

Instituto de Recursos Naturales  
y Agrobiológicos de Sevilla (CSIC)/

Curso:  
XXXI Curso Internacional de Edafología y Biología  
Vegetal.

Proyecto para Tesis Doctoral:  
Selección y obtención de material vegetal de vid  
tolerante a situaciones de estrés povocadas por falta  
de agua y exceso de sales en el medio.

Director de Tesis:  
Dr. Antonio Troncoso de Arce

Cecilia R. Matte C.

1994

## INTRODUCCION:

Es de suma importancia para la economía de Chile, como país exportador de alimentos, mejorar la producción y calidad de sus productos agrícolas. Entre ellos destaca la producción de frutas y vinos, donde ocupa un lugar trascendental la uva. En efecto se debe indicar, que la producción de vino representa alrededor del 7 % y la de uva de mesa un 8 % del valor de la producción agropecuaria chilena. El 40% del total recaudado en este sector, se debe a la producción de vino, con 600 millones de litros producidos en 1982 logrados con una tasa de crecimiento anual de un 2 % (Ortiz, 1983). El panorama cambia para la década de los 90 con una producción de sólo 43 millones de litros, a causa de la disposiciones reglamentarias establecidas, principalmente en la Comunidad Económica Europea, y el impuesto a nivel de productores aplicado en los Estados Unidos, sin embargo se evidencia indicios claros de una fuerte recuperación; el mayor interés por incrementar la superficie plantada y el aumento de las exportaciones, por ejemplo, ha incidido en un aumento de los precios internos. (Campos et al, 1991). En cuanto a la producción de uva para pisco (bebida alcohólica) las cifras indican una producción de 120 millones de kilos (Bulnes, 1988).

El Norte de Chile representa la zona más extensa del país, y está clasificado como desierto absoluto, debido a sus condicionantes geomorfológicas y climáticas.

Sus recursos fitogenéticos, no han sido suficientemente valorados, debido a que estas grandes extensiones de tierras son poco aptas para la agricultura, lo que no atrae el interés de los estratos que planifican y dirigen el desarrollo de las Regiones en Chile.

Por otro lado, en los pocos suelos viables, la agricultura se lleva a cabo con mucho esfuerzo, debido al carácter salino y a la falta de agua que sufren los suelos. En estos casos la agricultura se mantiene con ayuda del riego por goteo, lo que ha permitido utilizar algunas extensiones de terreno en régimen de monocultivos. No obstante, la paulatina acumulación de sales en las entrelíneas de plantación, ocasionada por el contenido de sales del agua de riego y el propio del perfil de suelo, ha hecho que muchas de esas zonas en cultivo hayan vuelto a ser incultivables.

#### ANTECEDENTES GENERALES:

##### I REGION DE CHILE:

La I Región, está ubicada en el extremo Norte del Territorio Nacional, extendiéndose entre los paralelos 17' 45' hasta 21' 20' y los meridianos 68' 30' y 70' 30'. Sus límites geopolíticos son: al Norte con la República del Perú, al Oeste con el Oceano Pacífico, al Este con la República de Bolivia y al Sur con la II Región, Antofagasta. Abarca una superficie de 5.807.270

Hás. de las cuales más del 50 % corresponden al desierto absoluto, clasificado como extremadamente árido (Corfo, 1982).

Los estudios realizados en la Región, han definido los ecosistemas desde el punto de vista climático y geomorfológico, para caracterizar su desarrollo y explicar la presencia o ausencia de especies vegetales en las diferentes áreas, aportando antecedentes de los procesos que han llevado a su adaptación en determinados hábitats (Santibañez et al, 1982). Estos procesos coevolutivos son los que en definitiva proporcionan el potencial de la variabilidad genética de los recursos vegetales endémicos y también de las especies introducidas (Hawkes, 1985).

#### Clima:

Corfo (1982) e Iren-Corfo (1978), indican que toda ésta Región se encuentra bajo la influencia constante del Anticiclón del Pacífico Sur-Oriental, generando condiciones de extrema estabilidad atmosférica.

En el litoral, se genera una inversión térmica, cuyo límite se ubica entre los 800 a 900 metros de altitud. El enfriamiento provocado origina abundante nubosidad de tipo estrato-cúmulos, que penetra en el continente por algunos kilómetros con un ciclo diario de avance y retroceso. Durante la noche, el brusco

enfriamiento del aire sumado al efecto estabilizador de la inversión térmica, originan frecuentes neblinas o camanchacas, que penetran en el continente hasta los 1000 metros de altura, y producen un efecto característico en las grandes quebradas y en las pampas.

Las temperaturas en el litoral y sus valles, presentan una oscilación diaria que no sobrepasa los 10 °C y las máximas rara vez sobrepasan los 28 °C. Este régimen térmico mantiene libre de heladas durante todo el año a esta zona, favoreciendo la agricultura local, cuya producción hortícola puede repetirse tres o cuatro veces en el año.

En las pampas, aumenta la oscilación térmica, llegando a máximas superiores a los 30°C y mínimas inferiores a 0°C. A excepción de los Oasis, los cuales mantienen un régimen similar al litoral, en las pampas se producen heladas constantes, las cuales alcanzan singular intensidad en los sectores ocupados por los salares. El litoral y las pampas, presentan precipitaciones inferiores a los 5 mm anuales, conformando un desierto absoluto. Estas escasas precipitaciones son erráticas, sin un patrón de distribución definido.

En la precordillera y altiplano, el clima se enfria gradualmente hasta alcanzar temperaturas bajo cero a los 4.000 metros sobre el nivel del mar (msnm). En el régimen altiplánico,

se mantienen las temperaturas medias durante todo el año por debajo de los 6 °C, y bajo cero durante varios meses.

Las precipitaciones en la precordillera, van desde 10 mm en el límite con las Pampas hasta algo más de 200 mm en el límite con el Altiplano, mostrando una distribución de tipo trópicar, preferentemente en verano.

Este régimen permite en la precordillera, el crecimiento de vegetación resistente a sequía, representada por asociaciones de cactáceas que evolucionan hacia una asociación tolar relativamente densa.

En el Altiplano, las precipitaciones superan los 200 mm, llegando a más de 300 mm en las partes más altas.

Los sectores bajos de los valles reciben el agua que proviene de las zonas altas, donde las avenidas dejan una reserva hídrica en el suelo suficiente para 2 o más años.

#### Suelos:

Iren-Corfo (1978), indica que en la actualidad el aprovechamiento en actividades agrícolas o pecuarias de los suelos de la I Región, está constituido por superficies pequeñas y

dispersas.

En el sector occidental de la Pampa del Tamarugal, donde se encuentra Huara, existieron algunos lagos que posteriormente se transformaron en salares, con predominio de materiales arcillosos y limosos, estratificados y con una cubierta de sales de espesor variable que va de unos centímetros hasta un metro o más. Estas sales generalmente son de sodio, calcio, magnesio y potasio, delicuescentes, de modo que da la impresión que estuvieran los suelos húmedos.

En la Pampa del Tamarugal, el panorama de los suelos muestra una graduación muy regular, en la que las arenas y arenas con gravas se presentan en una franja cerca del pié de los Andes, variando gradualmente a través de la llanura a arenas finas, arenas-limosas, franco-limosas, franco-arcillo-limosas, hasta llegar a suelos arcillo-limosos. Estos últimos se han depositado en "áreas lacustres", a pié de los flancos interiores de la Cordillera de la Costa.

La descripción de los suelos se resume en el trabajo de Wrigh (1963), quien los califica dentro de la Serie Tamarugo. Esta serie ocupa una franja alargada de suelos desarrollados en la Pampa del Tamarugal, desde la quebrada de Tiliviche hasta llegar a un sector cercano a Pintados. Los suelos están formados por sedimentos recientes alterados, primitivamente ocupados por los

bosques abiertos de Tamarugos con altitud entre los 1.000 a 1.200 msnm y relieve plano. Los perfiles del suelo son marcadamente estratificados con horizontes alternados de limo y arena.

El reconocimiento generalizado de los suelos de la I Región, ha sido realizado por IREN (1978) a una escala 1:500.000, con detalle cartográfico obtenido de la información en terreno, apoyado en la interpretación fotográfica de imágenes de satélite ERTS ampliada a 1:500.000, en bandas 5 y 7 (onda visible e infrarrojo).

Perfil del suelo, sector Arica:

- 00 - 20 cm Gris claro (10 YR, 7-2), con horizontes de arena y limos, no friable, estructura granular simple y fina. Con material vegetal no degradado incluido en horizontes limo arcillosos.
- 20 - 70 cm Gris claro (10 YR, 7-2) con arenas y horizontes de limo y arcilla. Presenta material petreo de menor a mayor tamaño a medida que se profundiza, de formas redondeadas por el transporte por agua.
- 70 - ++ cm Gris arena húmedo (10 YR, 5-1), apreciándose los horizontes de piedras por tamaño, revelando distintos

períodos de aluviones. Presenta inclusiones de limos y arcillas entre los horizontes de arenas finas, además se aprecian restos vegetales y animales sin degradar.

Análisis químico de muestras: meq/l

Muestra	Ph	K x 10 <sup>-3</sup>	Na	Ca	Mg	SO <sub>4</sub>	Cl	B
1A	6.98	136	1.352	367	98	38	1.980	-
2A	7.04	118	1.165	154	105	46	1.605	-
3A	7.02	68	978	106	83	57	1.384	-
4A	6.86	105	1.054	69	123	48	1.345	-

La ciudad de Arica, asentada sobre el delta del Río San José, presenta suelos dulces, debido a los continuos aluviones que bajaron en tiempos pretéritos y dejaron sus huellas en las estratas de piedras de gran tamaño mostrando horizontes de arenas, limos y arcillas que se repiten a medida que se profundiza en el suelo.

II REGION DE CHILE:

La II Región, Antofagasta, considerada exclusivamente zona minera por las minas de cobre y de nitrato de potasio (salitre), sustenta gran parte de la economía del país, sus condiciones edafoclimáticas son similares a la de la I Región

### III REGION DE CHILE:

Gurovish (1990), indica que la III Región, Atacama, tiene importancia agrícola, debido a que en ella se ubica el Valle del Río Copiapó. Su principal actividad agrícola es el cultivo de la vid, con el objetivo de producir básicamente para exportación en estado fresco al mercado internacional. El desarrollo de este cultivo tuvo lugar en forma muy intensa a partir de 1980, con la introducción del riego por goteo, que permitió la plantación de 4.500 Hás de parronales de vid de mesa, en suelos considerados marginales por su pendiente, pedregosidad, escasa profundidad u otras limitantes graves. Adicionalmente, casi la totalidad de los suelos previamente cultivados en el valle con riego superficial, también se han incorporado a la producción de uva de mesa bajo riego por goteo.

El uso continuo de este método de riego en el valle, ha originado como consecuencia una paulatina acumulación de sales en las entrelíneas de plantación, debida al contenido salino del agua de riego, al contenido previo de sales del perfil de suelo (en las áreas recién incorporadas al cultivo), y a la alta evapotranspiración (con un máximo, para algunos sectores del valle, de 950 mm), asociada a láminas de riego que generalmente no han considerado una fracción de lavado.

Las áreas afectadas por problemas de salinidad en el valle

representan un 65 % de la superficie arable (5.155 has, de un total de 7.931 Hás arables). Sin embargo, la mayor parte de la superficie agrícola actualmente con problemas de salinidad se ubica hacia el Nor-poniente de la ciudad de Copiapó, área limitada en su producción de uva de mesa por las condiciones climáticas existentes, relacionadas con la cercanía del mar.

A pesar de lo anterior, a una distancia de 20 Km de la ciudad de Copiapó hacia la costa, existen alrededor de 1.500 Hás plantadas con parronales, que están seriamente afectadas por problemas de salinización del suelo, cuyo efecto se ha visto significativamente incrementado de año en año, como resultado del uso continuo del riego por goteo.

En general, al término de la estación productiva, el volumen de suelo ocupado por las raíces inmediatamente bajo la línea de los goteros existentes, se encuentra en un nivel de concentraciones de sales totales, y de los elementos fitotóxicos principales, inferior a los niveles críticos que pueden esperarse para la vid, sin embargo, en la entre línea de plantación se ha producido una concentración de sales totales y de elementos fitotóxicos que superan varias veces el nivel soportable para un alto rendimiento de esta especie.

Asimismo, hasta una distancia de 35 Km al Sur-Oriente de la ciudad de Copiapó se encuentran más de 1.800 Hás de parronales,

también afectadas en mayor o menor grado por problemas similares, el resto de la superficie plantada con esta especie frutal se ubica hacia el interior del valle del río Copiapó, con una condición menos intensa de salinización, debido a que la calidad del agua de riego es superior, así como por tratarse de plantaciones jóvenes, en suelos con menor contenido inicial de sales, antes de su incorporación al cultivo con riego por goteo.

#### ANTECEDENTES ESPECIFICOS:

Los datos anteriores indican la necesidad de frenar la degradación, por salinización de los suelos, que se está produciendo en la zona Norte de Chile como consecuencia de métodos inadecuados de cultivo. Para evitar o al menos moderar los procesos de salinización del suelo agrícola, hay que actuar conjuntamente sobre la infraestructura (disponibilidad de agua, sistemas de drenaje, y otros), métodos de cultivos (tipo, dosis y frecuencia de riegos, labores, abonados, enmiendas orgánicas o cálizas, y otros) y también sobre las características de las plantas a cultivar, en especial en cuanto a su tolerancia a las situaciones de estrés.

Los dos primeros apartados (actuaciones sobre la infraestructura y métodos de cultivo) exigen, normalmente, grandes obras de adaptación, a veces relativas a la ingeniería civil, con

fuertes inversiones, lo que, aunque necesario de considerar, se aleja de las perspectivas de este trabajo. En consecuencia, aunque se trate de un aspecto parcial del problema, el presente estudio considera la caracterización y obtención de material vegetal de vid mejor adaptado a las condiciones de estrés (hídrico, salino) que configuran el sistema edafoclimático.

Tradicionalmente, la mejora genética de los vegetales se ha logrado cambiando métodos de selección clonal con otros de cruzamientos y retrocruzamientos inter o intraespecíficos. Aunque, este binomio es responsable de la aparición de los numerosos híbridos que hoy se usan en la agricultura mundial, no está carente de limitaciones (falta de un método de selección eficiente, frecuentemente en mutantes e incompatibilidad entre especies).

Los avances logrados últimamente en los estudios sobre biología molecular y celular de plantas y en las técnicas de ingeniería genética (cultivos in vitro, transferencias de genes, y otros), están abriendo nuevas perspectivas a los procesos de mejora genética aunque también con múltiples dificultades. Existen plantas como algunas solanaceas y cereales, en los que los métodos modernos de ingeniería genética están teniendo éxitos espectaculares. Por el contrario, otras, como las leñosas, se muestran bastante reticentes a los mismos, lo que se debe principalmente a que no responden adecuadamente a las técnicas.

Ante estas circunstancias, un proyecto lógico y actualizado sobre mejora genética de plantas debe combinar las ventajas que ofrecen los procedimientos tradicionales con las que aportan las nuevas tecnologías. Sobre esta base el objetivo básico y global del presente trabajo es obtener y caracterizar plantas de vid tolerantes a situaciones de estrés ambiental como son el exceso de sales y la falta de agua.

Para ellos, se consideran los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Selección y propagación del material de vid a emplear.
  - 1.1.- Selección de portainjertos y variedades aceptadas como tolerantes y sensibles al estrés hídrico y salino tanto españoles como chilenos.
  - 1.2.- Respuesta del material seleccionado a su propagación in vitro e invernadero. Formación de bancos de germoplasma.
- 2.- Caracterización del material de vid seleccionado por su respuesta a las situaciones de estrés consideradas.
  - 2.1.- Construcción de una escala de tolerancia a nivel de invernadero.
  - 2.2.- Construcción de una escala de tolerancia a nivel in vitro.

- 2.3.- En función de los resultados anteriores, posibilidad de afinar un procedimiento rápido in vitro para medir la tolerancia.
  - 2.4.- Definición de marcadores morfológicos y fisiológicos relacionables con la tolerancia.
  - 2.5.- Definición de marcadores moleculares relacionables con la tolerancia.
- 
- 3.- Mejora de las técnicas de cultivo in vitro de la vid e incremento de la biodiversidad.
    - 3.1.- Germinación de semillas y embriones in vitro
    - 3.2.- Afinar un procedimiento de selección in vitro de material cigótico tolerante.
    - 3.3.- Regeneración de plantas de vid in vitro a partir de explantes (disco foliar, peciolo y anteras), susceptibles de ser transgenizado.

## MATERIALES Y METODOS:

Se utilizarán portainjertos y variedades aceptadas como tolerantes y sensibles al estrés hídrico y salino tanto españoles como chilenos.

### Material vegetal español:

Se utilizarán los portainjertos españoles que presenten tolerancia y sensibilidad a la sequía y/o salinidad para construir una escala de tolerancia a estas condiciones de estrés.

Gilabert describe:

110 Richter : (Berlandieri x Rupestris), se adapta bien a los terrenos compactos y de subsuelo húmedo. Toma bien el injerto en el campo y comunica a las púas una buena capacidad de fructificación. Planta de excelente porvenir, salvo en casos de muy alta dosis de caliza. Presenta una buena resistencia a la sequía.

41 B : (Chasselas x Berlandieri), es una de las escasas hibridaciones de vinífera que han resultado resistentes a la filóxera. Considerado, con justicia, como una de las mejores plantas existentes en el mercado de portainjertos.

Ocupa el primer lugar por su corriente. Presenta un desarrollo lento en el primer año. Favorece y adelanta la maduración de los frutos. Muestra una mediana resistencia a la sequía.

196 - 17 : (Murviedro x Rupestris), presenta una mediana resistencia a la salinidad, puede adaptarse a terrenos más bien sueltos. Se le considera de segundo orden.

161-49 : Presenta un grado bajo de tolerancia a la sequía y a la cáliza. Es uno de los mejores portainjertos presentes en el mercado español.

Rupestris du Lot : Presenta un gran vigor, tolera la cáliza, y tiene raíces profundas capaces de alcanzar capas del terreno donde se acumula la humedad, es apropiada para climas de lluvias.

Material vegetal chileno:

Se recolectaron estacas de madera dura de vides adaptadas a la Zona Norte, específicamente de la Ciudad de Arica, I Región (zona considerada Desierto absoluto) dos clones de uva de mesa provenientes de la zona Central. Estas fueron sometidas a tratamiento de enraizamiento con auxina para ser colocadas en macetas con turba bajo invernadero para su enraizamiento y brotación. Una vez obtenido los sarmientos, se cortaron las yemas y bajo cámara de flujo laminar se esterilizaron para sembrarlas en tubos con medio nutritivo.

Clon 1: Uva blanca de mesa llamada Cristal traída de la zona Central de Chile, específicamente de Concepción. Presenta una excelente adaptación a los suelos de Arica, mostrando un gran vigor.

Clon 2: Uva negra de mesa, llamada Princesa, traída desde la zona Central de Chile, específicamente de Los Angeles. También presenta una excelente adaptación a los suelos de Arica, y un gran vigor.

Propagación in vitro:

a.- Tratamiento de esterilización:

Las yemas obtenidas de estacas de vid de campo e invernadero, se les somete a diferentes tiempos de exposición y concentraciones de etanol e hipoclorito sódico bajo cámara de flujo laminar.

b.- Medio nutritivo:

Se utilizará el medio nutritivo de Troncoso y cols. (1990), dosificado en tubos de vidrio cerrados con tapón de propileno y sellados con papel parafilm para el crecimiento de yemas. También se utilizará el medio de cultivo de Nitsch y Nitsch (1969) para los ensayos de embriogénesis somática en placas petri desechables y en tubos de vidrio para cultivo de embriones además para este último ensayo también se evaluará el medio de Murashige y Skoog (1962).

Para los ensayos de invernadero se utilizarán macetas con turba y arena y recipientes para cultivo hidropónico.

Todos los ensayos se realizarán en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiológicos de Sevilla, bajo la dirección de los doctores Antonio Troncoso de Arce, José A. Pintor-Toro y José Antonio Godoy.

#### ENSAYOS:

##### 1.- Simulación in vitro de estrés hídrico:

Se utilizarán las 2 variedades chilenas y los 5 portainjertos españoles.

La simulación in vitro se llevará a cabo por medio del carbohidrato polietilen glicol (PEG) que presenta la facultad de retener el agua en el medio de cultivo. PEG se incluirá en el medio de cultivo nutritivo en las siguientes concentraciones: 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l, cuyos resultados nos darán la primera curva de tolerancia, para posteriormente afinar el rango de concentraciones y definir el nivel preciso de tolerancia.

Se llevarán a cabo 3 repeticiones con 10 plantas cada una, lo que da un factorial de:  $7 \times 6 \times 3 \times 10 = 1260$  plántulas.

7 : clones

3 : repeticiones

6 : concentraciones

10: plántulas

Las evaluaciones se llevarán a cabo, cada 15 días considerando el tamaño de la plántula, número de brotes, hojas y raíces, color y aspecto general de la plántula.

Las plántulas que mejor respondan al tratamiento se repicarán y/o se traspasarán a suelo.

## 2.- Simulación in vitro de estrés salino:

Se utilizarán las 2 variedades chilenas y los 5 portainjertos españoles.

La simulación in vitro se llevará a cabo por medio de cloruro de sodio, siendo ésta la sal predominante de los suelos nortinos chilenos. El cloruro de sodio se incluirá en el medio de cultivo nutritivo en las siguientes concentraciones: 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l, cuyos resultados nos darán la primera curva de tolerancia, para posteriormente afinar el rango de concentraciones y definir el nivel preciso de tolerancia. Se toma como concentración límite 5 mg/l por las conclusiones de los trabajos de mandioca y olivo de Troncoso et al. (comunicación personal).

Se harán 3 repeticiones con 10 plántulas cada una, por lo tanto un factorial de:  $7 \times 3 \times 6 \times 10 = 1260$  plántulas.

Las evaluaciones se llevarán a cabo cada 15 días, considerando el tamaño de la plántula, número de brotes, hojas y raíces, color y aspecto general de la plántula.

Las plántulas que mejor respondan al tratamiento se repicarán y/o se traspasarán a suelo.

### 3.- Simulación de estrés salino in vivo:

Se utilizarán plantas procedentes de invernadero tanto de las variedades chilenas como de los portainjertos españoles. Se las someterá a tres diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0, 25, 50 mM) en medio hidropónico.

El ensayo constará del siguiente factorial:  $7 \times 3 \times 10$   
= 210 plantas  
7 : clones  
3 : concentraciones de NaCl  
10: plantas

Las evaluaciones se llevarán cada 15 días, considerando número de brotes, tamaño y aspecto general de las planta.

#### 4.- Simulación de estres hídrico in vivo:

Se utilizarán plantas procedentes de invernadero de las 2 variedades chilenas y los 5 portainjertos españoles. Se colocarán en macetas con turba y arena sometiéndolas a 3 tipos de riegos: 25, 100 y 400 ml de agua a la semana.

Por lo tanto este ensayo constará del siguiente factorial:  $7 \times 3 \times 10 = 210$  plantas

Las evaluaciones se llevarán a cabo cada 15 días considerando número de brotes, tamaño y aspecto general de la planta.

#### 5.- Germinación de semillas y de embriones in vitro:

##### a.- Esterilización:

Se utilizarán semillas de uva española a las que se les someterá a diferentes tiempos de exposición y concentraciones de etanol e hipoclorito sódico para su esterilización y posterior germinación.

b.- Germinación de semillas:

Para la germinación de semillas se utilizará por una parte la germinación tradicional en placa petri con papel filtro humedecido, y por otra, la germinación in vitro utilizando tubos de vidrio con medio nutritivo de Troncoso y cols. (1990).

Se utilizarán 2 variedades de uva española, el ensayo se repetirá 3 veces con 10 semillas cada uno, por lo tanto un factorial de:  $2 \times 3 \times 2 \times 10 = 120$  semillas

2 : variedades	2: placa y tubo
3 : repeticiones	10: semillas

c.- Evaluación del medio de cultivo nutritivo más óptimo para la germinación de embriones in vitro:

Se utilizarán 2 variedades de uva española con 3 diferentes medios de cultivo nutritivo: Troncoso y cols. (1990), Nitsch y Nitsch (1969) y Murashige y Skoog (1962). Se obtendrán los embriones desde las semillas con ayuda de un estereomicroscopio.

Se harán 3 repeticiones con 10 embriones cada una, por lo tanto un factorial de:  $2 \times 3 \times 3 \times 10 = 180$  embriones

2 : variedades	3 : medios de cultivo
3 : repeticiones	10 : embriones

Cada 15 días se evaluará; tamaño de la plántula, número de hojas y raíces y aspecto general de la plántula.

d.- Evaluación de reguladores de crecimiento en la germinación de embriones in vitro:

Stamp y Meredith (1988b) sugieren utilizar reguladores de crecimiento para la germinación de embriones de vid in vitro, sin embargo es sabido que el efecto de los reguladores de crecimiento no es favorable para la germinación de embriones. Por lo tanto se evaluará el efecto del ácido naftalenacético (ANA) en conjunto con la belcil aminopurina (BAP), en las siguientes concentraciones.

ANA	BAP	(mg/l)
0,25	0,05	
0,05	0,25	
0,5	0,1	
0	0	

Se harán 24 repeticiones con cada combinación, por lo tanto se utilizarán 98 embriones.

Cada 15 días se evaluará; tamaño de la plántula, número de hojas y raíces y aspecto general de la plántula.

Según los resultados que arrojen estos ensayos, serán las condiciones para los dos siguientes.

6.- Selección in vitro de material cigótico tolerante a salinidad:

Se utilizarán semillas de uva de dos variedades españolas, a las que se les someterá a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/l) en el medio nutritivo.

Se harán 3 repeticiones con 10 semillas cada una, por lo tanto un factorial de:  $2 \times 3 \times 6 \times 10 = 360$  pepitas

Las evaluaciones se llevarán a cabo cada 15 días en considerando el tamaño de la plántula, número de hojas y raíces y aspecto general de la plántula.

7.- Selección in vitro de material cigótico tolerante a estrés  
hídrico:

Se utilizarán semillas de uva de dos variedades españolas, a las que se les someterá a diferentes concentraciones de PEG (0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/l) en el medio nutritivo.

Se harán 3 repeticiones con 10 pepitas cada una, por lo tanto un factorial de:  $2 \times 3 \times 6 \times 10 = 360$  pepitas

Las evaluaciones se llevarán a cabo cada 15 días considerando el tamaño de la plántula, número de hojas y raíces y aspecto general de la plántula.

#### 8.- Embriogénesis somática:

##### a) Hojas:

La embriogénesis somática está supeditada al genotipo del cultivar por ende se utilizarán los cultivares Cabernet Sauvignon, Chardonnay y Grenache, por ser sugeridos por Goebel-Tourand (1993) y Stamp y Meredith (1988a).

Los explantes serán discos de hojas y peciolo, procedentes de cultivo in vitro. Las hojas que se utilizarán serán las más jóvenes no sobrepasando el centímetro de largo.

Se utilizará el medio de cultivo de Nitsch y Nitsch (1969), sólido, con 20 gr de sacarosa y un factorial de reguladores de crecimiento de 2,4-D (2,4-Acido diclorofenoxyacético) 1 y 2 mg/l, con BA (N-Bencil-9-(2-tetrahidroperanil)-adenina) 1 y 2 mg/l en placas petri. Se someterán los cultivos a oscuridad por un mes

a 25 °C, para posteriormente ser traspasados a luz.

Se harán 3 repeticiones con 10 placas conteniendo cada placa 3 explantes . Por lo tanto un factorial de:  $3 \times 3 \times 10 \times 3$   
= 210 explantes.

La primera evaluación se realizará en el momento de traspasar a la luz, el parámetro a medir es la presencia o ausencia de callos, y el aspecto general de estos.

A los 45 días de iniciado el cultivo, se subcultivarán los callos en medio de Nitsch y Nitsch con 0,2 mg/l de 2,4-D, por un mes.

Una vez evaluado, se subcultivarán los callos en medio de Nitsch y Nitsch sin reguladores de crecimiento para la inducción de embriones. Se evaluará el número de embriones en éstos por explante.

Después de un mes se volverá a subcultivar en el mismo medio de cultivo. Una vez desarrolladas las plántulas se trapasarán a suelo.

## b) Anteras:

Se utilizarán los cultivares Rupestris du Lot, Grenache y Cabernet Sauvignon, sugeridos por Martinelli et al (1993), Altamura et al (1992), Faure et al (1991), Faure (1989), Stamp y Meredith (1988a), Mauro et al (1986), Rajasekaran y Mullins (1983 ab) y Srinivasan y Mullins (1980).

Se tomarán los brotes florales en el estado fenológico pre-antesis, específicamente en el estado uninucleado de la microspora. Los brotes florales se someterán por 3-4 días a 4 °C.

Se sembrarán las anteras en medio de Nitsch y Nitsch (1969) sólido y en placa petri. El medio estará suplementado con 0,22 mg/l de BAP (6-bencilaminopurina) y 1,1 mg/l de 2,4-D.

El cultivo se someterá a oscuridad hasta la aparición de los primeros callos, que es aproximadamente un mes desde el inicio del cultivo. Se evaluará la presencia o ausencia de callos y el aspecto general de estos. Después de este período el cultivo se traspasará a luz.

Los callos se subcultivarán en medio de Nitsch y Nitsch con 0,22 mg/l de BAP y 0,55 mg/l de 2,4-D. Se evaluará el aspecto general de los callos.

Para la inducción de embriones se subcultivarán los callos en medio de Nitsch y Nitsch sin reguladores de crecimiento. Se evaluará el número de embriones por explante.

Las plantas adultas se traspasarán a suelo.

Se harán 3 repeticiones con 10 placas cada una conteniendo cada placa 5 anteras, por lo tanto el factorial constará de:  $3 \times 3 \times 10 \times 5 = 450$  anteras

#### ESTADISTICA:

Se utilizarán las pruebas de  $X^2$  y test de Student.

## BIBLIOGRAFIA:

- Altamura M. M., A. Cersosimo, C. Majoli and M. Crespan (1992).  
Histological study of embryogenesis and organogenesis from  
anthers of *Vitis rupestris* du Lot cultures in vitro.  
*Protoplasma* 171: 134-141.
- Bulnes L.O. (1988). Nuevos cultivares de vid para la producción de  
pisco. IPA La Platina N° 46. pp 29-88
- Campos A.M., B.J. Valenzuela y B.J. Pezoa (1991). La producción  
y comercialización de vinos. IPA La Platina N° 70. pp 11-19.
- CORFO (1982). Análisis de los Ecosistemas de la I Región de Chile  
199 pp.
- Faure O., M. Mengoli, A. Nougarede and N. Bagni (1991). Polyamine  
pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages  
of *Vitis vinifera*. *J. Plant Physiol.* 138: 545-549.
- Faure O. (1989). Embryons somatiques de *Vitis rupestris* et  
embryons zygotiques de *Vitis* spp: Morphologie, histologie,  
histochimie et développement. *Can. J. Bot.* 68: 2305 - 2315.

Goebel-Tourand I., M.C. Mauro, L. Sossountzov, E. Miginiac and A. Deloire (1993). Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterization and the effect of ABA, BAP and zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 91-103.

Gurovich L. (1990). Mejoramiento de suelos afectados por salinización causada por el riego por goteo en el valle de Copiapó. *ACONEX* 28 Abril/Mayo/Junio: 15-19.

IREN - CORFO (1978). Inventario de Recursos Naturales por Método de Percepción de Satélite Landsat. I Región. Convenio IREN - SERPLAC. Sin número de pág.

Martinelli L., P. Bragagna, V. Potelli and A. Scienza (1993). Somatic embryogenesis from leaf and petiole derived callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Report* 12: 207-210.

Mauro M.C., C. Nef and J. Fallot (1986). Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet sauvignon.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

- Nitsch J.P. and C. Nitsch (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85-87.
- Ortiz R.C. (1983). La situación vitivinícola en Chile y el mercado internacional. IPA La Platina Nº 16 pp 5-25.
- Rajasekaran K. and M.G. Mullins (1983 a). Influence of genotype and sex-expression on formation of plantlets by cultured anthers of grapevines. *Agronomic* 3: (3) 233.238.
- Rajasekaran K. and M.G. Mullins (1983 b). The origin of embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34 (2): 108-113.
- Santibañez F., L. Luzio, E. Vera, G. Etienne y K. Lailhacar (1982). Zonificación de los recursos climáticos de la I Región. En: *Análisis de los ecosistemas de la I Región de Chile*. CORFO 1982. 199 pp.
- Srinivasan C. and M.G. Mullins (1980). High frequency somatic embryo production from unferlized ovules of grapes. *Sci Hort* 13: 245-252.
- Stamp A.J. and C.P. Meredith (1988 a). Proliferative somatic embryogenesis from zygotic embryos of grapevine. *J.A. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113 (6): 941-945.

Stamp A.J. and C.P. Meredith (1988 b). Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. *Scientia Hortic.* 35: 235-250.

Troncoso A., A. Villegas, C. Mazuelos and M. Cantos (1990). Growth and mineral composition of grape vine rootstock cultured in vitro with different levels of amonium nitrate. *Plant Nutrition, Phisiology and Applications.* Kluwer academic publishers. The Netherlands.