)	80.4876	321			

**Número de explantes que desarrollan brotes**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	41.4563	23	1.80245	3.16	0.0000
Within groups	169.749	298	0.569627		
Total (Corr.)	211.205	321			



### Longitud del explante (mm)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1112.05	23	48.35	3.77	0.0000
Within groups	3824.56	298	12.8341		
Total (Corr.)	4936.61	321			

### ANEXO 5. PRUEBA DE COMPARACION DE MEDIAS (FISHER) PARA LAS VARIABLES EVALUADAS EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO.

Este método es usado para discriminar entre medias de los tratamientos por el procedimiento de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD), con un intervalo de confianza del 95%.

### OXIDACION (%)

Test de rango múltiple por tratamiento para la variable oxidación

Número de observaciones: 322

Número de niveles: 24

Método: 95.0 % LSD

Tratamiento	Conteo	Media	Grupos homogeneos
22	12	3.33333	a
3	15	5.33333	a
14	10	6.0	ab
23	13	6.15385	a
21	12	6.66667	ab
16	12	6.66667	ab
13	10	8.0	ab
10	15	8.0	ab
8	15	8.0	ab
15	12	8.33333	ab
11	15	9.33333	ab
7	15	12.0	abc
19	12	13.3333	abc
4	15	13.3333	abc
9	15	17.3333	abcd
20	12	18.3333	abcd
24	13	20.0	abcd
1	15	21.3333	abcd
12	15	24.0	bcde
17	12	30.0	cdef
5	15	33.3333	def
2	15	38.6667	ef
6	15	48.0	fg

En la siguiente tabla se contrastan las medias de cada tratamiento y se determina cual media es estadísticamente diferente de la otra; el asterisco indica que ese par de medias difieren estadísticamente una de la otra a un nivel de confiabilidad del 95%; de esta manera, se establece para la variable **oxidación (%)**, 7 grupos de medias homogéneos (ver tabla anterior en la parte superior de la página), identificados con las letras **a, b, c, d, e, f y g**; dentro de cada grupo no hay diferencias estadísticas.

Contraste	Diferencia	+/-Límites	Contraste	Diferencia	+/-Límites
1 - 2	*-17.3333	16.9892	3 - 11	-4.0	16.9892
1 - 3	16.0	16.9892	3 - 12	*-18.6667	16.9892
1 - 4	8.0	16.9892	3 - 13	-2.66667	18.9945
1 - 5	-12.0	16.9892	3 - 14	-0.666667	18.9945
1 - 6	*-26.6667	16.9892	3 - 15	-3.0	18.0198
1 - 7	9.33333	16.9892	3 - 16	-1.33333	18.0198
1 - 8	13.3333	16.9892	3 - 17	*-24.6667	18.0198
1 - 9	4.0	16.9892	3 - 18	*-53.0	18.0198
1 - 10	13.3333	16.9892	3 - 19	-8.0	18.0198
1 - 11	12.0	16.9892	3 - 20	-13.0	18.0198
1 - 12	-2.66667	16.9892	3 - 21	-1.33333	18.0198
1 - 13	13.3333	18.9945	3 - 22	2.0	18.0198
1 - 14	15.3333	18.9945	3 - 23	-0.820513	18.0198
1 - 15	13.0	18.0198	3 - 24	-14.6667	17.6305
1 - 16	14.6667	18.0198	4 - 5	*-20.0	16.9892
1 - 17	-8.66667	18.0198	4 - 6	*-34.6667	16.9892
1 - 18	*-37.0	18.0198	4 - 7	1.33333	16.9892
1 - 19	8.0	18.0198	4 - 8	5.33333	16.9892
1 - 20	3.0	18.0198	4 - 9	-4.0	16.9892
1 - 21	14.6667	18.0198	4 - 10	5.33333	16.9892
1 - 22	18.0	18.0198	4 - 11	4.0	16.9892
1 - 23	15.1795	17.6305	4 - 12	-10.6667	18.9945
1 - 24	1.33333	17.6305	4 - 13	5.33333	18.9945
2 - 3	*33.3333	16.9892	4 - 14	7.33333	18.9945
2 - 4	*25.3333	16.9892	4 - 15	5.0	18.0198
2 - 5	5.33333	16.9892	4 - 16	6.66667	18.0198
2 - 6	-9.33333	16.9892	4 - 17	-16.6667	18.0198
2 - 7	*26.6667	16.9892	4 - 18	*-45.0	18.0198
2 - 8	*30.6667	16.9892	4 - 19	0.0	18.0198
2 - 9	*21.3333	16.9892	4 - 20	-5.0	18.0198
2 - 10	*30.6667	16.9892	4 - 21	6.66667	18.0198
2 - 11	*29.3333	16.9892	4 - 22	10.0	18.0198
2 - 12	14.6667	16.9892	4 - 23	7.17949	17.6305
2 - 13	*30.6667	18.9945	4 - 24	-6.66667	17.6305
2 - 14	*32.6667	18.9945	5 - 6	-14.6667	16.9892
2 - 15	*30.3333	18.0198	5 - 7	*21.3333	16.9892
2 - 16	*32.0	18.0198	5 - 8	*25.3333	16.9892
2 - 17	8.66667	18.0198	5 - 9	16.0	16.9892
2 - 18	*-19.6667	18.0198	5 - 10	*25.3333	16.9892
2 - 19	*25.3333	18.0198	5 - 11	*24.0	16.9892
2 - 20	*20.3333	18.0198	5 - 12	9.33333	16.9892
2 - 21	*32.0	18.0198	5 - 13	*25.3333	18.9945

2 - 22	*35.3333	18.0198	5 - 14	*27.3333	18.9945
2 - 23	*32.5128	17.6305	5 - 15	*25.0	18.0198
2 - 24	*18.6667	17.6305	5 - 16	*26.6667	18.0198
3 - 4	-8.0	16.9892	5 - 17	3.33333	18.0198
3 - 5	*-28.0	16.9892	5 - 18	*-25.0	18.0198
3 - 6	*-42.6667	16.9892	5 - 19	*20.0	18.0198
3 - 7	-6.66667	16.9892	5 - 20	15.0	18.0198
3 - 8	-2.66667	16.9892	5 - 21	*26.6667	18.0198
3 - 9	-12.0	16.9892	5 - 22	*30.0	18.0198
3 - 10	-2.66667	16.9892	5 - 23	*27.1795	17.6305
<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>
5 - 24	13.3333	17.6305	9- 10	9.33333	16.9892
6 - 7	*36.0	16.9892	9 - 11	8.0	16.9892
6 - 8	*40.0	16.9892	9 - 12	-6.66667	16.9892
6 - 9	*30.6667	16.9892	9 - 13	9.33333	18.9945
6 - 10	*40.0	16.9892	9 - 14	11.3333	18.9945
6 - 11	*38.6667	16.9892	9 - 15	18.9945	18.0198
6 - 12	*24.0	16.9892	9 - 16	10.6667	18.0198
6 - 13	*40.0	18.9945	9 - 17	-12.6667	18.0198
6 - 14	*42.0	18.9945	9 - 18	*-41.0	18.0198
6 - 15	*39.6667	18.0198	9 - 19	4.0	18.0198
6 - 16	*41.3333	18.0198	9 - 20	-1.0	18.0198
6 - 17	18.0	18.0198	9 - 21	10.6667	18.0198
6 - 18	-10.3333	18.0198	9 - 22	14.0	18.0198
6 - 19	*34.6667	18.0198	9 - 23	11.1795	17.6305
6 - 20	*29.6667	18.0198	9 - 24	-2.66667	17.6305
6 - 21	6 - 21	18.0198	10 - 11	-1.33333	16.9892
6 - 22	*44.6667	18.0198	10- 12	-16.0	16.9892
6 - 23	*41.8462	17.6305	10- 13	0.0	18.9945
6 - 24	*28.0	17.6305	10 - 14	2.0	18.9945
7 - 8	4.0	16.9892	10- 15	-0.333333	18.0198
7 - 9	-5.33333	16.9892	10- 16	1.33333	18.0198
7 - 10	4.0	16.9892	10- 17	*-22.0	18.0198
7 - 11	2.66667	16.9892	10- 18	*-50.3333	18.0198
7 - 12	-12.0	16.9892	10- 19	-5.33333	18.0198
7 - 13	4.0	18.9945	10- 20	-10.3333	18.0198
7 - 14	6.0	18.9945	10- 21	1.33333	18.0198
7 - 15	3.66667	18.0198	10- 22	4.66667	18.0198
7 - 16	5.33333	18.0198	10- 23	1.84615	17.6305
7 - 17	-18.0	18.0198	10- 24	-12.0	17.6305
7 - 18	*-46.3333	18.0198	11- 12	-14.6667	16.9892
7 - 19	-1.33333	18.0198	11- 13	1.33333	18.9945
7 - 20	-6.33333	18.0198	11 - 14	3.33333	18.9945
7 - 21	5.33333	18.0198	11- 15	1.0	18.0198
7 - 22	8.66667	18.0198	11- 16	2.66667	18.0198
7 - 23	5.84615	17.6305	11- 17	*-20.6667	18.0198
7 - 24	-8.0	17.6305	11- 18	*-49.0	18.0198
8 - 9	-9.33333	16.9892	11- 19	-4.0	18.0198
8 - 10	0.0	16.9892	11- 20	-9.0	18.0198
8 - 11	-1.33333	16.9892	11- 21	2.66667	18.0198
8 - 12	-16.0	16.9892	11- 22	6.0	18.0198
8 - 13	0.0	18.9945	11- 23	3.17949	17.6305
8 - 14	2.0	18.9945	11- 24	-10.6667	17.6305

8- 15	-0.333333	18.0198	12- 13	16.0	18.9945
8- 16	1.33333	18.0198	12 - 14	18.0	18.9945
8- 17	*-22.0	18.0198	12- 15	15.6667	18.0198
8- 18	*-50.3333	18.0198	12- 16	17.3333	18.0198
8 - 19	-5.33333	18.0198	12- 17	-6.0	18.0198
8 - 20	-10.3333	18.0198	12- 18	*-34.3333	18.0198
8 - 21	1.33333	18.0198	12- 19	10.6667	18.0198
8 - 22	4.66667	18.0198	12- 20	5.66667	18.0198
8 - 23	1.84615	17.6305	12- 21	17.3333	18.0198
8 - 24	-12.0	17.6305	12- 22	*20.6667	18.0198
<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>
12 - 23	*17.8462	17.6305	16- 19	-6.66667	18.9945
12 - 24	4.0	17.6305	16- 20	-11.6667	18.9945
13 - 14	2.0	20.8074	16- 21	0.0	18.9945
13- 15	-0.333333	19.9216	16- 22	3.33333	18.9945
13- 16	1.33333	19.9216	16- 23	0.512821	18.6256
13- 17	*-22.0	19.9216	16- 24	-13.3333	18.6256
13- 18	*-50.3333	19.9216	17- 18	*-28.3333	18.9945
13- 19	-5.33333	19.9216	17- 19	16.6667	18.9945
13- 20	-10.3333	19.9216	17- 20	11.6667	18.9945
13- 21	1.33333	19.9216	17- 21	*23.3333	18.9945
13- 22	4.66667	19.9216	17- 22	*26.6667	18.9945
13- 23	1.84615	19.5702	17- 23	*23.8462	18.6256
13- 24	-12.0	19.5702	17- 24	10.0	18.6256
14- 15	-2.33333	19.9216	18- 19	*45.0	18.9945
14- 16	-0.666667	19.9216	18- 20	*40.0	18.9945
14- 17	*-24.0	19.9216	18- 21	*51.6667	18.9945
14- 18	*-52.3333	19.9216	18- 22	*55.0	18.9945
14- 19	-7.33333	19.9216	18- 23	*52.1795	18.6256
14- 20	-12.3333	19.9216	18- 24	*38.3333	18.6256
14- 21	-0.666667	19.9216	19- 20	-5.0	18.9945
14- 22	2.66667	19.9216	19- 21	6.66667	18.9945
14- 23	-0.153846	19.5702	19- 22	10.0	18.9945
14- 24	-14.0	19.5702	19- 23	7.17949	18.6256
15- 16	1.66667	18.9945	19- 24	-6.66667	18.6256
15- 17	*-21.6667	18.9945	20- 21	11.6667	18.9945
15- 18	*-50.0	18.9945	20- 22	15.0	18.9945
15- 19	-5.0	18.9945	20- 23	12.1795	18.6256
15- 20	-10.0	18.9945	20- 24	-1.66667	18.6256
15- 21	1.66667	18.9945	21- 22	3.33333	18.9945
15- 22	5.0	18.9945	21- 23	0.512821	18.6256
15- 23	2.17949	18.6256	21- 24	-13.3333	18.6256
15- 24	-11.6667	18.6256	22 - 23	-2.82051	18.6256
16- 17	*-23.3333	18.9945	22 - 24	-16.6667	18.6256
16- 18	*-51.6667	18.9945	23 - 24	-13.8462	18.2493

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

## NUMERO DE EXPLANTES VITRIFICADOS

Test de rango múltiple por tratamiento para la variable vitrificación

Numero de observaciones: 322

Numero de niveles: 24

-----  
 Metodo: 95.0 % LSD

Tratamiento	Conteo	Media	Grupos homogeneos
17	12	0.0833333	a
2	15	0.1333333	ab
18	12	0.1666667	abc
20	12	0.25	abcd
6	15	0.2666667	abcd
1	15	0.4	abcde
3	15	0.4	abcde
21	12	0.4166667	abcde
24	13	0.461538	bcdef
5	15	0.4666667	bcdef
14	10	0.5	bcdefgh
22	12	0.5	cdefg
16	12	0.5	cdefg
8	15	0.5333333	defgh
19	12	0.5833333	defgh
12	15	0.6	defgh
4	15	0.6	defgh
23	13	0.615385	defgh
9	15	0.6666667	efgh
13	10	0.7	efgh
10	15	0.7333333	efgh
11	15	0.8	fgh
15	12	0.8333333	gh
7	15	0.8666667	h

En la siguiente tabla se contrastan las medias de cada tratamiento y se determina cual media es estadísticamente diferente de la otra; el asterisco indica que ese par de medias difieren estadísticamente una de la otra a un nivel de confiabilidad del 95%; de esta manera, se establece para la variable **número de explantes vitrificados**, 8 grupos de medias homogeneos (ver tabla anterior en la parte superior de la página), identificados con las letras **a, b, c, d, e, f, g y h**; dentro de cada grupo no hay diferencias estadísticas.

<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>
1 - 2	0.266667	0.338628	3 - 11	*-0.4	0.338628
1 - 3	0.0	0.338628	3 - 12	-0.2	0.338628
1 - 4	-0.2	0.338628	3 - 13	-0.3	0.378597
1 - 5	-0.066667	0.338628	3 - 14	-0.1	0.378597
1 - 6	0.133333	0.338628	3 - 15	*-0.433333	0.359169
1 - 7	*-0.466667	0.338628	3 - 16	-0.1	0.359169
1 - 8	-0.133333	0.338628	3 - 17	0.316667	0.359169
1 - 9	-0.266667	0.338628	3 - 18	0.233333	0.359169
1 - 10	-0.333333	0.338628	3 - 19	-0.183333	0.359169
1 - 11	*-0.4	0.338628	3 - 20	0.15	0.359169
1 - 12	-0.2	0.338628	3 - 21	-0.016667	0.359169
1 - 13	-0.3	0.378597	3 - 22	-0.1	0.359169
1 - 14	-0.1	0.378597	3 - 23	-0.215385	0.351411
1 - 15	*-0.433333	0.359169	3 - 24	-0.0615385	0.351411
1 - 16	-0.1	0.359169	4 - 5	0.133333	0.338628
1 - 17	0.316667	0.359169	4 - 6	0.333333	0.338628
1 - 18	0.233333	0.359169	4 - 7	-0.266667	0.338628
1 - 19	-0.183333	0.359169	4 - 8	0.066667	0.338628
1 - 20	0.15	0.359169	4 - 9	-0.066667	0.338628
1 - 21	-0.016667	0.359169	4 - 10	-0.133333	0.338628
1 - 22	-0.1	0.359169	4 - 11	-0.2	0.338628
1 - 23	-0.215385	0.351411	4 - 12	0.0	0.338628
1 - 24	-0.0615385	0.351411	4 - 13	-0.1	0.378597
2 - 3	-0.266667	0.338628	4 - 14	0.1	0.378597
2 - 4	*-0.466667	0.338628	4 - 15	-0.233333	0.359169
2 - 5	-0.333333	0.338628	4 - 16	0.1	0.359169
2 - 6	-0.133333	0.338628	4 - 17	*0.516667	0.359169
2 - 7	*-0.733333	0.338628	4 - 18	*0.433333	0.359169
2 - 8	*-0.4	0.338628	4 - 19	0.016667	0.359169
2 - 9	*-0.533333	0.338628	4 - 20	0.35	0.359169
2 - 10	*-0.6	0.338628	4 - 21	0.183333	0.359169
2 - 11	*-0.666667	0.338628	4 - 22	0.1	0.359169
2 - 12	*-0.466667	0.338628	4 - 23	-0.0153846	0.351411
2 - 13	*-0.566667	0.378597	4 - 24	0.138462	0.351411
2 - 14	-0.366667	0.378597	5 - 6	0.2	0.338628
2 - 15	*-0.7	0.359169	5 - 7	*-0.4	0.338628
2 - 16	*-0.366667	0.359169	5 - 8	-0.066667	0.338628
2 - 17	0.05	0.359169	5 - 9	-0.2	0.338628
2 - 18	-0.0333333	0.359169	5 - 10	-0.266667	0.338628
2 - 19	*-0.45	0.359169	5 - 11	-0.333333	0.338628
2 - 20	-0.116667	0.359169	5 - 12	-0.133333	0.338628
2 - 21	-0.283333	0.359169	5 - 13	-0.233333	0.378597
2 - 22	*-0.366667	0.359169	5 - 14	-0.0333333	0.378597
2 - 23	*-0.482051	0.351411	5 - 15	*-0.366667	0.359169
2 - 24	-0.328205	0.351411	5 - 16	-0.0333333	0.359169
3 - 4	-0.2	0.338628	5 - 17	*0.383333	0.359169
3 - 5	-0.066667	0.338628	5 - 18	0.3	0.359169
3 - 6	0.133333	0.338628	5 - 19	-0.116667	0.359169
3 - 7	*-0.466667	0.338628	5 - 20	0.216667	0.359169

3 - 8	-0.133333	0.338628	5 - 21	0.05	0.359169
3 - 9	-0.266667	0.338628	5 - 22	-0.0333333	0.359169
3 - 10	-0.333333	0.338628	5 - 23	-0.148718	0.359169
<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>
5 - 24	0.00512821	0.351411	9 - 10	-0.0666667	0.338628
6 - 7	*-0.6	0.338628	9 - 11	-0.133333	0.338628
6 - 8	-0.266667	0.338628	9 - 12	0.0666667	0.338628
6 - 9	*-0.4	0.338628	9 - 13	-0.0333333	0.378597
6 - 10	*-0.466667	0.338628	9 - 14	0.166667	0.378597
6 - 11	*-0.533333	0.338628	9 - 15	-0.166667	0.359169
6 - 12	-0.333333	0.338628	9 - 16	0.166667	0.359169
6 - 13	*-0.433333	0.378597	9 - 17	*0.583333	0.359169
6 - 14	-0.233333	0.378597	9 - 18	*0.5	0.359169
6 - 15	*-0.566667	0.359169	9 - 19	0.0833333	0.359169
6 - 16	-0.233333	0.359169	9 - 20	*0.416667	0.359169
6 - 17	0.183333	0.359169	9 - 21	0.25	0.359169
6 - 18	0.1	0.359169	9 - 22	0.166667	0.359169
6 - 19	-0.316667	0.359169	9 - 23	0.0512821	0.351411
6 - 20	0.0166667	0.359169	9 - 24	0.205128	0.351411
6 - 21	-0.15	0.359169	10 - 11	-0.0666667	0.338628
6 - 22	-0.233333	0.359169	10 - 12	0.133333	0.338628
6 - 23	-0.348718	0.351411	10 - 13	0.0333333	0.338628
6 - 24	-0.194872	0.351411	10 - 14	0.233333	0.338628
7 - 8	0.333333	0.338628	10 - 15	-0.1	0.359169
7 - 9	0.2	0.338628	10 - 16	0.233333	0.359169
7 - 10	0.133333	0.338628	10 - 17	*0.65	0.359169
7 - 11	0.0666667	0.338628	10 - 18	*0.566667	0.359169
7 - 12	0.266667	0.338628	10 - 19	0.15	0.359169
7 - 13	0.166667	0.378597	10 - 20	*0.483333	0.359169
7 - 14	0.366667	0.378597	10 - 21	0.316667	0.359169
7 - 15	0.0333333	0.359169	10 - 22	0.233333	0.359169
7 - 16	*0.366667	0.359169	10 - 23	0.117949	0.351411
7 - 17	*0.783333	0.359169	10 - 24	0.271795	0.351411
7 - 18	*0.7	0.359169	11 - 12	0.2	0.338628
7 - 19	0.283333	0.359169	11 - 13	0.1	0.378597
7 - 20	*0.616667	0.359169	11 - 14	0.3	0.378597
7 - 21	*0.45	0.359169	11 - 15	-0.0333333	0.359169
7 - 22	*0.366667	0.359169	11 - 16	0.3	0.359169
7 - 23	0.251282	0.351411	11 - 17	*0.716667	0.359169
7 - 24	*0.405128	0.351411	11 - 18	*0.633333	0.359169
8 - 9	-0.133333	0.338628	11 - 19	0.216667	0.359169
8 - 10	-0.2	0.338628	11 - 20	*0.55	0.359169
8 - 11	-0.266667	0.338628	11 - 21	*0.383333	0.359169
8 - 12	-0.0666667	0.338628	11 - 22	0.3	0.359169
8 - 13	-0.166667	0.378597	11 - 23	0.184615	0.351411
8 - 14	0.0333333	0.378597	11 - 24	0.338462	0.359169
8 - 15	-0.3	0.359169	12 - 13	-0.1	0.378597
8 - 16	0.0333333	0.359169	12 - 14	0.1	0.378597
8 - 17	*0.45	0.359169	12 - 15	-0.233333	0.359169
8 - 18	*0.366667	0.359169	12 - 16	0.1	0.359169
8 - 19	-0.05	0.359169	12 - 17	*0.52	0.359169
8 - 20	0.283333	0.359169	12 - 18	*0.433333	0.359169
8 - 21	0.116667	0.359169	12 - 19	0.0166667	0.359169

8 - 22	0.0333333	0.359169	12- 20	0.35	0.359169
8 - 23	-0.0820513	0.351411	12- 21	0.183333	0.359169
8 - 24	0.0717949	0.351411	12- 22	0.1	0.359169
<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>
12 - 23	-0.0153846	0.351411	16- 19	-0.0833333	0.378597
12 - 24	0.138462	0.351411	16- 20	0.25	0.378597
13 - 14	0.2	0.414733	16- 21	0.0833333	0.378597
13- 15	-0.133333	0.397076	16- 22	0.0	0.378597
13- 16	0.2	0.397076	16- 23	-0.115385	0.378597
13- 17	*0.616667	0.397076	16- 24	0.0384615	0.378597
13- 18	*0.533333	0.397076	17- 18	-0.0833333	0.378597
13- 19	0.116667	0.397076	17- 19	*-0.5	0.378597
13- 20	*0.45	0.397076	17- 20	-0.166667	0.378597
13- 21	0.283333	0.397076	17- 21	-0.333333	0.378597
13- 22	0.2	0.397076	17- 22	*-0.416667	0.378597
13- 23	0.0846154	0.397076	17- 23	*-0.532051	0.378597
13- 24	0.238462	0.397076	17- 24	*-0.378205	0.378597
14- 15	-0.333333	0.397076	18- 19	*-0.416667	0.378597
14- 16	0.0	0.397076	18- 20	-0.0833333	0.378597
14- 17	*0.416667	0.397076	18- 21	-0.25	0.378597
14- 18	0.333333	0.397076	18- 22	-0.333333	0.378597
14- 19	-0.0833333	0.397076	18- 23	*-0.448718	0.378597
14- 20	0.25	0.397076	18- 24	-0.294872	0.378597
14- 21	0.0833333	0.397076	19- 20	0.333333	0.378597
14- 22	0.0	0.397076	19- 21	0.166667	0.378597
14- 23	-0.115385	0.397076	19- 22	0.0833333	0.378597
14- 24	0.0384615	0.397076	19- 23	-0.0320513	0.378597
15- 16	0.333333	0.378597	19- 24	0.121795	0.378597
15- 17	*0.75	0.378597	20- 21	-0.166667	0.378597
15- 18	*0.666667	0.378597	20- 22	-0.25	0.378597
15- 19	0.25	0.378597	20- 23	-0.365385	0.378597
15- 20	*0.583333	0.378597	20- 24	-0.211538	0.378597
15- 21	*0.416667	0.378597	21- 22	-0.0833333	0.378597
15- 22	0.333333	0.378597	21- 23	-0.198718	0.378597
15- 23	0.217949	0.378597	21- 24	-0.0448718	0.378597
15- 24	*0.371795	0.378597	22 - 23	-0.115385	0.378597
16- 17	*0.416667	0.378597	22 - 24	0.0384615	0.378597
16- 18	0.333333	0.378597	23 - 24	0.153846	0.363744

\* denota una diferencia estadísticamente significante.



## NUMERO DE EXPLANTES QUE DESARROLLAN BROTES

Test de múltiples rangos por tratamiento para la variable formación de brotes

Número de observaciones: 322

Número de niveles: 24

-----  
Método: 95.0 % LSD

Tratamiento	Conteo	Media	Grupos homogéneos
-------------	--------	-------	-------------------

2	15	0.2	a
18	12	0.25	ab
17	12	0.25	ab
6	15	0.533	abc
24	13	0.538	abc
21	12	0.583	abc
5	15	0.6	abc
23	13	0.6153	abc
16	12	0.666	abc
14	10	0.666	abc
13	10	0.7	abc
1	15	0.733	abc
8	15	0.7333	abc
9	15	0.7333	abc
20	12	0.75	abc
12	15	0.8	bc
4	15	0.8	bc
3	15	0.8	bc
22	12	0.8333	c
11	15	0.8666	c
19	12	0.91667	c
7	15	0.9333	c
10	15	0.9333	c
15	12	1	c

En la siguiente tabla se contrastan las medias de cada tratamiento y se determina cual media es estadísticamente diferente de la otra; el asterisco indica que ese par de medias difieren estadísticamente una de la otra a un nivel de confiabilidad del 95%; de esta manera, se establece para la variable **número de explantes que desarrollan brotes**, 3 grupos de medias homogéneas (ver tabla anterior en la parte superior de la página), identificados con las letras **a**, **b** y **c**; dentro de cada grupo no hay diferencias estadísticas.

<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>
1 - 2	0.5330	0.542351	3 - 11	0.0666667	0.542351
1 - 3	-0.06	0.542351	3 - 12	0.333333	0.542351
1 - 4	-0.06	0.542351	3 - 13	0.566667	0.606367
1 - 5	0.13	0.542351	3 - 14	0.134	0.575251
1 - 6	0.2	0.542351	3 - 15	-0.15	0.575251
1 - 7	- 0.2	0.542351	3 - 16	0.55	0.575251
1 - 8	0.0	0.542351	3 - 17	0.55	0.575251
1 - 9	0.0	0.542351	3 - 18	1.01667	0.575251
1 - 10	0.2	0.542351	3 - 19	0.1	0.575251
1 - 11	-0.13	0.542351	3 - 20	0.516667	0.575251
1 - 12	-0.06	0.542351	3 - 21	0.35	0.575251
1 - 13	0.033	0.606367	3 - 22	0.0166667	0.575251
1 - 14	0.067	0.606367	3 - 23	0.497436	0.562825
1 - 15	-0.26	0.575251	3 - 24	0.497436	0.562825
1 - 16	0.067	0.575251	4 - 5	0.4	0.542351
1 - 17	-0.1836	0.575251	4 - 6	0.533333	0.542351
1 - 18	-0.017	0.575251	4 - 7	-0.0666667	0.542351
1 - 19	0.15	0.575251	4 - 8	0.133333	0.542351
1 - 20	-0.1	0.575251	4 - 9	-0.0666667	0.542351
1 - 21	0.11	0.575251	4 - 10	-0.133	0.542351
1 - 22	0.195	0.575251	4 - 11	-0.133333	0.542351
1 - 23	0.11	0.575251	4 - 12	0.133333	0.542351
1 - 24	0.195	0.562825	4 - 13	0.366667	0.606367
2 - 3	*-1.06667	0.542351	4 - 14	0.466667	0.606367
2 - 4	*-0.866667	0.542351	4 - 15	-0.35	0.575251
2 - 5	-0.466667	0.542351	4 - 16	-0.0166667	0.575251
2 - 6	-0.333333	0.542351	4 - 17	0.555	0.575251
2 - 7	*-0.933333	0.542351	4 - 18	0.555	0.575251
2 - 8	-0.433333	0.542351	4 - 19	-0.1	0.575251
2 - 9	-0.433333	0.542351	4 - 20	0.316667	0.575251
2 - 10	*-0.733	0.542351	4 - 21	0.15	0.575251
2 - 11	*-0.666	0.542351	4 - 22	-0.183333	0.575251
2 - 12	*-0.6	0.542351	4 - 23	0.297436	0.575251
2 - 13	-0.5	0.606367	4 - 24	0.297436	0.562825
2 - 14	-0.4	0.606367	5 - 6	0.133333	0.542351
2 - 15	*-0.8	0.575251	5 - 7	-0.466667	0.542351
2 - 16	-0.46	0.575251	5 - 8	-0.266667	0.542351
2 - 17	-0.133333	0.575251	5 - 9	-0.466667	0.542351
2 - 18	-0.05	0.575251	5 - 10	-0.33	0.542351
2 - 19	*-0.7166	0.575251	5 - 11	-0.533333	0.542351
2 - 20	-0.55	0.575251	5 - 12	-0.266667	0.542351
2 - 21	-0.383	0.575251	5 - 13	-0.0333333	0.606367
2 - 22	*-0.633	0.575251	5 - 14	0.0666667	0.606367
2 - 23	-0.4153	0.562825	5 - 15	-0.4	0.575251
2 - 24	-0.333	0.562825	5 - 16	-0.416667	0.575251
3 - 4	0.2	0.542351	5 - 17	0.333333	0.575251
3 - 5	0.2	0.542351	5 - 18	0.416667	0.575251
3 - 6	0.267	0.542351	5 - 19	-0.5	0.575251
3 - 7	0.133333	0.542351	5 - 20	-0.0833333	0.575251
3 - 8	0.333333	0.542351	5 - 21	-0.25	0.575251

3 - 9	0.133333	0.542351	5 - 22	-0.233	0.575251
3 - 10	-0.4	0.542351	5 - 23	-0.102564	0.562825
<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>
5 - 24	-0.102564	0.562825	9 - 10	-0.533333	0.542351
6 - 7	-0.4	0.542351	9 - 11	-0.0666667	0.542351
6 - 8	-0.4	0.542351	9 - 12	0.2	0.542351
6 - 9	-0.2	0.542351	9 - 13	0.433333	0.606367
6 - 10	-0.4	0.542351	9 - 14	0.533333	0.606367
6 - 11	-0.333	0.542351	9 - 15	-0.283333	0.575251
6 - 12	-0.4	0.542351	9 - 16	0.05	0.575251
6 - 13	-0.166667	0.606367	9 - 17	*0.8	0.575251
6 - 14	-0.0666667	0.606367	9 - 18	*0.883333	0.575251
6 - 15	-0.467	0.575251	9 - 19	-0.0333333	0.575251
6 - 16	-0.55	0.575251	9 - 20	0.383333	0.575251
6 - 17	0.2	0.575251	9 - 21	0.216667	0.575251
6 - 18	0.283333	0.575251	9 - 22	-0.116667	0.575251
6 - 19	-0.383	0.575251	9 - 23	0.364103	0.562825
6 - 20	-0.216667	0.575251	9 - 24	0.364103	0.575251
6 - 21	-0.383333	0.575251	10 - 11	0.466667	0.542351
6 - 22	-0.3	0.575251	10 - 12	0.133	0.542351
6 - 23	-0.235897	0.562825	10 - 13	0.2333	0.606367
6 - 24	-0.235897	0.562825	10 - 14	0.2677	0.606367
7 - 8	0.2	0.542351	10 - 15	0.25	0.575251
7 - 9	0.0	0.542351	10 - 16	0.267	0.575251
7 - 10	-0.533333	0.542351	10 - 17	*0.683	0.575251
7 - 11	-0.0666667	0.542351	10 - 18	*0.683	0.575251
7 - 12	0.2	0.542351	10 - 19	0.5	0.575251
7 - 13	0.433333	0.606367	10 - 20	0.18333	0.575251
7 - 14	0.533333	0.606367	10 - 21	0.35	0.575251
7 - 15	-0.283333	0.575251	10 - 22	0.416667	0.575251
7 - 16	0.05	0.575251	10 - 23	0.317736	0.562825
7 - 17	*0.683	0.575251	10 - 24	0.395436	0.562825
7 - 18	*0.683	0.575251	11 - 12	0.266667	0.542351
7 - 19	-0.0333333	0.575251	11 - 13	0.5	0.606367
7 - 20	0.383333	0.575251	11 - 14	0.6	0.606367
7 - 21	0.216667	0.575251	11 - 15	-0.216667	0.575251
7 - 22	-0.116667	0.575251	11 - 16	0.116667	0.575251
7 - 23	0.364103	0.562825	11 - 17	*0.616667	0.575251
7 - 24	0.364103	0.562825	11 - 18	*0.616667	0.575251
8 - 9	-0.2	0.562825	11 - 19	0.0333333	0.575251
8 - 10	-0.2	0.542351	11 - 20	0.45	0.575251
8 - 11	-0.266667	0.542351	11 - 21	0.283333	0.575251
8 - 12	0.0	0.542351	11 - 22	-0.05	0.575251
8 - 13	0.233333	0.606367	11 - 23	0.430769	0.562825
8 - 14	0.333333	0.606367	11 - 24	0.430769	0.562825
8 - 15	-0.483333	0.575251	12 - 13	0.233333	0.606367
8 - 16	-0.15	0.575251	12 - 14	0.333333	0.606367
8 - 17	0.483	0.575251	12 - 15	-0.483333	0.575251
8 - 18	0.483	0.575251	12 - 16	-0.15	0.575251
8 - 19	-0.233333	0.575251	12 - 17	0.55	0.575251
8 - 20	0.183333	0.575251	12 - 18	0.55	0.575251
8 - 21	0.0166667	0.575251	12 - 19	-0.233333	0.575251
8 - 22	-0.316667	0.575251	12 - 20	0.183333	0.575251

8 - 23	0.164103	0.562825	12- 21	0.0166667	0.575251
8 - 24	0.164103	0.562825	12- 22	-0.316667	0.575251
<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>
12 - 23	0.164103	0.562825	16- 19	-0.0833333	0.606367
12 - 24	0.164103	0.562825	16- 20	0.333333	0.606367
13 - 14	0.1	0.664242	16- 21	0.166667	0.606367
13- 15	-0.3	0.635963	16- 22	-0.166667	0.606367
13- 16	-0.383333	0.635963	16- 23	0.314103	0.594592
13- 17	0.366667	0.635963	16- 24	0.314103	0.594592
13- 18	0.45	0.635963	17- 18	0.0833333	0.606367
13- 19	-0.466667	0.635963	17- 19	*-0.6666	0.606367
13- 20	-0.05	0.635963	17- 20	-0.416667	0.606367
13- 21	-0.216667	0.635963	17- 21	-0.583333	0.606367
13- 22	-0.55	0.635963	17- 22	*-0.583	0.606367
13- 23	-0.0692308	0.624746	17- 23	-0.435897	0.594592
13- 24	-0.0692308	0.624746	17- 24	-0.435897	0.594592
14- 15	-0.334	0.635963	18- 19	*-0.666	0.606367
14- 16	-0.483333	0.635963	18- 20	-0.5	0.606367
14- 17	0.266667	0.635963	18- 21	-0.3333	0.606367
14- 18	0.35	0.635963	18- 22	*-0.583	0.606367
14- 19	-0.566667	0.635963	18- 23	-0.519231	0.594592
14- 20	-0.15	0.635963	18- 24	-0.519231	0.594592
14- 21	-0.316667	0.635963	19- 20	0.416667	0.606367
14- 22	-0.167	0.635963	19- 21	0.25	0.606367
14- 23	-0.169231	0.624746	19- 22	-0.0833333	0.606367
14- 24	-0.169231	0.624746	19- 23	0.397436	0.594592
15- 16	0.333333	0.606367	19- 24	0.397436	0.594592
15- 17	*0.75	0.606367	20- 21	-0.166667	0.606367
15- 18	*0.75	0.606367	20- 22	-0.5	0.606367
15- 19	0.25	0.606367	20- 23	-0.0192308	0.594592
15- 20	0.25	0.606367	20- 24	-0.0192308	0.594592
15- 21	0.5	0.606367	21- 22	-0.333333	0.606367
15- 22	0.166667	0.606367	21- 23	0.147436	0.594592
15- 23	0.3847	0.594592	21- 24	0.147436	0.594592
15- 24	0.4627436	0.594592	22 - 23	0.480769	0.594592
16- 17	0.41675	0.606367	22 - 24	0.480769	0.594592
16- 18	0.41675	0.606367	23 - 24	0.0	0.582579

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

## LONGITUD DEL EXPLANTE (mm)

Test de rango múltiple por tratamiento para la variable longitud

Número de observaciones: 322

Número de niveles: 24

-----  
 Methodo: 95.0 % (LSD)

Tratamiento	Conteo	Media	Grupos homogeneos
-------------	--------	-------	-------------------

6	15	2.43333	a
2	15	2.46667	a
18	12	2.5	ab
14	10	2.6	ab
17	12	2.625	ab
1	15	2.83333	ab
13	10	3.2	abc
9	15	3.33333	abc
12	15	3.4	abc
5	15	3.53333	abc
20	12	3.58333	abcd
7	15	4.86667	abcde
4	15	5.0	abcde
8	15	5.2	bcde
19	12	5.29167	bcdef
23	13	5.61538	cdef
11	15	5.63333	cdef
21	12	6.41667	defg
22	12	6.5	efg
24	13	6.61538	efg
15	12	6.66667	efg
3	15	7.06667	efg
16	12	8.08333	fg
10	15	8.53333	g

En la siguiente tabla se contrastan las medias de cada tratamiento y se determina cual media es estadísticamente diferente de la otra; el asterisco indica que ese par de medias difieren estadísticamente una de la otra a un nivel de confiabilidad del 95%; de esta manera, se establece para la variable **longitud del explante (mm)**, 7 grupos de medias homogeneos (ver tabla anterior en la parte superior de la página), identificados con las letras **a, b, c, d, e, f y g**; dentro de cada grupo no hay diferencias estadísticas.

<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>
1 - 2	0.366667	2.57435	3 - 11	1.43333	2.57435
1 - 3	*-4.23333	2.57435	3 - 12	*3.66667	2.57435
1 - 4	-2.16667	2.57435	3 - 13	*3.86667	2.87822
1 - 5	-0.7	2.57435	3 - 14	*4.46667	2.87822
1 - 6	0.4	2.57435	3 - 15	0.4	2.73052
1 - 7	-2.03333	2.57435	3 - 16	-1.01667	2.73052
1 - 8	-2.36667	2.57435	3 - 17	*4.44167	2.73052
1 - 9	-0.5	2.57435	3 - 18	*4.56667	2.73052
1 - 10	*-5.7	2.57435	3 - 19	1.775	2.73052
1 - 11	*-2.8	2.57435	3 - 20	*3.48333	2.73052
1 - 12	-0.566667	2.57435	3 - 21	0.65	2.73052
1 - 13	-0.366667	2.87822	3 - 22	0.566667	2.73052
1 - 14	0.233333	2.87822	3 - 23	1.45128	2.67153
1 - 15	*-3.83333	2.73052	3 - 24	0.451282	2.67153
1 - 16	*-5.25	2.73052	4 - 5	1.46667	2.57435
1 - 17	0.208333	2.73052	4 - 6	2.56667	2.57435
1 - 18	0.333333	2.73052	4 - 7	0.133333	2.57435
1 - 19	-2.45833	2.73052	4 - 8	-0.2	2.57435
1 - 20	-0.75	2.73052	4 - 9	1.66667	2.57435
1 - 21	*-3.58333	2.73052	4 - 10	*-3.53333	2.57435
1 - 22	*-3.66667	2.73052	4 - 11	-0.633333	2.57435
1 - 23	*-2.78205	2.67153	4 - 12	1.6	2.57435
1 - 24	*-3.78205	2.67153	4 - 13	1.8	2.87822
2 - 3	*-4.6	2.57435	4 - 14	2.4	2.87822
2 - 4	-2.53333	2.57435	4 - 15	-1.66667	2.73052
2 - 5	-1.06667	2.57435	4 - 16	*-3.08333	2.73052
2 - 6	0.0333333	2.57435	4 - 17	2.375	2.73052
2 - 7	-2.4	2.57435	4 - 18	2.5	2.73052
2 - 8	*-2.73333	2.57435	4 - 19	-0.291667	2.73052
2 - 9	-0.866667	2.57435	4 - 20	1.41667	2.73052
2 - 10	6.06667	2.57435	4 - 21	-1.41667	2.73052
2 - 11	*-3.16667	2.57435	4 - 22	-1.5	2.73052
2 - 12	-0.933333	2.57435	4 - 23	-0.615385	2.67153
2 - 13	-0.733333	2.87822	4 - 24	-1.61538	2.67153
2 - 14	-0.133333	2.87822	5 - 6	1.1	2.57435
2 - 15	*-4.2	2.73052	5 - 7	-1.33333	2.57435
2 - 16	*-5.61667	2.73052	5 - 8	-1.66667	2.57435
2 - 17	-0.158333	2.73052	5 - 9	0.2	2.57435
2 - 18	-0.0333333	2.73052	5 - 10	*-5.0	2.57435
2 - 19	*-2.825	2.73052	5 - 11	-2.1	2.57435
2 - 20	1.11667	2.73052	5 - 12	0.133333	2.57435
2 - 21	*-3.95	2.73052	5 - 13	0.333333	2.87822
2 - 22	*-4.03333	2.73052	5 - 14	0.933333	2.87822
2 - 23	*-3.14872	2.67153	5 - 15	*-3.13333	2.73052
2 - 24	*-4.14872	2.67153	5 - 16	*-4.55	2.73052
3 - 4	2.06667	2.57435	5 - 17	0.908333	2.73052
3 - 5	*3.53333	2.57435	5 - 18	1.03333	2.73052
3 - 6	*4.63333	2.57435	5 - 19	-1.75833	2.73052
3 - 7	2.2	2.57435	5 - 20	-0.05	2.73052

3 - 8	1.86667	2.57435	5 - 21	*-2.88333	2.73052
3 - 9	*3.73333	2.57435	5 - 22	*-2.96667	2.73052
3 - 10	-1.46667	2.57435	5 - 23	-2.08205	2.67153
<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Límites</b>
5 - 24	*-3.08205	2.67153	9 - 10	*-5.2	2.57435
6 - 7	-2.43333	2.57435	9 - 11	-2.3	2.57435
6 - 8	*-2.76667	2.57435	9 - 12	-0.0666667	2.57435
6 - 9	-0.9	2.57435	9 - 13	0.133333	2.87822
6 - 10	*-6.1	2.57435	9 - 14	0.733333	2.87822
6 - 11	*-3.2	2.57435	9 - 15	*-3.33333	2.73052
6 - 12	2.36667	2.57435	9 - 16	*-4.75	2.73052
6 - 13	-0.766667	2.87822	9 - 17	0.708333	2.73052
6 - 14	-0.166667	2.87822	9 - 18	0.833333	2.73052
6 - 15	*-4.23333	2.73052	9 - 19	-1.95833	2.73052
6 - 16	*-5.65	2.73052	9 - 20	-0.25	2.73052
6 - 17	-0.191667	2.73052	9 - 21	*-3.08333	2.73052
6 - 18	-0.0666667	2.73052	9 - 22	*-3.16667	2.73052
6 - 19	*-2.85833	2.73052	9 - 23	-2.28205	2.67153
6 - 20	-1.15	2.73052	9 - 24	*-3.28205	2.67153
6 - 21	*-3.98333	2.73052	10 - 11	*2.9	2.57435
6 - 22	*-4.06667	2.73052	10 - 12	*5.13333	2.57435
6 - 23	*-3.18205	2.67153	10 - 13	*5.33333	2.87822
6 - 24	*-4.18205	2.67153	10 - 14	*5.93333	2.87822
7 - 8	-0.333333	2.57435	10 - 15	1.86667	2.73052
7 - 9	1.53333	2.57435	10 - 16	0.45	2.73052
7 - 10	*-3.66667	2.57435	10 - 17	*5.90833	2.73052
7 - 11	-0.766667	2.57435	10 - 18	*6.03333	2.73052
7 - 12	1.46667	2.57435	10 - 19	*3.24167	2.73052
7 - 13	1.66667	2.87822	10 - 20	*4.95	2.73052
7 - 14	2.26667	2.87822	10 - 21	2.11667	2.73052
7 - 15	-1.8	2.73052	10 - 22	2.03333	2.73052
7 - 16	*-3.21667	2.73052	10 - 23	*2.91795	2.67153
7 - 17	2.24167	2.73052	10 - 24	1.91795	2.67153
7 - 18	2.36667	2.73052	11 - 12	2.23333	2.57435
7 - 19	-0.425	2.73052	11 - 13	2.43333	2.87822
7 - 20	1.28333	2.73052	11 - 14	*3.03333	2.87822
7 - 21	-1.55	2.73052	11 - 15	-1.03333	2.73052
7 - 22	-1.63333	2.73052	11 - 16	-2.45	2.73052
7 - 23	-0.748718	2.67153	11 - 17	*3.00833	2.73052
7 - 24	-1.74872	2.67153	11 - 18	*3.13333	2.73052
8 - 9	1.86667	2.57435	11 - 19	0.341667	2.73052
8 - 10	*-3.33333	2.57435	11 - 20	2.05	2.73052
8 - 11	-0.433333	2.57435	11 - 21	0.783333	2.73052
8 - 12	1.8	2.57435	11 - 22	0.866667	2.73052
8 - 13	2.0	2.87822	11 - 23	0.0179487	2.67153
8 - 14	2.6	2.87822	11 - 24	-0.982051	2.67153
8 - 15	-1.46667	2.73052	12 - 13	0.2	2.87822
8 - 16	*-2.88333	2.73052	12 - 14	0.8	2.87822
8 - 17	2.575	2.73052	12 - 15	-2.21538	2.73052
8 - 18	2.7	2.73052	12 - 16	*-4.68333	2.73052
8 - 19	-0.0916667	2.73052	12 - 17	0.775	2.73052
8 - 20	1.61667	2.73052	12 - 18	0.9	2.73052
8 - 21	-1.21667	2.73052	12 - 19	-1.89167	2.73052

8 - 22	-1.3	2.73052	12- 20	-0.183333	2.73052
8 - 23	-0.415385	2.67153	12- 21	*-3.01667	2.73052
8 - 24	1.41538	-2.67153	12- 22	*-3.1	2.73052
<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>	<b>Contraste</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/-Lmites</b>
12 - 23	-2.21538	2.67153	16- 19	2.79167	2.87822
12 - 24	*-3.21538	2.67153	16- 20	*4.5	2.87822
13 - 14	0.6	3.15293	16- 21	1.66667	2.87822
13- 15	*-3.46667	3.0187	16- 22	1.58333	2.87822
13- 16	*-4.88333	3.0187	16- 23	2.46795	2.82232
13- 17	0.575	3.0187	16- 24	1.46795	2.82232
13- 18	0.7	3.0187	17- 18	0.125	2.87822
13- 19	-2.09167	3.0187	17- 19	-2.66667	2.87822
13- 20	-0.383333	3.0187	17- 20	-0.958333	2.87822
13- 21	*-3.21667	3.0187	17- 21	*-3.79167	2.87822
13- 22	*-3.3	3.0187	17- 22	*-3.875	2.87822
13- 23	-2.41538	2.96545	17- 23	*-2.99038	2.82232
13- 24	*-3.41538	2.96545	17- 24	*-3.99038	2.82232
14- 15	*-4.06667	3.0187	18- 19	-2.79167	2.87822
14- 16	*-5.48333	3.0187	18- 20	-1.08333	2.87822
14- 17	-0.025	3.0187	18- 21	*-3.91667	2.87822
14- 18	0.1	3.0187	18- 22	*-4.0	2.87822
14- 19	-2.69167	3.0187	18- 23	*-3.11538	2.82232
14- 20	-0.983333	3.0187	18- 24	*-4.11538	2.87822
14- 21	*-3.81667	3.0187	19- 20	1.70833	2.87822
14- 22	*-3.9	3.0187	19- 21	-1.125	2.87822
14- 23	*-3.01538	3.0187	19- 22	-1.20833	2.87822
14- 24	*-4.01538	3.0187	19- 23	-0.323718	2.82232
15- 16	-1.41667	2.87822	19- 24	-1.32372	2.82232
15- 17	*4.04167	2.87822	20- 21	-2.83333	2.87822
15- 18	*4.16667	2.87822	20- 22	*-2.91667	2.87822
15- 19	1.375	2.87822	20- 23	-2.03205	2.82232
15- 20	*3.08333	2.87822	20- 24	*-3.03205	2.87822
15- 21	0.25	2.87822	21- 22	-0.0833333	2.87822
15- 22	0.166667	2.87822	21- 23	0.801282	2.82232
15- 23	1.05128	2.82232	21- 24	-0.198718	2.82232
15- 24	0.0512821	2.82232	22 - 23	0.884615	2.82232
16- 17	*5.45833	2.87822	22 - 24	-0.115385	2.82232
16- 18	*5.58333	2.87822	23 - 24	-1.0	2.7653

\* denota una diferencia estadísticamente significante.



**Anexo 6.** Porcentaje de explantes que presentaron 25 y 100% de oxidación durante la fase de establecimiento.

<b>Tratamiento</b>	<b>25%</b>	<b>100%</b>	<b>Tratamiento</b>		<b>100%</b>
T1 <sub>L</sub>	80	0	T13 <sub>s</sub>	30	0
T2 <sub>L</sub>	80	20	T14 <sub>s</sub>	30	0
T3 <sub>L</sub>	20	0	T15 <sub>s</sub>	25	0
T4 <sub>L</sub>	53	0	T16 <sub>s</sub>	33	0
T5 <sub>L</sub>	59	20	T17 <sub>s</sub>	25	25
T6 <sub>L</sub>	53	33	T18 <sub>s</sub>	33	49
T7 <sub>L</sub>	46	0	T19 <sub>s</sub>	16	8
T8 <sub>L</sub>	33	0	T20 <sub>s</sub>	66	0
T9 <sub>L</sub>	46	6	T21 <sub>s</sub>	33	0
T10 <sub>L</sub>	33	0	T22 <sub>s</sub>	16	0
T11 <sub>L</sub>	33	0	T23 <sub>s</sub>	23	0
T12 <sub>L</sub>	56	6	T24 <sub>s</sub>	23	15

L: Medio líquido

s: Medio sólido

**Anexo 7.** Porcentaje de explantes que presentaron oxidación en un 25, 50, 75 y 100%, en los tratamientos evaluados a los 12, 26, 46, 61, 76, 91 y 105 días en la etapa de proliferación<sup>a</sup>.

T1								T6							
	12	26	46	61	76	91	105		12	26	46	61	76	91	105
<b>25%</b>	14	39	21	21	17	17	7	<b>25%</b>	28	42	46	46	57	17	7
<b>50%</b>	0	0	3	21	32	14	28	<b>50%</b>	3	0	0	7	21	17	14
<b>75%</b>	3	3	7	7	25	21	21	<b>75%</b>	0	7	4	4	7	7	17
<b>100%</b>	0	0	0	10	10	57	60	<b>100%</b>	0	0	3	3	10	35	36
T2								T7							
	12	26	46	61	76	91	105		12	26	46	61	76	91	105
<b>25%</b>	28	21	35	32	21	25	7	<b>25%</b>	25	35	35	17	21	17	7
<b>50%</b>	3	3	3	21	35	17	17	<b>50%</b>	0	0	3	10	14	10	20
<b>75%</b>	7	0	7	3	7	21	39	<b>75%</b>	0	3	17	3	14	14	21
<b>100%</b>	0	7	7	14	21	50	52	<b>100%</b>	3	3	3	17	17	17	17
T3								T8							
	12	26	46	61	76	91	105		12	26	46	61	76	91	105
<b>25%</b>	17	21	28	17	26	35	22	<b>25%</b>	10	14	17	14	23	22	20
<b>50%</b>	0	3	3	13	17	16	14	<b>50%</b>	3	3	3	17	31	13	12
<b>75%</b>	3	3	7	3	14	9	8	<b>75%</b>	0	7	3	2	18	36	30
<b>100%</b>	3	3	3	10	11	23	23	<b>100%</b>	3	3	7	7	7	18	18
T4								T9							
	12	26	46	61	76	91	105		12	26	46	61	76	91	105
<b>25%</b>	39	39	42	23	28	32	25	<b>25%</b>	25	28	42	27	27	24	22
<b>50%</b>	0	0	3	9	37	16	14	<b>50%</b>	0	0	0	13	19	13	12
<b>75%</b>	0	0	3	4	5	16	22	<b>75%</b>	3	3	7	2	8	16	17
<b>100%</b>	0	0	0	11	16	18	18	<b>100%</b>	3	3	10	10	12	16	16
T5								T10							
	12	26	46	61	76	91	105		12	26	46	61	76	91	105
<b>25%</b>	14	14	13	10	16	29	22	<b>25%</b>	28	17	20	20	10	17	14
<b>50%</b>	0	0	0	13	21	21	20	<b>50%</b>	0	0	3	5	15	9	8
<b>75%</b>	0	3	6	1	4	16	19	<b>75%</b>	3	3	3	8	23	23	19
<b>100%</b>	0	0	0	6	10	13	13	<b>100%</b>	3	3	3	8	8	28	28

<sup>a</sup>: Se realizaron subcultivos a los 47 y 92 días después de dar inicio a la fase de proliferación

**Anexo 8.** Análisis de varianza (ANOVA) para las variables evaluadas en cada tiempo (12, 26, 46, 61, 76, 91 y 105 días) de la fase de proliferación.

Variables dependientes: oxidación (%), número de brotes vitrificados, número de brotes por explante, longitud del brote CM y número de nudos por brote

Factor	Niveles	Valores
TDZ	2	0 / 0,001
BA	5	0 / 1 / 1.13 / 4,5 / 5
Repeticiones	4	1 / 2 / 3 / 4

Número de observaciones por grupo: 40

VARIABLES QUE TIENEN INTERACCION BA\*TDZ EN ALGUN TIEMPO  
TODAS LAS VARIABLES CON TRANSFORMACION RAIZ (X+0.5)

**TIEMPO = 12**

**OXIDACION (%)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	6,35904314	0,7065604	0,39	0,9293
Error	30	54,04395709	1,8014652		
Corrected Total	39	60,40300023			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,105277	43,65711	1,3424867	3,0742828	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	3,858534	0,9645335	0,54	0,7107
TDZ	1	0,00057238	0,0005724	0	0,9859
TDZ*BA	4	2,49993676	0,6249842	0,35	0,844

**NUMERO DE BROTES VITRIFICADOS**

Source	DF	Sum of Square	Mean Squares	F Value	Pr > F
Model	9	1,87826538	0,2086962	0,7	0,7075
Error	30	9,00060441	0,3000202		
Corrected Total	39	10,87886978			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,172653	39,44741	0,547741	1,3885346	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,39499349	0,0987484	0,33	0,8562
TDZ	1	0,42210346	0,4221035	1,41	0,2449
TDZ*BA	4	1,06116843	0,2652921	0,88	0,4852

**NÚMERO DE BROTES POR  
EXPLANTE**

Source	DF	Sum of Square	Mean Squares	F Value	Pr > F
Model	9	0,19519098	0,0216879	1,14	0,3593
Error	30	0,57270787	0,0190903		
Corrected Total	39	0,75789885			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,254188	14,00265	0,1381575	0,986724	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,09147859	0,0228697	1,2	0,3321
TDZ	1	0,04797217	0,0479722	2,51	0,1234
TDZ*BA	4	0,05574022	0,0139351	0,73	0,5786

**LONGITUD  
DEL BROTE  
(CM)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Pr > F
Model	9	0,05440321	0,0060448	0,77	0,6463
Error	30	0,23616759	0,0078723		
Corrected Total	39	0,2905708			
	R-square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,0187229	8,453776	0,0887257	1,0495395	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,04251251	0,0106281	1,35	0,2746
TDZ	1	0,00022799	0,000228	0,03	0,866
TDZ*BA	4	0,01166271	0,0029157	0,37	0,8278

**LONGITUD  
DEL BROTE  
(cm)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Pr > F
Model	9	0,25230274	0,0280335	0,59	0,7144
Error	30	1,2235878	0,0407863		
Corrected Total	39	1,47589054			
	R-square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,170949	17,20437	0,2019561	1,1738653	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,0216268	0,0054067	0,13	0,9692
TDZ	1	0,05475484	0,0547548	1,34	0,2557
TDZ*BA	4	0,1759211	0,0439803	1,08	0,3847

**TIEMPO 26**

**OXIDACION  
(%)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	15,11261681	1,6791797	0,99	0,4679
Error	30	50,84037165	1,6946791		
Corrected Total	39	65,95298847			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,229142	38,46909	1,3017984	3,3840114	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	3,07597864	0,7689947	0,45	0,7689
TDZ	1	0,01430069	0,0143007	0,01	0,9274
TDZ*BA	4	1202233748	3,0055844	0,77	0,1603

**NUMERO DE BROTES  
VITRIFICADOS**

Source	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	1,9430846	0,2158983	0,97	0,4822
Error	30	6,66600628	0,2222002		
Corrected total	39	8,60909088			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,225701	3284449	0,4713812	1,4351908	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,5802284	0,1450571	0,65	0,6294
TDZ	1	0,12346123	0,1234612	0,56	0,4618
TDZ*BA	4	1,23939498	0,3098487	1,39	0,2597

**NÚMERO DE BROTES POR  
EXPLANTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,36566376	0,0406293	3,94	0,0021
Error	30	0,30964292	0,0103214		
Corrected Total	39	0,67530668			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,541478	9,562449	0,1015944	1,0624312	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,31940164	0,0798504	7,74	0,0002
TDZ	1	0,00044553	0,0004455	0,04	0,8368
TDZ*BA	4	0,04581659	0,0114542	1,11	0,3702

**LONGITUD**

**DEL BROTE  
(cm)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,31119251	0,034577	3,42	0,0053
Error	30	0,30318249	0,0101061		
Corrected Total	39	0,61437501			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,506519	8,71694	0,100529	1,1532604	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,23332299	0,0583308	5,77	0,0014
TDZ	1	0,00216988	0,0021699	0,21	0,6464
TDZ*BA	4	0,07569964	0,0189249	1,87	0,1412

---

**NUMERO DE NUDOS POR  
BROTE**

Source	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,66044482	0,0733828	1,76	0,1194
Error	30	1,25382672	0,0417942		
Corrected Total	39	1,91427154			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,345011	15,9524	0,2044364	1,2815401	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,25507087	0,0637677	1,53	0,2199
TDZ	1	0,02146786	0,0214679	0,51	0,4791
TDZ*BA	4	0,38390608	0,0959765	2,3	0,0822

---

**TDZ\*BA Effect Sliced by BA for NUMERO DE NUDOS POR BROTE**

BA	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
0	1	0,02133	0,02133	0,5104	0,4805
1	1	0,050321	0,050321	1,204	0,2813
3	1	0,000031312	3,131E-05	0,000749	0,9783
5	1	0,312049	0,312049	7,4663	0,0104
4,5	1	0,021643	0,021643	0,5178	0,4773

**TDZ\*BA Effect Sliced by BA for OXIDACION (%)**

BA	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
0	1	5,624090	5,62409	3,3187	0,0785
1	1	0,306804	0,306804	0,181	0,6735
3	1	0,019894	0,019894	0,0117	0,9144
5	1	5,623325	5,623325	3,3182	0,0785
4,5	1	0,462525	0,462525	0,2729	0,6052

**TDZ\*BA Effect Sliced by TDZ for NUMERO DE NUDOS POR BROTE**

TDZ	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
1	4	0,088758	0,02219	0,5309	0,7139
2	4	0,550218	0,137555	3,2912	0,0238

**TDZ\*BA Effect Sliced by TDZ for OXIDACION (%)**

TDZ	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr > F
1	4	7,695954	1,923988	1,1353	0,3588
4	4	7,402362	1,850591	1,092	0,3783

---

**TIEMPO 46**

---

**OXIDACION (%)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > f
Model	9	23,97173543	2,6635262	1,66	0,1432
Error	30	48,13955325	1,6045518		
Corrected Total	39	72,11128869			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,332427	31,94652	1,2667485	3,9552152	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	15,79977122	3,9499428	2,46	0,0666
TDZ	1	0,01737661	0,0173766	0,01	0,9178
TDZ*BA	4	8,1545876	2,0386459	1,27	0,3034

---

**NUMERO DE BROTES VITRIFICADOS**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	3,32270889	0,3691899	1,98	0,0778
Error	30	5,5942096	0,1864737		
Corrected Total	39	8,91691849			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,37263	27,03098	0,431826	1,5975222	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	2,26403395	0,5660085	3,04	0,0325
TDZ	1	0,08278283	0,0827828	0,44	0,5103
TDZ*BA	4	0,97589211	0,243973	1,31	0,2894

**NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,73818071	0,0820201	4,91	0,0004
Error	30	0,50125814	0,0167086		
Corrected Total	39	1,23943885			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,595577	11,3721	0,1292618	1,1365574	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,7296226	0,1824057	10,92	0,0001
TDZ	1	0,00337734	0,0033773	0,2	0,6562
TDZ*BA	4	0,00518078	0,0012952	0,08	0,9886

---

**LONGITUD  
DEL BROTE  
(cm)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,27310953	0,0303455	3,17	0,0086
Error	30	0,28888402	0,0096295		
Corrected Total	39	0,56199355			
	R-Square	C.V.	Root MSE	LONG Mean	
	0,485966	8,466729	0,0981299	1,1590055	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,25178092	0,0629452	6,54	0,0007
TDZ	1	0,00027623	0,0002762	0,03	0,8666
TDZ*BA	4	0,02105238	0,0052631	0,55	0,7029

---

**NUMERO DE NUDOS POR  
BROTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,62803679	0,0697819	3,13	0,009
Error	30	0,66945471	0,0223152		
Corrected Total	39	1,297415			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,484039	11,45595	0,1493826	1,3039732	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,37917096	0,0947927	4,25	0,0077
TDZ	1	0,02058983	0,0205898	0,92	0,3444
TDZ*BA	4	0,22827599	0,057069	2,56	0,059

**TDZ\*BA Effect Sliced by BA for NUMERO DE NUDOS POR BROTE**



BA	DF	Sum of Square	F Value	Pr > F
0	1	0,004154	0,1866	0,6688
1	1	0,103594	4,6423	0,0393
3	1	0,109154	4,8919	0,0347
5	1	0,022154	0,9928	0,327
4,5	1	0,009791	0,4387	0,5128

**TDZ\*BA Effect Sliced by TDZ for NUMERO DE NUDOS POR BROTE**

TDZ	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
1	4	0,136138	0,034035	1,5252	0,22
2	4	0,471309	0,117827	5,2801	0,0024

---

**TIEMPO 61**

---

**OXIDACION (%)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	16,29709223	1,810788	1,01	0,4572
Error	30	54,02372963	1,800791		
Corrected Total	39	70,32082186			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,231753	28,01728	1,3419355	4,789671	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	7	1,6288069	0,9	0,4738
TDZ	1	2,62420981	2,6242098	1,46	0,2368
TDZ*BA	4	7,15765496	1,7894137	0,99	0,4262

---

**NUMERO DE BROTES VITRIFICADOS**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,23382115	0,0259801	0,8	0,6196
Error	30	0,97487281	0,0324958		
Corrected Total	39	1,20869395			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,193449	23,88134	0,1802658	0,7548395	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,18445042	0,0461126	1,42	0,2517
TDZ	1	0,0190983	0,0190983	0,59	0,4493
TDZ*BA	4	0,03027243	0,0075681	0,23	0,9177

**NÚMERO DE BROTES POR  
EXPLANTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,59824738	0,0664719	5,05	0,0003
Error	30	0,39457007	0,0131523		
Corrected Total	39	0,99281745			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,602575	10,1189937	0,1146836	1,1255225	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,47782457	0,1194561	9,08	0,0001
TDZ	1	0,06207311	0,0620731	4,72	0,0379
TDZ*BA	4	0,0583497	0,0145874	1,11	0,3705

**LONGITUD  
DEL BROTE  
(cm)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,29304411	0,0325605	2,58	0,0249
Error	30	0,37911353	0,0126371		
Corrected Total	39	0,67215774			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,435975	9,54597	0,112415	1,1774936	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,2622302	0,0655576	5,19	0,0027
TDZ	1	0,00020388	0,0002039	0,02	0,8998
TDZ*BA	4	0,03061004	0,0075525	0,51	0,6617

**NUMERO DE NUDOS POR  
BROTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	1,36530345	0,1517004	5,22	0,0003
Error	30	0,8716451	0,0290548		
Corrected Total	39	2,23694855			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,610342	1290311	0,1704548	1,3210367	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	1,05597257	0,2639931	9,09	0,0001
TDZ	1	0,15147309	0,1514731	5,21	0,0297
TDZ*BA	4	0,15785779	0,0394645	1,36	0,2718

**TIEMPO 76**

**OXIDACION (%)**

Source	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	9,70632173	1,0784802	0,78	0,6348
Error	30	41,40463582	1,3801545		
Corrected Total	39	51,11095755			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,189907	18,24512	1,1747998	6,4389792	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	2,1392688	0,5348172	0,39	0,8158
TDZ	1	3,46257426	3,4625743	2,51	0,1237
TDZ*BA	4	4,10447868	1,0261197	0,74	0,57

---

**NUMERO DE BROTES VITRIFICADOS**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,53673259	0,059637	1,18	0,3456
Error	30	1,52256758	0,0507523		
Corrected Total	39	2,05930017			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,260638	28,5301	0,2252826	0,7896312	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,24526864	0,0613172	1,21	0,3279
TDZ	1	0,12833516	0,1283352	2,53	0,1223
TDZ*BA	4	0,16312879	0,0407822	0,8	0,5326

---

**NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,86948698	0,0966097	5,03	0,0004
Error	30	0,57637193	0,0192124		
Corrected Total	39	1,44585891			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,601364	1.166.029	0,1386088	1,1887255	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,76637296	0,1915932	9,97	0,0001
T7DZ	1	0,04098816	0,0409882	2,13	0,1545
TDZ*BA	4	0,06212586	0,0155315	0,81	0,5297

**LONGITUD DEL BROTE**

(cm)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,36022111	0,0400246	2,76	0,0176
Error	30	0,43471407	0,0144905		
Corrected Total	39	0,79493518			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,453145	10,00212	0,1203764	1,2035083	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,31535258	0,0788381	5,44	0,002
TDZ	1	0,00154083	0,0016408	0,11	0,7388
TDZ*BA	4	0,04322771	0,0108069	0,75	0,5685

---

**NUMERO DE NUDOS POR BROTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	1,46916182	0,1632402	4,93	0,0004
Error	30	0,99424952	0,0331417		
Corrected Total	39	2,46341134			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,596393	13,46974	0,1820485	1,3515367	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	1,18271632	0,2956791	8,92	0,0001
TDZ	1	0,09057998	0,09058	2,73	0,1087
TDZ*BA	4	0,19586552	0,0489664	1,48	0,2338

---

**TIEMPO 91**

**OXIDACION (%)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	14,94165303	1,6601837	1,89	0,0927
Error	30	25,37463694	0,8791546		
Corrected Total	39	41,31628995			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,361641	12,95858	0,9376324	7,2356128	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	10,7178469	2,6794617	3,05	0,032
TDZ	1	0,86451536	0,8646154	0,98	0,3293
TDZ*BA	4	3,35919077	0,8397977	0,96	0,4462

**NUMERO DE BROTES VITRIFICADOS**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	2,44789438	0,2719883	3,69	0,0033
Error	30	2,2107677	0,0736923		
Corrected Total	39	4,65866208			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,52545	31,69575	0,2746318	0,8564657	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	2,22397741	0,5559944	7,54	0,0002
TDZ	1	0,03138593	0,0313859	0,43	0,519
TDZ*BA	4	0,19253103	0,0481328	0,65	0,6292

---

**NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,62149519	0,069055	4,41	0,001
Error	30	0,46970884	0,015657		
Corrected Total	39	1,09120404			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,56955	10,29624	0,1251278	1,2152767	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,59251632	0,1481291	9,46	0,0001
TDZ	1	0,00039862	0,0003986	0,03	0,8743
TDZ*BA	4	0,02858025	0,0071451	0,46	0,767

---

**LONGITUD DEL BROTE (cm)**

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F Value	Pr > F
Model	9	0,48937658	0,0543752	4,28	0,0012
Error	30	0,38121371	0,0127071		
Corrected	39	0,8705903			
	R_square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,56212	8,709192	0,1127259	1,2942431	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,47274202	0,1181856	9,3	0,0001
TDZ	1	0,00071147	0,0007115	0,06	0,8145
TDZ*BA	4	0,01592309	0,0039808	0,31	0,8668

**NUMERO DE NUDOS POR BROTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	1,82682262	0,2029803	3,4	0,055
Error	30	1,7924933	0,0597498		
Corrected Total	39	3,61931592			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,504743	16,39913	0,2444377	1,4905526	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	1,75516678	0,4387917	7,34	0,0003
TDZ	1	0,00190959	0,0019096	0,03	0,8593
TDZ*BA	4	0,06974625	0,0174366	0,29	0,881

---

**TIEMPO  
105**

**OXIDACION  
(%)**

Source	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	26,71845415	2,9687171	4,09	0,0016
Error	30	21,76679802	0,7255599		
Corrected Total	39	48,48525217			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,551064	11,21219	0,8517981	7,5970691	

Source	DSF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	20,75666964	5,1891674	7,15	0,0004
TDZ	1	0,00028216	0,0002822	0	0,9844
TDZ*BA	4	5,96150235	1,4903756	2,05	0,1119

---

**NUMERO DE BROTES  
VITRIFICADOS**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	7,09087	0,7878744	6,19	0,0001
Error	30	3,81706169	0,1272354		
Corrected Total	39	10,90793169			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,650065	34,77233	0,356707	1,0258176	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	6,53949817	1,6348745	12,85	0,0001
TDZ	1	0,19373233	0,1937323	1,52	0,2268
TDZ*BA	4	0,3576395	0,0894099	0,7	0,5963

**NÚMERO DE BROTES POR  
EXPLANTE**

Source	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	1,09984192	0,1220466	7,56	0,0001
Error	30	0,48401538	0,0161339		
Corrected Total	39	1,58243457			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,694132	10,00176	0,1270191	1,2699667	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	1,0483062	0,2620766	15,24	0,0001
TDZ	1	0,00000974	9,74E-06	0	0,9805
TDZ*BA	4	0,05010325	0,0125258	0,78	0,5493

---

**LONGITUD  
DEL BROTE  
(cm)**

Source	DF	Sum of Square	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0,58735447	0,0663727	3,99	0,002
Error	30	0,49889724	0,0166299		
Corrected Total	39	1,09625171			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,544906	9,744228	0,128957	1,3234194	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	0,55832576	0,1395814	8,39	0,0001
TDZ	1	0,00022318	0,0002232	0,01	0,9085
TDZ*BA	4	0,03880553	0,0097014	0,58	0,6771

---

**NUMERO DE NUDOS POR  
BROTE**

Source	DF	Sum Of Squares	Mean square	F Value	Pr > F
Model	9	2,03075845	0,2256398	4,57	0,0007
Error	30	1,48073394	0,0493578		
Corrected Total	39	3,5114924			
	R-Square	C.V.:	Root MSE	Mean	
	0,578318	14,45251	0,2221662	1,5372145	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	4	1,91998239	0,4799956	9,72	0,0001
TDZ	1	0,00018049	0,0001805	0	0,9522
TDZ*BA	4	0,11059557	0,0276489	0,56	0,6933

**Anexo 9.** Análisis de varianza (ANOVA) para las variables evaluadas en la fase de proliferación, tomando el tiempo como una

fuente de variación

Análisis tomando tiempo como otro factor  
 Todas las variables con transformación raíz (x+0,5)

**OXIDACION (%)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	69	950,419911	13,77420161	9,75	0,0001
<b>Error</b>	210	295,5935824	1,41235087		
<b>Corrected Total</b>	279	1247,013593			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,76216	22,80109	1,18842369	5,21213	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>TIEMPO</b>	6	837,3129945	139,5521658	98,81	0,0001
<b>TDZ</b>	1	2,51988452	2,51988452	1,78	0,1831
<b>TIEMPOxTDZ</b>	6	4,46404674	0,74400779	0,53	0,7876
<b>BA</b>	4	23,89871096	5,97467774	4,23	0,0026
<b>TIEMPO x BA</b>	24	38,9645857	1,6235244	1,15	0,2929
<b>TDZ x BA</b>	4	15,59903477	3,97475869	2,81	0,254
<b>TIEMPO x TDZ x BA</b>	24	27,35065384	1,14002724	0,81	0,7257

**NUMERO DE BROTES  
 VITRIFICADOS**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	69	46,2646061	0,67050154	4,73	0,0001
<b>Error</b>	210	29,78609006	0,14183852		
<b>Corrected Total</b>	279	76,05069616			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,60834	3359202	0,37651456	1,12114	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>TIEMPO</b>	6	28,81122911	4,80187152	33,85	0,0001
<b>TDZ</b>	1	0,82459438	0,82459438	5,81	0,0168
<b>TIEMPOxTDZ</b>	6	0,17630487	0,02938414	0,21	0,9743
<b>BA</b>	4	6,59605411	1,64901353	11,63	0,0001
<b>TIEMPO x BA</b>	24	5,83639637	0,243183867	1,71	0,0242
<b>TDZ x BA</b>	4	1,02735466	0,25683867	1,81	0,1279
<b>TIEMPO x TDZ x BA</b>	24	2,99267261	0,12469469	0,88	0,6305

**NUMERO DE BROTES POR  
 EXPLANTE**



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	69	6,67305578	0,09671095	6,14	0,0001
<b>Error</b>	210	3,30827576	0,01575369		
<b>Corrected Total</b>	279	9,9813309			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,66855	11,00266	0,12554371	1,14076	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>TIEMPO</b>	6	2,185537154	0,35439526	23,13	0,0001
<b>TDZ</b>	1	0,00868003	0,00868003	0,55	0,4587
<b>TIEMPOxTDZ</b>	6	0,14658464	0,02443077	1,55	0,1631
<b>BA</b>	4	3,35904573	0,83916143	53,31	0,0001
<b>TIEMPO x BA</b>	24	0,66647714	0,02776988	1,76	0,0188
<b>TDZ x BA</b>	4	0,17053454	0,04253363	2,71	0,0314
<b>TIEMPO x TDZ x BA</b>	24	0,13536211	0,00564009	0,35	0,9979

---

**LONGITUD DEL  
BROTE (cm)**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	69	4,41523047	0,06398885	5,33	0,0001
<b>Error</b>	210	2,52217275	0,01201035		
<b>Corrected Total</b>	279	6,93740322			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,63644	9,175825	0,10959173	1,19435	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>TIEMPO</b>	6	2,03652893	0,33942149	28,25	0,0001
<b>TDZ</b>	1	0,00110912	0,00110912	0,09	0,7615
<b>TIEMPO x TDZ</b>	6	0,00434434	0,00072406	0,06	0,9991
<b>BA</b>	4	1,82174525	0,45543631	37,92	0,0001
<b>TIEMPO x BA</b>	24	0,31452173	0,01310507	1,09	0,3559
<b>TDZ x BA</b>	4	0,08884515	0,2221154	1,85	0,1206
<b>TIEMPO x TDZ x BA</b>	24	0,148113496	0,00617229	0,51	0,9722

**NUMERO DE NUDOS POR  
BROTE**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	69	11,91125889	0,17349651	4,4	0,0001
<b>Error</b>	210	8,285911	0,0394571		
<b>Corrected Total</b>	279	20,25724999			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,59096	14,69882	0,19863611	1,35139	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>TIEMPO</b>	6	3,7384282	0,62307137	15,79	0,0001
<b>TDZ</b>	1	0,19124727	0,19124727	4,85	0,0288
<b>TIEMPO x TDZ</b>	6	0,1497084	0,0249514	0,53	0,7043
<b>BA</b>	4	4,79904789	1,19976197	30,41	0,0001
<b>TIEMPO x BA</b>	24	1,7706588	0,07377745	1,87	0,0136
<b>TDZ x BA</b>	4	0,79217529	0,19804382	5,02	0,0007
<b>TIEMPO x TDZ x BA</b>	24	0,52999304	0,02208304	0,56	0,9533

**TIEMPOxTDZ effect sliced by TIEMPO for**

**OXIDACION (%)**

TIEMPO	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
12	1	0,000572	0,000572	4,1E-05	0,984
26	1	0,014301	0,014301	0,0101	0,9199
46	1	0,017377	0,017377	0,0123	0,9118
61	1	2,62421	2,62421	1,858	0,1743
76	1	3,462574	3,462574	2,4516	0,1189
91	1	0,864615	0,864615	0,6122	0,4348
105	1	0,000282	0,000282	0,0002	0,9887

**NUMERO DE BROTES  
VITRIFICADOS**

TIEMPO	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
12	1	0,422103	0,422103	2,9759	0,086
26	1	0,123461	0,123461	0,8704	0,03519
46	1	0,082783	0,082783	0,5836	0,4457
61	1	0,019098	0,019098	0,1346	0,714
76	1	0,128335	0,128335	0,9048	0,3426
91	1	0,031386	0,031386	0,2213	0,6386
105	1	0,193732	0,193732	1,3659	0,2438

**NUMERO DE BROTES POR  
EXPLANTE**

TIEMPO	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
12	1	0,047972	0,047972	3,0451	0,0824
26	1	0,000446	0,000446	0,0283	0,8666
46	1	0,003377	0,003377	0,2144	0,6438
61	1	0,062072	0,062072	3,9402	0,0484
76	1	0,040988	0,040988	2,6018	0,1082
91	1	0,000399	0,000399	0,0253	0,8739
105	1	0,000009738	0,000009738	0,00062	0,9802

**LONGITUD DEL BROTE (cm)**

TIEMPO	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
12	1	0,000228	0,000228	0,019	0,8905
26	1	0,00217	0,00217	0,1807	0,6712
46	1	0,000276	0,000276	0,023	0,8796
61	1	0,000204	0,000204	0,017	0,8965
76	1	0,001541	0,001541	0,1366	0,712
91	1	0,000711	0,000711	0,0592	0,8079
105	1	0,000223	0,000223	0,0186	0,8917

**NUMERO DE NUDOS POR BROTE**

TIEMPO	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
12	1	0,054755	0,054755	1,3877	0,2401
26	1	0,021468	0,021468	0,5441	0,4616
46	1	0,02059	0,02059	0,5218	0,4719
61	1	0,151473	0,151473	0,8389	0,0514
76	1	0,09058	0,09058	2,2957	0,1312
91	1	0,00191	0,00191	0,0484	0,8261
105	1	0,00018	0,00018	0,00457	0,9461

**TIEMPO \*TDZ Effect Sliced by BA for**

**OXIDACION (%)**

BA	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
0	1	0,065931	0,065931	0,0467	0,8292
1	1	0,000087759	0,000087759	6,2E-05	0,9937
3,15	1	0,978694	0,978694	0,693	0,4061

4,5	1	1,376599	1,376599	0,9747	0,3247
5	1	15,997608	15,997608	11,3269	0,0009

---

**NUMERO DE BROTES  
VITRIFICADOS**

BA	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
0	1	0,082875	0,082875	0,5843	0,4455
1	1	1,039262	1,039262	7,3271	0,0074
3,15	1	0,587377	0,587377	4,1412	0,0431
4,5	1	0,080704	0,080704	0,569	0,4515
5	1	0,061731	0,061731	0,4352	0,5102

---

**NUMERO DE BROTES POR  
EXPLANTE**

BA	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
0	1	0,006884	0,006884	0,437	0,5093
1	1	0,016822	0,016822	1,0678	0,3026
3,15	1	0,000207	0,000207	0,0131	0,9089
4,5	1	0,072434	0,072434	4,5979	0,0332
5	1	0,082867	0,082867	5,2602	0,0228

---

**LONGITUD DEL  
BROTE (cm)**

BA	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
0	1	0,000782	0,000782	0,0651	0,7988
1	1	0,013379	0,13379	1,1139	0,2924
3,15	1	0,00897	0,00897	0,7469	0,3885
4,5	1	0,021293	0,021293	1,7729	0,1845
5	1	0,045531	0,045531	3,791	0,0529

---

**NUMERO DE NUDOS POR  
BROTE**

BA	DF	Sum of Square	Mean Square	F value	Pr>F
0	1	0,18021	0,18021	4,5672	0,0337
1	1	0,251164	0,251164	6,3655	0,0124
3,15	1	0,340483	0,340483	8,5292	0,00037
4,5	1	0,000125	0,000125	0,00317	0,9551
5	1	0,211439	0,211439	5,3587	0,0216

**ANEXO 10.** Análisis de los efectos lineales y cuadráticos de BA para las variables evaluadas en la etapa de proliferación

**TIEMPO 26**

**NUMERO DE BROTES POR EXPLANTE**

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para **BA lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	0,22939	0,229329	19,54	0,0001
<b>Error</b>	38	0,44597769	0,01173625		
<b>Corrected Total</b>	39	0,67530668			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,339592	10,1968	0,108334	1,06243121	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,22939	0,229329	19,54	0,0001

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	0,956999969	32,59	0,0001	0,02936446
<b>BA</b>	0,039048609	4,42	0,0001	0,00883366

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para **BA cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	0,24004786	0,12002393	10,2	0,0003
<b>Error</b>	37	0,43525882	0,01176376		
<b>Corrected Total</b>	39	0,67530668			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,655465	10,20874	0,10846083	1,06243121	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,22939	0,229329	19,49	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,01071886	0,01071886	0,91	0,346

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	0,975219331	27,82	0,0001	0,03505132
<b>BA</b>	0,003471675	0,09	0,9283	0,0383056
<b>BA x BA</b>	0,007044196	0,96	0,346	0,00737955

**LONGITUD DEL**

**BROTE (cm)****Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	0,23301221	0,22301221	21,65	0,0001
<b>Error</b>	38	0,3913628	0,01029902		
<b>Corrected Total</b>	39	0,61437501			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,36299	8,199755	0,10148409	1,15326043	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,23301221	0,22301221	21,65	0,0001

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	1,049291362	38,15	0,0001	0,02750776
<b>BA</b>	0,038507063	4,65	0,0001	0,00827512

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	0,22429381	0,1121469	10,54	0,0002
<b>Error</b>	37	0,3900812	0,01054274		
<b>Corrected Total</b>	39	0,61437501			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,356076	8,903264	0,10267782	1,15326043	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,22301221	0,22301221	21,15	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,0012816	0,0012816	0,12	0,7293

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	1,042991434	31,43	0,0001	0,03318243
<b>BA</b>	0,050808927	1,4	0,1695	0,03626319
<b>BA x BA</b>	-0,002435756	-0,35	0,7293	0,00398608

**TIEMPO 46****NUMERO DE BROTES POR EXPLANTE**

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	0,61415952	0,61415952	37,32	0,0001
<b>Error</b>	38	0,62527933	0,01645472		
<b>Corrected Total</b>	39	1,23942885			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,495514	11,28537	0,12827595	1,13665739	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,61415952	0,61415952	37,32	0,0001

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	0,964121109	27,73	0,0001	0,03476982
<b>BA</b>	0,063902327	6,11	0,0001	0,01045975

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	0,6206064	0,3103032	18,65	0,0001
<b>Error</b>	37	0,61883245	0,0167252		
<b>Corrected Total</b>	39	1,23943885			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,500716	11,37774	0,12932595	1,13665739	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,61415952	0,61415952	36,72	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,00644689	0,00644689	0,39	0,5385

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	0,978250838	23,41	0,0001	0,04179431
<b>BA</b>	0,036311217	0,79	0,4317	0,04567463
<b>BA x BA</b>	0,005463011	0,62	0,5385	0,00879919

**LONGITUD DEL BROTE (cm)**

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	0,2288463	0,2288463	26,1	0,0001

<b>Error</b>	38	0,33314725	0,00876703		
<b>Corrected Total</b>	39	0,56199355			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,407204	8,078688	0,09363243	1,15900546	
<b>Source</b>	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,2288463	0,2288463	26,1	0,0001
<b>Parameter</b>		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,053685233	41,52	0,0001	0,02537953
<b>BA</b>		0,039007492	5,11	0,0001	0,00763488

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA cuadráticos

<b>Source</b>	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	0,24052102	0,12026051	13,84	0,0001
<b>Error</b>	37	0,32147253	0,00868845		
<b>Corrected Total</b>	39	0,56199355			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,427978	8,042399	0,09321184	1,16900546	
<b>Source</b>	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,2288463	0,2288463	26,34	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,01167472	0,0116747	1,34	0,2538
<b>Parameter</b>		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,034670859	34,35	0,0001	0,03001233
<b>BA</b>		0,075136846	2,31	0,0264	0,03292004
<b>BA x BA</b>		-0,007351573	-1,16	0,2538	0,00634203

<b>NUMERO DE NUDOS POR BROTOS</b>
-----------------------------------

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales

<b>Source</b>	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	0,35731577	0,35731577	14,44	0,0005
<b>Error</b>	38	0,94017574	0,02474147		
<b>Corrected Total</b>	39	1,2974915			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,27519	12,06269	0,1572942	1,30397324	



Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	1	0,35731577	0,35731577	14,44	0,0005

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	1,172370195	27,5	0,0001	0,04263536
BA	0,048741868	3,8	0,0005	0,01282593

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0,35848512	1,17924306	7,06	0,0025
Error	37	0,93900538	0,02537852		
Corrected Total	39	1,2974915			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,276292	12,217	0,15930638	1,30397324	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	1	0,35731577	0,35731577	14,08	0,0006
BA x BA	1	0,00117035	0,00117035	0,05	0,8311

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	1,166349897	22,66	0,0001	0,0514831
BA	0,060497703	1,08	0,2892	0,05626295
BA x BA	-0,002327643	-0,21	0,8311	0,01083903

**TIEMPO 61**

**NUMERO DE BROTES POR  
EXPLANTE**

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0,42612354	0,42812364	28,81	0,0001
Error	38	0,56469382	0,01486036		
Corrected Total	39	0,99281745			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,431221	10,8308	0,12190309	1,2552246	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	1	0,42812364	0,42812354	28,81	0,0001

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	0,981458752	29,7	0,0001	0,03304243
BA	0,053353226	5,37	0,0001	0,0099401

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0,44772127	0,22386063	15,2	0,0001
Error	37	0,54509618	0,01473233		
Corrected Total	39	0,99281745			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,45096	10,78404	0,12137681	1,25552246	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	1	0,42812354	0,42812364	29,05	0,0001
BA x BA	1	0,019599763	0,01959763	1,33	0,2552

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	0,956833294	24,39	0,0001	0,039225328
BA	0,101458867	2,37	0,0233	0,04286719
BA x BA	-0,009524866	-1,15	0,2562	0,00825834

**LONGITUD DEL BROTE (cm)**

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0,17235472	0,14235472	13,1	0,0009
Error	38	0,49980303	0,01315271		
Corrected Total	39	0,672115774			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,25642	9,739779	0,11468527	1,17749355	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	1	0,17235472	0,14235472	13,1	0,0009

Parameter	Estimate	T for Ho:	Pr T	Std Error of

		Parameter= 0		Estimate
<b>INTERCEPT</b>	1,086092446	34,94	0,0001	0,031086
<b>BA</b>	0,03385226	3,62	0,0009	0,00935155

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	0,23789608	0,11894804	10,13	0,0003
<b>Error</b>	37	0,43426166	0,0117368		
<b>Corrected Total</b>	39	0,67215774			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,353929	9,200604	0,10833652	1,17749355	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,17235472	0,17235472	14,68	0,0005
<b>BA x BA</b>	1	0,06554136	0,06554136	5,58	0,0235

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	1,041040187	29,73	0,0001	0,03501115
<b>BA</b>	0,121825772	3,18	0,0029	0,03826169
<b>BA x BA</b>	-0,017418663	-2,36	0,0235	0,00737109

<b>NUMERO DE NUDOS POR BROTE</b>
----------------------------------

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	1,02252512	1,02252512	32	0,0001
<b>Error</b>	38	1,21442342	0,03195851		
<b>Corrected Total</b>	39	2,23694855			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,457417	13,53251	0,17876944	1,32103673	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,02252512	1,02252512	32	0,0001

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	1,098410237	22,67	0,0001	0,04845633
<b>BA</b>	0,082454256	5,66	0,0001	0,01457704

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	1,02896037	0,51448018	15,76	0,0001
<b>Error</b>	37	1,20798818	0,03264833		
<b>Corrected Total</b>	39	2,23594855			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,459985	13,67778	0,18068849	1,32103673	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,02252512	1,02252512	31,32	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,00643524	0,00643524	0,2	0,6697
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,084293275	18,57	0,0001	0,05839316
<b>BA</b>		0,110020438	1,72	0,093	0,6281456
<b>BA x BA</b>		-0,00548075	-0,44	0,6591	0,01229384

### TIEMPO 76

#### FORMACION DE BROTES

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	0,75159952	0,75159952	41,14	0,0001
<b>Error</b>	38	0,694294	0,01826998		
<b>Corrected Total</b>	39	1,44585891			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,519829	11,37071	0,1316651	1,18875848	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,75159952	0,75159952	41,14	0,0001
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		0,997857498	27,24	0,0001	0,03661754
<b>BA</b>		0,070591847	6,41	0,0001	0,01102151

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	0,72258935	0,376114467	20,07	0,0001
<b>Error</b>	37	0,69356957	0,01874512		
<b>Corrected Total</b>	39	1,44585891			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,520306	11,51752	0,13691283	1,1872548	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	1	0,75159952	0,75159952	40,1	0,0001
BA x BA	1	0,00068983	0,00068983	0,04	0,8489

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	0,993235502	22,45	0,0001	0,04424617
BA	0,079771722	1,65	0,1077	0,04835412
BA x BA	-0,001787014	-0,19	0,8489	0,00931539

### LONGITUD DEL BROTE (cm)

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0,25102231	0,25102231	17,54	0,0002
Error	38	0,54391287	0,0143135		
Corrected Total	39	0,79493518			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,315777	9,940856	0,11963903	1,20350826	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	1	0,25102231	0,25102231	17,54	0,0002

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	1,09320305	33,71	0,0001	0,03242874
BA	0,04085378	4,19	0,0002	0,00975549

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0,30456521	0,15228261	11,49	0,0001
Error	37	0,49036997	0,01325324		
Corrected Total	39	0,79493518			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,383132	9,564495	0,115122	1,20350826	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BA	1	0,25102231	0,25102231	18,94	0,0001
BA x BA	1	0,0535429	0,0535429	4,04	0,0518

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	1,05248286	28,29	0,0001	0,03720425
BA	0,120368062	2,96	0,0053	0,04065841
BA x BA	-0,015743744	-2,01	0,0518	0,00783282

**NUMERO DE NUDOS POR BROTE**

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	1,16170833	1,16170833	33,91	0,0001
<b>Error</b>	38	1,30170301	0,03425534		
<b>Corrected Total</b>	39	2,46341134			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,471585	13,69419	0,18508199	1,35153671	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,16170833	1,16170833	33,91	0,0001
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,114241809	22,21	0,0001	0,05016738
<b>BA</b>		0,087886999	5,82	0,0001	0,01509177

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	1,15174456	0,58087228	16,51	0,0001
<b>Error</b>	37	1,30166678	0,0351818		
<b>Corrected Total</b>	39	2,45341134			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,4716	13,87782	0,18756381	1,35153671	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,16170833	1,16170833	33,02	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,00003523	0,00003523	0	0,9746
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,113182584	18,36	0,0001	0,06061506
<b>BA</b>		0,089955348	1,36	0,1827	0,06624275
<b>BA x BA</b>		-0,000409531	-0,03	0,9746	0,01276163

**TIEMPO 91**

**OXIDACIÓN (%)**

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	----------------	-------------	---------	--------

<b>Model</b>	1	7,55873522	7,55873522	8,51	0,0059
<b>Error</b>	38	33,75755474	0,8883567		
<b>Corrected Total</b>	39	4131628996			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,182948	13,02622	0,94252677	7,23561281	
<b>Source</b>	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	7,55873522	7,55873522	8,51	0,0059
<b>Parameter</b>		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		7,840904084	30,69	0,0001	0,25547647
<b>BA</b>		-0,224181953	-2,92	0,0059	0,079585458

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

<b>Source</b>	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	9,34503092	4,57251546	5,41	0,0087
<b>Error</b>	37	31,97125904	0,85408808		
<b>Corrected Total</b>	39	41,31628996			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,226183	12,84706	0,92956338	7,23561281	
<b>Source</b>	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	7,55873522	7,55873522	8,75	0,0054
<b>BA x BA</b>	1	1,7862957	1,7862958	2,7	0,1589
<b>Parameter</b>		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		8,076103113	26,88	0,0001	30040731
<b>BA</b>		-0,683454915	-2,08	0,0443	0,032829807
<b>BA x BA</b>		0,090935563	1,44	0,1589	0,06324544

---

### NUMERO DE BROTES VITRIFICADOS

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

<b>Source</b>	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	1,03009233	1,03009233	10,79	0,0022
<b>Error</b>	38	3,62856975	0,09548868		
<b>Corrected Total</b>	39	4,65866208			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,221113	35,07995	0,30901242	0,85646567	
<b>Source</b>	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,03009233	1,03009233	10,79	0,0022
<b>Parameter</b>		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		0,633016926	7,55	0,0001	0,08375932

<b>BA</b>	0,082758795	3,28	0,0022	0,02519718
-----------	-------------	------	--------	------------

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	1,46905347	0,73452674	8,52	0,0009
<b>Error</b>	37	3,18960861	0,08620564		
<b>Corrected Total</b>	39	4,65866208			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,315338	34,28135	0,29360797	0,86646567	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,03009233	1,03009233	11,95	0,0014
<b>BA x BA</b>	1	0,43896114	0,43896114	5,09	0,03

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	0,749609767	7,9	0,0001	0,0948853
<b>BA</b>	-0,144911957	-1,4	0,1705	0,10369484
<b>BA x BA</b>	0,045078569	2,26	0,03	0,01997675

---

**NUMERO DE BROTES POR EXPLANTE**

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	0,5628682	0,5628682	40,48	0,0001
<b>Error</b>	38	0,52833584	0,0139357		
<b>Corrected Total</b>	39	1,09120404			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,515823	9,702599	0,11791342	1,21527668	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,5628682	0,5628682	40,48	0,0001

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	1,50102099	32,86	0,0001	0,03196101
<b>BA</b>	0,061175759	6,35	0,0001	0,00961478

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	0,56683078	0,28341539	20	0,0001
<b>Error</b>	37	0,52437325	0,01419225		
<b>Corrected Total</b>	39	1,09120404			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	



	0,519454	9,795898	0,11904726	1,21527668	
<b>Source</b>	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,5628682	0,5628682	39,72	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,00396259	0,00396259	0,28	0,6001
<b>Parameter</b>		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,039024435	27,01	0,0001	0,03847254
<b>BA</b>		0,082807114	1,97	0,0564	0,04204445
<b>BA x BA</b>		-0,004282984	-0,53	0,6001	0,00809984

### LONGITUD DEL BROTES (cm)

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales

<b>Source</b>	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	0,37080072	0,37080072	28,19	0,0001
<b>Error</b>	38	0,49978957	0,01315235		
<b>Corrected Total</b>	39	0,8705903			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,425919	8,861065	0,11468373	1,29424312	
<b>Source</b>	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,37080072	0,37080072	28,19	0,0001
<b>Parameter</b>		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,160179745	37,32	0,0001	0,03108558
<b>BA</b>		0,0496531	5,31	0,0001	0,00935143

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA cuadráticos

<b>Source</b>	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	0,3924664	0,1962332	15,19	0,0001
<b>Error</b>	37	0,47812389	0,01292227		
<b>Corrected Total</b>	39	0,8705903			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,450805	8,783215	0,11657615	1,29424312	
<b>Source</b>	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,37080072	0,37080072	28,69	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,02166568	0,02166568	1,68	0,2034
<b>Parameter</b>		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,134277048	30,88	0,0001	0,03673676
<b>BA</b>		0,100233278	2,5	0,0171	0,04014752

<b>BA x BA</b>	-0,010014822	-1,29	0,2034	0,0077344
----------------	--------------	-------	--------	-----------

<b>NUMERO DE NUDOS POR BROTE</b>
----------------------------------

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	1,61653191	1,61653191	30,67	0,0001
<b>Error</b>	38	2,00278401	0,05270484		
<b>Corrected Total</b>	39	3,61931592			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,44664	15,40203	0,22957535	1,49055262	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,61653191	1,61653191	30,67	0,0001
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,210633868	19,45	0,0001	0,06222752
<b>BA</b>		0,10367361	5,54	0,0001	0,01871981

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	1,66089523	0,83044761	15,69	0,0001
<b>Error</b>	37	1,95842069	0,05293029		
<b>Corrected Total</b>	39	3,61931592			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,458898	15,43494	0,230006584	1,49055262	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,61653191	1,61653191	30,54	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,04435332	0,04436332	0,84	0,3659
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,173568283	15,78	0,0001	0,07435245
<b>BA</b>		0,17605155	2,17	0,0368	0,08125338
<b>BA x BA</b>		-0,014330756	-0,92	0,3659	0,01565342

**TIEMPO 105**

<b>OXIDACIÓN (%)</b>
----------------------

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	15,05581886	15,05581886	17,11	0,0002
<b>Error</b>	38	33,42943331	0,87982193		
<b>Corrected Total</b>	39	48,48525217			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,310524	12,34601	0,93793493	7,59706912	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	15,05581886	15,05581886	17,11	0,0002
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		8,451332984	33,24	0,0001	0,25423183
<b>BA</b>		-0,316394024	-4,14	0,0002	0,07648016

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	19,49489319	9,74744659	12,44	0,0001
<b>Error</b>	37	28,9903598	0,78352322		
<b>Corrected Total</b>	39	48,48525217			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,402079	11,65145	0,88516847	7,59706912	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	15,05584886	15,05581886	19,22	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	4,43907433	4,439074	5,67	0,0226
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		8,822103385	30,84	0,0001	0,28606019
<b>BA</b>		-1,0403971	-3,33	0,002	0,31261892
<b>BA x BA</b>		0,143351847	2,38	0,0226	0,06022586

---

### NUMERO DE BROTES VITRIFICADOS

### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	3,9021368	3,9021368	21,17	0,0001
<b>Error</b>	38	7,00579488	0,18436302		
<b>Corrected Total</b>	39	10,90793159			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,357734	41,85687	0,42937515	1,02581758	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	3,9021368	3,9021368	21,17	0,0001
Parameter		Estimate	T for Ho:	Pr T	Std Error of

		Parameter= 0		Estimate
<b>INTERCEPT</b>	0,590915894	5,08	0,0001	0,11638423
<b>BA</b>	0,161074699	4,6	0,0001	0,03501168

#### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	4,71980922	2,35990451	14,11	0,0001
<b>Error</b>	37	6,18812246	0,16724655		
<b>Corrected Total</b>	39	10,90793169			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,432695	39,86663	0,40895789	1,02581758	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	3,9021368	3,9021368	23,33	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,81767242	0,81767242	4,89	0,0333

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	0,750044597	5,68	0,0001	0,13216306
<b>BA</b>	-0,149655797	-1,04	0,3069	0,14443349
<b>BA x BA</b>	0,061524311	2,21	0,0333	0,02782503

---

#### NUMERO DE BROTES POR EXPLANTE

#### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	1,00201799	1,00201799	65,6	0,0001
<b>Error</b>	38	0,58041658	0,01527415		
<b>Corrected Total</b>	39	1,58243457			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,693213	9,731534	0,12358851	1,26996669	

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,00201799	1,00201799	65,6	0,0001

Parameter	Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>	1,049583933	31,33	0,0001	0,03349927
<b>BA</b>	0,081623242	8,1	0,0001	0,01007753

#### Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA **cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	1,01896644	0,50948322	33,46	0,0001
<b>Error</b>	37	0,56346813	0,01522887		

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Corrected Total</b>	39	1,58243457			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,643923	9,717208	0,12340531	1,25996669	
<b>BA</b>	1	1,00201799	1,00201799	65,8	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,01694845	0,01694845	1,11	0,2983
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,026674	25,74	0,0001	0,03999093
<b>BA</b>		0,126359451	2,9	0,0063	0,0435836
<b>BA x BA</b>		-0,008857722	-1,05	0,2983	0,0083936

### LONGITUD DEL BROTES (cm)

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	0,39143637	0,39143637	21,1	0,0001
<b>Error</b>	38	0,70482534	0,01854804		
<b>Corrected Total</b>	39	1,09624171			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,357059	10,29085	0,13619117	1,32341942	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,39143637	0,39143637	21,1	0,0001
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,185677894	32,13	0,0001	0,3691528
<b>BA</b>		0,051015379	4,59	0,0001	0,01110517

Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA cuadráticos

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	0,43460322	0,21730161	12,15	0,0001
<b>Error</b>	37	0,66164849	0,01788239		
<b>Corrected Total</b>	39	1,09625171			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,396445	10,10451	0,13372506	1,32341942	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,39142637	0,39142637	21,89	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,04317685	0,04317685	2,41	0,1287
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate

<b>INTERCEPT</b>	1,149111315	26,59	0,0001	0,04321597
<b>BA</b>	0,12241891	2,59	0,0136	0,04722828
<b>BA x BA</b>	-0,014138724	-1,55	0,1287	0,0090985

<b>NUMERO DE NUDOS POR BROTE</b>
----------------------------------

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA lineales**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	1	1,65803064	1,65803064	33,99	0,0001
<b>Error</b>	38	1,85346175	0,04877531		
<b>Corrected Total</b>	39	3,5114924			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,472173	14,36698	0,22085133	1,53721451	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	0,65803064	1,65803064	33,99	0,0001
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,253725565	20,94	0,0001	0,05986283
<b>BA</b>		0,104995904	5,83	0,0001	0,01800844

**Obtención de los parámetros (Betas) de regresión para BA cuadráticos**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	1,76213964	0,88106982	18,64	0,0001
<b>Error</b>	37	1,74935276	0,0472798		
<b>Corrected Total</b>	39	3,5114924			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Mean	
	0,501821	14,14501	0,2174392	1,43721451	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>BA</b>	1	1,65803064	1,65803064	35,07	0,0001
<b>BA x BA</b>	1	0,1040899	0,10410899	2,2	0,1463
Parameter		Estimate	T for Ho: Parameter= 0	Pr T	Std Error of Estimate
<b>INTERCEPT</b>		1,196944573	17,03	0,0001	0,0702699
<b>BA</b>		0,215872103	2,81	0,0079	0,07679398
<b>BA x BA</b>		-0,021953371	-1,48	0,1463	0,01479432

**ANEXO 11** ANOVA por tratamientos, para la variable peso seco raíz (g) y peso seco parte aérea (g) a los 17 y 34 días en fase aclimatación

Factor: Tratamientos  
 Número de observaciones: 12  
 Número de niveles: 4

**Peso seco raíz (g) a los 17 días**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.000318189	3	0.000106063	1.06	0.4191
Within groups	0.000802193	8	0.000100274		
Total (Corr.)	0.00112038	11			

**Peso seco raíz (g) a los 34 días**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.00115297	3	0.000384324	0.83	0.5124
Within groups	0.00369111	8	0.000461389		
Total (Corr.)	0.00484409	11			

**Peso seco parte aérea (g) a los 17 días**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.00067746	3	0.00022582	0.47	0.7106
Within groups	0.00383305	8	0.000479131		
Total (Corr.)	0.00451051	11			

**Peso seco parte aérea (g) a los 34 días**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.00395703	3	0.00131901	0.45	0.7257
Within groups	0.023564	8	0.0029455		
Total (Corr.)	0.0275211	11			

**Valores de peso seco de la raíz (g) y de la parte aérea (g) tomados en la etapa de enraizamiento-aclimatación**

**Valores de peso seco a los 17 días**

Tratamiento	Individuo No.	Raíz	Parte aérea	Peso seco total
1	1	0.0056	0.0318	0.087
	2	0.0043	0.0137	0.018
	3	0.0016	0.0859	0.087
<b>Promedio</b>		<b>0.0115</b>	<b>0.1314</b>	<b>0.1429</b>
2	1	0.0039	0.0145	0.018
	2	0.0040	0.0219	0.025
	3	0.0059	0.0420	0.047
<b>Promedio</b>		<b>0.0138</b>	<b>0.0784</b>	<b>0.092</b>
3	1	0.0032	0.0187	0.021
	2	0.0059	0.0407	0.046
	3	0.0016	0.0165	0.018
<b>Promedio</b>		<b>0.0107</b>	<b>0.0759</b>	<b>0.086</b>
<b>Promedio</b>	1	0.0052	0.0316	0.036
	2	0.0096	0.0473	0.056
	3	0.0074	0.0258	0.032
<b>Promedio</b>		<b>0.0222</b>	<b>0.1047</b>	<b>0.126</b>

**Valores de peso seco a los 34 días**

Tratamiento	Individuo No.	Raíz	Parte aérea	Peso seco total
1	1	0.0260	0.0961	0.122
	2	0.0071	0.655	0.662
	3	0.0653	0.1673	0.232
<b>Promedio</b>		<b>0.0984</b>	<b>0.3299</b>	<b>0.428</b>
2	1	0.0664	0.2475	0.313
	2	0.0188	0.0992	0.118
	3	0.0146	0.0710	0.085
<b>Promedio</b>		<b>0.0138</b>	<b>0.4177</b>	<b>0.4315</b>
3	1	0.0098	0.0320	0.0418
	2	0.0044	0.0495	0.0539
	3	0.0266	0.1699	0.1965
<b>Promedio</b>		<b>0.0107</b>	<b>0.2514</b>	<b>0.2621</b>
4	1	0.0132	0.1424	0.155
	2	0.0148	0.1210	0.135
	3	0.0118	0.0564	0.068
<b>Promedio</b>		<b>0.0410</b>	<b>0.3198</b>	<b>0.360</b>



**ANEXO 12.** Resultados de la pruebas realizadas por la Corporación BIOTEC, 2000 para la identificación de partículas virales.



**A.** Resultados de las pruebas “DAS - ELISA”, a partir de espectofotometría (nm).

MUESTRAS Müller Thurgau (RxS)	“DAS-ELISA”		
	GFLV	GLRaV-1	GVA
RS1	(-)-0.018	(-)-0.005	(-)-0.003
RS2	(-)-0.003	(-)-0.011	(-) 0.005
RS3	(-)-0.002	(-)-0.013	(-) 0.006
CONTROLES			
Control negativo (sano de SANOFI)	(-) - 0.010	(-) 0.001	(-) 0.001
Control positivo (enfermo de SANOFI)	(-) > 3.000	(+/-) 0.287	(-) 0.006

**B.** Electroforesis de dsRNA.

Tomada en el proyecto "Sondeo de posibles agentes de enfermedades aparentemente virales de uva".  
Corporación BIOTEC (2000)<sup>2</sup>

**C.** Cálculo de los pesos moleculares de las bandas dsRNA encontradas.

ds RNA			
Banda	Movilidad	Tamaño (b.p)	Tamaño (Daltons)
1	5.00 Muy tenue	1396	0.92x10 <sup>6</sup>
2	5.20 Muy tenue	1336	0.88x10 <sup>6</sup>

<sup>2</sup>: Información publicada con autorización del autor del proyecto (Raúl Salazar)