

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA EN EL MEDIO, SOBRE LA RESPUESTA DE MATERIAL DE VID "IN VITRO".

Troncoso, A., Matte, C., Venegas, M.J. y Cantos, M.

IRNAS (CSIC) Apdo 1052, 41080 SEVILLA

RESUMEN

Se estudia el efecto de dos concentraciones (20 y 30 g l⁻¹) de sacarosa en el medio de cultivo, sobre el desarrollo in vitro de los portainjertos de vid 41B, 110 de Richter, 196-17, 161-49 de Couderc y Rupestris de Lot, del cultivar Superior y de los clones CH-1 y CH-2 procedentes de Chile.

El medio con la concentración mas baja de sacarosa favoreció, en general el crecimiento de la parte aérea del material de vid in vitro, en especial de las variedades 161-49, Rupestris de Lot, Superior y 196-17. Este mayor crecimiento de la parte aérea del explanto (órganos con clorofila), no se produjo en el sistema radical, cuyo desarrollo fue independiente de la concentración de azúcar en el medio y mas relacionable con la variedad de vid.

El medio con 20 g l⁻¹ de sacarosa también mostró una ligera mayor predisposición a la vitrificación del material vegetal in vitro.

INFLUENCE OF DIFFERENT SUCROSE AMOUNTS IN THE NUTRIENT MEDIUM ON THE RESPONSE OF GRAPEVINE CULTURED "IN VITRO".

SUMMARY

The effects of two sucrose amounts, 20 and 30 g l⁻¹, added to the nutrient medium on the in vitro development of grapevine rootstocks 41B, 110 Richter, 196-17, 161-49 de Couderc and Rupestris de Lot, of Superior cultivar and of CH-1 and CH-2 clones from Chile was studied.

Medium with the lowest amount of sucrose favoured the aerial part growth of varieties 161-49, Rupestris de Lot, Superior and 196-17. This major growth of aerial part of explant (organs with chlorophyll), did not produce it in radical system. Development of this system was independent of sugar concentration in substrat and more in relation with grape variety.

Substrat with 20 g l⁻¹ of sucrose also shown a light major inclination to vitrification of in vitro plant material.

INTRODUCCION

La presencia de azúcar en el medio nutritivo, es esencial para el desarrollo de una planta in vitro (Pierik, 1990) debido a que la fotosíntesis en estas condiciones de cultivo, suele ser insuficiente para satisfacer la demanda de carbono por la planta. Esto, se relaciona con que los tejidos verdes in vitro no son suficientemente autotróficos, con que la concentración de CO₂ en la atmósfera del tubo de cultivo no es siempre la mas adecuada (Gibson, 1967) y con una iluminación insuficiente. En consecuencia, la planta in vitro necesita tomar carbono del medio de cultivo para satisfacer sus necesidades.

Venketeswaren (1965), Vasil y Hildebrandt (1966) y Grout y Crisp (1977) intentaron inducir autotrofismo en la planta in vitro sin gran éxito. Chaumont y Gudin (1985) lograron cultivos autotróficos in vitro, aunque de poca calidad, por adición al tubo de ensayo de CO₂. Galzy y Compman (1992) cultivaron in vitro especies de vid, *Vitis rupestris* y *Vitis vinifera* en condiciones fotoautotróficas (medio sin sacarosa) después de haberlas cultivado durante 34 días en medio con sacarosa. Es decir, iniciaron

el cultivo tipo autotrófico después de haber obtenido una planta completa por cultivo no autotrófico, y no obstante las plantas finales no fueron de buena calidad.

Se deduce de lo indicado que el cultivo autotrófico in vitro es caro, difícil y de resultados inciertos, por lo que la presencia de azúcar en el medio nutritivo es el mejor sistema para complementar el nivel adecuado de carbono a la planta. La sacarosa a concentraciones entre 1 y 5%, según el tipo de material vegetal, es el azúcar más usado en el cultivo in vitro. No obstante, también se pueden utilizar otros azúcares como glucosa, fructosa etc. La nutrición heterotrófica del carbono a partir de sacarosa en el medio, implica la hidrólisis del azúcar por la planta (Galzy, 1985 y 1990 y Lees y cols, 1991).

Aunque de antemano no es posible definir la concentración óptima de sacarosa en el medio, se sabe que cuando ésta es elevada, tiende a disminuir la capacidad fotosintética. Langford y Wainwright (1988) mostraron que la capacidad fotosintética de brotes de rosa in vitro con 40 gl^{-1} de sacarosa en el medio fue significativamente menor que cuando en el medio sólo existían 20 gl^{-1} del azúcar. Chee y Pool (1988) obtuvieron plantas de *Vitis rotundifolia* de baja calidad y con poca facilidad para resistir el trasplante cuando en el medio había 3% de sacarosa.

Por el contrario, cuando las concentraciones de sacarosa son más bajas, se tiende a incrementar la capacidad fotosintética y con ello se reducen los cambios fisiológicos de la planta para adaptarse al suelo con lo que mejora su respuesta al trasplante (Conner y Thomas, 1982). No obstante, se pueden producir otros efectos no deseados. Así, concentraciones de 10 gl^{-1} de sacarosa provocaron un bajo contenido de clorofila en la planta in vitro y fuerte tendencia a la vitrificación (Langford y Wainwright, 1988). Von Arnold y Ericksson (1984) habían indicado que los brotes vitrificados o hiperhidratados originaban plantas con graves problemas para ser trasplantadas. Wainwright y Marsh (1986) también relacionaron la presencia de brotes vitrificados con la concentración de sacarosa en el medio y Debergh y col. (1981) con los cambios de presión osmótica del medio originados por la mayor o menor presencia de azúcar.

Ante una situación como la indicada, se pretende en este trabajo, conocer el comportamiento in vitro de distintos cultivares de vid cuando en el medio existen respectivamente 30 gl^{-1} o 20 gl^{-1} de sacarosa, que parecen ser los límites superior e inferior del comportamiento normal del material.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron dos pruebas: En la primera se utilizó como material vegetal el cultivar 41B de Millardet (*Vitis vinifera* var. *Chasselas* x *Vitis Berlandieri*). Por su tolerancia a la cal activa y a la sequía es el portainjerto más empleado en Andalucía.

En el segundo experimento se emplearon los cultivares, 110 de Richter (*V. Berlandieri*, var. *Resseguier* n°2 x *V. Rupestris*, var. *Martin*) que es un portainjerto tolerante a los suelos calizos y a la falta de agua. 196-17 (*V. Murviedro* x *V. Rupestris* x *V. Riparia*) portainjerto muy tolerante a la salinidad y sequía, y sensible a la cal. 161-49 de Couderc (*V. Riparia* x *V. Berlandieri*) portainjerto muy tolerante a cal activa y humedad. 41B de Millardet, ya descrito, *Rupestris* de Lot que es una especie americana pura y el cultivar Superior (variedad apirena) muy tolerante a sequía y salinidad. Todos estos portainjertos fueron facilitados por la estación de Viticultura "El Rancho de la Merced" de Jerez de la Frontera dependiente de la Junta de Andalucía. Junto con los anteriores cultivares también se utilizaron los clones CH-1 y CH-2 seleccionados en la zona desértico-salina del norte de Chile.

A partir del material tomado en campo se prepararon estaquillas de unos 15 cm de longitud sin hojas que se trataron con cobre 0.2% y se dejaron 24 horas a 4°C. Después, se les provocó una fuerte brotación por cultivo en solución de sacarosa (2%) a 25°C. A partir de los brotes neoformados, se prepararon explantos con 1-1.5 cm de longitud y dotados con dos yemas, que tras ser esterilizados con etanol 70% durante 30 segundos, hipoclorito sódico, 25 minutos a temperatura de 30°C y posterior lavado con agua estéril en tres ocasiones, se sembraron en tubo de ensayo para ser cultivados in vitro.

El medio base de cultivo fue el de TRONCOSO y cols., 1990, y las condiciones de incubación en cámara de ambiente controlado fueron 25±1°C de temperatura, 16 horas luz de fotoperíodo y una radiación fotosintética de 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

A partir del material obtenido por el método indicado y después de sucesivos subcultivos, se iniciaron los experimentos objeto de estudio.

En la primera prueba, se cultivaron 480 explantos de 41B en el medio base indicado, al que se añadieron 30 gl^{-1} de sacarosa y otros 480 explantos del mismo portainjerto, en el mismo medio base pero con adición de sólo 20 gl^{-1} de sacarosa. En el segundo experimento se repitió el esquema indicado para el primero (substratos respectivos con 30 y 20 gl^{-1} de sacarosa) para cada una de las variedades de vid en consideración, aunque en estos casos solo se usaron 24 explantos por tratamiento de azúcar y variedad de vid.

Transcurrido el tiempo determinado en cada experimento, (dos meses en el primero y un mes en el segundo), en cada explanto se midió la longitud del tallo, el número de yemas y brotes neoformados, la radicación y el número de raíces. En la primera prueba las mediciones fueron semanales, y en la segunda sólo al final del experimento.

RESULTADOS Y DISCUSION

En cuanto al primer experimento, aunque las dos concentraciones de sacarosa utilizadas (20 y 30 gl^{-1}) proporcionaron crecimientos aceptables del tallo de los explantos del portainjerto 41B, el medio con la concentración mas baja produjo resultados significativamente mejores desde la primera semana de cultivo (figura 1A). Del mismo modo, dicha concentración de azúcar también originó la formación de un mayor número de brotes en el explanto, con resultados significativamente distintos a partir de la tercera semana de cultivo (figura 1B). Es decir, la concentración de azúcar mas baja en el medio de cultivo favoreció claramente el crecimiento y desarrollo de la parte aérea del explanto del portainjerto 41B.

En el segundo experimento realizado, en el que las dos concentraciones de azúcar se aplicaron al cultivo de diferentes variedades de vid, también se llegó al mismo resultado global. Es decir, que la concentración de 20 gl^{-1} de sacarosa favoreció mas que la de 30 gl^{-1} al crecimiento y desarrollo de la parte aérea del explanto. Aunque esto se cumplió al considerar la media del crecimiento del tallo (figura 2) o del número de brotes neoformados (figura 3) del conjunto de las variedades en consideración, existieron diferencias en el comportamiento de cada una de ellas. El portainjerto 161-49 fue el que mostró la mayor diferencia y consecuentemente el mas alto grado de significación, entre el crecimiento del tallo en el medio con 20 gl^{-1} de sacarosa y el habido en el medio con 30 gl^{-1} del azúcar, le siguieron las variedades R. de Lot, Superior y 196-17 que aunque con diferencias menos acusadas todavía con un crecimiento significativamente mayor en el medio con 20 gl^{-1} de sacarosa. 110R, CH-2 y 41B también respondieron mejor en el medio con 20 gl^{-1} de sacarosa aunque en estos casos no existieron diferencias significativas con el crecimiento en el medio con 30 gl^{-1} de azúcar. Tan solo CH-1 mostró un crecimiento de tallo ligeramente superior en el medio con 30 gl^{-1} de sacarosa, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

En relación con el número de yemas-brotes, las variedades consideradas mostraron un comportamiento parecido al indicado para el crecimiento del tallo, e incluso mas homogéneo, ya que todas las variedades, excepto 110R, formaron un número mayor de yemas (con diferencias significativas) en el medio con 20 gl^{-1} de sacarosa (figura 3).

Estos resultados concuerdan con lo indicado por Langford y Wainwright (1988) quienes mostraron que la capacidad fotosintética de brotes de rosa in vitro con 40 gl^{-1} de sacarosa en el medio fue significativamente menor que cuando en el medio sólo existían 20 gl^{-1} del azúcar, lo que originó un menor desarrollo de dichos brotes. También Chée y Pool (1988) asociaron la baja calidad de las plantas de *Vitis rotundifolia* obtenidas in vitro, con la presencia en el medio de cantidades de 30 gl^{-1} de sacarosa. Del mismo modo los resultados se pueden asociar con lo indicado por Galzy y Compman (1992) sobre la relación existente entre la concentración de azúcar en el medio y la capacidad de fotosíntesis del material in vitro y en consecuencia con sus posibilidades de desarrollo.

Los autores anteriores indicaron que una adecuada reducción de sacarosa en el medio, incrementaba la capacidad fotosintética de los brotes debido a que al ser los hidratos de carbono sintetizados productos finales de almacenamiento, en la fase oscura de la fotosíntesis, su falta induce una mayor actividad fotosintética obligando a la planta a desarrollar mas la parte aérea para disponer de mayor cantidad de clorofila.

El comportamiento de los explantos de vid en cuanto al crecimiento y desarrollo del sistema radical, fue distinto al indicado para la parte aérea ya que no se pudieron establecer relaciones claras con la concentración de sacarosa en el medio.

En la primera prueba, el portainjerto 41B presentó un mayor número de explantos radicados en las primeras cuatro semanas de cultivo, es decir mayor precocidad de radicación, en el medio con mayor concentración de sacarosa (figura 4A). Después, aunque se siguió manteniendo dicha tendencia, las diferencias entre el número de explantos radicados en ambos medios no fueron significativas. El substrato con 30 gl^{-1} proporcionó el desarrollo de un mayor número de raíces por planta (figura 4B).

No existieron diferencias significativas en cuanto al tanto por ciento de plantas radicadas en los dos substratos con distintas concentraciones de sacarosa, en el segundo experimento, salvo con el cultivar Superior que respondió mejor con la concentración mas baja del azúcar (figura 5). En lo referente al número de raíces por planta (figura 6) de nuevo el cultivar Superior mostró unos resultados significativamente mejores en el medio con menos sacarosa, mientras que, al contrario, los cultivares Rupestris de Lot, CH1 y CH2 formaron mayor número de raíces en el substrato con mayor nivel de azúcar. El resto de los cultivares no presentaron diferencias significativas para este parámetro.

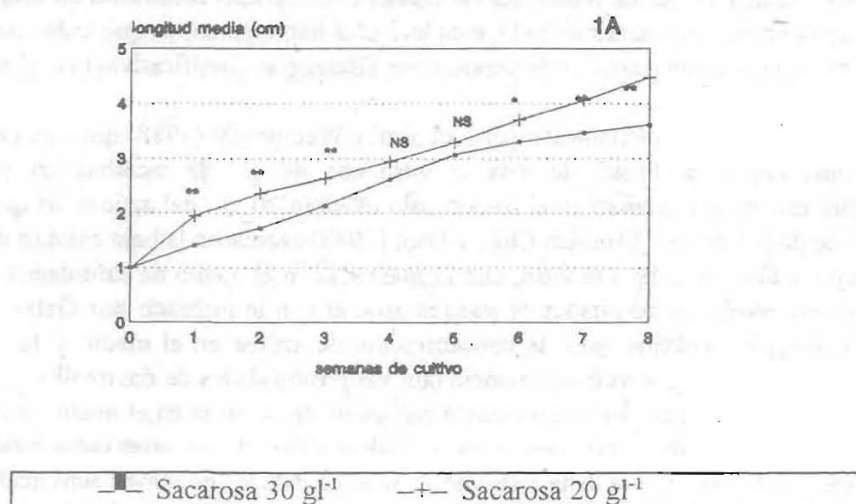
De estos resultados se deduce, que al contrario de los indicado antes para la parte aérea, verde, de la planta, la formación y desarrollo del sistema radicular no se vio favorecido en general por el medio con menor concentración de sacarosa. Este hecho avala la relación indicada entre concentración de azúcar en el substrato, actividad fotosintética y crecimiento aéreo de la planta in vitro.

En las tres primeras semanas, no se observaron síntomas de vitrificación en las plantas cultivadas en ambos substratos. A partir de ese momento, comenzaron a observarse síntomas de vitrificación en algún material cultivado en el medio con menor concentración de azúcar, llegándose al final de la prueba a un 14.66% de plantas vitrificadas, frente al 1.61% en el otro medio. No obstante dichos síntomas no fueron muy severos lo que permitió que el material afectado siguiese su desarrollo casi con normalidad. Esta mayor vitrificación al disponer la planta de menos azúcar en el medio confirmó lo indicado por Von Arnold y Ericksson (1984) y Wainwright y Mars (1986).

Del conjunto de los resultados indicados, se puede resumir que no obstante el distinto comportamiento de los cultivares usados, la concentración de 20 gl^{-1} de sacarosa en el substrato favoreció el desarrollo de la parte aérea del material de vid in vitro, aunque también favoreció su vitrificación. Por el contrario, la concentración mas alta del azúcar en el medio (30 gl^{-1}) no produjo vitrificación y benefició el desarrollo del sistema radicular de algunos cultivares, pero moderó el desarrollo de la parte aérea de la planta.

Se deduce por tanto, que para muchos cultivares de vid el nivel mas adecuado de sacarosa en el medio se sitúa entre las dos concentraciones aquí empleadas.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA DEL MEDIO SOBRE LA EVOLUCION DE LA LONGITUD MEDIA EN PLANTAS DE 41B



INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA DEL MEDIO SOBRE LA EVOLUCION DEL NUMERO MEDIO DE BROTES DESARROLLADOS EN PLANTAS DE 418

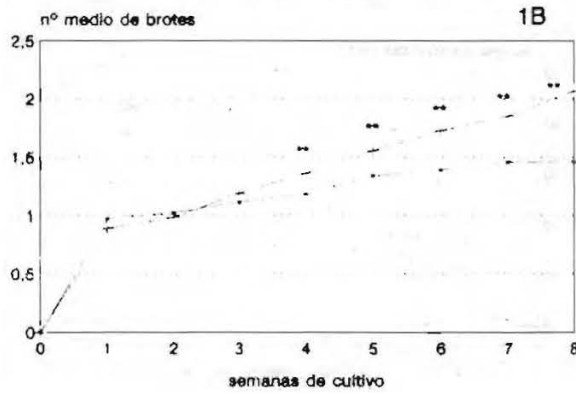


FIGURA 2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA EN EL MEDIO, SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TALLO DEL EXPLANTO DE VID, DESPUES DE 30 DIAS DE CULTIVO IN VITRO

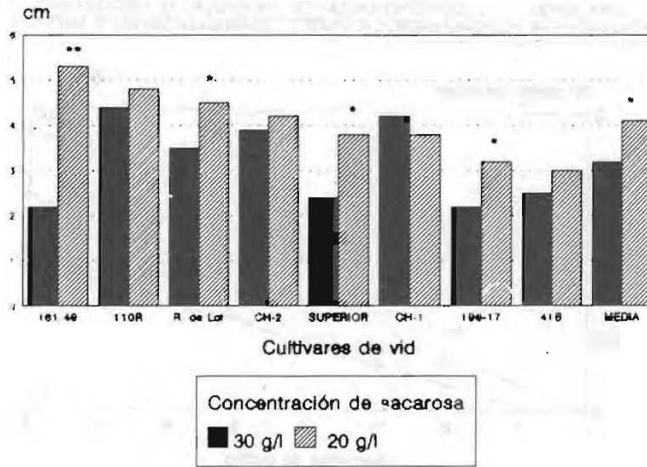
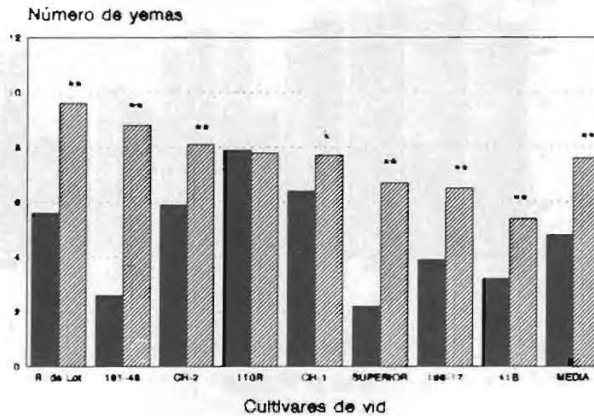
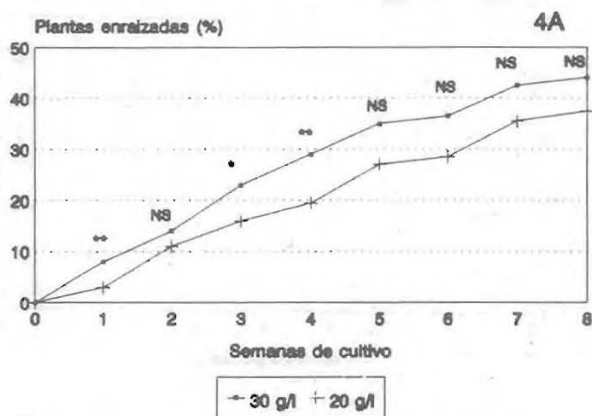


FIGURA 3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA EN EL MEDIO SOBRE EL NUMERO DE YEMAS DEL EXPLANTO DE VID, DESPUES DE 30 DIAS DE CULTIVO IN VITRO



EVOLUCION DEL PORCENTAJE DE PLANTAS ENRAIZADAS DE 41B CON 30 g/l Y 20 g/l DE SACAROSA EN EL MEDIO DE CULTIVO



INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA DEL MEDIO SOBRE LA EVOLUCION DEL NUMERO MEDIO DE RAICES DESARROLLADAS EN PLANTAS DE 41B

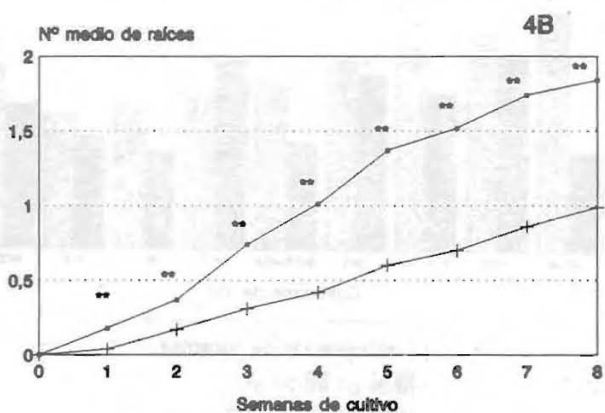


FIGURA 2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA EN EL MEDIO SOBRE LA RADICACION DEL EXPLANTO DE VID DESPUES DE 30 DIAS DE CULTIVO IN VITRO

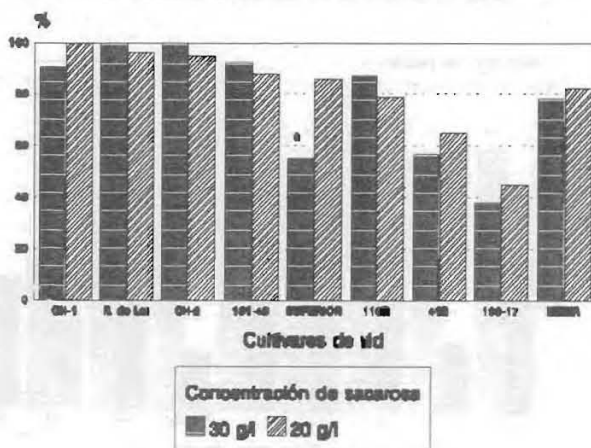
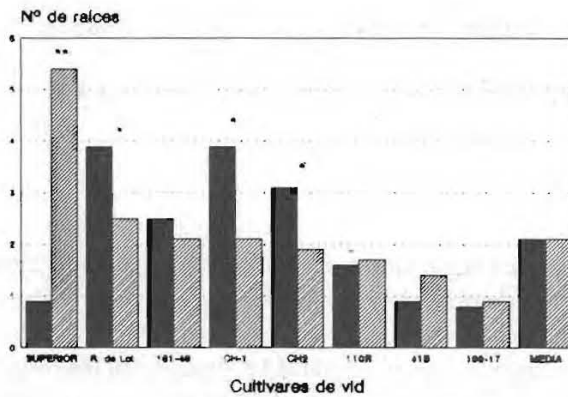


FIGURA 6. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA EN EL MEDIO SOBRE EL NUMERO DE RAICES DEL EXPLANTO DE VID DESPUES DE 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*



BIBLIOGRAFIA

- CONNER, A.J. and THOMAS, M.B. (1982). Re-establishing plantlets from tissue culture: a review. Proc. Int. Plant. Prop. Soc. 31: 342-357.
- CHAUMONT, D. and GUDIN, C. (1985). Transition from photomixotrophic to photoautotrophic growth of *Asparagus officinalis* in suspension culture. Biomass 8: 41-58.
- CHEE, R. and POOL, R.M. (1988). Sucrose and NAA influence growth of subcultured shoots and in vitro root production in *Vitis*. HortScience. 23(4): 776.
- DEBERGH D.C., MAENE N. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Sci.Hort. 14:335-345.
- GALZY, R. (1990). Remarques sur la nutrition carbonée de la vigne cultivée in vitro. Bull. O.I.V. 707-708: 5-20.
- GALZY, R. AND COMPAN, D. (1992). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31: 239-244.
- GALZY, R. 1985. Les possibilités de conservation "in vitro" d'une collection de clones de vignes. Bulletin de L'OIV. Vol. 58: 650-651: 377-390.
- GIBSON. 1967 Austr. J. Biol. Sci. 20: 189-191.
- GROUT, B.W.W. and CRISP, P. (1977). Practical aspects of the propagation of cauliflower by meristem culture. Acta Horticulturae 78: 289-196.
- LANGFORD, P.J. and WAINWRIGHT, H. (1988). Influence of sucrose concentration on the photosynthetic ability of "in vitro" grown rose shoots. Acta Horticulturae 227: 305-310.
- LEES, R.P., EVANS, E.H. and NICHOLAS, J.R. (1991). Photosynthesis in *Clematis* The President, during growth "in vitro" and subsequent "in vivo" acclimatization. J. Exp. Bot. 238: 605-610.
- PIERIK R.L.M., (1990). Cultivo "in vitro" de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- TRONCOSO, A., VILLEGAS, A. and CANTOS, M. (1990). Growth and mineral composition of grape-vine rootstock cultured in vitro with different levels of ammonium nitrate. Plant Nutrition, Physiology and Applications. Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp 581-584.
- VASIL, I.K. and HILDEBRANDT, A.C. (1966). Growth and chlorophyll production in plant callus tissues grown "in vitro". Planta 68: 69-82.
- VENKETESWAREN, S. (1965). Studies on the isolation of green pigmented callus tissue of tobacco and its continued maintenance in suspension cultures. Physiol. Plant. 18: 776-789.
- VON ARNOLD, S. and ERIKSSON, T. (1984). Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* L. (Karst.) Plant Cell Tissue and Organ Culture 3: 257-264.
- WAINWRIGHT, H. and MARSH, J. (1986). The micropropagation of watercress (*Rorippa nasturium-aquaticum* L.) J. Hort. sci. 61:251-256.