

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“OPTIMIZACIÓN DEL USO DE REGULADORES DE  
CRECIMIENTO PARA EL CULTIVO *in vitro* DE TRES  
CULTIVARES PORTAINJERTOS EN *Vitis vinifera* L. (VID) PARA  
USO EN LA INDUSTRIA PISQUERA: “HARMONY”, “PAULSEN”  
Y “FREEDOM””**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**PATRICK GONZALES BOCÁNGEL**

**Lima - Perú**

**2017**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente tesis (Art. 24 -  
Reglamento de Propiedad Intelectual)**

*Dedicatoria*

*En el proceso aprendí de valiosas personas que...*

*Dra. Antonietta, la Ciencia no te espera, corre y alcázala.*

*Jonathan, las mejores ideas surgen luego de minutos de locura.*

*Liliana, no hay ninguna adversidad que la voluntad no pueda superar.*

*Edson, la solución hasta de los problemas más grandes están en los detalles más pequeños.*

*Equipo CIRGEBB, no hay mejor forma de terminar un día que con las sonrisas de los amigos.*

*... y les agradezco por eso.*

# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1	Objetivo general .....	3
2.2	Objetivos específicos.....	3
<b>III.</b>	<b>REVISIÓN DE LA LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
3.1	Definición del problema .....	4
3.2	Marco conceptual .....	6
3.2.1.	Generalidades del cultivo .....	6
3.2.2.	Clasificación taxonómica de <i>Vitis vinifera</i> L. ....	8
3.2.3.	Descripción de la planta <i>Vitis vinifera</i> L. ....	8
3.2.4.	Origen de la vid en Perú .....	17
3.2.5.	Cultivo de la vid en Perú .....	17
3.2.6.	Cultivo de tejidos .....	22
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1	Lugar de ejecución.....	39
4.2	Materiales .....	39
4.2.1	Material vegetal.....	39
4.2.2	Materiales de uso rutinario .....	39
4.3	Medios de Cultivo .....	40
4.3.1	Medio de cultivo .....	40
4.3.2	Soluciones .....	40
4.4	Equipos .....	40
4.5	Métodos .....	41
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
5.1	15 días de tratamiento.....	44
5.2.1	“Harmony” (1613 couderc x dog ridge).....	44
5.2.2	“1103 Paulsen” (V. berlandieri x V. rupestris) .....	46
5.2.3	“Freedom” (1613 couderc x dog ridge).....	48
5.2	45 días de tratamiento.....	50
5.2.1	“Harmony” (1613 couderc x dog ridge).....	50
5.2.2	“1103 Paulsen” (V. berlandieri x V. rupestris) .....	52
5.2.3	“Freedom” (1613 couderc x dog ridge).....	54

5.2.4	Análisis de los comportamientos de las variables al finalizar los 45 días de ensayo.....	56
5.2.5	Análisis de la longitud.....	56
5.2.6	Análisis del número de hojas .....	58
5.2.7	Análisis de la formación de tejido calloso .....	61
5.2.8	Análisis del enraizamiento .....	63
5.2.9	Análisis de la reevaluación.....	67
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Parámetros de salinidad del suelo para vid.....	6
<b>Tabla 2:</b>	Contenido nutricional.....	11
<b>Tabla 3:</b>	Distribución del área cultivada en hectáreas de vid en Perú hasta el 2012.....	18
<b>Tabla 4:</b>	Aumento en la producción de uva en Perú en el período 2010-2014.....	20
<b>Tabla 5:</b>	Producción, superficie cosechada y rendimiento por regiones (principales) de uva en el Perú en el 2014.....	20
<b>Tabla 6:</b>	Producción nacional de Pisco del 2000 al 2015.....	20
<b>Tabla 7:</b>	Exportación de Uvas frescas según subpartida 0806100000.....	21
<b>Tabla 8:</b>	Exportación de Pisco según subpartida 2208202100.....	21
<b>Tabla 9:</b>	Descripción de los tratamientos utilizados en la micropropagación para los tres cultivares.....	42
<b>Tabla 10:</b>	Comportamiento de la micropropagación del cultivar “Harmony” a los 15 días luego de sembrados los esquejes.....	44
<b>Tabla 11:</b>	Comportamiento de la micropropagación del cultivar “Paulsen” a los 15 días luego de sembrados los esquejes.....	46
<b>Tabla 12:</b>	Comportamiento de la micropropagación del cultivar “Freedom” a los 15 días luego de sembrados los esquejes.....	48
<b>Tabla 13:</b>	Comportamiento de la micropropagación del cultivar “Harmony” a los 45 días luego de sembrados los esquejes.....	50
<b>Tabla 14:</b>	Comportamiento de la micropropagación del cultivar “Paulsen” a los 45 días luego de sembrados los esquejes.....	52
<b>Tabla 15:</b>	Comportamiento de la micropropagación del cultivar “Freedom” a los 45 días luego de sembrados los esquejes.....	54
<b>Tabla 16:</b>	Comportamiento en la reevaluación de micropropagación del cultivar “Harmony” a los 45 días de sembrados los esquejes.....	68
<b>Tabla 17:</b>	Comportamiento en la reevaluación de micropropagación del cultivar “Paulsen” a los 45 días de sembrados los esquejes.....	69
<b>Tabla 18:</b>	Comportamiento en la reevaluación de micropropagación del cultivar “Freedom” a los 45 días de sembrados los esquejes.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Imagen del haz y envés de las hojas en época joven y adulta de Paulsen.....	13
<b>Figura 2:</b>	Imagen del haz y envés de las hojas en época joven y adulta de Freedom.....	14
<b>Figura 3:</b>	Imagen del haz y envés de las hojas en época joven y adulta de Harmony.....	15
<b>Figura 4:</b>	MS/2 + ANA 0.5ppm, expresión del buen desarrollo foliar y radicular.....	45
<b>Figura 5:</b>	MS/2 + BAP 1.0 + ANA 0.5ppm, explantes manifestaron hiperhidratación.....	45
<b>Figura 6:</b>	MS/2 + BAP 1.0 + ANA 0.5ppm, proliferación de tejido calloso sobre las bases.....	47
<b>Figura 7:</b>	MS/2 + ANA 0.05ppm, crecimiento adecuado de los esquejes.....	47
<b>Figura 8:</b>	A. MS/2 + BAP 1.0 + ANA 0.5ppm y B. MS/2 + BAP 2.0 + ANA 0.5ppm, efecto sobre los esquejes ante elevadas concentraciones de reguladores.....	49
<b>Figura 9:</b>	MS/2 + ANA 0.075ppm, óptimo crecimiento del esqueje.....	49
<b>Figura 10:</b>	Acción de concentraciones elevadas de BAP, formación de múltiples brotes (izquierda e inhibición del crecimiento radicular (derecha).....	51
<b>Figura 11:</b>	Alta susceptibilidad de Paulsen a los reguladores de crecimiento, el crecimiento de callos sobre las bases impide la adecuada toma de nutrientes provocando un mal desarrollo de los esquejes.....	53
<b>Figura 12:</b>	Engrosamiento de la base y formación de callos impiden el desarrollo de raíces.....	55
<b>Figura 13:</b>	Izquierda, esquejes provenientes de brotes hiperhidratados, Derecha, esquejes provenientes de brotes normales, 30 días en MS/2.....	60
<b>Figura 14:</b>	Promedio de los resultados de Longitud (A) y Número de hojas (B) después de 45 días de siembra y prueba estadística de Tukey en el cultivar “Harmony”.....	64
<b>Figura 15:</b>	Promedio de los resultados de Longitud (A) y Número de hojas (B) después de 45 días de siembra y prueba estadística de Tukey en el cultivar “Paulsen”.....	65

<b>Figura 16:</b>	Promedio de los resultados de Longitud (A) y Número de hojas (B) después de 45 días de siembra y prueba estadística de Tukey en el cultivar “Freedom”.....	66
<b>Figura 17:</b>	La exposición a una reevaluación generó cambios en los tratamientos con BAP para Harmony y Freedom.....	67
<b>Figura 18:</b>	Promedio de los resultados de Longitud (A) y Número de hojas (B) en los ensayos de repetición después de 45 días de siembra y prueba estadística Tukey en el cultivar “Harmony”.....	69
<b>Figura 19:</b>	Promedio de los resultados de Longitud (A) y Número de hojas (B) después de 45 días de siembra y prueba estadística de Tukey en el cultivar “Paulsen”.....	70
<b>Figura 20:</b>	Promedio de los resultados de Longitud (A) y Número de hojas (B) después de 45 días de siembra y prueba estadística de Tukey en el cultivar “Freedom”.....	70

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b>	Medio de cultivo MS/2 (CIRCEBB).....	86
<b>Anexo 2:</b>	Rol y forma disponible de los constituyentes en un medio de cultivo.....	87
<b>Anexo 3:</b>	<b>3.1</b> Reporte de resultados totales de cada unidad experimental de las variables Longitud y Número de hojas en cada cultivar a los 15 y 45 días.....	88
	<b>3.2</b> Reporte de resultados en los tratamientos de reevaluación en cada unidad experimental de las variables Longitud y Número de hojas en cada cultivar a los 45 días.....	91
<b>Anexo 4:</b>	<b>4.1</b> Cuadros de los Análisis de Varianza y resultados de prueba estadística Tukey realizados para las variables de Longitud (izquierda) y Número de hojas (derecha) a los 45 días para cada cultivar.....	92
	<b>4.2</b> Cuadros de los Análisis de Varianza y resultados de prueba estadística Tukey realizados para las variables de Longitud (izquierda) y Número de hojas (derecha) en los ensayos de repetición a los 45 días.....	93
<b>Anexo 5:</b>	(imágenes).....	95



## RESUMEN

Una de las técnicas de reconocida eficacia es el uso de portainjertos por la resistencia a las plagas que estos le confieren a la variedad comercial. La información disponible sobre la micropropagación *in vitro* de portainjertos de vid es escasa, siendo el objetivo del estudio el analizar y optimizar el uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo en tres cultivares portainjertos para el uso en la industria pisquera: “Harmony”, “Freedom” y “Paulsen”. Se estudiaron diferentes concentraciones de la bencilaminopurina (BAP) y del ácido naftalenacético (ANA) como reguladores de crecimiento en distintas concentraciones y combinaciones sobre el medio de cultivo MS/2, analizando un total de 20 tratamientos para cada cultivar. Para la elección de las mejores combinaciones y concentraciones se evaluaron la longitud de plántula, el número de hojas y características visuales no cuantitativas (grosor de tallo, coloración de hojas) a los 15 días y 45 días después de la siembra. Mediante la prueba estadística de Tukey se determinaron las diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada cultivar. Se corroboraron los resultados, replicando el material en sus mismos tratamientos y reevaluando por segunda vez a 45 días. Para el cultivar Harmony se concluyó que el mejor medio de propagación es el medio MS/2 + ANA 0.5ppm; para el cultivar Freedom, el medio MS/2 + ANA 0.05ppm; y para el cultivar Paulsen, se encontraron dos medios con igual respuesta positivas al no presentar diferencias significativas, el medio MS/2 + ANA 0.075ppm y el medio MS/2 + ANA 0.1ppm. Se observó una clara respuesta genotipo dependiente de la acción de la auxina sobre los cultivares, así se vio también, que el genotipo fue determinante en los efectos de la citoquinina sobre los mismos, pero manifestaron respuestas mucho más drásticas, pues todos los esquejes desarrollaron tejidos callosos desde BAP 0.5 ppm.

Palabras clave: *In vitro* – Portainjerto – Vid pisqueras - Harmony – Paulsen - Freedom

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Vitis vinifera* L. en el Perú constituye una de las actividades frutícolas de mayor importancia por su extensión (43 748.79 hectáreas según censo agrario 2012), valor de la producción (690 378.9 miles de dólares según SUNAT 2015) y producir la materia prima que requiere la industria vitivinícola nacional. La necesidad de incrementar la producción de vid por la mayor demanda en el mercado nacional, así como por el incremento de la exportación como uva de mesa o transformado, ha impulsado a el aumento de la producción de este material adoptando condiciones de tecnologías no tradicionales (tecnología tecnificada) en su cultivo y con el uso de métodos agronómicos que aseguren una calidad fitosanitaria en el cultivo. Una de las técnicas de reconocida eficacia es el uso de portainjertos por la resistencia a las plagas que estos le confieren a la variedad comercial. En los últimos años, se han importado de los Estados Unidos de Norte América y Europa portainjertos que vienen siendo estudiados en la eficacia de su uso (Palma y Landeo del Pino, 2008). Uno de los impactos de la introducción de tecnología tecnificada es el gran incremento de rendimiento de uva que supera las 30 toneladas por hectárea (MINAGRI-SIEA, 2016).

En la mayoría de las regiones vinícolas más importantes del mundo, las uvas se cultivan sobre patrones injertados (WSU, 2012). Es decir, los injertos varietales (la parte de la planta que produce las hojas, brotes y frutos) son injertadas sobre patrones resistentes al insecto filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch), un pequeño chupador de savia, y a nematodos microscópicos que atacan las raíces de la vid (Clark, 2012). Se utilizan cruces de diversas especies de *Vitis* de América del Norte como patrones como el único medio factible para prevenir la pérdida del viñedo debido a la infestación de vid de origen europeo susceptibles (*Vitis vinifera* L.) por la filoxera (Keller *et al.*, 2012).

La utilización de injertos puede ser empleada para superar problemas de sequía, exceso de agua, y salinidad que tengan los viñedos (UC Integrated Viticulture, 2013). Pese a las enormes ventajas que ofrece al cultivo de la vid, aun en el Perú se conservan las

prácticas agrícolas tradicional, estableciéndose plantación a “pie franco” (la misma planta enraíza y da los frutos), práctica tradicional que todavía se sigue extendiendo en las diferentes regiones pisqueras del país. En adición, dicha práctica los obliga la utilización de agroquímicos para el control de bichos, el uso de portainjertos evita la utilización de los mismos y prolonga el tiempo de vida de las plantas con rendimientos casi constantes (Palma y Landeo del Pino, 2008).

La importación de portainjertos obliga a controles fitosanitarios a fin de no permitir el ingreso de plagas no existentes en nuestro territorio. La producción *in vitro* de los mismos asegura su inocuidad y distribución de material limpio de todo patógeno a nivel nacional, hecho de suma importancia no solo para el establecimiento de las plantaciones sino para el futuro uso y comercialización de los productos de este cultivo. En este sentido, la presente investigación, realizada en las instalaciones del Centro de Investigación en Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), pretende generar una formalización de la producción mediante la optimización del uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo *in vitro* para tres cultivares de vid de uso comercial como portainjertos.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Optimizar del uso de reguladores de crecimiento, Bencilaminopurina y Acido naftalenacético, para el cultivo *in vitro* de tres cultivares de vides portainjertos para *Vitis vinifera* L., para uso comercial en la industria pisquera: “Harmony”, “Paulsen” y “Freedom”.

### 2.2 Objetivos específicos

- Evaluar cuantitativamente y cualitativamente las variables: número de hojas, altura y longitud de la raíz por cada tratamiento en cada cultivar luego de 45 días de realizada la micropropagación.
- Elegir el medio de cultivo con la mejor respuesta con relación al balance de reguladores de crecimiento para cada cultivar a partir de la evaluación de variables cuantitativas y cualitativas.

### III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### 3.1 Definición del problema

Desde hace aproximadamente una década la agroexportación de productos no tradicionales, como la uva de mesa, se ha convertido en uno de los sectores más dinámicos de nuestra economía, según Lopez (2014), las exportaciones de uvas de mesa han tenido una tendencia creciente a partir del año 2000, de igual forma se ha observado que productos derivados como el Pisco ha sufrido incremento en su exportación, como lo afirma la Comisión Nacional del Pisco (CONAPISCO): “...*la producción de pisco ha presentado un crecimiento acumulado de 34 por ciento entre el 2011 y 2015. En el 2011 la producción fue de 6.3 millones de litros y en el 2014 se alcanzó a los 8.6 millones de litros y en diciembre del año pasado se alcanzó una producción de 9.5 millones de litros que marcaron un récord histórico...*”.

Sin embargo, a pesar de este incremento, nuestra producción aún queda muy por detrás de la que ostenta Chile, donde, según la Organización Internacional de Vid y Vino (OIV, 2016), la superficie cultivada en el 2012 (últimos datos disponibles) fue de 206 mil hectáreas, mientras que en el Perú hubo 26 mil hectáreas.

Fitosanitariamente, a diferencia de Chile, el suelo del Perú no se encuentra libre de la filoxera (Charlín, 1992; Vieira, 1985), por lo que el uso de portainjertos resistentes a dicho patógeno, como tecnología distinta o complementaria al uso de plaguicidas, resulta necesaria.

La necesidad de incrementar la producción de vid por la mayor demanda en el mercado nacional, así como por el incremento de la exportación como uva de mesa o transformado, ha impulsado a el aumento de la producción de este material adoptando condiciones de tecnologías no tradicionales (tecnología tecnificada) en su cultivo y con el uso de métodos agronómicos que aseguren una calidad fitosanitaria en el cultivo. Una de las técnicas de reconocida eficacia es el uso de portainjertos por la resistencia a las plagas que estos le confieren a la variedad comercial. En los últimos años, se han

importado de los Estados Unidos de Norte América y Europa portainjertos que vienen siendo estudiados en la eficacia de su uso.

Cabe precisar que, el uso de portainjertos para vid puede ser necesaria por otras razones que no tienen directa relación con la filoxera, como lo menciona Archer (2002) y Muñoz y González (2000) quienes lo justifican por varios factores, como: presencia de parásitos que afectan el sistema radicular, fundamentalmente los nemátodos y, las distintas características fisicoquímicas del suelo (ver Tabla 1), como salinidad, elevado o bajo pH, exceso o falta de humedad, baja fertilidad, aireación y la compactación del mismo.

Sumado a esto, como lo reporta el “Estudio acerca de las tecnologías de cultivo de vid y producción de pisco y propuesta de cómo establecer distintas calidades de pisco” realizado mediante el “Proyecto de cooperación UE-Perú en materia de asistencia técnica relativa al comercio”, unos de los principales problemas o limitaciones de los viñedos en determinadas zonas del Perú son las plagas y en menor medida la salinidad.

A pesar de ello, nuestro país tiene en la gran mayoría de sus viñedos plantaciones sobre pie franco. La región Tacna presenta ambos sistemas de plantación; Moquegua, 67 por ciento a pie franco y 33 por ciento portainjertos; Arequipa, a pie franco en los viñedos antiguos y portainjertos en los viñedos recientes; Ica, 80% a pie franco y 20% portainjertos; Lima, el 90% lo ha realizado a pie franco y 33% con portainjertos (algunos casos usan ambos sistemas a la vez) (Palma y Landeo del Pino, 2008).

La poca incidencia en el uso de portainjertos, podría deberse a la falta de conocimiento, por parte de los viticultores más antiguos, de las ventajas que ofrece su uso y de las necesidades que se pueden cubrir haciendo uso de este sistema de plantación, y por falta de material certificado en el mercado. Ante la falta de material certificado en el mercado surge la opción de una producción masiva mediante la técnica del cultivo de tejidos *in vitro*. De esta forma se asegura una planta genéticamente idéntica al parental y libre de patógenos. Pero, quizás la principal ventaja de la tecnología *in vitro* es la producción de material genético de alta calidad , que se puede ejecutar en cualquier lugar, independientemente de la estacionalidad y las condiciones del tiempo, y todo el año (desde la introducción a *in vitro* hasta la siembra en suelo permanente), mientras que con técnicas de propagación tradicionales es necesario contar con una planta madre con

suficiente madera para generar los patrones, lo que llevaría aproximadamente tres años, desde su siembra (Walker y Golino, 1999).

**Tabla 1: Parámetros de salinidad del suelo para vid**

Problemática del suelo	Sin problemas a máximo 10% de pérdida	Problema creciente 10-25% pérdida	Problema severo 25-50% pérdida
Salinidad mS/cm	1.5 - 2.5	2.5 - 4	4 - 7
% Sodio intercambiable	< 10	10 -15	> 15
Cloro meq/L	< 10	10 – 30	> 30
Sodio meq/L		> 30	
pH	5.5 - 8.5		

FUENTE: Doraliza, 2012 (Guía Técnica-Agrobanco)

### 3.2 Marco conceptual

#### 3.2.1. Generalidades del cultivo

La *Vitis vinifera* L., uva cultivada, es un miembro de la familia de *Vitaceae*, híbrido de dos especies americanas *Vitis vulpine* y *Vitis labrusca* (Jamwal 2013). Fue domesticada hace aproximadamente 6000-10000 años (Levadoux, 1956; McGovern, 2003; Zohary y Hopf 2000). El género se compone de más de 60 especies interfértiles cuya distribución geográfica se limita a las zonas templadas del hemisferio norte, algunas especies alcanzan los trópicos. Entre ellos, la especie *Vitis vinifera* L. es la única autóctona de Europa, Asia y África del Norte (This *et al.*, 2006). El género ha sido dividido en dos subgéneros, *Euvtis* y *Muscadinia*; algunos autores los refieren como dos géneros *Vitis* y *Muscadinia* (Reisch *et al.*, 2012). Los que están separados por características morfológicas, anatómicas, y citológicas. Las especies del subgénero *Euvtis* poseen  $2n=2x=38$  cromosomas, zarcillos bifurcados, corteza estriada, semillas piriformes, diafragmas nodales, llamadas uvas de racimo; mientras que las especies del subgénero *Muscadinia* tienen  $2n=2x=40$  cromosomas, zarcillos continuos, corteza estrellada, semillas naviformes, carecen de diafragmas en los nodos, llamadas uvas muscadinias. *Vitis vinifera* L. es, con mucho, la especie económicamente más importantes y es

responsable de la mayoría de las plantaciones de uva comerciales, no sólo para el vino (Shapiro, 2012).

*Vitis vinifera* L., está dentro de los frutales que fueron introducidos por los españoles al Perú, luego de la conquista. El inicio exacto del cultivo de vid en el Perú aún se desconoce, pero la mayoría de historiadores coinciden que a mediados del siglo XVI se introdujo la vid al país mediante la siembra de cepas originarias de las Islas Canarias (Fernandez-Cano, 2001; Brown, 2001; Garcia, 2004).

Actualmente, las plantaciones de vid se encuentran dispersas a lo largo de la costa peruana con una expansión constante en los últimos cinco años, principalmente en las regiones de La Libertad, Lima, Arequipa, Tacna, Piura e Ica; siendo estas dos últimas regiones con los valores más altos (DGESEP, 2015). El cultivo se encuentra difundido en todo el mundo, según la FAO (2016), en promedio, para el periodo 2010-2014, las mayores producciones se concentran en China, Italia y Estados Unidos. China ocupa el primer lugar con un promedio anual de 10 millones de toneladas. En Sudamérica, Chile ocupa el lugar en la producción anual con tres millones de toneladas en promedio, aproximadamente.

Los diversos cultivares de uvas de mesa producidas en el Perú son: “Crimson Seedless”, “Flame Seedless”, “Sugarone”, “Thompson Seedless” y “Red Globe” (Provid, 2016). Por otro lado, como lo afirma la Comisión Nacional del Pisco (CONAPISCO): “...*la producción de pisco ha presentado un crecimiento acumulado de 34% entre el 2011 y 2015... se alcanzó un récord histórico...*”. Lo que mantiene a este cultivo como un producto agroindustrial prometedor.



### 3.2.2. Clasificación taxonómica de *Vitis vinifera* L.

*Vitis vinifera* L. es un miembro de la familia de *Vitaceae*, híbrido de dos especies americanas *Vitis vulpina* y *Vitis labrusca* (Jamwal, 2013). La clasificación botánica que proporciona Hassler (2016) es la siguiente:

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Vitales
<b>Familia</b>	Vitaceae
<b>Género</b>	<i>Vitis</i>
<b>Especie</b>	<i>Vitis vinifera</i> L.

### 3.2.3. Descripción de la planta *Vitis vinifera* L.

#### A. Descripción Botánica

*Vitis vinifera* L. es una planta trepadora vigorosa, que alcanza una altura de 16 a 20 m si se deja sin podar. Se trepa por medio de zarcillos bifurcados producidos de forma intermitente en dos de cada tres nudos vegetativos. Sus hojas son de 9 a 28 cm de ancho, de pedúnculo largo, palmeada lobulada, y toscamente dentadas. Las flores con pequeñas de color verdosas en inflorescencia de tipo panícula. Los frutos son bayas carnosas, con o sin semillas (Shapiro, 2012).

Las raíces, salvo se empleen semillas, proceden de la diferenciación de células del periciclo, también denominada capa rizógena, con múltiples ramificaciones, es decir, raíces laterales que se ramifican en más raíces laterales más pequeñas, teniendo un efecto en el incremento del área aprovechada. La mayor parte del sistema radicular se difunde, generalmente, dentro de los primeros 90 cm del suelo. Algunos hongos del suelo como *mycorrhizae*, viven en una asociación mutualista con las raíces de la vid. Las que influyen en la nutrición (toma de fósforo) y crecimiento de las plantas (Hellman, 2003). Las diferentes variedades de uvas tienen, naturalmente, diferentes patrones de crecimiento de la raíz. Las raíces de *Vitis riparia* crecen más verticalmente, mientras que las de *Vitis rupestris* tienen un crecimiento más lateral, por ejemplo (Goldammer, 2015).

La inflorescencia de la uva es una panícula que se encuentra en la parte abaxial de la hoja. Pudiéndose encontrar de una a seis inflorescencias soportadas por brote, variaciones dependientes al cultivar y condiciones ambientales. Las inflorescencias están constituidas por flores de 2-7 mm de largo, que varían desde menos de 60 a más de 1000.

Cada flor tiene un cáliz de cinco sépalos rudimentarios, cinco pétalos fusionados en sus puntas para formar la caliptra, que encierra los órganos reproductivos, cinco estambres y un pistilo. El pistilo es de ovario supero, conformado por dos hojas carpelares. Durante la maduración de la flor, la caliptra cae facilitando la fertilización por los estambre que ella contiene (Reisch *et al.*, 2012).

Las yemas contienen puntos de crecimientos que se desarrollan en la axila de todas las hojas. La única que se desarrolla en esta área se describe en términos botánicos como una yema axilar. En viticultura, se describen dos brotes asociados a una hoja, la yema lateral y la yema dormante (o yema latente). La yema lateral es la verdadera yema axilar de la hoja del follaje, y la yema latente se forma en la axila de las brácteas de la yema lateral. Debido a la asociación de su desarrollo, las dos yemas están situados una al lado de la otra en la axila de la hoja principal (Hellman, 2003). A pesar de que la yema dormante o latente pareciera una simple estructura, en su interior se encuentran tres zonas de crecimiento que brotarán en la siguiente temporada. Estas son nombradas, por la mayoría de referencias, como yema primaria, secundaria y terciaria de la yema dormante (Weaver, 1976; Mullins *et al.*, 1992; Hellman, 2003; Goffinet, 2004; Goldammer, 2015).

Un buen brote produce, dependiendo de la variedad o cultivar y a las condiciones de la temporada anterior en la que la yema dormante se desarrolló, de uno a tres racimos de flores (Hellman, 2003; Goldammer, 2015), estos se desarrollan la base abaxial del pedúnculo de las hojas, por lo general a partir el tercer o sexto nodo desde la base. Las inflorescencias se alternan con la formación hojas o zarcillos en una relación de dos a uno, dos nudos forman inflorescencias y uno forma zarcillo (Goldammer, 2015). Un racimo contendrá de decenas a varios cientos de flores individuales, también, dependiendo de la variedad (Hellman, 2003).

Una vez ocurrida la fertilización de las flores, las uvas se desarrollan a partir del ovario. El óvulo, junto con sus embriones en el interior, forman las semillas. Puesto que son

cuatro óvulos por flor, el máximo número de semillas por uva son, por ende, cuatro (Hellman, 2003). El tamaño de la uva está relacionado con el número de semillas en su interior, pero también condicionado por las condiciones de crecimiento y las prácticas de cultivo, particularmente con el uso de agua, lo que puede conllevar a un fenómeno descrito por Pratt (1971) conocido como *millerandage*, en el cual algunas bayas inmaduras son retenidas por el racimo sin completar su crecimiento y desarrollo normal, disminuyendo los rendimientos del cultivo, mas no así su calidad (Goldammer, 2015). El crecimiento del fruto se produce en tres etapas generales: 1) crecimiento inicial rápido; 2) periodo corto de crecimiento lento -fase *Lag*-; y 3) período de rápido crecimiento -fase *Véraison*- (Weaver, 1976; Mullins *et al.*, 1992; Hellman, 2003; Retallack, 2012; Goldammer, 2015).

#### B. Composición del fruto

Según los últimos datos disponibles en la página web de la Organización Internacional de Vid y Vino (OIV), que datan del año 2012, la producción total de uva de ese año se destinó un 64% para producción de vino, 34% para el consumo de uva de mesa y 2% para la producción de pasas. La gran cantidad de azúcar en el fruto de la vid es importante en el destino de este fruto para la producción y elaboración de vino. Shapiro (2012) y Goldammer (2015) mencionan que el porcentaje de azúcar en el fruto va de 15 a 25%, con cantidades aproximadamente igual de glucosa y fructosa y solo trazas de sacarosa. Shapiro (2012), menciona, por otro lado, una baja cantidad de vitamina C (~ 3mg/100g) y, además, concentraciones parecidas de ácido tartárico y ácido málico (~ 0.5g/100g). Así también, hace referencia a los compuestos fenólicos como constituyentes importantes del fruto pues juegan un rol clave para determinar el color del fruto y las características del sabor del vino.

El contenido nutricional que ofrece el INS en “Tablas peruanas de composición de alimentos” (2009) para la uva Italia es el siguiente:

**Tabla 2: Contenido nutricional**

Por cada 100g de fruta			
Energía	66 kcal	Calcio	19 mg
Agua	81.1 g	Fósforo	28 mg
Proteínas	0.4 g	Zinc	0.07 mg
Grasa total	0.1 g	Hierro	0.5 mg
Carbohidratos totales	17.7 g	Niacina	0.24 mg
Carbohidratos disponibles	16.8 g	Vitamina A eq. totales	3.0 µg
Fibra cruda	0.4 g	Tiamina	0.03 mg
Fibra dietaria	0.9 g	Riboflavina	0.1 mg
Cenizas	0.7 g	Vitamina C	2.8 mg

FUENTE: INS, 2009

Los contenidos nutricionales varían de una variedad a otra, pero los valores entre ellas son muy cercanos (INS, 2009).

### C. Situación fitosanitaria de Portainjertos

Como en todo el mundo, la viticultura se inició con plantas sin injertar. Sin embargo, problemas graves en los años 1860-1870, aproximadamente, con la crisis filoxérica en Francia donde se destruyeron casi la totalidad de los cultivos (Del solar y Silva, 1997; Cousins, 2005), llevaron a la obligada utilización de portainjertos. Insecto parecido a un áfido que pueden alimentarse y dañar las raíces de *Vitis vinifera* (Reisch, 2012). Los científicos reconocieron que la filoxera que atacó los viñedos de Francia, provino de América del Norte, por lo que tomaron a plantas de vid silvestres que aparentemente manifestaban resistencia al ataque del insecto para sus estudios. Una amplia experimentación logró identificar qué selecciones de uvas norteamericanas, resistentes a filoxera, eran adecuadas para su uso como portainjertos en los viñedos europeos (Cousins, 2005).

Muchas especies silvestres de vid en América del Norte son resistentes a la filoxera, sin embargo, sólo unas pocas especies fueron adecuadas para su uso directo como portainjertos.

*Vitis riparia* y *V. rupestris* fueron una fuente importante de selecciones de portainjertos. Sin embargo, estas dos especies no son muy tolerantes a los suelos calcáreos, y la disponibilidad de nutrientes en el suelo varía con el pH; por ejemplo, las plantas que crecen en suelos de alto pH necesitan ser adaptados a la baja disponibilidad de hierro. *Vitis berlandieri* es reconocida por su adaptación a suelos calcáreos, de pH alto y resistente a la filoxera., pero esta especie es muy difícil de enraizar a partir de esquejes maduros, por lo que no son utilizadas directamente como patrones. Los viticultores cruzaron *V. berlandieri* con *V. rupestris* y *V. riparia* y desarrollaron nuevas familias de

patrones que combinan la adaptación a suelos calcáreos con la facilidad de propagación (Cousins, 2005; Reisch, 2012). Estas tres fueron las fuentes más importantes, y poco a poco se incorporaron otras especies como *Vitis cordifolia*, *V. monticola*, *V. rotundifolia*, *V. aestivalis*, *V. nesbittiana*, *V. mustangensis* y *V. acerifolia* (Boyden y Cousins, 2003; Cousins y Lauver, 2003; Reisch, 2012), para luchar contra otra peste muy común, pero menos letal en vid, los nemátodos radiculares (*Meloidogyne spp*, *Xiphinem spp*, *Pratylenchus spp*, etc).

Hasta hoy, la razón más importante por la que los portainjertos son utilizados en la viticultura es para la protección contra la filoxera (*D. vitifoliae*). Por otro lado, aun cuando los suelos se encuentran libre de filoxera o no representan una amenaza, otras pestes pueden ser manejadas con los portainjertos y son varios factores que lo justifican como: presencia de parásitos que afectan el sistema radicular, fundamentalmente los nemátodos y, las distintas características fisicoquímicas del suelo (ver Tabla 1), como salinidad, elevado o bajo pH, exceso o falta de humedad, baja fertilidad, aireación y la compactación del mismo (Muñoz y González, 2000; Archer, 2002; Walker y Stirling, 2008).

Sin embargo, existen países, como en el caso de Chile, en donde las plantas de vid son cultivadas a pie franco, pues ninguna peste manifiesta problema para sus cultivos, no obstante, la adopción de los portainjertos en el país del sur está en aumento, así lo informó el Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile durante Seminario Internacional sobre portainjertos en la uva de mesa en el 2012. Debido principalmente a la vigorosidad que otorgan a la planta, el agotamiento del suelo agrícola y el envejecimiento de los huertos (Bornscheuer y Cruzat, 2003). Su uso se traduce en mayores frutos.

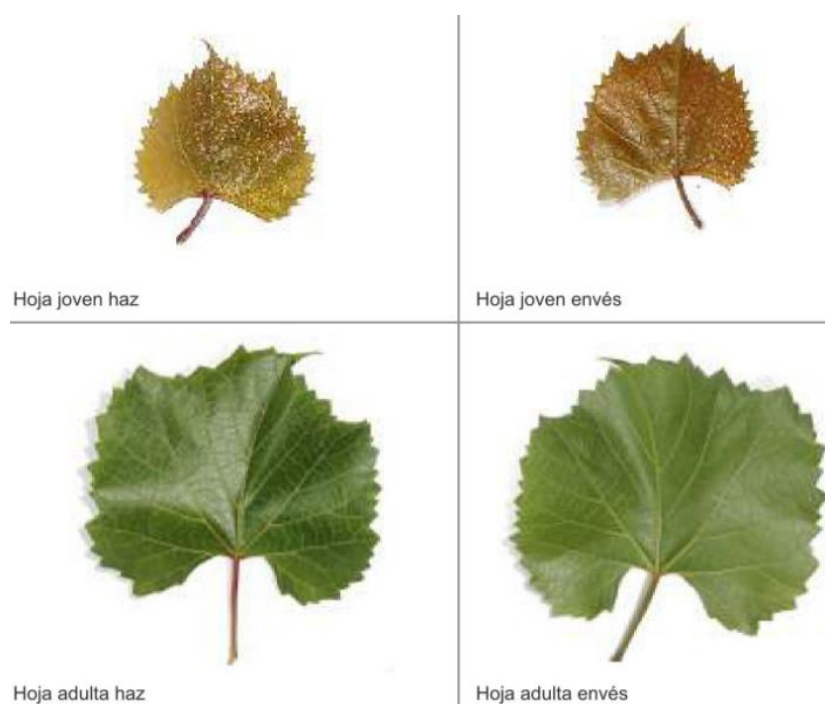
Es importante que aquellos que decidan el uso de portainjertos sean conscientes de las condiciones bajo las cuales se seleccionó el patrón y por qué fue elegido, no sólo por las cualidades que tendrá. No será más útil que una planta a pie franco si las condiciones del lugar no se ajustan a sus características. Deben de coincidir las expectativas del usuario con los atributos conocidos del patrón particular.

Es preciso definir, antes, el término cultivar, y no confundirlo con variedad o forma. Un cultivar es un conjunto de plantas que ha sido seleccionado para un carácter en particular o combinación de caracteres; es distinto, uniforme y estable para estos caracteres; y cuando se propaga por los medios apropiados, conserva esos caracteres (ISHS, 2009)

En el presente estudio se utilizaron tres cultivares de vides comúnmente usadas como portainjertos de la vid comercial *Vitis vinifera* L.:

- “1103 Paulsen” o “Paulsen” (*V. berlandieri* x *V. rupestris*)

Pertenece a la primera generación de híbridos interespecíficos, que fueron desarrollados antes de 1900 (en 1892 según Archer, 2002 y en 1895 según Walker, 2004) y aún es de importancia en viticultura (Reisch, 2012). Acondicionada a los ambientes secos montañosos y suelos calcáreos de Sicilia, Italia. Plantadas y preferidas en zonas propensas a sequía y de salinidad elevada, importante tolerancia a filoxera y media a alta resistencia a nemátodos (Cousins, 2005). Sus raíces, por lo general, se encuentran en los primeros 40cm de suelo (Whiting, 2012), por eso es recomendado para suelos relativamente profundos (60-90 cm) bien drenados y con buena retención de humedad (Archer, 2002). Las hojas jóvenes tienen coloración bronceada y de ausente o muy baja pigmentación antociánica de los pelos del pámpano joven. Las hojas adultas tienen el limbo reniforme pequeño de un solo lóbulo, borde acerrado con lado cóncavo y el otro convexo, y con pigmentación antociánica hasta la primera bifurcación (ver Figura 1) (CITEagroindustrial, 2015). Estudios sugieren que son portainjertos más vigorosos en condiciones de abundante agua, suelos fértiles y planos (Wolpert, 2005).

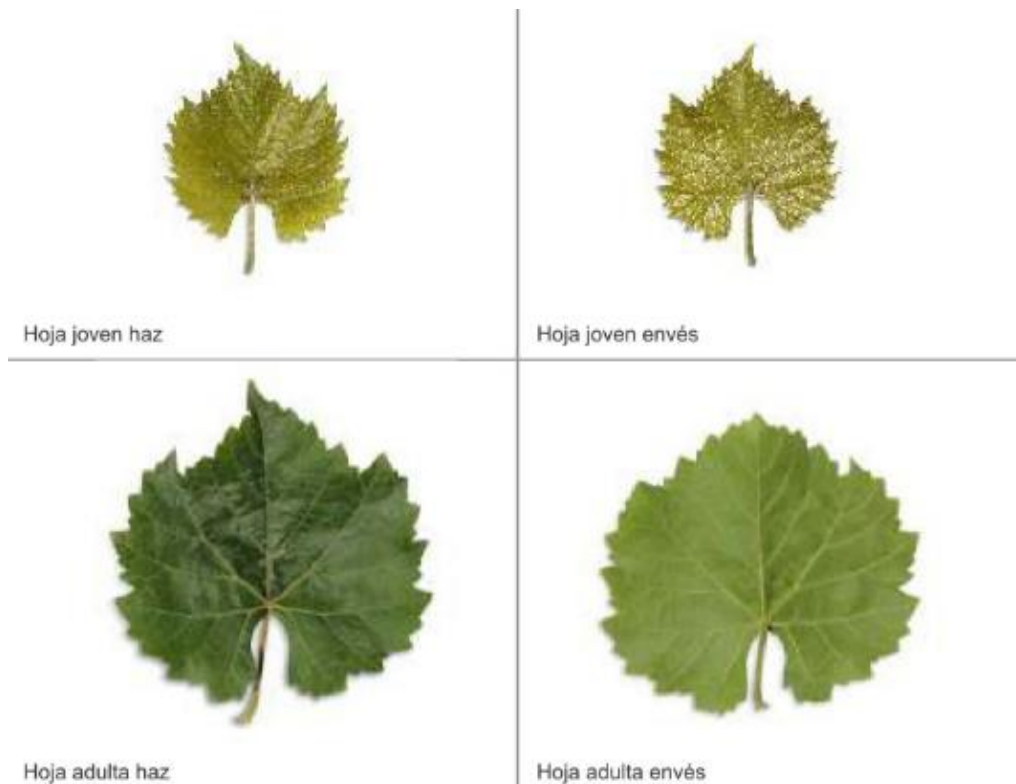


**Figura 1. Imagen del haz y envés de las hojas en época joven y adulta de Paulsen**

FUENTE: CITEagroindustrial, 2015

- “Freedom” (1613 couderc x dog ridge)

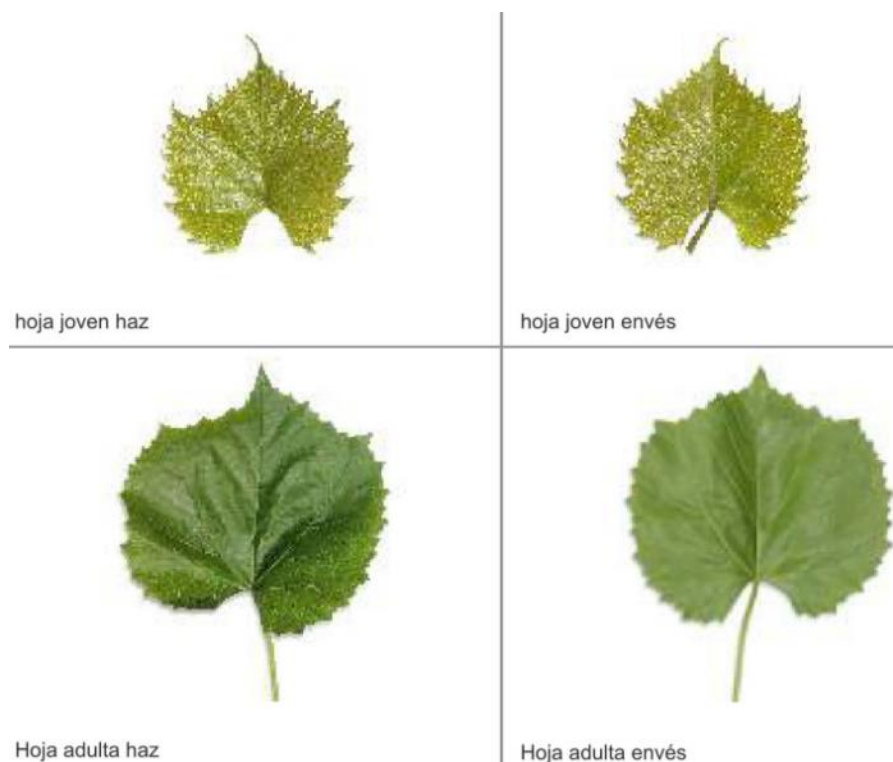
Es el resultado varios cruces (*V. X champinii*, *V. riparia*, *V. labrusca*, *V. vinífera*, *V. solonis*) en los suelos arenosos del Valle de San Joaquín, California en Estados Unidos, dando un híbrido complejo (Walker, 2004). La planta, durante joven, presenta un pámpano de muy baja intensidad en la pigmentación antociánica y una coloración verde de las hojas. Las hojas adultas tienen las mismas características, el limbo reniforme pequeño de un solo lóbulo, borde acerrado con lado cóncavo y el otro convexo, y con pigmentación antociánica hasta la primera bifurcación (ver Figura 2) (CITEagroindustrial, 2015). Genera un alto vigor al injerto, ligera resistencia a filoxera, mientras que otorga una alta resistencia a nemátodos más una adaptación moderada a suelos calcáreos (Cousins 2005). Aumenta significativamente el vigor de “Red Globe”, pero en “Thompson” lo disminuye respecto al testigo (Ureta, 1993).



**Figura 2. Imagen del haz y envés de las hojas en época joven y adulta de Freedom**  
 FUENTE: CITEagroindustrial, 2015

- “Harmony” (1613 couderc x dog ridge)

Producido en 1955 por los Drs. Weinberger y Harmon en la estación de investigación de Fresno en California, también denominado US 16-154 (Archer, 2002), este híbrido de selecciones de polinización abierta (distintas a las Freedom) de 1613 Couderc (*V. solonis* x ‘Othello’ (‘Clinton’ (*V. labrusca* x *V. riparia*) x *V. vinifera* ‘Muscat Hamburg’) y de Dog Rigde (*V. champinni*) (Walker, 2004). Seleccionada debido a su fácil enraizamiento y resistencia hacia nematodos. Sin embargo, este patrón no es conveniente en una zona árida con una fuerte presión de filoxera debido a tiene a *V. vinifera* entre sus antecesores (Cousins, 2005). Junto con “Freedom” fueron los primeros portainjertos cultivados con el propósito específico de proveer protección contra nemátodos (Clark, 1997; Weinberger y Harmon, 1966; Reisch, 2012). Ureta, (1993) señala que resulta vigorizante para la uva “Red Globe” y no afecta el vigor en “Thompson”. Al igual que el cultivar anterior, presenta un pámpano joven de muy baja intensidad en la pigmentación antociánica, pero una coloración amarilla de las hojas. Las hojas adultas también tienen el limbo reniforme pequeño de un solo lóbulo, borde acerrado con lado cóncavo y el otro convexo, y con pigmentación antociánica hasta la primera bifurcación (ver Figura 3) (CITEagroindustrial, 2015).



**Figura 3. Imagen del haz y envés de las hojas en época joven y adulta de Harmony**  
 FUENTE: CITEagroindustrial, 2015



Un patrón seleccionado en un entorno puede funcionar bien en muchos ambientes, pero no se debería asumir que la amplia aplicabilidad es la regla, ya sea para la resistencia a las plagas o adaptación a suelos particulares (Cousins 2005).

#### 3.2.4. Origen de la vid en Perú

Existen tres teorías con mayor aceptación entre historiadores. La primera nos dice que el padre jesuita de Andalúz, Bernabé Cobo, consideró que el primero en cultivar la vid en el Perú fue Hernando de Montenegro en la ciudad de Lima hacia 1549 (García, 2004). La segunda, es la que recoge el Inca Garcilaso de la Vega, en la que indica que el Marqués Francisco de Caravantes hacia 1555 fue con quien introdujo cepas procedentes de las Islas Canarias (García, 2004; Fernández-Cano, 2001). Y la tercera, que según Brown (2001) fue Bartolomé Terrazas también con cepas de Canarias a mediados del siglo XVI, quien plantó en el valle de Condesuyos, al noreste de Arequipa, las primeras cepas que pasarían sucesivamente a los de Vitor, Moquegua y Majes, y de ahí suministraron material de vino a Potosí, La Paz y el Cuzco.

#### 3.2.5. Cultivo de la vid en Perú

##### A. Área cultivada

En el Perú, el cultivo de vid se ha convertido en un importante negocio de crecimiento vertiginoso y de gran retorno. En el 2015, la fruta fresca más exportada del Perú fue la uva de mesa “Red Globe” por montos sobre los 695 millones de dólares americanos (El Comercio, 2016a), además, haber tenido una producción récord de Pisco con 9.5 millones de litros, para el consumo interno y en otros 10 países. (Gestión, 2016).

Actualmente, las plantaciones de vid se encuentran dispuestas a lo largo de la costa peruana. Cifras oficiales del último Censo Agrario del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) (INEI, 2012), registraron 17 regiones con presencia del cultivo, haciendo un total de 43 819.57 hectáreas de superficie cultivada en todo el territorio nacional. Siendo las regiones de Ica y Lima las de mayor área. Para el 2013, existían 7 mil hectáreas de cultivo de uvas pisqueras y con una proyección posible de 3 mil hectáreas a sembrarse en cinco años, dependiendo de la demanda interna por el destilado, hecho informado por el presidente del Consejo Regulador de la Denominación de Origen Pisco, Jaime Marimón Pizarro (Agraria.pe, 2013). Cabe resaltar que el censo agrario es un recuento exhaustivo de las unidades agropecuarias del país, por eso contiene la información más desagregada posible, a diferencia de investigaciones estadísticas previas y posteriores, que no cubren, generalmente, todo el

territorio nacional y no comprenden asimismo a todas las unidades agropecuarias. El Tabla 3 muestra las 17 regiones con su área cultivada respectiva. Los gruesos de las unidades agropecuarias se encuentran en las regiones tradicionales de Ica y Lima, y ahora también en regiones donde antes no existía cultivos de uva, como la región norte.

**Tabla 3: Distribución del área cultivada en hectáreas de vid en Perú hasta el 2012**

Región	Hectáreas	Unidades agropecuarias
Ica	15 909.61	6 259
Lima	13 640.08	6 343
Piura	4 841.82	149
La Libertad	3 150.48	1 957
Lambayeque	1 650.22	76
Cajamarca	1 392.53	407
Arequipa	981.43	833
Ancash	854.84	477
Tacna	785.64	780
Moquegua	426.25	679
Ayacucho	113.5	17
Huancavelica	1.25	2
Tumbes	0.75	2
Loreto	0.25	1
Huánuco	0.13	1
Amazonas	0.01	1
<b>TOTAL</b>	<b>43 748.79</b>	<b>17 984</b>

FUENTE: INEI, 2012

#### B. Crecimiento y Producción del cultivo

En los últimos 20 años se ha observado un aumento constante en la producción, siendo los últimos cinco años los alcanzados con valores extraordinarios (Tabla 4), las dos regiones con mayor volumen y rendimiento (Kg/Ha) son Piura e Ica (SIEA, 2015) (ver Tabla 5). Regiones en las cuales se destina la producción para exportación y presenta un manejo agronómico tecnificado. Como se mencionó anteriormente, la región norte vio una reconversión en los cultivos, e impulsada por el MINAGRI, tuvo la finalidad de ir reduciendo progresivamente las grandes hectáreas destinadas al cultivo de arroz, que están generando la pérdida de tierras debido a la salinización de los suelos por el alto consumo del recurso hídrico (Mejía, 2015). La uva se convirtió en el cultivo más importante, sobre todo en Piura. Hasta el 2002, Piura tenía tan solo 15 ha de uva, en el

2009 593 ha, y desde entonces fue la región con mayor crecimiento en la producción de uva de mesa y, con el mayor rendimiento por hectárea (Ginocchio, 2014).

### C. Producción de Pisco

El Pisco, es el producto obtenido exclusivamente por destilación de mostos frescos de uvas pisqueras recientemente fermentados, utilizando métodos que mantengan los principios tradicionales de calidad; y producido en la costa de los departamentos de Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y los Valles de Locumba, Sama y Caplina del departamento de Tacna. Estas uvas son de la variedad Quebranta, Negra Criolla, Mollar, Italia, Moscatel, Albilla, Torontel y Uvina. En el caso de esta última variedad, sólo se considerará a aquella cuyo cultivo se circunscriba únicamente a los distritos de Lunahuaná, Pacarán y Zúñiga, en la provincia de Cañete, departamento de Lima (CONAPISCO, 2016).

Según el historiador peruano Lorenzo Huertas la producción de aguardiente se inició a fines del siglo XVI, una vez destilado los mostos de la uva y convertido en aguardiente, éste se almacenaba en tinajas de arcillas llamadas “*pisco*”, siendo este el posible origen del nombre. No queda claro dónde fue el primer lugar en que se produjo aguardiente de uva en Perú, pero en 1572, Álvaro De Ponce fundó el pueblo Santa María Magdalena en el valle de Pisco, que con el paso del tiempo se llamaría simplemente Pisco, lugar donde se producía el aguardiente de uva (Museo del Pisco, 2016).

En la actualidad, el crecimiento en la industria del Pisco ha sido, también, extraordinaria. Y es que en el periodo 2000-2015, la producción aumentó en 493%, es decir, de 1.6 millones a 9.5 millones de litros, respectivamente (Agraria.pe, 2016), como se aprecia en la Tabla 6. «El aumento del consumo interno está ligado al crecimiento en su producción de los últimos años, gracias a las campañas de promoción, así como al impulso del Centro de Innovación y Transferencia Tecnológica (Cite) y a la labor de la CONAPISCO», viceministro de Mype e Industria del Ministerio de Producción, Carlos Carrillo.

**Tabla 4: Aumento en la producción de uva en Perú en el período 2010-2014**

Producción		
Año	Total nacional (t)	Variación (%)
2010	280 468	+6
2011	296 902	+6
2012	361 870	+22
2013	439 244	+21
2014	507 097	+15

FUENTE: MINAGRI - Series históricas de producción agrícola.

**Tabla 5: Producción, superficie cosechada y rendimiento por regiones (principales) de uva en el Perú en el 2014.**

Región	Producción (t)	Superficie (ha)	Rendimiento (t/ha)
Arequipa	22 997	1 117	20.6
Ica	189 921	9 017	21.1
La Libertad	41 321	1 989	20.8
Lambayeque	17 132	887	19.3
Lima	70 026	3 902	17.9
Piura	147 263	4 993	29.5

FUENTE: MINAGRI - SIEA.

**Tabla 6: Producción nacional de Pisco del 2000 al 2015**

Año	Volumen (L)	Variación (%)
2000	1.6 millones	-
2001	1.8 millones	11.4
2002	1.5 millones	54.7
2003	2.4 millones	22.8
2004	2.9 millones	35.6
2005	3.9 millones	26.1
2006	4.9 millones	26.1
2007	6.1 millones	22.6
2008	6.5 millones	7.5
2009	6.6 millones	1.3
2010	6.3 millones	- 4.4
2011	6.3 millones	-0.4
2012	7.1 millones	12.8
2013	7.1 millones	-0.1
2014	8.6 millones	21.5
2015	9.5 millones	10.1

FUENTE: PRODUCE – DEMI, 2016

#### D. Perspectiva de crecimiento

La uva es una fruta que puede ser destinada para el consumo en fresco, seco o para la industria de destilados dependiendo de la variedad y características del fruto. Sin embargo, su crecimiento se ve dominado por la demanda y saturación del mercado (ver Tabla 7). En el caso de la uva fresca, existe una fuerte competencia en el mercado internacional, posicionándonos en el quinto lugar en exportación (WTEEx, 2016). La saturación de la uva “Red Globe”, por ejemplo, hizo que las nuevas plantaciones sean de variedades menos productivas, pero de mejor precio, como las de sin semilla, “Flame Seedles”. El presidente regional de Ica, en el XVIII Simposio Internacional de la Uva (SIUVA, 2015), dijo: «La advertencia está dada: los precios van a la baja y los costos en alza y frente a esto sólo la calidad hace la diferencia» (Rojas, 2015). El Perú tiene la ventaja competitiva de cosechar durante todo el año, como lo que sucede en el norte. Es así que en poco menos de 10 años, las regiones norteñas desplazaron a las del sur como principales exportadores. Piura, con 100 mil toneladas y menos área cosechada apunta convertirse en el principal exportador nacional (Rojas, 2015).

Por otro lado, la industria del Pisco ha sufrido altos y bajos en su producción, como se muestra en la Tabla 6. Esta está muy ligada al consumo interno, pues solo un pequeño porcentaje se exporta. Debido a las campañas de promoción y a transferencias de tecnologías, la demanda interna volvió a aumentar en los últimos años, y así lo hizo la demanda externa (ver Tabla 8), luego de agregar a tres nuevos países como destinos del producto: Australia, Holanda y Brasil (El Comercio, 2016b).

**Tabla 7: Exportación de Uvas frescas según subpartida 0806100000**

Año	Peso neto (t)	Precio FOB (miles US\$)
2010	74 864.6	179 760.3
2011	119 815.2	300 803.5
2012	148 695.5	365 393.4
2013	172 136.5	441 375.8
2014	260 863.48	632 453.1
2015	307 987.2	690 378.9

FUENTE: SUNAT, 2016

**Tabla 8: Exportación de Pisco según subpartida 2208202100**

Año	Peso neto (t)	Precio FOB (miles US\$)
2010	399.69	1 981.77
2011	769.23	3 880.21

### Continuación...

2012	1 057.07	5 526.48
2013	992.62	5 408.19
2014	1 029.18	5 461.67
2015	1 464.91	8 216.73

FUENTE: SUNAT, 2016

#### 3.2.6. Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos *in vitro* es el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos o toda la planta en condiciones nutricionales y ambientales controladas (Thorpe, 2007) a menudo para producir los clones de las plantas. Los clones resultantes son de genotipo idénticos a del explante seleccionado.

Las condiciones controladas proporcionan al cultivo de un entorno propicio para su crecimiento y multiplicación. Estas condiciones incluyen el suministro adecuado de nutrientes, pH óptimo del medio, fotoperiodo adecuado, temperatura adecuada y un ambiente líquido y gaseoso apropiado (Bhojwani y Dantu, 2013).

El crecimiento óptimo y la morfogénesis de los tejidos pueden variar para las diferentes plantas de acuerdo a sus necesidades nutricionales (Saad, 2012). Incluso, los tejidos de diferentes partes de las plantas pueden también tener diferentes requisitos para un óptimo crecimiento (Murashige y Skoog, 1962). Los medios de cultivo de tejidos vegetales deben contener generalmente algunos, o todos de los siguientes componentes: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos o suplementos de nitrógeno, fuente(s) de carbono, suplementos orgánicos inespecíficos, reguladores del crecimiento y agentes solidificantes (De Fossard, 1976).

Según Christianson y Warnick (1985), la organogénesis puede ser dividida en tres fases: 1) adquisición de competencia, es decir, la habilidad de responder a la inducción organogénica; 2) inducción organogénica, momento donde las células deciden la formación de un órgano específico; y 3) morfogénesis y desarrollo, produciendo raíces y brotes visibles. Estos autores fueron los primeros en demostrar que el control del tipo de organogénesis por el balance de hormonas exógenas, es dado en la fase de inducción. Solo durante este periodo el balance hormonal en el medio de cultivo es crítico (Mercier *et al.*, 2003).

Para el establecimiento de un nuevo protocolo para un propósito específico en cultivo de tejidos, el medio adecuado tendrá mejor composición mediante pruebas individuales de adiciones de una serie de concentraciones de un compuesto dado a un medio basal universal como MS (Murashige y Skoog, 1962), LS (Linsmaier y Skoog, 1965) o B5 (Gamborg *et al.*, 1968). Una concentración completa de sales en los medios de cultivo demostró ser buena para varias especies, pero en algunas especies la reducción de la concentración de sales a  $\frac{1}{2}$  o  $\frac{1}{4}$  de la concentración total, dio mejores resultados en el crecimiento *in vitro* (Saad, 2012). Las variables más eficaces en medios de cultivo de tejidos vegetales son los reguladores de crecimiento, especialmente las auxinas y citoquininas.

#### A. Micropropagación

La tecnología de cultivo de tejidos vegetales está siendo muy utilizada para la multiplicación de plantas a gran escala. Aparte de su uso como una herramienta de investigación, las técnicas de cultivo de tejidos de plantas han sido en los últimos años de gran importancia en la industria de la propagación de plantas, en la eliminación de enfermedades, en la mejora de plantas y en la producción de metabolitos secundarios (Altaf, 2012).

La micropropagación, haciendo uso de las técnicas de cultivo de tejidos, ofrece ventajas sustanciales sobre las largamente ineficientes técnicas clásicas usadas para la propagación de gran escala (Sharbati, 2012). Así, pequeños pedazos de tejido, llamados explantes, son usados para la producción de cientos o miles de plantas en un proceso continuo, todo esto en un periodo de tiempo relativamente corto y en el espacio en condiciones controladas, independientemente de la estación y el tiempo a lo largo de todo el año (Akin-Idow, 2009). Su uso no solo es destinado para la producción industrial de plantas de interés comercial, sino también especies raras y en peligro de extinción han sido propagadas y conservadas con éxito debido al alto coeficiente de multiplicación (Altaf, 2012).

Por otro lado, la tecnología de micropropagación tiene un enorme potencial para producir plantas de calidad superior, para aislar variantes útiles bien adaptadas de genotipos con alto rendimiento, mejores capacidades de resistencia a enfermedades y tolerancia al estrés (Brown, 1995). Esta comprende cinco etapas bien definidas, cada una con requerimientos y problemas específicos:



a. Etapa 0: Etapa preparatoria

Involucra toda acción que garantice la calidad de las plantas parentales, es decir, sanidad y estado fisiológico óptimo. Pueden incluir la manipulación del régimen de luz y temperatura, bajo los cuales la plantas madres son mantenidas, en tanto que algunas plantas requieren de pre tratamientos de temperatura para una mejor respuesta a condiciones *in vitro* (Zobayed *et al.*, 2000; Cassells y Doyle, 2005).

b. Etapa 1: Inicio del cultivo

El objetivo es introducir cultivos asépticos de la planta a micropropagar escogiendo los explantes adecuados, realizando un correcto protocolo de esterilización, y previniendo alguna reacción de hipersensibilidad de los explantes (Husain y Anis, 2009). Los desinfectantes más comúnmente usados son hipoclorito de sodio (Tilkat *et al.*, Marana y Miglioranza, 2009), hipoclorito de calcio (Garcia *et al.*, 1999), etanol (Singh y Gurung, 2009), y cloruro de mercurio (Husain y Anis, 2009). La elección del explante dependerá del tipo de regeneración y multiplicación deseado, y el objetivo del estudio. Los explantes más utilizados son por yemas apicales o microesquejes con al menos una yema axilar, estos tipos de tejido aseguran una copia fidedigna del parental. Por otro lado, si el objetivo es desarrollar plantas libres de virus, lo ideal es el cultivo de meristemas. No obstante, tiene baja tasa de supervivencia y requiere complejos cuidados. Ahora, si el objetivo es regeneraciones *de novo* de brotes o embriogénesis somática, entonces las posibilidades en la elección aumentan, pudiendo usar raíces, tallos, hojas, o tejido nucelar (Bhojwani y Razdan, 1996).

c. Etapa 2: Multiplicación

El éxito del protocolo de micropropagación depende mucho en la eficiencia de esta etapa. La multiplicación se logra a través de: regeneración de callos, formación adventicia de brotes, y ramificación axilar forzada.

- Células vegetales de cualquier parte son capaces de formar callos bajo condiciones adecuadas, y estos pueden ser inducidos a regenerar la planta mediante organogénesis o embriogénesis somática. En protocolos estandarizados, este método tiene producciones industriales haciendo usos de biorreactores, sin embargo, no es aplicable a muchas especies y la uniformidad genética no está asegurada (Debergh y Maene, 1981).

- La formación de brotes de cualquier parte de la planta distinta de yemas apicales o axilares, se denominan brotes adventicios. Los explantes para micropropagación pueden ser hojas, raíces, bulbos etc. La tasa de multiplicación por propágulo pueden ser muy altas, con casi nula variabilidad, y muchas plantas recién manifiestan esta capacidad hasta que son introducidas a *in vitro* (Debergh y Maene, 1981).
- La ramificación forzada se alcanza aplicando reguladores de crecimiento al medio, en particular, citoquininas. Estas pueden forzar la formación de brotes aun en presencia de la yema terminal. La formación de brotes es limitada, debido al consumo del medio y de los reguladores, aproximadamente a la cuarta semana dejan de surgir brotes, por lo que es necesario propagar los nuevos brotes a medio de cultivo fresco y repetir el ciclo. Este método asegura más la estabilidad genética que los otros dos, pero concentraciones excesivas en los reguladores pueden, eventualmente, generar variabilidad o cambios epigenéticos en las plantas (Debergh y Maene, 1981).

#### d. Etapa 3: Elongación y enraizamiento

En algunos casos, luego de los métodos anteriores descritos, los brotes no elongan lo suficiente como para ser transferidos al medio de enraizamiento, por lo que se requiere de condiciones previas. El medio de elongación puede contener la misma composición que el utilizado para la etapa 3, pero en estado líquido (Dantu y Bhojwani, 1995) o, con concentraciones reducidas de citoquinina. Puesto que esta fitohormona inhibe la formación de raíces, es necesario de transferir los brotes a un medio adecuado para su enraizamiento, deben ser transferidos de forma individual a un medio suplementado con auxinas, otra fitohormona reguladora del crecimiento. Auxinas son reguladores críticos en la inducción de las raíces adventicias (Rasmussen, 2015; Steffens, 2016). Durante el enraizamiento adventicio, cambios considerables en la actividad de ciertas reacciones enzimáticas, como las producidas por peroxidasas y polifenol oxidasas (Kose *et al.*, 2011), ocurren en la zona de enraizamiento del esqueje. La formación de raíces adventicias consta de tres fases: inducción de raíces, iniciación de raíces y emergencia de raíces (Kevers, 1997; Nag, 2001). La fase de inducción es el período durante el cual se producen cambios bioquímicos antes de la primera división celular; iniciación se refiere a las divisiones celulares que conducen a la formación de raíces primordiales; y

emergencia se refiere al crecimiento de raíces adventicias a través de la corteza y fuera de la epidermis (Stuepp, 2017).

#### e. Etapa 4: Trasplante y aclimatación

Las dos principales anomalías que sufren las plantas *in vitro* son la nutrición heterotrófica debido al medio rico en compuestos orgánicos e inorgánicos, que conlleva a una pobre capacidad fotosintética, y el bajo desarrollo sobre el control de pérdida de agua. La aclimatación consiste en retirar las plantas enteras del agar para colocarlas en medio *ex vitro*, como vermiculita, poli estireno, etc., regadas con solución nutritiva a mitad de concentración, pero manteniendo la humedad elevada cubriendo el recipiente. Acostumbrar a las plantas a menores humedades y a luz natural es un proceso gradual (Zobayed *et al.*, 2000) que toma no menos de un mes. El proceso termina cuando se asegura el desarrollo de nuevas hojas por completo y el endurecimiento de las raíces, o la formación de raíces nuevas en caso se hizo la aclimatación sin raíces (Bhojwani y Razdan, 1996).

### B. Inconvenientes de la micropropagación

#### a. Hiperhidratación

Como se mencionó anteriormente, las plantas regeneradas bajo las condiciones *in vitro* suelen manifestar anomalías, tanto morfológicas, anatómicas, fisiológicas y metabólicas, todas inherentes a la micropropagación (Kharrazi *et al.*, 2011). Las plantas hiperhidratadas (Debergh *et al.*, 1992) lucen hojas y tallos húmedos, vidriosos, de tejido translúcido, suculentas o apariencia quebradiza y gruesa. Otras anomalías asociadas a este tipo de manifestación se encuentran la pobre diferenciación del mesófilo (el mesófilo empalizado está ausente o altamente reducido), deficiencia clorofílica, baja lignificación, pobre diferenciación de cloroplastos, carencia de depósitos de cera en las hojas, y los estomas permanecen abiertos (Dewir *et al.*, 2006; Bhojwani y Dantu, 2013). La hiperhidratación es uno de los mayores problemas en micropropagación comercial pues los brotes exhiben pobre enraizamiento y sobrevivencia de trasplante (Rojas-Martínez *et al.*, 2010). El grado en que se manifiesta dependerá de las especies e incluso el cultivar, las características físicas del medio, el tipo de envoltura de sellado, la cantidad de agar y el tipo de citoquinina (Debergh, 1987).

### b. Contaminación

El problema de contaminación se agrava cuando existen bacterias latentes, de crecimiento lento que son endógenas a la planta y pueden llevarse en los tejidos sin ser detectadas hasta una etapa avanzada cuando todo aparenta estar estéril (Bhojwani y Dantu, 2013). Las infecciones latentes también se manifiestan en tejidos necrosados, reducción en el número de brotes y raíces (Sluis, 2006). Se sugiere, entonces, el uso de plantas indexadas, donde tanto plántulas como tejidos son analizados para la presencia de microorganismo endógenos o no visibles haciendo uso de medios de cultivos estándar, como caldo nutritivo o agar papa dextrosa, específicos para el crecimiento de bacterias y hongos, o a través de marcadores moleculares para presencia de virus (Bhojwani y Dantu, 2013). Sin embargo, desinfección de un material traído de campo, aun tratándose de plantas que provienen de generaciones indexadas, debe ser correcta y minuciosa, pues pueden quedar adheridos distintos diminutos insectos que no son perceptibles a simple vista y solo se evidencian su presencia mediante infección microbiana, mayormente fúngica (Leifert y Cassells, 2001).

### c. Oxidación

Muchas plantas especies, como la uva, generan ennegrecimiento del medio *in vitro* en las zonas de corte del explante en contacto con el medio. En algunos casos, el ennegrecimiento es tan intenso que el explante se oscurece, sufre necrosis y, eventualmente, muere (Ko *et al.*, 2009). Dicho fenómeno de ennegrecimientos del medio es producido por la oxidación de los compuestos fenólicos liberados por los explantes y pueden ser fitotóxicos para ellos (Khatri *et al.*, 1997, George *et al.* 2008, Bhojwani y Dantu, 2013). La muerte del tejido es debido a la actividad de la polifenol oxidasa (PFO) (Litz y Vijayahumar, 1998). La PFO y algunas otras enzimas oxidativas como fenilalanina amonio liasa (FAL) y peroxidasa (POD), un catalizador de la biosíntesis de los polifenoles, toman parte en el ennegrecimiento en la región de los cortes de los explantes (Anderson y Ievinsh, 2002; Tabiyeh *et al.*, 2006). Se cree que el ácido cinámico es el primer paso en la biosíntesis de compuestos fenólicos. Se sintetiza a partir de la FAL (Sreenivasula *et al.*, 1989). Las o-quinonas (doble oxidación de monofenoles) son muy reactivas y atacan a una gran variedad de componentes celulares. La rápida polimerización de las O-quinonas produce pigmentos de color negro, marrón o rojo, lo que a su vez es la causa del pardeamiento enzimático (Sellés-Marchart *et al.*, 2007). Los fenoles son inhibitorios para el crecimiento celular (Cao, 2000; Zhang,

2000), pues cuando son oxidados producen quinonas que entrarán gradualmente a los tejidos cultivados en el medio reprimiendo las actividades de otras enzimas y, como resultado, envenenando otros contenidos del medio (Feng *et al.*, 2007).

El grado de ennegrecimiento depende de la especie o genotipo del donante (Shimelis, 2015), edad del tejido (tejidos más viejos ennegrecen más). No obstante, un explante o tejido ennegrecido no debería ser descartado de inmediato sin antes darle una cuidadosa observación y estudio o utilizar determinados elementos en el medio a fin de adsorber los polifenoles, como el carbón activado.

#### d. Recalcitrancia en plantas

Se entiende con recalcitrancia de una planta como la imposibilidad de poder ingresar o multiplicar o clonar a un individuo bajo condiciones *in vitro*. El cultivo de tejidos ofrece diferentes grados de complejidad en las diferentes especies vegetales, siendo las especies arbóreas las más difícil en introducir a *in vitro*. Una planta leñosa en su estado adulto pierda su capacidad de regeneración de estructuras juveniles. Sin embargo, esta recalcitrancia puede superarse, Bhojwani y Dantu (2013) menciona que la recalcitrancia puede superarse a través de: el uso de los tejidos más jóvenes del árbol, tratamientos repetidos con citoquininas, y el desramado del árbol puede provocar la formación de nuevos brotes los cuales serían usados para el inicio de cultivos. En varias plantas como *Prunus*, *Eucalyptus*, *Pinus* y *Sequoia*, el tratamiento repetitivo con citoquinina reactivaron el meristemo (Thorpe *et al.*, 1991).

#### e. Heterogeneidad

Llamados también *off-types* (nombre en inglés), es el resultado de un cambio genético espontáneo en plantas *in vitro* conocido como variación somaclonal. Este es un problema mayor cuando se tiene como objetivo la multiplicación clonal de variedades o cultivares deseados, sobre todo para laboratorios comerciales. La aparición de anomalías se da con mayor frecuencia cuando la propagación implica una fase de callos, pues son zonas de alta división celular. Además, la formación adventicia de brotes directamente de los explantes no está libre de estos fenómenos (Bhojwani y Dantu, 2013). Dichos métodos deben evitarse en lo posible, y de no ser así, solo deben sufrir estas prácticas la primera generación de plantas. Los *off-types*, son influenciados por el tipo de explante, composición del medio, tiempo de exposición a las condiciones de cultivo y el genotipo de la planta donante (Pierik, 1987; Bhojwani y Dantu, 2013). Por otro lado, Baitu *et al.* (2011) reporta la necrosis de la yema apical en

*Harpagophytum procumbens* como resultado de la acumulación excesiva de citoquinina en los tejidos. Puesto que la variación genética sólo se puede distinguir hasta una etapa avanzada del desarrollo fenológico de la planta, cuando ya se encuentran por florecer, por ejemplo, se recomienda hacer pruebas genéticas en etapas tempranas de la propagación para la identificación de las variantes somaclonales.

#### f. Costos elevados

La micropropagación sigue siendo más costoso que la propagación convencional, pues requiere de inversión en infraestructura, materiales, mano de obra, etc. Calcular los costos para un laboratorio de investigación, donde los objetivos se centran en desarrollo de protocolos, no es plausible ni deseable, mas sí lo es para laboratorios comerciales. Aquí, la mayor porción de los gastos va hacía mano de obra y electricidad, 35% y 19%, respectivamente (Bhojwani y Dantu, 2013). Por esta razón muchas empresas ubicadas en países desarrollados, crean sucursales de menor desarrollo ya que encuentran allí mano de obra y servicios más baratos, bajando los costos de producción (Tomar *et al.*, 2008).

### C. Medio de cultivo

Cómo se ha visto en los subtítulos anteriores, el crecimiento, el desarrollo y la morfología de un explante en cultivo *in vitro* depende de su carga génica, las condiciones del cultivo y la composición del medio de cultivo, siendo este último el de más fácil control. Son 17 los elementos esenciales para el crecimiento de las plantas. Los medios de cultivo deben contener los siguientes componentes:

#### a. Macroelementos

Los requerimientos básicos de minerales como potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S), son requeridos en mayores cantidades (macronutrientes/macroelementos/elementos mayores) (George y De Klerk, 2008; Saad y Elshahed, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013). El medio debe contener por lo menos 25-60 mM de nitrógeno inorgánico, K en forma de sales de cloruro de nitratos a una concentración entre 20-30 mM. Por otro lado las concentraciones de P, Mg, S, Ca deben estar entre 1-3 mM en un medio balanceado con demás requerimientos de crecimientos (Torres 1989, citado en Saad y Elshahed, 2012)

## b. Microelementos

Hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), boro (B), níquel (Ni), cloro (Cl), y molibdeno (Mo), son requeridos en menores cantidades (micronutrientes/microelementos/elementos menores) para el crecimiento de tejidos de plantas (George y De Klerk, 2008; Saad y Elshahed, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013). El hierro necesita un tratamiento especial, pues tiende a precipitar con facilidad, por lo que es agregado en solución quelante mediante el uso del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), formando el Fe-EDTA, el cual es agregado por separado (Murashige y Skoog, 1962).

De acuerdo a Epstein (1971), un elemento es considerado esencial para el crecimiento de la planta si:

- la planta no cumple su ciclo de vida ante la ausencia del elemento;
- su acción es específica y no puede ser reemplazada completamente por otro elemento;
- su efecto en el organismo es directo, no indirecto con el ambiente;
- es constituyente de una molécula que se sabe es esencial.

Carbono (C), oxígeno (O) e Hidrógeno (H), completan los 17 elementos esenciales (George y De Klerk, 2008), y dependerá de la especie si ha de necesitar elementos esenciales adicionales.

Algunos medios de cultivo añaden otros microelementos, cuyas características como elementos esenciales no han sido estandarizadas, por ejemplo, Cobalto (Co), Yodo (I), Sodio (Na) (Saad y Elshahed, 2012).

## c. Fuente de Carbono y energía

Además de compuestos inorgánicos, el medio de cultivo de tejidos provee de una fuente carbonada a la planta en tanto que esta no realiza la fijación de carbono atmosférico ante la completa pérdida de capacidad fotosintética. Por lo general se usa sacarosa a una concentración de 2-5% (p/v) (Saad y Elshahed, 2012), esta actúa no solo como fuente de carbono, sino también como un importante componente osmótico (Bhojwani y Dantu, 2013). La lactosa, galactosa, maltosa y almidón han sido usados como fuente de carbono, pero los reportes indican menores eficiencias que la sacarosa o glucosa (Saad y Elshahed, 2012). Se ha demostrado con frecuencia que la sacarosa autoclavada se aprovecha mejor para el crecimiento que sacarosa esterilizada por filtración, el

autoclavado hidrolizaría la sacarosa en azúcares de uso más eficientes como la fructosa (Saad y Elshahed, 2012). La sacarosa ha sido reportada como desencadenador morfo-genético en la formación de yemas axilares y ramificaciones de raíces adventicias (Vinterhalter y Vinterhalter, 1997).

#### d. Constituyentes orgánicos

Las vitaminas y aminoácidos son considerados constituyentes orgánicos, los cuales son añadidos como trazas. De todas las vitaminas usadas en cultivo de tejidos, solo tiamina y myo-inositol (es un carbohidrato) son consideradas elementos esenciales (Saad y Elshahed, 2012). De todas las vitaminas utilizadas, incluido el complejo B como la biotina o tiamina, ácido ascórbico, fólico, nicotínico, pantoténico, tocoferol (vitamina E), riboflavina son usados en algunos medios de cultivo, pero no son elementos esenciales. Se cree que el myo-inositol participa en la división celular por su ruptura en ácido ascórbico y pectina y su posterior incorporación en fosfoinosítidos y fosfatidilinositol, lípidos de membrana (Saad y Elshahed, 2012). Los requerimientos de aminoácidos para el crecimiento óptimo es sintetizado por la mayoría de plantas, y solo son agregados para determinados tipos de cultivos. Los aminoácidos proveen a la planta de nitrógeno de fácil asimilación, por sobre las fuentes de inorgánicas. Otros, añaden mezclas nutritivas de composiciones no definidas como endospermo líquido de coco, caseína hidrolizada, extracto de levadura, homogenizado de plátano, etc (George y De Klerk, 2008; Saad y Elshahd, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013).

Aquellos medios que contengan en su composición la totalidad de los elementos esenciales se les puede llamar Medios Basales (MB). El MB de “Murashige y Skoog (1962) con constituyentes orgánicos mínimos” es usado en mayor frecuencia, el cual fue desarrollado para el óptimo crecimiento de callos en plantas del tabaco. La composición de este y los medios utilizados durante la presente investigación lo encuentra en el ANEXO 1. Sin duda, cada especie de planta tendrá su composición característica básica la cual se podría adaptar al MB (Gonçalves *et al.*, 2005), pero se corre el riesgo de que ocurra una precipitación cuando se varían las composiciones minerales, luego del proceso de autoclavado del medio, por la naturaleza endotérmica de la reacción (George y De Klerk, 2008). En el ANEXO 2 se encuentra una descripción detallada de los roles que cumplen los compuestos de un medio basal.



#### e. pH del medio

Luego de la preparación del medio y agregado todos los componentes, se procede a ajustar el pH final al valor deseado añadiendo NaOH 0.1N y/o HCl 0.1N al medio. El pH final es un factor de suma importancia:

- Valores inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes.
- El valor del pH afecta la solubilidad de algunos componentes del medio,
- afecta la absorción de determinados nutrientes por parte del explante (absorción de iones de NO<sub>3</sub> aumenta con la acidez del medio),
- afecta al pH del citoplasma y como consecuencia la actividad de muchas enzimas.

El citoplasma vegetal se encuentra a una acidez próxima a 5, durante el autoclavado, por lo general, la acidez del medio disminuye por lo que se recomienda tener una acidez final de 5.4-5.6.

#### D. Reguladores de crecimiento

Dentro de los tejidos vegetales se sintetizan sustancias químicas (forma endógena) unas cumpliendo un rol nutricional, y otras cumpliendo un rol regulatorio del crecimiento y desarrollo, los cuales se encuentran activos a muy bajas concentraciones (0.001-10 µM), se les conoce como fitohormonas o sustancias de crecimiento vegetal (Machakova *et al.*, 2008). A pesar de la producción endógena de estos reguladores, es necesario con frecuencia suplementar al medio (forma exógena) para obtener determinadas respuestas (Bhojwani y Dantu, 2013), adquiriendo el término de reguladores de crecimiento vegetal (Machakova *et al.*, 2008), pues tienen actividades fisiológicas similares a las fitohormonas.

Existen relativamente nuevos compuestos los que se unen a los clásicos grupos conocidos: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Entre ellos están: brasinoesteroides, oligosacarinas, ácido jasmónico y sistemina, entre los caracterizados bioquímicamente; algunos otros aún deben ser caracterizados bioquímicamente como las fitotropinas y los análogos naturales de la fusicoccina. Sin embargo, auxinas y citoquininas siguen siendo los dos grupos de reguladores de crecimiento más utilizados en cultivo de tejidos *in vitro*. Existen auxinas y citoquininas naturales y se producen muchas sintéticas. Los compuestos sintéticos han sido

descubiertos con una actividad biológica igual o superior que su equivalente natural (Machakova *et al.*, 2008). No obstante, es importante reconocer que los reguladores de crecimiento que pueden ser bastante efectivos para la propagación *in vitro* en una especie pueden no ser igualmente efectivos para otro cultivar o especie (Poudel *et al.*, 2005). Además, la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo suele ser el principal causante del desarrollo de callos en micropropagación (Mahdinezhad y Ghanbari, 2015).

a. Auxinas

La AIA es la auxina de producción natural, mientras que el ácido indol-3-butírico (AIB), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA) son las sintéticas. El AIA es la auxina endógena en mayores proporciones en tejidos vegetales, pero la generación de 4-cloro-AIA (Engvild, 1985) e IBA (Ludwig-Müller y Epstein, 1991) de forma endógena, han sido también demostrada. Las diferencias fisiológicas entre auxinas se dan en la medida en que son translocadas entre tejidos y metabolizadas (Saad y Elshahed, 2012). Basado en un ensayo de curvatura del tallo, se determinó, entre otros, que la actividad del ANA tiene un doble de actividad que AIA (Lam y Steet 1977), pues tiende a oxidarse y metabolizarse rápidamente (Machakova *et al.*, 2008). Las auxinas están involucradas en muchos procesos de desarrollo en las plantas como ser la elongación de tallos y entrenudos, tropismos, dominancia apical, abscisión y enraizamiento (Machakova *et al.*, 2008; Saad y Elshahed, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013; Stuepp, 2017). En cultivo de tejidos, auxinas han sido usadas para inducir la división celular, citodiferenciación y diferenciación organogénica y embriogénica (Machakova *et al.*, 2008; Bhojwani y Dantu, 2013). Por lo general, bajas concentraciones favorecen la iniciación de raíces, mientras altas concentraciones inducen formación de callos (Machakova *et al.*, 2008; Saad y Elshahed, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013; Stuepp, 2017).

Por otro lado, las concentraciones de auxinas endógenos en los tallos de los esquejes dependen directamente de la edad de la planta donde se obtuvo el explante, la posición de donde se ubicó el explante en la planta y de la velocidad de su oxidación y conjugación (De Klerk *et al.*, 1999). El AIA libre es metabolizado rápidamente por peroxidasas (Fu *et al.*, 2011) mientras, que en su forma conjugada (AIA-Asp), la auxina es parcialmente protegida contra la oxidación (Stuepp *et al.*, 2017). La conjugación evita la acumulación de AIA libre en los tejidos (Faivre-Rampant *et al.*, 2002). La

forma conjugada de IBA puede ser una fuente más estable de auxinas en los tejidos debido a su gran resistencia a la degradación enzimática (Ludwig-Müller *et al.*, 2000).

- Ruta de biosíntesis. - El precursor primario de AIA en la planta es el triptófano (Trp) (originado en la ruta del ácido shikímico) y su biosíntesis se realiza en ápices en crecimiento, hojas en desarrollo, semillas y frutos. Dos grandes rutas han sido propuestas: aquellas dependientes del Trp y aquellas independientes del Trp (Woodward y Bartel, 2005; Chandler, 2009; Normanly, 2010). De esta última, se cree que el indol-3-glicerol fosfato como el precursor, no obstante, poco se sabe de la ruta bioquímica (Ouyang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008; Mano y Nemoto, 2012). De las rutas dependientes del Trp, las dos de mayor aceptación son la ruta del ácido indol-3-pirúvico (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008) y la del indol-3-acetamida (Nemoto *et al.*, 2009; Mano *et al.*, 2010).
- Modo de acción. - La estimulación de crecimiento exige necesariamente en las células vegetales un aumento de la plasticidad de la pared celular, la cual es consecuencia de la ruptura de enlaces de las moléculas que configuran esta pared. Las auxinas, en conjunto con las giberelinas, inducen el aumento de la plasticidad parietal, y la extensión de los protones H<sup>+</sup> del citoplasma hacia el espacio parietal. El aumento de acidez provoca la distensión de las paredes y la activación de ciertas enzimas. Conlleva dos fases, una acción rápida y otra lenta (Cabrera, 2003).

#### b. Citoquininas

Las citoquininas naturales son las zeatina (6-4-hydroxy-3-metil-trans-2-butenilaminopurina) y la 2iP (6-dimetilaminopurina), pero las comunes en cultivo de tejidos son las sintéticas, las que incluyen a la 6-bencilaminopurina (BAP), 6-dimetilaminopurina (2iP), N-2-furanilmetil-1H-purina-6-amina (kinetina), 6-4-hydroxy-3-metil-trans-2-butenilaminopurina (zeatina) y thiazuron-N-fenil-N-1,2,3-tiadiazol-5-ylurea (TDZ). Tanto la Zeatina como la 2iP son citoquininas endógenas (Saad y Elshahed, 2012), poco utilizadas debido a su rápida degradación (Van Staden *et al.*, 2008), pero necesarias para el correcto desarrollo vegetativo y floral, pero también para un rol central, pero opuesto, en el desarrollo de raíces y meristemas (Werner *et al.*, 2003). En medios de cultivo, han demostrado la estimulación de la división celular, inducción de brotes y proliferación de brotes axilares (detención de dominancia apical), inhibición la formación de raíces (Van Staden *et al.*, 2008; Bhojwani y Dantu, 2013),

estimula la expansión de las hojas por el agrandamiento de las células, en algunas especies aumentan la apertura estomatal, estimulan la producción clorofila (Davies, 1995; Salisbury y Ross, 1992). La citoquinina más eficiente y usada es BAP, añadida en un amplio rango, 1-10  $\mu\text{M}$  (0.2-2ppm). Niveles elevados de citoquininas producen la formación de muchos pequeños brotes de un explante, pero que no tienen éxito en su elongación. Además, concentraciones elevadas pueden provocar callos, formas inusuales en las hojas e inducir la hiperhidratación o cristalización (Van Staden *et al.*, 2008, Bhojwani y Dantu, 2013). Sin embargo, no es excluyente el uso de citoquininas para el enraizamiento, Van Staden *et al.* (2008) menciona que Fries (1960), Nemeth (1979) y Konwar y Coutts (1990), ya habían demostrado la inducción de raíces adventicias en ausencia de auxinas y en presencia de citoquininas. La mejor organogénesis se logra con un balance específico para la variedad entre auxinas y citoquininas.

- Ruta de biosíntesis. - En las plantas se encuentran como moléculas libres, también se encuentran en los RNAt del citoplasma y cloroplastos (Van Staden *et al.*, 2008). Los ápices de las raíces son las zonas donde se concentra la mayor síntesis citoquininas, así como en otros tejidos de crecimiento activo (Chen *et al.*, 1985), los que son transportados por el xilema al resto de la planta. El proceso completo no se conoce con certeza, pero se tiene un esquema de la modificación bioquímica de adenina (McGaw, 1995; Salisbury and Ross, 1992): La isomerización de isopentilpirofosfato (IPP) permite la reacción con adenosin monofosfato (AMP), formando IPP-AMP. Luego de dos remociones sucesivas, la primera de un fosfato y la segunda de adenosina, se forma isopentil adenina. Esta molécula puede ser convertida en las formas endógenas de citoquininas.
- Modo de acción. - Tanto citoquininas como auxinas juntas juegan un rol importante en la regulación del ciclo celular de las células vegetales. El modo de acción de citoquininas es aún menos claro que el de auxinas. Empezaría con la recepción de las citoquininas a los receptores quinasas de histidinas, la señal de recepción desencadena una cascada de reacciones que conlleva a la depresión de los reguladores de división celular, formación de brotes, etc (Van Staden *et al.*, 2008).

### c. Giberelinas

Usada bastante en cultivo de tejidos, un tanto menos que los dos grupos anteriores. Muestran alta sensibilidad a la temperatura por lo que no son esterilizados por autoclave sino por filtración. Existen más de 20 tipos de giberelinas, de los cuales el ácido giberélico (AG3) es una de las pocas formas activas de giberelinas y usado con mayor frecuencia. Se reporta que promueven la elongación de los entrenudos, crecimiento de meristemas en algunas especies, estimulación de germinación y brote de yemas al suprimir la dormancia (Bhojwani y Dantu, 2013).

### d. Etileno y Ácido abscísico

Etileno es una hormona gaseosa que influencia algunos procesos morfogénicos como la embriogénesis y organogénesis, pero sus efectos no son claros. Es producido por tejidos en estrés y senescencia, también por los compuestos orgánicos del medio expuestos al calor y oxidación. Por otro lado, el ácido abscísico, un inhibidor de crecimiento natural, es necesario para el correcto desarrollo, crecimiento y maduración de embriones somáticos (Bhojwani y Dantu, 2013).

## E. Cultivo de tejidos en *Vitis vinifera* L.

### a. Propagación *in vitro* en *Vitis vinifera* L.

El uso de las técnicas *in vitro* como cultivo de tejidos, termoterapia y quimioterapia, de forma individual o en combinación, representan buenas alternativas para la propagación de la vid y ofrecen la posibilidad de obtener plantas homogéneas y sanas para proveer al agricultor de material vegetal con mayor uniformidad y libre de patógenos, este método mejora también en forma significativa la tasa de multiplicación, lo que se traduce en mayor cantidad de plantas en menor tiempo y espacio (Altaf, 2012). La micropropagación, haciendo uso de las técnicas de cultivo de tejidos, ofrece ventajas sustanciales sobre las largamente ineficientes técnicas clásicas usadas para la propagación de gran escala (Sharbati, 2012).

Las investigaciones en las últimas tres décadas con variedades de vid tanto para el consumo fresco como para la elaboración de bebidas, han permitido definir medios y condiciones de cultivos estándares para la propagación *in vitro* (Chee *et al.*, 1984; Sim, 2006). En general, la mayoría de variedades estudiadas tienen buenas respuestas a los medios estándares de propagación, pero en última instancia cada variedad necesita de

un medio en particular. En estos casos será necesario realizar cambios en la composición del medio para optimizar la producción (Sim, 2006).

Son muchos los autores que han documentado sus trabajos en propagación *in vitro* en *Vitis* spp. (Chee and Pool, 1982; Singh *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2004; Roubelakis-Angelakis, 2001; Poudel *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2015) y en específico para portainjertos de *Vitis vinifera* son un tanto menos (Machado *et al.*, 2007; El-Agamy *et al.*, 2009; M. Alizadeh *et al.*, 2010; Papiya *et al.*, 2010). Es a partir de la literatura científica y por experiencias *a priori* del CIRGEBB con este material vegetal de estudio, es que se determinó el medio de cultivo y las concentraciones reguladores de crecimiento que conforman los 20 tratamientos del estudio. Es así que para el acondicionamiento del material de *ex vitro* a *in vitro*, se utilizó el medio basal MS a concentración completa (1x), mientras que, para la micropropagación, MS a mitad de concentración (x/2 o MS/2); además de ser utilizado por varios autores como medio para el establecimiento de explantes *in vitro*, se promueve la generación de raíces (Hyndman *et al.* 1982, Martínez-Montiel *et al.* 2011). En cuanto al uso de reguladores de crecimiento, las concentraciones varían de autor en autor, según el genotipo estudiado. La presente investigación se utilizaron auxinas y citoquininas en un rango de 0.0 – 2.0 ppm BAP y de 0.0 – 0.5 ppm ANA.

#### b. Propagación *in vitro* en *Vitis vinifera* L. en el Perú

Un paso importante para mejorar el rendimiento cualitativo y cuantitativo del viñedo es la selección clonal de los mejores especímenes (González *et al.*, 2011). Ello implica una evaluación de las plantas en un territorio determinado, la selección de los mejores individuos de acuerdo a criterios sanitarios y productivos (Muñoz-Organero *et al.*, 2001). Aquí juega un rol importante la propagación *in vitro*, pues se tendrá una multiplicación a gran escala de clones de vid en condiciones asépticas. Sin embargo, muy poca investigación se ha realizado en el Perú sobre introducción y propagación *in vitro* de las diferentes variedades de cultivo en el país (González *et al.*, 2011), y menos aún sobre cultivares portainjertos de la uva, las pocas investigaciones existentes han sido aislados y poco sistemáticos, o han sido desarrollados por pocas empresas que mantienen en confidencialidad las informaciones técnicas que ellas generan.

Las plantas destinadas a la producción de Pisco en el Perú, necesitan con urgencia ser estudiadas en sus características fitosanitarias, la aplicación de la técnica *in vitro* es de

crucial importancia para el saneamiento de tanto los patrones como las de pie franco en esta industria. Es debido a ello que la presente investigación cumple un rol fundamental para la mejora en la industria del Pisco. Esta situación debe subsanarse si es que se pretende mejorar la producción del pisco sobre todo dada la problemática fitosanitaria de los suelos de cultivo de vid.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio del Centro de Investigación de Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM)

### 4.2 Materiales

#### 4.2.1 Material vegetal

Se utilizaron microesquejes de tres cultivares portainjertos de uso comercial para *Vitis vinifera* L.: “Harmony”, “Freedom” y “Paulsen”, los cuales venían siendo micropropagadas por el CIRGEBB de la UNALM. Los orígenes del material vegetal fueron proveídos por una persona natural externa al laboratorio.

#### 4.2.2 Materiales de uso rutinario

- Algodón
- Pinza
- Bisturí
- Estilete
- Cinta de embalaje
- Parafilm™
- Gorra
- Guantes
- Pabilo
- Mascarilla
- Envase de vidrio de 500 ml
- Pipetas graduadas de 10ml, 5ml y 2 ml
- Placas Petri
- Probetas de 1000 ml, 100 ml y 50 ml
- Puntas de micropipeta de 10-200 µl y 100-1000 µl
- Vasos de precipitado
- Mechero



### 4.3 Medios de Cultivo

#### 4.3.1 Medio de cultivo

- Murashige y Skoog (MS) (1962)

#### 4.3.2 Soluciones

- Soluciones madre de BAP 1000ppm
- Soluciones madre de ANA 1000ppm
- Tween 20
- Alcohol al 96%
- Alcohol al 70%
- Hipoclorito de sodio 2%

### 4.4 Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza de platillo
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica digital
- Congeladora de -20°C
- Desionizador de agua
- Horno de secado
- Horno microondas
- Potenciómetro
- Purificador de H<sub>2</sub>O
- Refrigeradora
- Ambiente Controlado de Crecimiento:
  - Temperatura: 22 °C +/- 2°C
  - Fotoperíodo: 8/16 hrs
  - Luminosidad: 2200Lux

## 4.5 Métodos

### 4.5.1 Homogenización

Los esquejes se mantuvieron las mismas condiciones (temperatura, fotoperiodo, luminosidad) a las empleadas en la investigación previos a su utilización en el presente estudio. Esta homogenización de las condiciones implicó que todos los esquejes sean incubados por 60 días en medio MS/2 para asegurar la adaptación a las condiciones *in vitro*.

### 4.5.2 Instalación de los experimentos

#### a. Propagación del material acondicionado

- Se utilizó el material vegetal introducido a condiciones *in vitro* como fuente de explantes, los que se mantuvieron en incubación por un periodo de 60 días
- En condiciones estériles dentro de la cámara de flujo laminar, se extrajeron las plántulas y en una placa Petri estéril fueron seccionadas, tomando las consideraciones de asepsia de los instrumentos. Cada microesqueje tuvo entre dos y tres yemas, dependiendo de la extensión de los entrenudos.
- Se colocaron tres explantes por unidad experimental (frasco) para los tratamientos con el cultivar Harmony, y dos explantes por unidad experimental para los cultivares Freedom y Paulsen, debido a los escasos del material.
- Cada tratamiento se hizo por triplicado, es decir, constó de tres unidades experimentales.

#### b. Selección de los mejores tratamientos para reevaluación

Transcurridos los 45 días, se escogieron aquellos tratamientos que manifestaron mejores promedios en las variables evaluadas (longitud del explante, número de hojas y longitud de raíz), para ser expuestos a una repetición del ensayo bajo las condiciones del tratamiento en el cual crecieron. La evaluación de los ensayos de repetición consistió en la medición de la longitud de las plántulas y el número de hojas. Esta vez, se dispuso de seis explantes, sólo uno por unidad experimental, de manera que cada tratamiento a reevaluación tuvo como muestra seis unidades experimentales.

#### c. Descripción de los tratamientos

Los tratamientos consistieron en variaciones de las concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y de ácido naftalenacético (ANA). El medio de cultivo

utilizado fue el medio basal Murashige y Skoog (1962) a mitad de concentración suplementado con sacarosa al 3%, pH 5.50, y 7.5% de agar. El mismo que utilizado como control (ver Tabla 9):

**Tabla 9: Descripción de los tratamientos utilizados en la micropropagación para los tres cultivares**

Medio de cultivo	Tratamiento	Combinación de reguladores	
		BAP (ppm)	ANA (ppm)
MS/2	1*	0.0	0.0
	2**	0.0	0.025
	3	0.0	0.05
	4	0.0	0.075
	5	0.0	0.1
	6	0.0	0.5
	7	0.5	0.0
	8	0.5	0.05
	9	0.5	0.075
	10	0.5	0.1
	11	0.5	0.5
	12	1.0	0.0
	13	1.0	0.05
	14	1.0	0.075
	15	1.0	0.1
	16	1.0	0.5
	17	2.0	0.0
	18	2.0	0.05
	19	2.0	0.075
	20	2.0	0.1
	21	2.0	0.5

\*Tratamiento tomado como control. \*\*Solo utilizado en Freedom.

FUENTE: Elaboración propia.

#### 4.5.3 Descripción de la unidad experimental

Se utilizaron como unidades experimentales, frascos de vidrio de 250 mL de capacidad, los cuales contuvieron 25 mL de medio de cultivo con los reguladores de crecimiento correspondientes y con tres explantes por unidad experimental. Concentración de ANA (ppm): 0.0, 0.025\*\*, 0.05, 0.075, 0.1 y 0.5; BAP (ppm): 0.0, 0.5, 1.0. y 2.0, que se evaluarán para cada cultivar.

#### 4.5.4 Análisis Estadístico

El experimento factorial fue desarrollado con un DCA, para cada cultivar de forma independiente.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + u_{ij}, \text{ donde:}$$

$Y_{ij}$ : Variable respuesta

$\tau_i$ : Efecto del i-ésimo tratamiento

$\mu$ : Error experimental

$u_{ij}$ : Condiciones *in vitro*

Se utilizó la prueba de análisis de varianza para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Para el caso de la existencia de diferencias significativas, se empleó la prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey que consiste en una comparación de pares entre todos los tratamientos otorgando una letra diferente a cada promedio con diferencias significativas, para los promedios estadísticamente iguales se les otorgarán la misma letra. El análisis estadístico de los datos obtenidos fue llevado cabo utilizando el programa estadístico *InfoStat* 2015. Todos los análisis se realizaron luego de verificar el cumplimiento de los supuestos necesarios y a un nivel de confianza de 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

#### 4.5.5 Variables de respuesta

Las variables se evaluaron en todas las unidades experimentales, y fueron las siguientes:

- El número de hojas a 15 y 45 días de sembrados.
- Longitud de la plántula a los 15 y 45 días de sembrados.
- Longitud de las raíces a los 45 días de sembrados.

Además, debido a las características de la investigación se realizó un análisis descriptivo ya que no fue factible registrar todas las características de forma numérica. Para ello se detalló en forma precisa cada evento realizado y los cambios que ocurrieron dentro de cada tratamiento, para así poder reforzar los resultados estadísticos y cumplir con los objetivos de la investigación. Se pretende conocer las respuestas de los cultivares a diferentes combinaciones de reguladores que mejor favorezcan a la propagación *in vitro* de dichos cultivares.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 15 días de tratamiento

#### 5.2.1 “Harmony” (1613 couderc x dog ridge)

A los 15 días fue difícil observar grandes diferencias en cuanto al crecimiento del explante en los diferentes cultivares, sin embargo, es posible esbozar algunas tendencias. Por ejemplo, Harmony mostró un buen crecimiento bajo un medio sin reguladores (control), es así que tuvo un buen desarrollo de las hojas y de las raíces (ver ANEXO 5), además de presentar un crecimiento más rápido en comparación del resto de tratamientos, como se aprecia en la Tabla 10.

**Tabla 10: Comportamiento de la micropropagación del cultivar “Harmony” a los 15 días luego de sembrados los esquejes**

Tratamiento	Altura promedio (cm)	Número de hojas promedio	<sup>1</sup> Estado
Control (MS/2)	1.3	1.44	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.05	1.03	1.00	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.075	0.74	1.11	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.1	1.14	0.56	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.5	1.12	1.89	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.0	1.06	0.89	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.05	1.09	0.67	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.075	0.63	1.11	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.1	1.09	0.89	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.5	0.74	1.00	Normal
BAP 1.0 + ANA 0.0	0.94	1.00	Engrosamiento
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.08	2.33	Engrosamiento
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.10	0.67	Engrosamiento
BAP 1.0 + ANA 0.1	0.90	1.00	Engrosamiento
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.27	1.17	Engrosamiento
BAP 2.0 + ANA 0.0	0.99	2.17	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.07	2.33	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.02	1.17	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.03	1.33	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.5	0.59	0.33	Callo

<sup>1</sup> Se refiere a las condiciones de la zona basal de los esquejes en contacto directo al medio de cultivo, que son predominantes entre el total de esquejes por cada tratamiento; dónde: engrosamiento significa un aumento puntual del grosor de la zona basal de forma desproporcionada al resto del esqueje y, callo, significa la formación de tejido calloso sobre el corte del esqueje. FUENTE: Elaboración propia.

Por otro lado, se observó que todos los tratamientos ausentes de citoquinina manifestaron un buen desarrollo de la planta, en especial el tratamiento que contenía ANA 0.5ppm, el cual tuvo buen desarrollo radicular (Figura 4 y ANEXO 5 A-D). Desde la combinación de BAP 1.0 ppm + ANA 0.0 ppm, produjeron proliferación de brotes adventicios (2-3 brotes por esqueje, Figura 5), se pudo observar formaciones inusuales en los cortes de los esquejes, y por encima de esa concentración de citoquinina hubo formación de tejido calloso, esta condición no permite o complica el desarrollo de raíces de la zona de corte por lo que planta tendrá problemas en su crecimiento o desarrollará raíces tipo zanco que no favorecen la aclimatación de las futuras plántulas (ANEXO E-H). Es importante resaltar que, estos brotes presentaron baja longitud y sus hojas no tuvieron desarrollos regulares, estando la mayoría hiperhidratadas, condición que no es favorable para su propagación ni para su aclimatación.



**Figura 4: MS/2 + ANA 0.5ppm, expresión del buen desarrollo foliar y radicular**  
FUENTE: Elaboración propia



**Figura 5: MS/2 + BAP 1.0 + ANA 0.05 ppm, explantes manifestaron hiperhidratación**  
FUENTE: Elaboración propia

## 5.2.2 “1103 Paulsen” (V. berlandieri x V. rupestris)

Al igual que la tabla anterior, no se muestran grandes diferencias en el cultivar Paulsen. Así también, los promedios aun no muestran grandes diferencias. Los resultados indican que el crecimiento es ligeramente más lento que en Harmony. Es importante notar que Paulsen presenta mucha mayor susceptibilidad ante la presencia de citoquininas exógenas, esto resulta evidente al visualizar el estado de una gran cantidad de esquejes con tejidos callosos, incluso también, a partir de la concentración 0.5 ppm de BAP en comparación a los demás cultivares (ver Tabla 11 y ANEXO 6).

**Tabla 11. Comportamiento de la micropropagación del cultivar “Paulsen” a los 15 días luego de sembrados los esquejes**

Tratamiento	Altura promedio (cm)	Número de hojas promedio	<sup>1</sup> Estado
Control (MS/2)	0.85	1.5	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.05	1.05	2	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.075	1.2	1.5	normal
BAP 0.0 + ANA 0.1	1	1	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.5	0.567	0	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.0	0.9	1	Engrosamiento
BAP 0.5 + ANA 0.05	0.6	1	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.075	1.15	1	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.1	1.25	1.5	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.5	0.65	1	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.3	2.5	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.3	2	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.075	0.5	2	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.1	1	2	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.5	0.9	1.5	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.0	0.85	0.5	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.05	0.9	1.5	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.05	2.5	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.1	0.6	1.67	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.5	1	0.5	Callo

<sup>1</sup> Se refiere a las condiciones de la zona basal de los esquejes en contacto directo al medio de cultivo, que son predominantes entre el total de esquejes por cada tratamiento; dónde: engrosamiento significa un aumento puntual del grosor de la zona basal de forma desproporcionada al resto del esqueje y callo significa la formación de tejido calloso sobre el corte del esqueje. FUENTE: Elaboración propia.

El tratamiento Control evidenció tener un buen crecimiento, aun cuando inferior en lo observado en la tabla anterior. Así como con en Harmony, las combinaciones con concentraciones elevadas de BAP produjeron múltiples brotes y varias hojas, pero éstos fueron deformes, pequeñas y con claros indicios de hiperhidratación; al incrementarse la concentración de BAP se incrementó el crecimiento de callos (ver Figura 6). Comparativamente a lo observado en Harmony, el cultivar Paulsen se manifestó mucho

más sensible a la presencia de citoquininas, formando masa de callos a partir de la segunda semana de sembrado en medio con este regulador de crecimiento. Las plántulas que se desarrollaron en los medios cultivados en las concentraciones de ANA 0.05, 0.075 y 0.1 ppm, tuvieron los mejores desarrollos en las hojas (coloración homogénea, forma y tamaño) y en las raíces, que si bien aún eran cortas presentaban buena estructura (ver Figura 7 y ANEXO 6 A-E). Cabe resaltar que los colores y texturas de los tejidos callosos no fueron uniformes, si no, fueron variando de tratamiento en tratamiento (ver ANEXO 6 F-H).



**Figura 6: MS/2 + BAP 1.0 + ANA 0.5 ppm, proliferación de tejido calloso sobre las bases**  
FUENTE: Elaboración propia



**Figura 7: MS/2 + ANA 0.05 ppm, crecimiento adecuado de los esquejes**  
FUENTE: Elaboración propia



### 5.2.3 “Freedom” (1613 couderc x dog ridge)

El crecimiento de las plantas a los 15 días en el cultivar Freedom manifestó ser ligeramente superior a los dos cultivares anteriormente descritos. Al igual que en los otros cultivares, el tratamiento control mostró buen crecimiento de plántulas, con buenos tamaños y buena producción de hojas. Sin embargo, se evidenció que este cultivar presenta una mayor susceptibilidad a la presencia de ANA en el medio de cultivo, como se nota el gran número de formaciones callosas en la Tabla 12 (ver Figura 8).

**Tabla 12. Comportamiento de la micropropagación del cultivar "Freedom" a los 15 días luego de sembrados los esquejes**

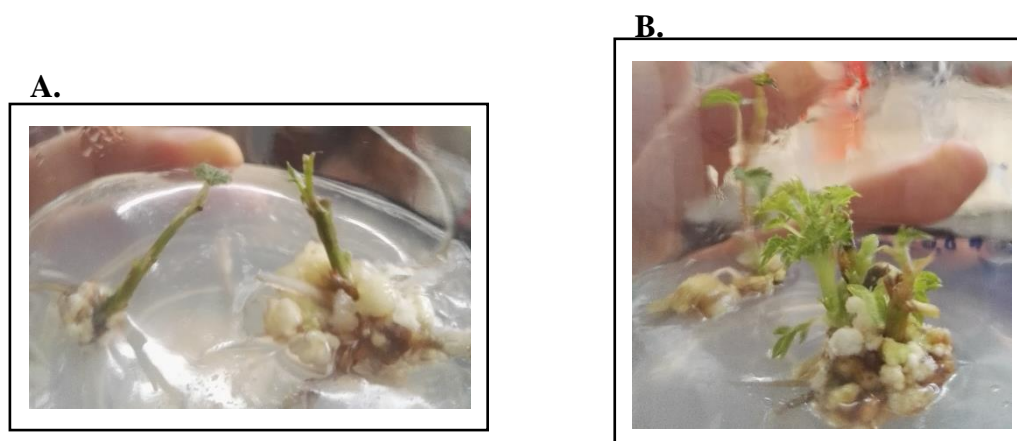
Tratamiento	Altura promedio (cm)	Número de hojas promedio	<sup>1</sup> Estado
Control (MS/2)	1.2	2.5	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.025	0.85	1.5	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.05	1.5	2	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.075	1.35	2	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.1	1.8	1	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.5	0.52	1.2	Engrosamiento
BAP 0.5 + ANA 0.0	1.35	1	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.05	1.6	2	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.075	1.15	1	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.1	0.15	1	Engrosamiento
BAP 0.5 + ANA 0.5	1.05	1	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.05	1.5	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.6	2	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.9	1	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.1	1.2	1.5	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.05	1	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.0	1.8	3	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.05	0.75	1.5	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.15	3	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.5	1	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.5	1.45	1	Callo

<sup>1</sup>Se refiere a las condiciones de la zona basal de los esquejes en contacto directo al medio de cultivo, que son predominantes entre el total de esquejes por cada tratamiento; dónde: engrosamiento significa un aumento puntual del grosor de la zona basal de forma desproporcionada al resto del esqueje y callo significa la formación de tejido calloso sobre el corte del esqueje. FUENTE: Elaboración propia

Corroborándose trabajos previos en el laboratorio, donde el cultivar presenta mejores resultados a concentraciones bajas de ANA, hecho que dio el sustento para tomar la decisión de utilizar concentraciones muy bajas de ANA (ANA 0.025 ppm) en este cultivar.

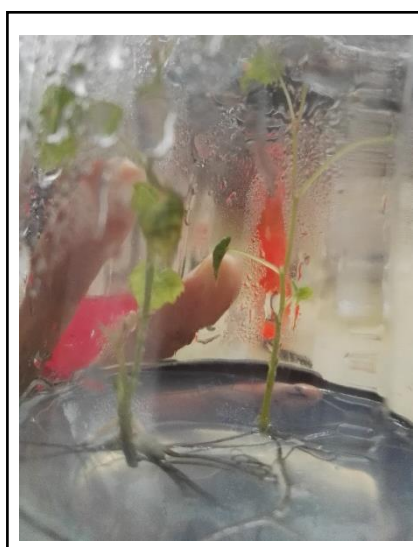
El comportamiento de Freedom y Harmony a la tolerancia de las citoquininas, que no es compartido con el cultivar Paulsen, podría deberse a que los dos primeros comparten parentales en su origen genético (Walker, 2004). Es decir, tendrán diferentes expresiones fenotípicas bajo un genotipo común.

En términos generales, el cultivar Freedom manifestó un buen desarrollo y coloración uniforme en las hojas en la gran mayoría de tratamientos, BAP 0.5, BAP 0.5 + ANA 0.05, 0.075 y 0.1. Los resultados indican entonces, que para la concentración de 0.5 BAP se deben usar bajas concentraciones de ANA (ver Figura 9 y ANEXO 7).



**Figura 8: A. MS/2 +BAP 1.0 + ANA 0.5 ppm y B. MS/2 + BAP 2.0 + ANA 0.5 ppm, efecto sobre los esquejes ante elevadas concentraciones de reguladores**

FUENTE: Elaboración propia



**Figura 9: MS/2 + ANA 0.075, óptimo crecimiento del esqueje**

FUENTE: Elaboración propia

## 5.2 45 días de tratamiento

### 5.2.1 "Harmony" (1613 couderc x dog ridge)

**Tabla 13. Comportamiento de la micropropagación del cultivar "Harmony" a los 45 días luego de sembrados los esquejes.**

Tratamiento	Longitud promedio (cm)	Incremento (pts)	Número de hojas promedio	Incremento (pts)	<sup>1</sup> Longitud radicular (cm)	<sup>2</sup> Estado
Control (MS/2)	3.25	1.95	4.44	3.0	6.00	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.05	3.30	2.27	5.00	4.0	7.00	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.075	4.30	3.56	5.56	4.5	4.50	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.1	4.28	3.14	5.56	5.0	5.80	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.5	4.60	3.48	5.56	3.7	12.00	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.0	3.22	2.16	4.22	3.3	8.00	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.05	3.72	2.63	4.00	3.3	5.00	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.075	3.80	3.17	2.11	1.0	5.50	Engrosamiento
BAP 0.5 + ANA 0.1	4.20	3.11	5.44	4.6	7.00	Engrosamiento
BAP 0.5 + ANA 0.5	4.00	3.26	4.77	3.8	4.50	Engrosamiento
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.00	0.06	4.44	3.4	0.50	Engrosamiento
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.11	0.03	5.33	3.0	0.50	Engrosamiento
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.24	0.14	8.11	7.4	1.00	Engrosamiento
BAP 1.0 + ANA 0.1	1.45	0.55	5.56	4.6	1.50	Engrosamiento
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.57	0.30	7.78	6.6	3.30	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.0	1.00	0.01	6.50	4.3	0.00	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.20	0.13	5.33	3.0	0.00	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.22	0.20	4.67	3.5	0.00	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.32	0.29	3.33	2.0	1.00	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.5	0.60	0.01	2.17	1.8	0.60	Callo

<sup>1</sup> Dada la alta variabilidad entre las longitudes de las raíces dentro de un mismo tratamiento, se optó por anotar el promedio de las entre las raíces más largas de cada unidad experimental.

<sup>2</sup> Se refiere a las condiciones de la zona basal de los esquejes en contacto directo al medio de cultivo, que son predominantes entre el total de esquejes por cada tratamiento. Dónde: engrosamiento significa un aumento puntual del grosor de la zona basal de forma desproporcionada al resto del esqueje y callo significa la formación de tejido calloso sobre el corte del esqueje.

A diferencia de los resultados de los 15-30 días, ya se tienen promedios más diferenciados y desarrollos vegetales más evidentes. Efectivamente, el cultivar Harmony presenta un buen crecimiento en el medio MS/2 sin presencia de reguladores, tanto en su nivel radicular como aéreo. Las raíces tuvieron importantes longitudes, y sus hojas pasaron los 2cm de largo.

De los tratamientos con solamente auxinas, se tuvieron los mejores promedios con la concentración ANA 0.5 ppm, además presentó mejores características visuales, por ejemplo, el grosor del tallo y su firmeza fueron mejores que los demás. Por otro lado, se puede decir que las concentraciones elevadas de BAP no produjeron plantas altas, se nota que aquellos tratamientos dónde sólo hubo BAP en el medio, las plántulas tuvieron

los promedios más bajos en altura. Y, por el contrario, los tratamientos con sólo ANA tuvieron los promedios más altos. Por otro lado, los altos números de hojas de los tratamientos con BAP se deben a los múltiples brotes que generaron, pero como se mencionó anteriormente, estos fueron de muy corta longitud y de hojas deformes con coloraciones disparejas e hiperhidratadas. Vale decir que los tratamientos con BAP 0.5 ppm en el medio presentaron valores promedios muy parecidos, e incluso mejores a los tratamientos de solo ANA (ver Tabla 13), en especial en las longitudes, distinguiéndose en las elongaciones de los internados, pues los que presentaban citoquinina en el tratamiento manifestaron un ligero recorte a diferencia de los tratamientos con solamente auxinas. A partir de los tratamientos con BAP 1.0 ppm, evidenciaron raíces pobres, incluso en la mayoría no hubo formación alguna de raíz, principalmente debido al engrosamiento de la base y a la formación de tejido calloso (Figura 10). De todos los tratamientos destacan: BAP 0.0 + ANA 0.075 ppm, BAP 0.0 + ANA 0.1 ppm, BAP 0.0 + ANA 0.5 ppm, BAP 0.5 + ANA 0.1 ppm y BAP 0.5 + ANA 0.5 ppm. Es probable que la no muy alta concentración de BAP y la elevada concentración de ANA generen una buena sinergia, Estos tratamientos presentaron buena formación de raíces, tanto principales como secundarias, y hojas de buen tamaño (1.5 – 2.5 cm) (ver ANEXO 5 E-F). Pero, el tratamiento que destacó entre los demás fue el de BAP 0.0 + ANA 0.5 ppm, pues obtuvo los mejores promedios en las dos características medidas y, además, tuvieron las raíces mejores desarrolladas.



**Figura 10: Acción de concentraciones elevadas de BAP, formación de múltiples brotes (izquierda) e inhibición del crecimiento radicular (derecha)**

FUENTE: Elaboración propia

## 5.2.2 “1103 Paulsen” (V. berlandieri x V. rupestris)

A los 45 días es bastante notoria la susceptibilidad de este cultivar a las concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento. Si bien no todos los esquejes evidenciaron la formación de tejido calloso, la mayoría de dichos tratamientos, lo hicieron como se aprecia en la siguiente tabla.

**Tabla 14. Comportamiento de la micropropagación del cultivar Paulsen a los 45 días luego de sembrados los esquejes.**

Tratamiento	Longitud promedio (cm)	Incremento (pts)	Número de hojas promedio	Incremento (pts)	<sup>1</sup> Longitud radicular (cm)	<sup>2</sup> Estado
Control (MS/2)	2.8	2.0	4	2.5	4.5	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.05	4.2	3.2	5	3.0	5	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.2	4.0	5	3.5	14.2	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.1	4.8	3.8	4.5	3.5	10.5	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.5	3	2.4	3	3.0	5.5	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.0	1.15	0.3	2.5	1.5	3.5	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.05	2	1.4	3.5	2.5	2	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.075	2.1	1.0	4	3.0	5.3	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.1	2.1	0.9	5.5	4.0	7.5	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.5	0.8	0.2	1.5	0.5	6	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.5	0.2	5	2.5	1.4	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.05	2.65	1.4	9.5	7.5	1.8	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.4	0.9	8	6.0	1	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.1	1.4	0.4	2.5	0.5	0.8	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.2	0.3	1.5	0.0	1.5	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.0	0.9	0.1	3	2.5	1.4	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.1	0.2	4.5	3.0	2,6	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.25	0.2	2.5	0.0	1.3	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.1	1	0.4	2.33	0.7	2.0	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.5	1.3	0.3	0.5	0.0	1.5	Callo

<sup>1</sup> Dada la alta variabilidad entre las longitudes de las raíces dentro de un mismo tratamiento, se optó por anotar el promedio de las entre las raíces más largas de cada unidad experimental.

<sup>2</sup> Se refiere a las condiciones de la zona basal de los esquejes en contacto directo al medio de cultivo, que son predominantes entre el total de esquejes por cada tratamiento. Dónde: engrosamiento significa un aumento puntual del grosor de la zona basal de forma desproporcionada al resto del esqueje y callo significa la formación de tejido calloso sobre el corte del esqueje.

El tratamiento Control continuó manifestando buen desarrollo a los 45 días de sembrado, pero en torno a las características visuales, este tratamiento se vio disminuido en comparación a los otros tres, ya que las hojas no manifestaron una coloración intensa, además se encontraron dobladas sobre sí y los tallos no se encontraron aun definidos, es decir aún estaban traslúcidos. La susceptibilidad de este cultivar a los reguladores de crecimiento, nos indicaría que el cultivar Paulsen presenta cantidades considerables de auxinas y citoquininas endógenas, por lo que las dosis de elevadas concentraciones alteraron drásticamente su desarrollo (Figura 11). Los callos tuvieron

diferentes colores y texturas; colores entre verdes, blancos y cremas con texturas cremosas, rígidas y gelificadas. La base con formaciones de tejido calloso no permitió, en la mayoría de casos, la generación de raíces por lo que las plántulas no tuvieron fuente de absorción de los nutrientes y no tuvieron un buen crecimiento. Por el contrario, todos los tratamientos sin BAP presentaron buen desarrollo de raíces y, por ende, buen crecimiento aéreo. En dichos tratamientos se tuvieron longitudes de hojas por encima de los 2cm y raíces sobre los 10cm. Destacan el tratamiento BAP 0.0 + ANA 0.075 ppm y BAP 0.0 + ANA 0.1 ppm con un ligero sesgo hacia la primera. Estas poseen, además, mejores características visuales como el grosor del tallo, coloración intensa y el tamaño de sus hojas, las cuales tuvieron un tamaño considerable (ver ANEXO 6 B-D).



**Figura 11: Alta susceptibilidad de “Paulsen” a los reguladores de crecimiento, el crecimiento de callos sobre las bases impide la adecuada toma de nutrientes provocando un mal desarrollo de los esquejes.**

FUENTE: Elaboración propia

### 5.2.3 "Freedom" (1613 couderc x dog ridge)

Tras 45 días, los resultados evidenciaron comportamientos peculiares. Se vio que la respuesta del cultivar Freedom fue una combinación de las otras dos, pues si bien tuvo una buena respuesta a bajas concentraciones de BAP, a concentraciones de ANA desde 0.1 ppm, ya generan alteraciones en el desarrollo de las plántulas. Esto nos indicaría que este cultivar tendría una producción endógena mejor balanceada de fitohormonas, a comparación de las demás.

**Tabla 15. Comportamiento de la micropropagación del cultivar "Freedom" a los 45 días de sembrados los esquejes.**

Tratamiento	Longitud promedio (cm)	Incremento (pts)	Número de hojas promedio	Incremento (pts)	<sup>1</sup> Longitud radicular (cm)	<sup>2</sup> Estado
Control (MS/2)	2.85	1.7	4.5	2	6	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.025	4.5	3.7	4	3	8.5	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.05	6.4	4.9	6	4	10.50	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.55	4.2	5	3	9	Normal
BAP 0.0 + ANA 0.1	5.1	3.3	5	4	11.6	Engrosamiento
BAP 0.0 + ANA 0.5	3.7	3.2	1.17	0	0	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.0	6	4.7	5	4	16	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.05	5.65	4.1	5.5	4	17	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.075	4	2.9	5.5	5	12.5	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.1	0.85	0.7	1	0	8.5	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.5	1.3	0.3	1	0	1.5	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.4	0.4	3.5	2	14	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.6	0.0	11.5	10	11.5	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.9	0.0	4	3	6.8	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.1	0.83	-0.4	5	4	12.5	Callo
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.35	0.3	1	0	15	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.0	2	0.2	9	6	4.8	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.8	1.1	9.5	8	2.5	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.35	0.2	12.5	10	1	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.7	0.2	1	0	16	Callo
BAP 2.0 + ANA 0.5	1.7	0.3	2.5	2	11.5	Callo

<sup>1</sup> Dada la alta variabilidad entre las longitudes de las raíces dentro de un mismo tratamiento, se optó por anotar el promedio de las entre las raíces más largas de cada unidad experimental.

<sup>2</sup> Se refiere a las condiciones de la zona basal de los esquejes en contacto directo al medio de cultivo, que son predominantes entre el total de esquejes por cada tratamiento. Dónde: engrosamiento significa un aumento puntual del grosor de la zona basal de forma desproporcionada al resto del esqueje y callo significa la formación de tejido calloso sobre el corte del esqueje. Fuente: Elaboración propia.

Como en los demás cultivares, la presencia de BAP en el medio de cultivo generó, efectivamente, mayor producción de brotes y por ende de follaje, es decir, más yemas (ver Tabla 15). Sin embargo, estas no son material óptimo para usarlas para la propagación y, menos deseables para el proceso de aclimatación. Las plántulas desarrolladas en esos medios fueron bajas, con hojas deformes, decoloradas e

hiperhidratadas. En la mayoría de casos, los callos no permitieron la formación de raíces y en otros, no hubo crecimiento alguno de raíces (ver Figura 12). A diferencia de Paulsen, los tejidos callosos tuvieron predominancia con coloración blanquecina y de textura arenosa. Otro aspecto que ha diferenciado los callos de este cultivar es el crecimiento de raíces, pues a pesar de haber desarrollado callos en los cortes, las raíces crecieron sin problemas, algunas desarrollaron tejido calloso en sus raíces lo que llevó luego a que estas crezcan deforme. Este hecho se ve reflejado en los promedios de las longitudes de las raíces de la Tabla 15., siete tratamientos cuyos tejidos tuvieron predominancia callosa, tuvieron raíces por encima de los 10cm. Sin embargo, este tipo de tejidos no asegura la toma de nutrientes del medio y tampoco asegura la adhesión al tallo cuando se retire la plántula del soporte o medio. Por el contrario, en aquellas plántulas cuyo estado fue de Normal, las raíces crecieron correctamente, las hojas tuvieron buena forma, coloración homogénea y buen tamaño (ver ANEXO 7). Pero, el tratamiento que tuvo mejores resultados fue MS/2 + BAP 0.0 + ANA 0.05 ppm, tuvieron raíces extraordinariamente largas, así como hojas de coloración intensa y de mayor tamaño.



**Figura 12: Engrosamiento de la base y formación de callos impiden el desarrollo de raíces**

FUENTE: Elaboración propia



#### 5.2.4 Análisis de los comportamientos de las variables al finalizar los 45 días de ensayo

Las Tablas 13, 14, 15, representan gráficamente los valores promedios de la Tabla 5, 6, 7. Además, se incluyó la prueba estadística Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey. Se encontró en cada cultivar una respuesta específica diferente para cada tratamiento, como se esperaba. Yerbolova *et al.* (2013) manifiesta que existen factores limitantes en la micropropagación de vides y otras especies leñosas, estos son: el genotipo, el tamaño del explante y la naturaleza y concentración de los reguladores de crecimiento. Reguladores de crecimiento que pueden ser bastante efectivos para la propagación *in vitro* en una especie puede no ser igualmente efectivos para otro cultivar o especie (Singh *et al.*, 2004; Poudel *et al.*, 2005; Alizadeh *et al.*, 2010). Cómo lo mencionó Aazami (2010), el uso de reguladores de crecimiento, ya sea uno o en combinaciones, definirá el éxito del cultivo de explantes *in vitro* en vid, tanto se respete un balance específico de la variedad y la eficiencia de la propagación dependerá en la rapidez y uniformidad en que estos crezcan (Khan *et al.*, 2015).

Si bien no existen publicaciones realizadas en micropropagación *in vitro* sobre los cultivares empleados en la presente investigación, se encontraron importantes trabajos con la información suficiente para utilizarlos como referencias.

#### 5.2.5 Análisis de la longitud

De los resultados, existen aspectos que se distinguen notoriamente, como, por ejemplo, el efecto de elevadas concentraciones de reguladores en el desarrollo de los esquejes, teniendo como última instancia la formación de callos (ver Figura 14A, 15A y 16A.). Un detalle que llamó la atención fue que para todos los cultivares, en los primeros 15 días del ensayo se tuvieron las mayores longitudes en los tratamientos que incluían BAP, con excepciones en donde el callo impidió la toma de nutrientes, esto se debería a uno de los efectos de las citoquininas que es la de romper la dormancia de las yemas y la dominancia apical (Singh *et al.*, 2005). Pero, con el tiempo estos esquejes manifestaron estancamiento en su desarrollo, siendo superados por los tratamientos con ausencia de BAP. Sajid *et al.* (2006) y Tehrim *et al.* (2013), observaron que a mayor concentración de BAP más decrecía la elongación de los esquejes. Esto se debería a que una elevada concentración de citoquininas conlleva una producción elevada de etileno que, a su vez, limita la regeneración de brotes e inhibe la elongación de los entrenudos

(Khan *et al.*, 2015). No obstante, otros estudios encontraron resultados opuestos como los encontrados por Poudel *et al.* (2005), quienes en su estudio observaron que los brotes continuaban creciendo aun cuando incrementaba la concentración de BAP, para dos genotipos de vides.

Otros autores evidenciaron que la elongación de los esquejes es influenciada por las concentraciones de los reguladores de crecimiento, contrarrestando su desarrollo a elevadas concentraciones (Kadota y Niimi, 2003). En el presente estudio se pudieron apreciar resultados mixtos en referencia a los mencionados autores. Así, por ejemplo, el cultivar Paulsen fue el que manifestó mayor sensibilidad al incremento de los reguladores de crecimiento, sobre todo sensible a elevadas concentraciones. Este hecho corrobora lo encontrado por Sajid *et al.* (2006) y Tehrim *et al.* (2013), ya que el cultivar Paulsen se vió afectado incluso por el tratamiento que incluyó a solamente ANA 0.5ppm. Así pues, se ve el descenso brusco desde el tratamiento mencionado en la Tabla 14A. De esta tabla se aprecia también que, el tratamiento que obtuvo el mayor crecimiento promedio estadísticamente diferente del resto fue ANA 0.075ppm, seguido de ANA 0.1ppm (ver Figura 15A). Por otro lado, el cultivar Freedom mostró tener mejor resultados sobre concentraciones y combinaciones más elevadas que el cultivar Paulsen (ver Tabla 15A), y no resulta sorprendente que el cultivar Harmony haya presentado un comportamiento muy similar cultivar Freedom. La probable razón es la cercanía genética que ambos poseen. Para ambos casos se observó mayor tolerancia al uso de reguladores de crecimiento y combinaciones más elevadas que Paulsen (ver Figura 16A).

En el presente estudio, las respuestas observadas en los tres cultivares a la utilización de reguladores de crecimiento son un tanto distintos a los reportados por la vasta mayoría de autores revisados en la literatura (Singh *et al.*, 2004; Poudel *et al.*, 2005; Jaskani *et al.*, 2008; 2009; Alizadeh *et al.*, 2010; Křižan *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2015; Dev *et al.*, 2015) los cuales indican a BAP como citoquinina indispensable para la micropropagación de *Vitis*, mientras que al ANA, presente solo en concentraciones relativamente bajas (0.05-0.2 ppm). Si bien los mencionados autores trabajaron con otros cultivares, el uso y concentraciones de estos reguladores son indicadas como tendencia del comportamiento de las vides. Alizadeh *et al.* (2010) y Dev *et al.* (2015), por ejemplo, tuvieron el establecimiento con éxito *in vitro*, de sus cuatro genotipos diferentes, utilizando BAP 2.00 ppm + ANA 0.2 ppm. Mientras que Křižan *et al.*

(2012), también en cuatro portainjertos distintos, obtuvo los mejores resultados en el desarrollo de las plántulas utilizando 2.0ppm BAP + 0.01ppm ANA, resultados que difieren con los hallados por la presente investigación, ya que para los tres cultivares estudiados, la BAP manifestó ser contraproducente en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

#### 5.2.6 Análisis del número de hojas

De la misma manera, los resultados indicarían, que existió una correlación cuando aumentaron las concentraciones de hormonas, en cuanto al número de hojas por tratamiento. Como se mencionó anteriormente, el aumento en el número de hojas se debió, principalmente, a la formación de múltiples brotes de la mano de concentraciones de BAP por encima de 1.0ppm. Poudel *et al.* (2005), por ejemplo, obtuvo en su experimento realizado en dos genotipos de vid (una variedad de vid silvestre y un cultivar híbrido interespecífico de *Vitis vinifera* L.) la mayor cantidad de brotes; 3.8 y 3.1, respectivamente, en el tratamiento con 10 $\mu$ M de BAP, aproximadamente 2ppm. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Mukherjee *et al.* (2010), Tehrim *et al.* (2013), Khan *et al.* (2015), todos en distintos cultivares de vid, donde obtuvieron entre 4-5 brotes por explante en concentraciones superiores a 1.0ppm. Por otro lado, que Křižan *et al.* (2012) encontró que la combinación de citoquininas y auxinas significa una mejora en el desarrollo de brotes a comparación de citoquininas individuales. Usando 2.0ppm de BAP obtuvo, en promedio, 3.62 brotes, y cuando le agregó a esa concentración 0.01ppm de ANA logró obtener 8.77 brotes en promedio. También hay cultivares cuya tolerancia a las concentraciones elevadas es superior. Abido *et al.* (2013) ensayó con combinaciones de concentraciones de 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 ppm BAP y 0.1, 0.2 y 0.3 ppm ANA en *Vitis vinifera* L. cv. Moscatel de Alejandría. El máximo número de brotes se produjo con el medio conteniendo 3.0ppm BAP + 0.2 ppm ANA. Esta combinación de reguladores es bastante superior a la que podría resistir cualquiera de las tres plantas usadas en la presente investigación. Además, Butiuc-Keul *et al.* (2009) y Craciunas *et al.* (2009) encontraron que al suplementar al medio con citoquininas, se mejoró la tasa de multiplicación de brotes en vid al promover, posiblemente, el crecimiento de las yemas axilares en el cultivo de tejidos.

En cuanto a la selección de los mejores medios de cultivo para la generación adecuada de hojas, fundamentales para realizar fotosíntesis durante los momentos de aclimatación, se tuvieron valores bastante más homogéneos en comparación de las longitudes (ver Figura 12B, 13B, 14B). Los valores más altos corresponden a los tratamientos donde se produjeron múltiples brotes pequeños a manera de conglomerados o “clusters”, los cuales tenían entre 3-4 hojas cada uno, la gran mayoría en hiperhidratación o deformes debido a las concentraciones elevadas de reguladores. No existe una relación lógica precisa para determinar qué tratamiento fue el que produjo más brotes, pues dependió bastante del desarrollo del callo, del corte durante el sembrado, la longitud inicial del esqueje, etc. Pero sí se puede hablar de una tendencia. Harmony resultó con los tratamientos ANA 0.075, 0.1 y 0.5 ppm sin diferencias significativas en la cantidad de hojas (ver Figura 12B), debido a que precisamente estos tres tratamientos produjeron, a su vez, las mayores longitudes, lo que les dio mayores zonas de brotes y, en consecuencia, mayor cantidad de hojas. Sin duda, un aspecto favorable para fines de propagación. Paulsen, presentó un comportamiento similar al cultivar anterior, las plántulas de mayor longitud presentaron valores semejantes en producción de hojas, solamente superadas por aquellas que presentaron múltiples brotes. Los tratamientos ANA 0.05ppm y 0.075ppm, sin diferencias significativas, fueron los que se generaron mayor número de hojas en buen estado. De la misma manera, Freedom manifestó el comportamiento de los otros dos cultivares, teniendo a los esquejes de mayor longitud como aquellos que produjeron el mayor número de hojas en buen estado, estos fueron los tratamientos: ANA 0.05ppm, BAP 0.5 + ANA 0.05ppm y BAP 0.5 + ANA 0.075ppm.

Khan *et al.* (2015), y los demás autores mencionados, reportaron que los brotes obtenidos presentaron una alta calidad y buen desarrollo, lo cual fue totalmente opuesto a lo obtenido en la presente investigación cuando se utilizaron concentraciones similares a las empleadas en los mencionados trabajos, ya que manifestaron hiperhidratación, decoloración y tamaños reducidos. Entre los primeros es reportar el efecto de la hiperhidratación fueron Morini *et al.* (1985) y Heloir *et al.* (1997), este último encontró en sus estudios, que el efecto se podía reducir al disminuir la concentración de BAP, por ejemplo, de 2 a 1ppm. En el caso del presente trabajo, esto podría darse si la reducción de BAP sucede hasta como máximo 0.5ppm. No obstante, también se tuvieron brotes normales a concentraciones mayores de BAP. Křížan *et al.* (2012), por otro lado,

encontraron que la hiperhidratación dependió del tipo de auxina empleado, y que la combinación de ANA y BAP, incluso en concentraciones altas de citoquininas, no generaban dicho efecto.

A este tipo de brotes, tanto en Harmony, Paulsen y Freedom, se los intentó propagar en medio fresco basal MS/2 y MS, pero ninguno logró desarrollarse con éxito (ver Figura 11).

En el caso particular de la variable número de hojas, al contabilizarlas se tuvo una lectura gris, ya que las cuantificaciones incluyeron los brotes de masas de callos que son explantes que no deberían ser utilizados, pues a pesar de que produjeron múltiples brotes y por ende múltiples hojas, estos tienen altas probabilidades de presentarse como variantes somaclonales siendo este material distinto al deseado, y además, en su mayoría no se pudieron propagar.

**Figura 13: Izquierda, esquejes provenientes de brotes hiperhidratados. Derecha, esquejes provenientes de brotes normales, 30 días en MS/2.**



FUENTE: Elaboración propia

### 5.2.7 Análisis de la formación de tejido calloso

La presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo suele ser el principal causante del desarrollo de callos en micropropagación (Mahdinezhad y Ghanbari, 2015). En los ensayos de inducción de callos por López-Pérez *et al.* (2005) se evidenció que el porcentaje de inducción fue afectado tanto por el genotipo, el tipo de explante y el medio; este efecto fue descrito con anterioridad para vid por Bouquet *et al.* (1982), Mauro *et al.* (1986) y Stamp y Meredith (1988). Así, en esta investigación, las condiciones de formación de callos variaron de un cultivar a otro. Sin embargo, la formación del tejido calloso tuvo como común denominador la presencia de BAP en el tratamiento. Mahdinezhad y Ghanbari (2015) en sus ensayos con dos cultivares del medio oriente usando tres diferentes concentraciones de BAP (0.0, 1.0 y 2.0ppm), obtuvieron los callos más voluminosos, tanto secos como frescos, en la concentración 2.0ppm.

En Harmony, por un lado, no se observaron desarrollos de grandes masas de células indiferenciadas, fueron apenas cúmulos pequeños de tejido blanquecino en la zona de los cortes de los esquejes, y en su mayoría, fueron engrosamientos que privaron a la planta de la toma de nutrientes. Este cultivar fue el que más tolerancia tuvo, respecto a su desarrollo en BAP. Por otro lado, Paulsen tuvo la reacción más adversa y de mayor formación de callos. Desde el tratamiento ANA 0.5ppm en adelante, todos los esquejes desarrollaron masas de este tipo de células en la base de los esquejes. Estos no fueron iguales en todos los tratamientos y por el contrario tuvieron formas, texturas y colores diferentes. Se pudieron distinguir tres tonalidades, blanquecinas amarillentas, marrones y verdosas; entre las variadas texturas de difícil descripción estuvieron las granuladas, friables, gelificadas y compactas, en ese orden, aproximado, es que se fueron presentado conforme aumentaban las concentraciones de BAP, es decir, hacia las concentraciones de BAP 2.0ppm, los callos presentaron una textura compacta y sólida de coloración verdosa. Y, por último, Freedom presentó una reacción similar a Paulsen, pero con ligera mayor resistencia a BAP, pues la primera aparición de tejido calloso fue en el tratamiento BAP 0.5 + ANA 0.05 ppm. A diferencia del cultivar anterior, las masas de células tuvieron mayor homogeneidad entre combinaciones de reguladores. Así, predominaron las texturas granuladas y arenosas de coloración blanquecina (ver ANEXO 6 E-F y 7 G-H).

Son muchos los autores que consideran a las concentraciones endógenas de fitohormonas como pieza clave en la organogénesis *in vitro* (Harris y Stevenson, 1982; Beale y Sponsel, 1993; Gaspar *et al.*, 1996; Ludwig-Müller, 2005; Pop *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2015)

Sadguna y Mustafa (2014) reportaron que el medio MS suplementado con ANA 1.0ppm + BAP 2.0ppm produjo callos marrón verdosos a los explantes, muy similar a los resultados obtenidos en la investigación. De la misma forma, y al igual que en la presente investigación, López-Pérez *et al.* (2005) reportó que en la primera semana todos los callos se presentaron como una masa de tonalidad blanquecina, y para los 30 días tuvo dos tipos de callos: blancos o amarillentos granulados y marrones claro de suave textura; en algunos se tornaron marrones oscuros y murieron.

El principal inconveniente de tener explantes con formaciones callosas en la base de los explantes es básicamente la reducción dramática de asimilación de nutrientes en la etapa temprana, y en etapa avanzada, es la dificultad que representa la aclimatación del esqueje al tener estructuras tan friables en sus raíces. También, en aquellas micropropagaciones que involucra la regeneración de todo un individuo, representa un inconveniente la alta variabilidad generada, es decir, la uniformidad genética no se puede asegurar (Debergh y Maene, 1981). Se conoce que altas concentraciones de ANA podrían inducir a la formación de callos, a pesar de ello se prefiere su uso sobre AIA o IBA en plantas leñosas (Machakova *et al.*, 2008; Saad y Elshahed, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013). La exposición prolongada, además, también podría causar clorosis en las hojas dificultando la aclimatación de las futuras plántulas (Bhojwani y Dantu, 2013).

En el presente estudio, si bien cada cultivar tuvo su propia respuesta a la formación de callos en los explantes antes los reguladores de crecimiento, BAP fue sin duda, el principal factor detonante en la formación de callos.

### 5.2.8 Análisis del enraizamiento

El desarrollo de raíces entre los diferentes esquejes, incluso en un mismo tratamiento, fue altamente irregular, pues como lo enuncia Ludwig-Müller (2005), las raíces adventicias son menos predecibles en su lugar de origen celular que ningún otro tejido.

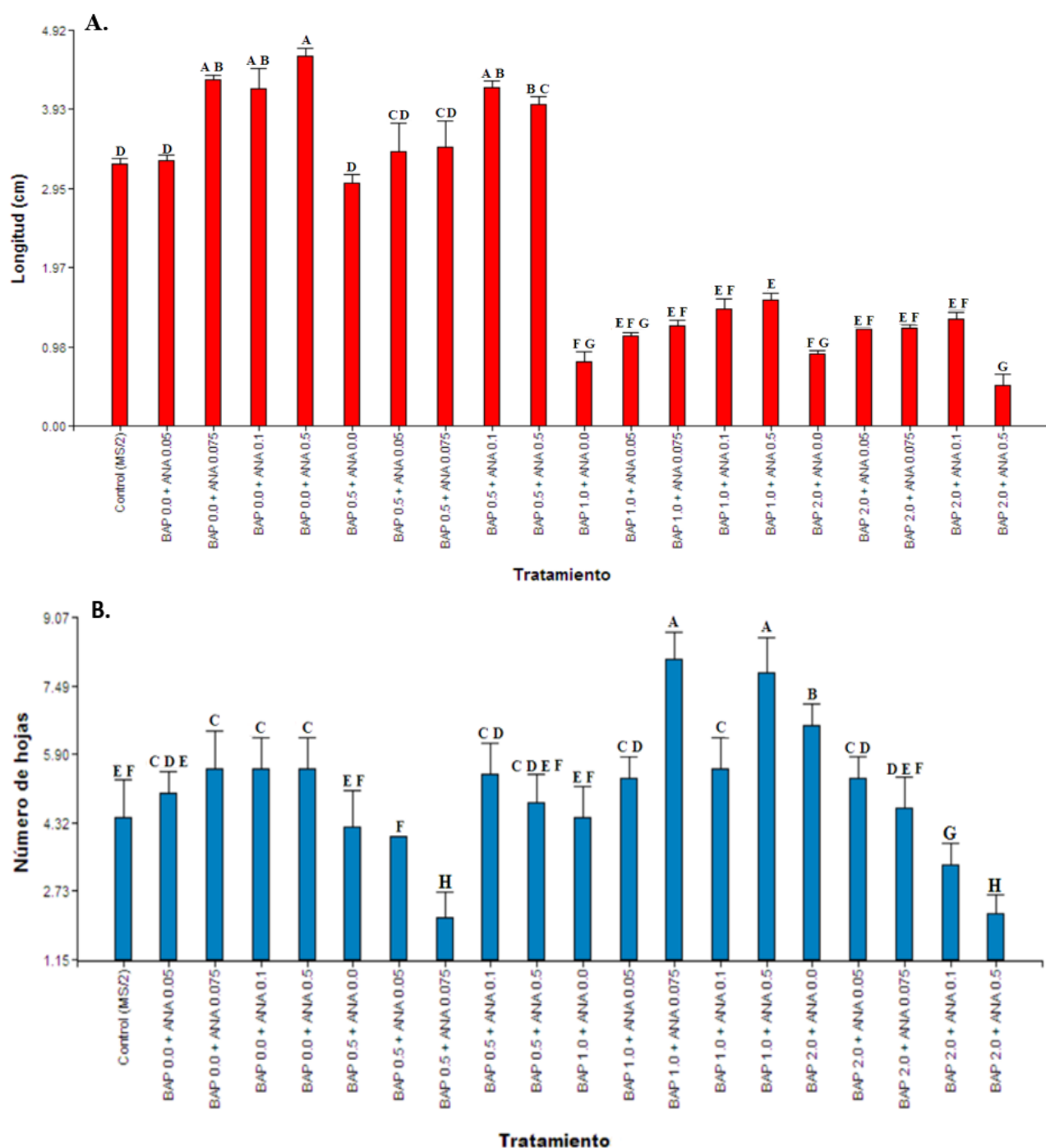
Como dicho por los autores Jaskani et al., 2008; Alizadeh et al., 2010; Chowdhury et al., 2012; Dev et al., 2015, en general, el enraizamiento fue según lo esperado, es decir, aquellos tratamientos con sólo auxinas en el medio presentaron longitudes mayores que aquellos con solo citoquininas o en combinación. Esto no se aplicó para Freedom en los tratamientos BAP 0.5ppm y BAP 0.5 + ANA 0.05 ppm, sin embargo, luego en los ensayos de repetición, no mostraron tal comportamiento.

Sin embargo, no es excluyente el uso de citoquininas para el enraizamiento. Van Staden *et al.* (2008) menciona que Fries (1960), Nemeth (1979) y Konwar y Coutts (1990), ya habían demostrado la inducción de raíces adventicias en ausencia de auxinas y en presencia de citoquininas, pero pueden provocar formas inusuales en las hojas e inducir al brote a que hiperhidrate (Van Staden *et al.*, 2008). En muchos casos, incluso sobre los callos producidos por las elevadas concentraciones de reguladores hubo crecimiento de raíces, pero los tejidos se mostraron deformes y quebradizos. Este hecho no es singular, pues Casson y Lindsey (2003) ya mencionan que el crecimiento de raíces adventicias se daría por dos rutas: por organogénesis de células diferenciadas o por tejido calloso.

La mejor organogénesis se logra con un balance específico para la variedad entre auxinas y citoquininas.



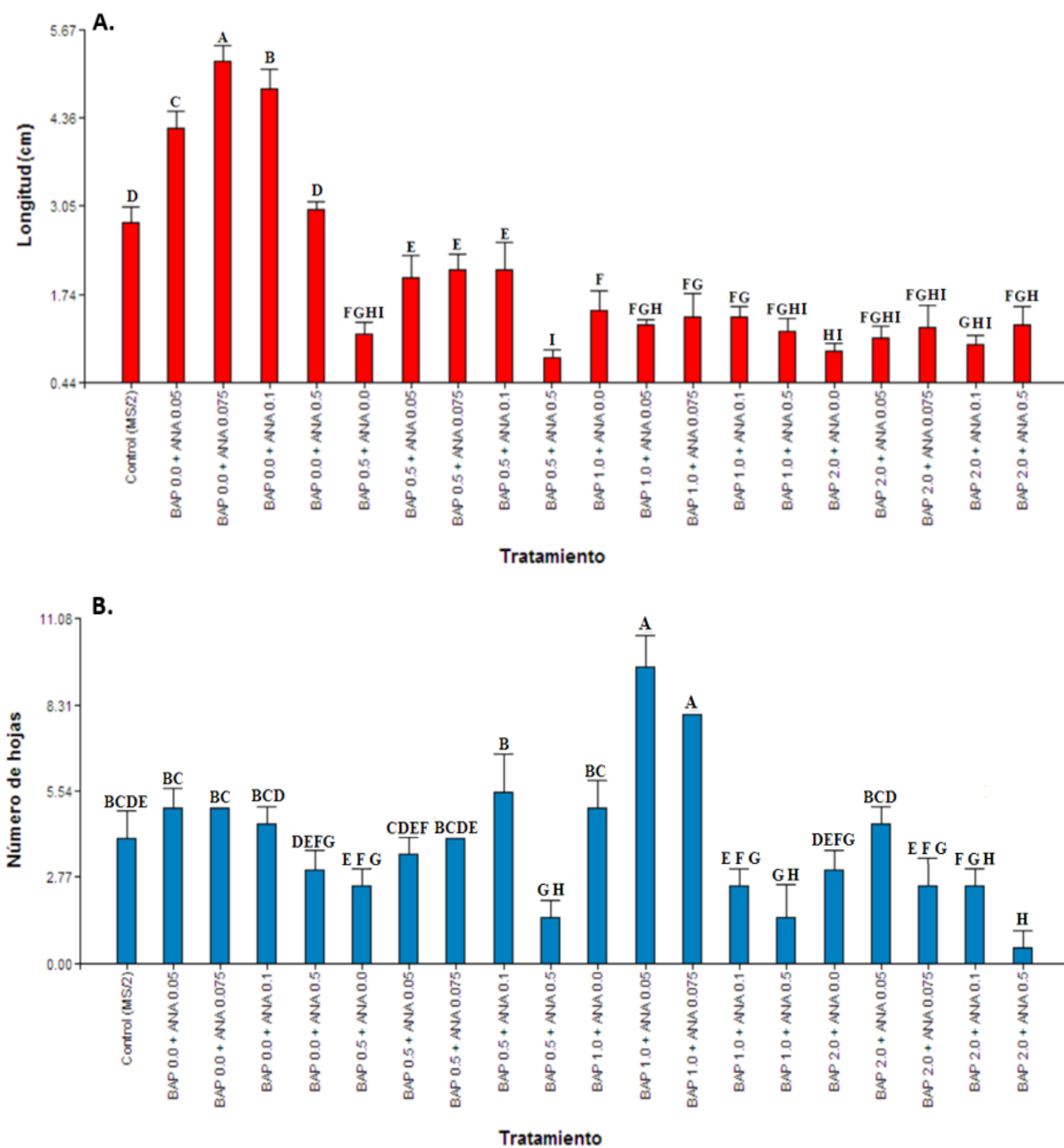
**Figura 14: Promedio de los resultados de Longitud (A) y Número de Hojas (B) después de 45 días de siembra y prueba estadística Tukey en el cultivar “Harmony”**



Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$  por la prueba de Tukey.

FUENTE: Elaboración propia

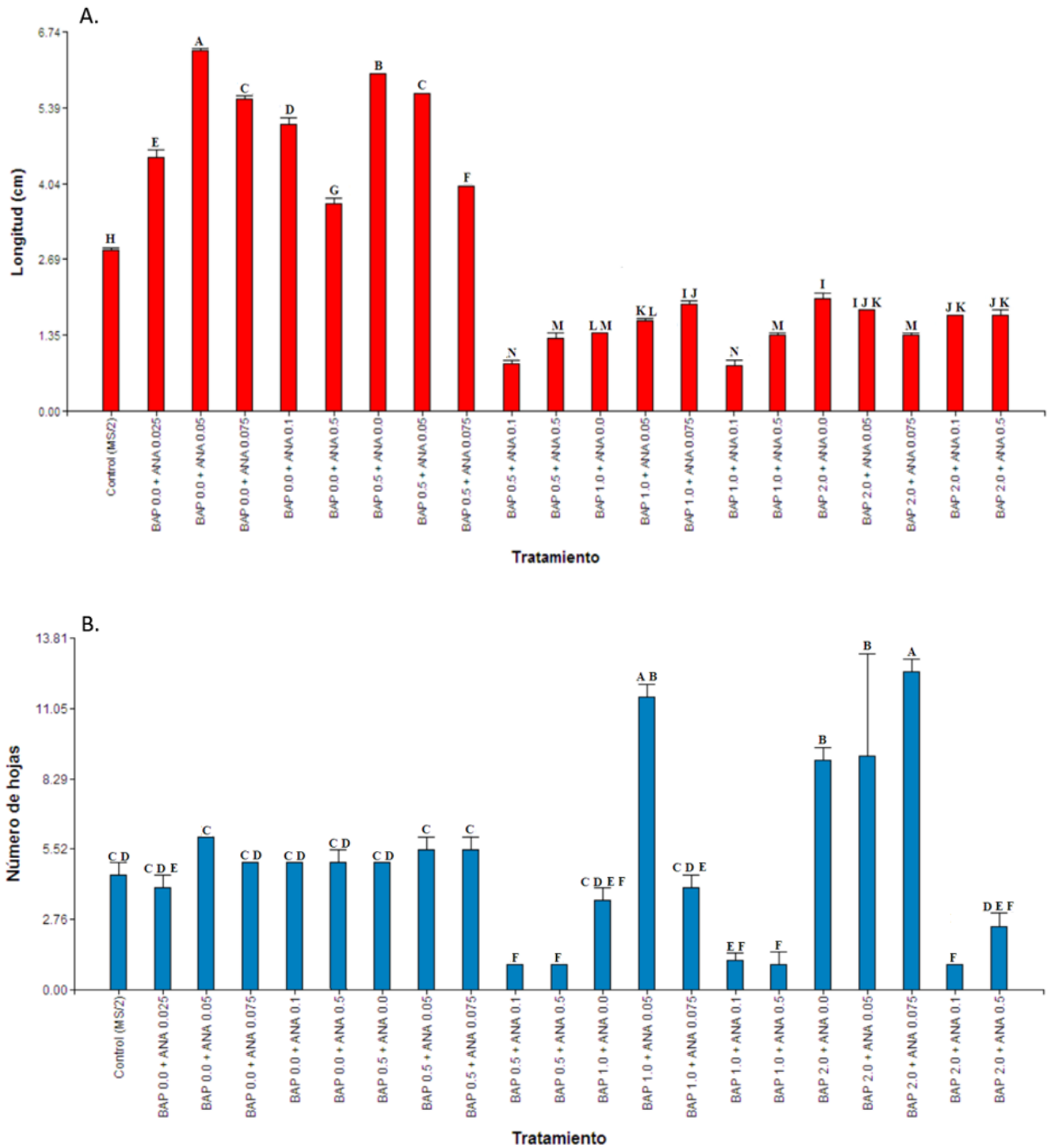
**Figura 15: Promedio de los resultados de Longitud (A) y Número de Hojas (B) después de 45 días de siembra y prueba estadística Tukey en el cultivar “Paulsen”**



Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$  por la prueba de Tukey.

FUENTE: Elaboración propia

**Figura 16: Promedio de los resultados de Longitud (A) y Número de Hojas (B) después de 45 días de siembra y prueba estadística Tukey en el cultivar “Freedom”**



Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$  por la prueba de Tukey.

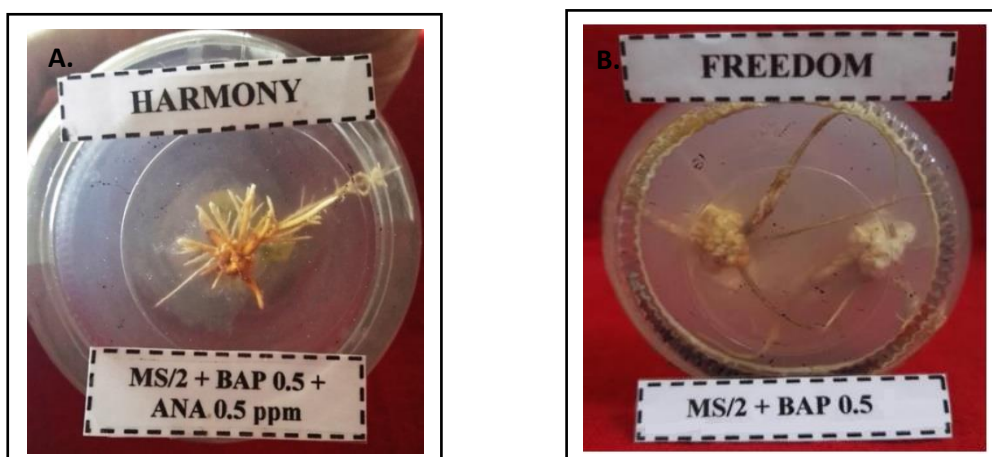
FUENTE: Elaboración propia

### 5.2.9 Análisis de la reevaluación

A partir de las evaluaciones de los resultados previamente descritos, se decidió repetir aquellos tratamientos que tuvieron los mejores valores promedios en conjunto, en las características evaluadas. En las Tablas 16 al 18, y en las Figuras 16 a la 18, se encuentran los consolidados de los promedios de las seis unidades experimentales por tratamiento y las representaciones gráficas de las diferencias significativas, respectivamente. Al hacer esto, se pretendió simular la actividad común en la micropropagación que consiste en propagar las plántulas que alcanzaron el tamaño adecuado para maximizar el número de esquejes a un medio de cultivo, por lo general, exactamente igual del que provino, y continuar el ciclo otra vez.

Resultó sorprendente al encontrar que aquellas combinaciones de reguladores, que en los ensayos previos no habían generado el desarrollo de tejidos callosos, tras el segundo cultivo, sí hayan tenido este comportamiento, y en gran magnitud. Tanto en Harmony como en Freedom, las combinaciones con BAP formaron callos en la zona basal, cuando en la evaluación previa expresaron resultados bastante positivos (Figura 15). Esto último indicaría que las plántulas tendrían entre sus tejidos aun los reguladores tomados en los ensayos previos, y que no fueron utilizados. Las concentraciones de auxina y citoquininas en los esquejes dependen directamente de la velocidad de su oxidación y conjugación.

**Figura 17: La exposición a una reevaluación generaron cambios en los tratamientos con BAP para Harmony y Freedom.**



A, hubo un desarrollo profuso de callos sobre la base del esqueje, reduciendo el tamaño de la planta considerablemente; B, el engrosamiento de la base y la formación de callo sobre el centro no permitieron un correcto desarrollo de las raíces lo que a vez provocó la reducción drástica de la longitud del esqueje.  
FUENTE: Elaboración propia

No obstante, aquellos tratamientos con solo ANA en su composición no desarrollaron alguna alteración. De la misma manera, los valores promedios durante la reevaluación no manifestaron grandes diferencias con los resultados previos, dejando a BAP como única variable sensible. En contraste a esta hipótesis, Bhojwani y Dantu (2013) mencionan en su texto que el desarrollo de nuevos brotes debido al consumo de nutrientes y al de reguladores de crecimientos, sólo durará entre tres y cuatro semanas, entendiéndose que los nutrientes comienzan a escasear y que los reguladores a consumirse. Sin embargo, los explantes estuvieron expuestos a las condiciones por siete semanas, y de alguna forma sólo BAP fue un lastre para los explantes.

Otra posible explicación, parte de que las unidades experimentales durante la reevaluación sólo contenían un esqueje y, por ende, este tendría más reguladores para asimilar. Esta hipótesis queda descartada pues los explantes del cultivar Paulsen no evidenciaron una mayor toma de ANA, pues de haber sido el caso, el tratamiento ANA 0.1 se hubiera visto afectado, pero no fue así.

Estos hechos indicarían que existen aspectos intrínsecos (reacciones enzimáticas específicas) relacionadas con el genotipo de cada cultivar (Mercier *et al.*, 2003; Somkuwar *et al.*, 2009; Kose *et al.*, 2011; Stuepp *et al.*, 2017) y que permitirían la acumulación de BAP en los tejidos de las plántulas generando una concentración interna mayor que la esperada.

**Tabla 16. Comportamiento en la reevaluación de micropropagación del cultivar “Harmony” a los 45 días de sembrados los esquejes**

Tratamiento	Altura promedio (cm)	Número de hojas promedio	Longitud radicular (cm)	<sup>2</sup> Estado
Control (MS/2)	3.4	4	6.5	Normal
ANA 0.075	4.1	5	8.0	Normal
ANA 0.1	4.8	5	8.5	Normal
ANA 0.5	5.8	6.0	10.3	Normal
BAP 0.5 + ANA 0.1	0.8	7	4.4	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.5	0.8	4	3.0	Callo

<sup>1</sup>Se refiere a las condiciones de la zona basal de los esquejes en contacto directo al medio de cultivo, que son predominantes entre el total de esquejes por cada tratamiento. Dónde: callo significa la formación de tejido calloso sobre el corte del esqueje. FUENTE: Elaboración propia

**Tabla 17. Comportamiento en la reevaluación de micropropagación del cultivar “Paulsen” a los 45 días de sembrados los esquejes**

Tratamiento	Altura promedio (cm)	Número de hojas promedio	Longitud radicular (cm)	<sup>1</sup> Estado
Control (MS/2)	2.8	3.5	5.0	Normal
ANA 0.05	2.8	4	5.6	Normal
ANA 0.075	5.5	6.0	12.2	Normal
ANA 0.1	3.8	5.3	11.0	Normal

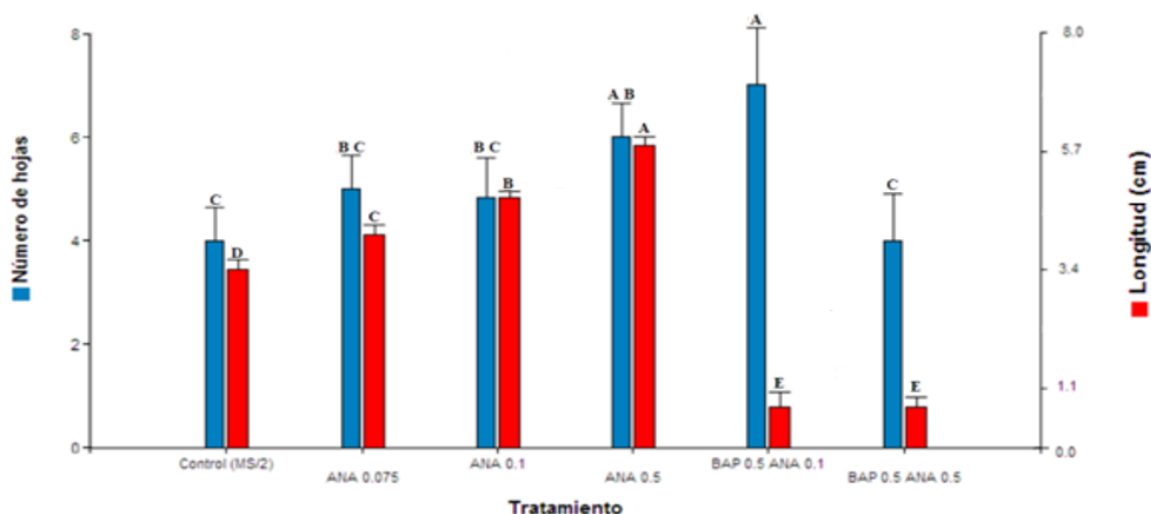
<sup>2</sup>Se refiere a las condiciones de la zona basal de los esquejes en contacto directo al medio de cultivo, que son predominantes entre el total de esquejes por cada tratamiento. Dónde: callo significa la formación de tejido calloso sobre el corte del esqueje. FUENTE: Elaboración propia.

**Tabla 18. Comportamiento en la reevaluación de micropropagación del cultivar “Freedom” a los 45 días de sembrados los esquejes**

Tratamiento	Altura promedio (cm)	Número de hojas promedio	Longitud radicular (cm)	<sup>1</sup> Estado
Control (MS/2)	2.5	3	6.0	Normal
ANA 0.025	4.1	4	7.5	Normal
ANA 0.05	5.4	5.5	10.5	Normal
ANA 0.075	2.8	3.7	8.4	Normal
ANA 0.1	2.4	3.5	7.8	Normal
BAP 0.5	2.7	5.5	9.0	Callo
BAP 0.5 + ANA 0.05	4.8	5.3	8.0	Callo

<sup>1</sup>Se refiere a las condiciones de la zona basal de los esquejes en contacto directo al medio de cultivo, que son predominantes entre el total de esquejes por cada tratamiento. Dónde: callo significa la formación de tejido calloso sobre el corte del esqueje. FUENTE: Elaboración propia

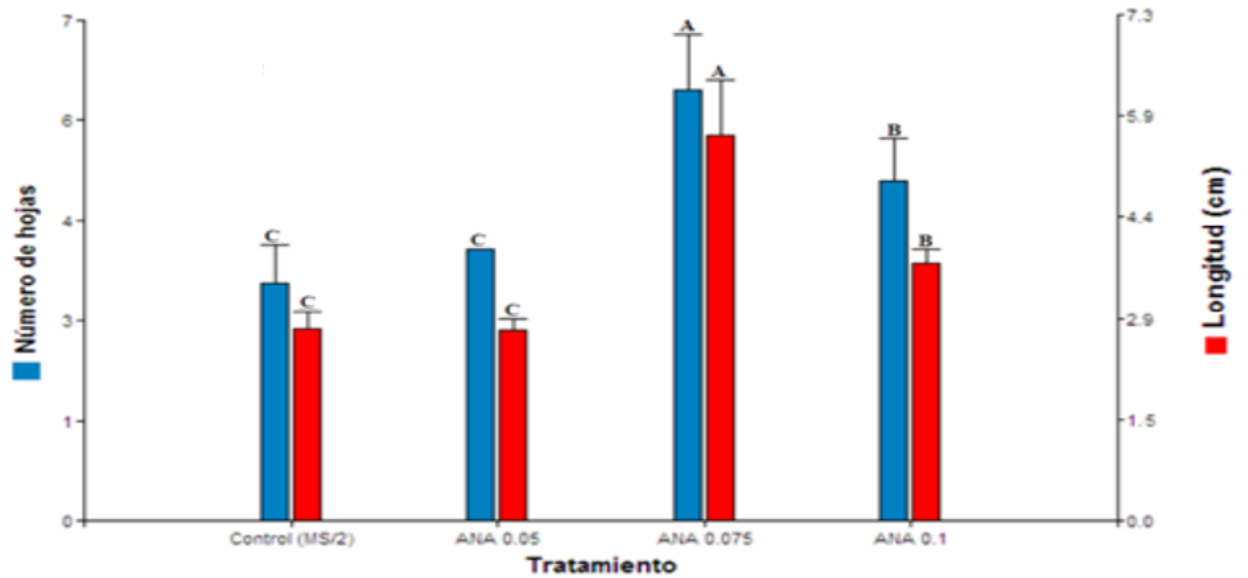
**Figura 18: Promedio de los resultados de Longitud y Número de Hojas en los ensayos de repetición después de 45 días de siembra y prueba estadística Tukey en el cultivar “Harmony”**



Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$  por la prueba de Tukey.

FUENTE: Elaboración propia

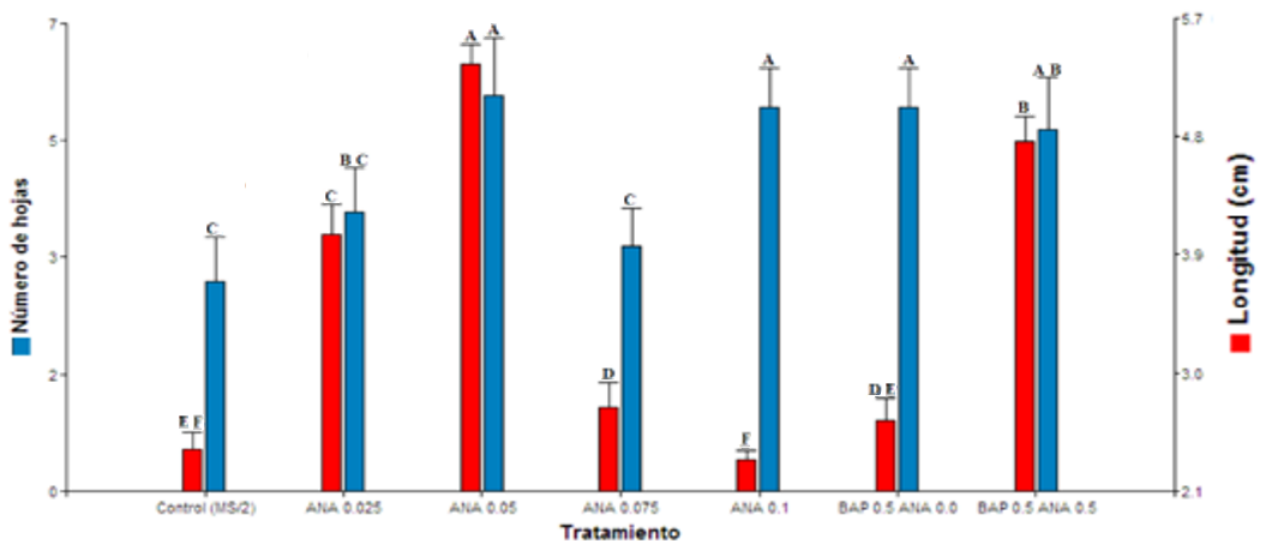
**Figura 19: Promedio de los resultados de Longitud y Número de Hojas en los ensayos de repetición después de 45 días de siembra y prueba estadística Tukey en el cultivar Paulsen**



Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$  por la prueba de Tukey.

FUENTE: Elaboración propia

**Figura 204: Promedio de los resultados de Longitud y Número de Hojas en los ensayos de repetición después de 45 días de siembra y prueba estadística Tukey en el cultivar “Freedom”**



Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$  por la prueba de Tukey.

FUENTE: Elaboración propia

## VI. CONCLUSIONES

Luego de desarrollar el presente estudio, los resultados llevaron a concluir:

Se logró optimizar el uso de reguladores de crecimiento para el cultivo *in vitro* de los cultivares Harmony, Paulsen, Freedom; en donde cada cultivar responde independientemente a un medio óptimo de propagación. Es una clara corroboración que la expresión en el desarrollo *in vitro* es genotipo dependiente.

Luego de 45 días de realizada la micropropagación, se evidenció la existencia de diferencias significativas entre tratamientos.

La elección del medio de cultivo con el mejor balance de reguladores de crecimiento para cada cultivar es:

- i. Cultivar Harmony: MS/2 + ANA 0.5ppm
- ii. Cultivar Freedom: MS/2 + ANA 0.05ppm
- iii. Cultivar Paulsen: MS/2 ANA 0.075ppm



## **VII. RECOMENDACIONES**

Finalizado la presente investigación, se permite recomendar:

1. Elegir esquejes de un grosor y longitud suficientes para que ingrese sin problemas en el agar del medio de cultivo. Pues tallos muy delgados no se desarrollan correctamente, y de tener yemas muy próximas al medio, éstas suelen generar raíces en lugar de brotes.
2. De ser posible, cuantificar previamente las concentraciones de fitohormonas de cada cultivar para el uso de dosis específicas de reguladores de crecimiento.
3. Utilizar otros tipos de citoquininas como por ejemplo: Kinetin o 2-ip, toda vez que BAP no sea adecuado.
4. Vista la experiencia de una clara influencia genotipo-dependiente, se recomienda aumentar el abanico de genotipos con un medio de cultivo optimizado para su disponibilidad en el mercado.
5. Realizar estandarizaciones de los medios de propagación adecuados, no solo para plantas patrón, sino para las plantas dadoras del fruto.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aazami, MA. 2010. Effect of some growth regulators on *in vitro* culture of two *Vitis vinifera* L. cultivars. Romanian Biotechnological Letters 15: 5229-5232.
2. Abido, AIA; Aly, MAM; Hassanen, SA y Rayan, GA. 2013. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria cv. for conservation of endargement. Middle-East. Journal of Scientific Research 13: 328-337.
3. Agencia Agraria de Noticias. 2013. Perú podría sembrar 3 mil hectáreas de uvas pisqueras en próximos 5 años. (en línea). Agencia Agraria de Noticias. Lima, PE, jul. 29. Consultado 23 oct. 2016. Disponible en: <http://agraria.pe/noticias/peru-podria-sembrar-3-mil-hectareas-de-uvas-pisqueras-en-pro-4925>
4. Agencia Agraria de Noticias. 2016. Producción del pisco creció casi 500% en los últimos 16 años. (en línea). Agencia Agraria de Noticias. Lima, PE, jul. 25. Consultado 13 set. 2016. Disponible en: <http://agraria.pe/noticias/produccion-del-pisco-crecio-casi-500-en-los-ultimos-11644>
5. Akin-Idowu, PE; Ibitoye, DO; Ademoyegun, OT. 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. African Journal of Biotechnology 8(16): 3782-3788.
6. Altaf, H; Iqbal, AQ; Hummera, N y Ikram, U. 2012. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. Eds. A Leva y LMR Rinaldi. InTech. 320 p.
7. Alizadeh, M; Singh, SK y Patel, VB. 2010. Comparative performance of *in vitro* multiplication in four grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes. International Journal of Plant Production 4(1): 41-50.
8. Andersone, U y Ievinsh, G. 2002. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. Annals of Botany 90: 293-298.
9. Archer, E. 2002. *Vitis* especies y rootstocks cultivars. University of Stellenbosh, Department of Viticulture and Oenology. 156 p.
10. Bairu, MW; Stirk, WA; Doležal, K y Van Staden, J. 2011. Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis. Plant Growth Regulation 63: 105-114.
11. Beale, MH y Sponsel, V. 1993. Future directions in plant hormone research. Journal of Plant Growth Regulation 12(4):227-235
12. Bhojwani, SS y Dantu PK. 2013. Plant tissue culture: an introductory text. Springer, Agra, Uttar Pradesh. India.
13. Bhojwani, SS y Razdan MK. 1996. Plant tissue culture: theory and practice—a revised edition. Elsevier, Amsterdam.

14. Bornscheuer, C y Cruzat, R. 2003. Situación actual en el desarrollo de nuevas variedades frutales y uso de portainjertos en vides de Chile. *In Seminario de Uva de Mesa*, (Santiago, CL). Eds. Asociación Gremial de Viveros Frutales de Chile. p. 1-14.
15. Bouquet, A; Piganeau, B; Lamaison, AM. 1982. Influence du génotype sur la production de callos, d'embryoïdes et de plantes entières par culture d'anthères *in vitro* dans le genre *Vitis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 295: 569-574.
16. Boyden, LE y Cousins, P. 2003. Evaluation of *Vitis aestivalis* and related taxa as sources of resistance to root-knot nematodes. *Acta Horticulturae* 623: 283–290.
17. Brand, MH. 2011. Tissue proliferation conditions in micropropagated ericaceous plants. *Plant Growth Regulation* 63(2): 131-136.
18. Brown, DCW y Thorpe, TA. 1995. Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 409-415.
19. Brown, K. El desarrollo de la viticultura colonial en el sur del Perú: Los vinos y aguardientes de Arequipa. *Actas I Simposio de la Asociación Internacional de Historia y civilización de la vid y el vino*. Ed J. Maldonado Rosso El Puerto de Santa María 2001. p.471-479
20. Butiuc-Keul, AL; Coste, A; Halmagyi, A; Deliu, C; Farago, M; Iliescu, M y Iuoras, R. 2009. *In vitro* micropropagation of several grapevine cultivars from Romania. *Acta Horticulture* 812: 129-134.
21. Cabrera Morales, A. 2003. Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón *Prunus pérsica* (L.) Batsch var. Salcajá. Tesis Lic. Guatemala, GT: Universidad San Carlos de Guatemala. 101 p.
22. Cao, AP. 2000. Applying of fruitless *Platanus occidentalis* L. in city virescence. *China Horticulture Journal* 4: 76.
23. Cassells, AC y Doyle, BM. 2005. Pathogen and biological contamination management: the road ahead. *In Plant Cell Culture Protocols*. Eds. Loyola-Varagas VM y Vázquez-Flota F. Human Press. New York, US: 35-50.
24. Casson, SA y Lindsey, K. 2003. Genes and signaling in root development. *New Phytologist*. 158: 11–38.
25. Chandler, JW. 2009. Local auxin production: a small contribution to a big field. *Bioessays* 31: 60–70.
26. Charlin, R. 1992. La filoxera de la vid en los países limítrofes. *Aconex* 36: 5-9.
27. Chee, R y Pool, RM. 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 16: 17-27.
28. Chee, R; Pool, RM y Bucher, D. 1984. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. *New York's Food and Life Sciences Bulletin* 109: 1-9.

29. CITEagroindustrial (Centro de Innovación Tecnológica, PE)
30. Clark, B. 2012. Rootstock vs Own-rooted (en línea). Washington, US, WSU. Consultado 30 mar. 2016. Disponible en <https://cahnrs.wsu.edu/blog/2012/03/grafted-vs-own-rooted-taste-washington-auction-of-washington-wines-wine-cruise/>.
31. Clark, JR. 1997. Grape. *In* The american society for horticultural sciences. Ed. The Brooks and Olmo Register of Fruit and Nut Varieties. Virginia, US. ASHS Press. p. 258-299.
32. Chen, CM; Ertl, JR; Leisner, SM y Chang, CC. 1985. Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plant and carrot roots. *Plant Physiology* 78: 510-513.
33. Chowdhury, MMH; Ashrafuzzaman, M; Begum, SN; Islam, MM y Dhar, P. 2012. Regeneration of plantlets from grape (*Vitis Vinifera* L.) through different explants. *International Journal of Sustainable Crop Production* 7(2): 12-18.
34. CONAPISCO (Comisión Nacional del Pisco). 2016. El Pisco. (en línea). Consultado 23 oct. 2016. Disponible en: <http://www.conapisco.org.pe/el-pisco.html>
35. Cousins, P. 2005. Evolution, Genetics, and Breeding: Viticultural Applications of the Origins of our Rootstocks. *In* Grapevine Rootstocks: Current use, Research, and Applications, (2005, Osage Beach, Missouri, US). Proceedings of the 2005 Rootstock Symposium. Eds. P. Cousins y RK. Striegler. Missouri. p. 1-7.
36. Cousins, P y Lauver, M. 2003. Segregation of resistance to root-knot nematodes in a *Vitis vulpina* hybrid population. *Acta Horticulturae* 623: 313–318.
37. Craciunas, C; Butiuc-Keul, A; Coste, A; Oltean, B; Farago, M; Iliescu, M y Iuoras, R. 2009. Selection of valuable germplasm of grapevine and preservation by *in vitro* culture. *Acta Horticulture* 843:145-150.
38. Dantu PK y Bhojwani, SS. 1995. *In vitro* corm formation and field evaluation of corm derived plants of gladiolus. *Scientia Horticulturae* 61:115–129.
39. Davies, PJ. 1995. Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Dordrecht, NL. Kluwer.
40. Debergh, PC y Maene, LJ. 1981. A scheme for the comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* 14: 335-345.
41. Debergh, PC. 1987. Improving micropropagation. Newsletter 51: 2–10.
42. Debergh, P; Aitken-christie, J; Cohen, D; Grout, B; Von Arnold, S; Zimmerman, R; Ziv, M. 1992. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30: 135-140.
43. De Fossard R. 1976. Tissue culture for plant propagation. Armidale: University of New England.
44. De Klerk, GJ; Van Der Krieken, W; De Jong, JC. 1999. The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 35: 189–199.
45. Del Solar, C y Silva, E. 1997. Historia de la Vitivinicultura en Chile. Santiago, CL. Editorial Universidad de las Américas. 94 p.

46. Dewir, YH; Chakrabarty, D; Ali, MB; Hahn, EJ; Paek, KY. 2006. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia milii* hyperhydric shoots. *Environmental and Experimental Botany* 58: 93-99.
47. DGSEP (Dirección General de Seguimiento y Evaluación de Políticas). 2015. Valor bruto de la producción agropecuaria-VBP. (Boletín electrónico). Lima, Perú, Ministerio de Agricultura y Riego. Consultado 8 jul. 2016. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/boletineselectronicos/VBP/2015/VBP-diciembre-2015.pdf>
48. El Comercio. 2016a. Envío de frutas y hortalizas subió 13% a US\$2,154 mlls el 2015. (en línea). El Comercio, Lima, PE, feb. 2. Consultado 12 set. 2016. Disponible en: <http://elcomercio.pe/economia/peru/envio-frutas-y-hortalizas-subio-13-us2154-mlls-2015-noticia-1875841#comentarios>
49. \_\_\_\_\_. 2016b. Produce: Producción de pisco marcó récord histórico en 2015 (en línea). El Comercio, Lima, PE, feb. 5. Consultado 14 set. 2016. Disponible en: <http://elcomercio.pe/economia/peru/produce-produccion-pisco-marco-record-historico-2015-noticia-1876498>
50. El-Agamy, SZ; El-Mahdy, TK y Mohamed, AA. 2009. *In vitro* Propagation of some grape rootstocks. *Acta Horticulturae* 839: 125-132.
51. Engvild, KC. 1985. Pollen irradiation and possible gene transfer in *Nicotiana* species. *Theoretical and Applied Genetics* 69: 457-461.
52. Faivre-Rampant, O; Charpentier, JP; Kevers, C; Dommès, J; Van Onckelen, H; Jay-Allemand, C y Gaspar, T. 2002. Cuttings of the non-rooting rac tobacco mutant overaccumulate phenolic compounds. *Functional Plant Biology* 29: 63–71.
53. Feng, JT; Zhi-yi, Z; Jun, Z; Na, Y y Dmei, W. 2007. Contamination and browning in tissue culture of (*Platanus occidentalis* L). *Forestry Studies in China* 9(4): 279-282.
54. Fernandez-Cano, LH. 2001. La viticultura canaria. *Agricultura: Revista agropecuaria* no. 820: 796-805.
55. Fu, JH; Sun, XH; Wang, JD; Chu, JF y Yan, CY. 2011. Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin* 56: 355–366.
56. Gamborg, OL; Miller, RA y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 15-158.
57. García, E. 2004. Los vinos de ida y vuelta. *Ars Pharmaceutica* 45(4): 373-383.
58. Garcia, R; Morán, R, Somonte, D; Zaldúa, Z; López, A y Mena, CJ. 1999. Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) biotechnology: perspectives and progress. *In Plant biotechnology and in vitro biology in 21<sup>st</sup> century*. Eds. Altman A, Ziv M y Shamay I. NL: 143-146.
59. Gaspar, T; Kevers, C; Penel, C; Greppin, H; Reid, DM y Thorpe, TA. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology* 32: 272-289.

60. George, EF. c2008. Plant tissue culture procedure – Background. *In* Plant propagation by tissue culture, (Dordrecht, NL). Eds. EF George; MA Hall y GJ De Klerk. 3 ed. Springer. v. 1, C1.
61. George, EF y GJ De Klerk. c2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I. *In* Plant propagation by tissue culture, (Dordrecht, NL). Eds. EF George; MA Hall y GJ De Klerk. 3 ed. Springer. v. 1, C3.
62. Gestión. 2016. Producción de pisco marcó récord histórico de 9.5 millones de litros. (en línea). Gestión, Lima, PE, feb. 5. Consultado 12 set. 2016. Disponible en: <http://gestion.pe/economia/produccion-pisco-marco-record-historico-95-millones-litros-2154088>
63. Ginocchio CA. 2014. Diplomacia y universidad: La historia de la uva en Piura. (en línea). Agencia Agraria de Noticias, Lima, PE, oct. 22. Consultado 12 set. 2016. Disponible en: <http://agraria.pe/columna.php?url=diplomacia-y-universidad-la-historia-de-la-uva-en-piura>
64. Goffinet, MC. 2004. The anatomy of low-temperature injury of grapevines. (en línea). New York, US. Cornell University. Consultado 12 jul. 2016. En formato PDF. Disponible en: [http://www.hort.cornell.edu/goffinet/Anatomy\\_of\\_Winter\\_Injury\\_hi\\_res.pdf](http://www.hort.cornell.edu/goffinet/Anatomy_of_Winter_Injury_hi_res.pdf)
65. Goldammer, T. 2015. Grape Grower's Handbook: A Guide to Viticulture for Wine Production. 2 ed. US, Apex Publishers. 728 p.
66. Gonçalves, S; Correia, PJ; Martins-Loução, MA y Romano, A. 2005. A new medium formulation for *in vitro* rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentration. *Biologia Plantarum* 49: 277-280.
67. González, E; Pignataro, D; Orjeda, G; Gonzáles, WL y Clark, D. 2011. Optimización de los medios de propagación y enraizamiento *in vitro* de las variedades “criollas” de vid para elaborar pisco. *Revista Peruana de Biología* 18(3): 361-366.
68. Harris, RE y Stevenson, JH. 1982. *In vitro* propagation of *Vitis*. Saanichton Research and Plant Quarantine Station, Sidney, CA. 21: 22-32.
69. Hassler M. (2016). World Plants: synonymic checklists of the vascular plants of the world. (en línea). *In* Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 27<sup>th</sup> June 2016. Consultado 9 jul. 2016. Disponible en: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/039d37e37ddd7c5c01d17be9dd6a48f1>
70. Hellman, EW. 2003. Oregon Viticulture. 1 ed. Oregon, US, Oregon State University Press. p. 5-19.
71. Heloir, MC; Fournioux, JC; Oziol, L y Bessis, R. 1997. An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera*) using axillary bud microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 223–225.
72. Husain, MK y Anis, M. 2009. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). *Acta Physiologiae Plantarum* 31(4): 765-772.

73. Hyndman, ES; Hasegawa PM y Bressan, AR. 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose shorts through the use of reduced concentrations of mineral salts. *Horticultural Science* 17: 82-83.
74. IAEA. 2004. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Vienna, AU. 102 p.
75. Ilan, A y Khayat, E. 1997. An overview of comercial and technological limitations to marketing of micropropagated plants. *Acta Horticulturae* 447: 642-648.
76. INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática, PE). Censo Nacional Agropecuario (IV, 2012). 2013. Sistema de consulta de datos. Lima, PE. Consultado 12 set. 2016. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/Cenagro/redatam/>
77. INS (Instituto Nacional de Salud, PE). Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. 2009. Tablas peruanas de composición de alimentos. Instituto Nacional de Salud. 8 ed. Lima. p. 24-25.
78. ISHS (International Society for Horticultural Science). 2009. Internacional code of nomenclature for cultivated plants. Eds. CD Brickell, C Alexander, JC David, WLA Hetterscheid, AC Leslie, V Malecot, Xiaobai Jin. 8<sup>a</sup> ed. Leuven, BE. *Scripta Horticulture* 10. 184 p.
79. Kadota, N y Niimi, Y. 2003. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 72: 261-265.
80. Khan, N; Ahmed, M; Hafiz, I; Abbasi, N; Ejaz, S; y Anjum, M. 2015. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. *OENO One* 49(1), 37-45.
81. Khatri, A; Khan, LA; Siddiqui, SH; Ahmed, M y Siddiqui, KA. 1997. *In vitro* culture of indigenous and exotic banana clone for maximizing multiplication. *Pakistan Journal of Botany* 29: 143-150.
82. Keller, M; Mills, LJ. y Harbertson, JF. 2012. Rootstock Effects on Deficit-Irrigated Winegrapes in a Dry Climate: Vigor, Yield Formation, and Fruit Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 63(1): 29-39.
83. Kharrazi, M; Nemati, H; Tehranifar, A; Bagheri, A; Sharifi, A. 2011. *In vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 5: 1-6.
84. Ko, WH; Su, CC; Chen, CL; Chao, CP. 2009. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 96:137-141.
85. Kose, C; Erdal, S; Kayaa, O y Aticib, O. 2010. Comparative evaluation of oxidative enzyme activities during adventitious rooting in the cuttings of grapevine rootstocks. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 738-741.
86. Křižan, B; Ondrušiková, E y Moudrá, J. 2012. The effect of media composition on multiplication of grape rootstocks *in vitro*. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 60(8): 141-144.

87. Lam, TH y Street, HE. 1977. The effect of selected aryloxalcane carboxylic acids on the growth and levels of soluble phenols in cultured cells of *Rosa damascens*. *Pflanzenphysiologie* 84:121.
88. Levadoux, L. 1956. Les populations sauvages et cultivees de *Vitis vinifera* L. *Annales de l'amélioration des plantes* 6: 59 –118.
89. Leifert, C; Cassells, AC. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cellular & Developmental Biology* 37: 133-138.
90. Linsmaier, EM y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127.
91. Litz, RE y Vijayakumar, N. 1988. *In vitro* somatic embryogenesis from the nucellus of mango. *Acta Horticulturae* 231: 473-475.
92. López Llave, LJ. 2014. Evolución y Análisis de la Producción y Exportación de Uvas de Mesa: 2000-2012. Tesis Mg. Sc. Lima, PE, UNMSM. 86 p.
93. López-Pérez, AJ; Carreño, J; Martínez-Cutillas, A y Dabauza, M. 2004. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis* 44(2): 79–85.
94. Ludwig-Müller, J y Epstein, E. 1991. Occurrence and *in vivo* biosynthesis of indole 3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiology* 97: 765-770.
95. Ludwig-Müller, J. 2000. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 32: 219–230.
96. Ludwig-Müller, J; Vertocnik, A y Town, CD. 2005. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *J. Exp. Bot.* 56, 2095–2105
97. Machado, MP; Biasi, LA; Ritter, M; Ribas, LLF; Koehler, HS y Zanette, F. 2007. Meios de cultura na micropropagação do porta-enxerto de videira “VR043-43” (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). *Ciência Rural* 60:141-144.
98. Machakova, I; Zazimalova, E y George, EF. c2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. *In* Plant propagation by tissue culture, (Dordrecht, NL). Eds. EF George; MA Hall y GJ De Klerk. 3 ed. Springer. v. 1, C5.
99. Mahdinezhad, N y Ghanbari, Sina. 2015. Comparative study of the effect of culture media and hormonal treatment on callus formation and regeneration of some native Sistan grapes. *Journal on New Biological Reports*. 4(1):94-97.
100. Mano, Y; Nemoto, K; Suzuki, M; Seki, H; Fuji, I y Muranaka, T. 2010. The *AMII* gene family: índole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* 61:25-32.
101. Mano, Y y Nemoto, K. 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* 63(8): 2853-2872.
102. Marana, JP; Miglioranza, E y De Faria, RT. 2009. *In vitro* establishment of *Jacaratia spinosa* (Aubl.) ADC. *Semina-Ciencia Agrarias* 30(2): 271-274.



103. Martínez-Montiel, OM; Pastelín-Solano, MC; Ventura-Zapata, E; Castañeda-Castro, O; González-Arno, MT; Guevara-Valencia, M; Luna-González, A; Díaz-Ramos, C. 2011. Alargamiento y enraizamiento de vitroplantas de cereza del Perú (*Physalis peruviana* L.). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13: 537–542.
104. Mauro, MC; Nef, C; Fallot, J. 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Reports* 5: 377-380.
105. McGaw, BA. 1995. Cytokinin biosynthesis and metabolism. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, NL. Kluwer. p. 98-117.
106. McGovern, PE. y Michel, RH. 1995. The analytical and archaeological challenge of detecting ancient wine: two case studies from the ancient Near East, In *The Origins and Ancient History of Wine*. PE McGovern, SJ Fleming y SH Katz. Eds. Gordon and Breach, Amsterdam. p. 57–67.
107. Mejía M. 2015. MINAGRI impulsa reconversión productiva en norte del país. (en línea). Andina, Lima, PE, feb. 16. Consultado 12 set. 2016. Disponible en: <http://www.andina.com.pe/agencia/noticia-minagri-impulsa-reconversion-productiva-norte-del-pais-543574.aspx>
108. Mercier, H; Souza, BM; Kraus, JE; Hamasaki, RM y Sotta, B. 2003. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15(2): 107-112.
109. MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego, PE). 2016a. Series Históricas de Producción Agrícola: Compendio Estadístico (en línea). Lima, PE. Consultado 12 set. 2016. Disponible en: [http://frenteweb.minag.gob.pe/sisca/?mod=consulta\\_cult](http://frenteweb.minag.gob.pe/sisca/?mod=consulta_cult)
110. \_\_\_\_\_. 2016b. SIEA (Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias): Actividades Estadísticas - Anuario de Producción Agrícola (en línea). Lima, PE. Consultado 20 ago. 2016. Disponible en: <http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=produccion-agricola>
111. Morini, S., Marzioletti, P., Barbieri, C., 1985. *In vitro* propagation of grapevine. *Rivista Ortoflorofruitt Italiana* 69: 385-96.
112. Mukherjee, P; Husain, N; Misra, SC y Rao, VS. 2010. *In vitro* propagation of a grape rootstock, deGrasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of medium compositions and plant growth regulators. *Scientia Horticulturae* 126: 13–19.
113. Muñoz, I y González, H. 2000. Portainjertos En: Uva de mesa en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina. Santiago. 75-85 p.
114. Muñoz-Organero, G; Rodríguez-Torres, I y Cabello, F. 2001. Importancia de la selección clonal de variedades de vid. *Acenología* 12.
115. Mullins, MG; Bouquet, A y Williams, LE. 1992. *Biology of the Grapevine*. Cambridge University Press. 239 p.

116. Murashige, T; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
117. Museo del Pisco. 2016. Todo sobre el Pisco: Historia del Pisco. (en línea). Consultado 23 oct. 2016. Disponible en: <http://museodelpisco.org/espanol/todo-sobre-el-pisco/>
118. Nemoto, K; Hara, M; Suzuki, M; Seki, H; Oka, A; Muranaka, T y Mano, Y. 2009. The NtAMII gene functions in cell division of tobacco BY-2 cells in the presence of índole-3-acetamide. *FEBS Letters* 583, 487-492.
119. Normanly, J. 2010. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a001594.
120. Ouyang, J; Shao, X y Li, J. 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 24: 327-333.
121. Palma, JC y Landeo del Pino, E. 2008. Estudio acerca de las tecnologías de cultivo de vid y producción de pisco y propuesta de cómo establecer distintas calidades de pisco. In Proyecto de cooperación UE-Perú en materia de asistencia técnica relativa al comercio-Apoyo al programa estratégico (PENX 2003-2013). Ministerio de Comercio Exterior y Turismo. 110 pp.
122. Pierik, RLM. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL. s.p.
123. Pop, TI; Pamfil, D y Bellin, C. 2011. Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoc* 39(1):307-316.
124. Pratt, C. 1971. Reproductive anatomy in cultivated grapes: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 25:131-150.
125. PRODUCE (Ministerio de la Producción, PE). 2016. Dirección de Estudios Económicos de MYPE e Industria: Anuario Estadístico. (en línea). Lima, PE. Consultado 13 set. 2016. Disponible en: <http://demi.produce.gob.pe/publicaciones?idtp=1>
126. Poudel, PR; Kataoka, I y Mochioka, R. 2005. Effect of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Vitis ficifolia* var. ganebu and its interspecific hybrid grape. *Asian Journal of Plant Sciences* 4: 466-71.
127. PROVID - Asociación de productores de uva de mesa del Perú. 2016. Lima, PE. Consultado 8 jul. 2016. Disponible en: <http://www.providperu.org/main.php>
128. Ratallack, M. 2012. Grapevine Biology: Fact sheet. (en línea). South Australia, AU, Ratallack Viticulture. Consultado 14 jul. 2016. Pdf. Disponible en: <http://www.viti.com.au/pdf/MVWGG%20Fact%20Sheet%20-%20Grapevine%20Biology.pdf>
129. Reisch, BI; Owens, CL y Cousins, PS. 2012. Chapter 7. Grape. In *Fruit Breeding*. Eds. Badenes, ML y Byrne, DH. New York. Springer. p. 225-262.

130. Rojas-Martinez, L; Visser, RGF; de Klerk, GJ. 2010. The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propagation of Ornamental Plants* 10: 169–175.
131. Rojas, N. 2015. Perú exportó 250 mil TM de uva de mesa en campaña 2014-2015. (en línea). *Uvas del Perú*. Lima, PE, abr. 27. Consultado 14 set. 2016. Disponible en: <https://uvasperu.wordpress.com/page/2/>
132. Roubelakis-Angelakis, KA. 2001. *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*. Kluwer Academic Publishers, London, 474p.
133. Saad AI, Elshahed AM. 2012. Plant tissue culture media. Rijeka, Croatia: InTech. p. 29-40.
134. Salisbury, FB y Ross, CW. 1992. *Plant Physiology*. Belmont, CA: Wadsworth. p. 357-407, 531-548.
135. Sajid G.M., Ilyas M.K. and Anwar R., 2006. Effect of diverse hormonal regimes on *in vitro* growth of grape germplasm. *Pakistan Journal of Botany*. 38: 385-391.
136. Sellés-Marchart, S; Casado-Vela, J y Bru-Martínez, R. 2007. Effect of detergents, trypsin and unsaturated fatty acids on latent loquat fruit polyphenol oxidase: basis for the enzyme's activity regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 464(2): 295-305.
137. Shapiro, L. 2012. "Vitis vinifera: Brief summary". (en línea). Consultado 9 jul 2016. Disponible en Encyclopedia of Life (EOL), [http://eol.org/data\\_objects/21071692](http://eol.org/data_objects/21071692).
138. Shimelis D, Bantte K, Feyissa T (2015) Effects of polyvinyl pyrrolidone and activated charcoal to control effect of phenolic oxidation on *in vitro* culture establishment stage of micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Advances in Crop Science and Technology* 3:184.
139. Sim, S.T. 2006. Virus elimination from grape selections using tissue culture. *FPS Grape Program Newsletter*. p 30-31.
140. Singh, SK; Khawale, RN y Singh, SP. 2004. Techniques for rapid *in vitro* multiplication of *Vitis vinifera* L. cultivars. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 19: 267-72.
141. Singh, SK; Sharma, HC; Singh, SP y Sharma, RR. 2000. Propagation of grape through repetitive micro-cutting technique. *Indian Horticulture Journal* 3: 14-15.
142. Singh, R y Jaiwal, PK. 2002. Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. *Plant Science* 163(1): 101-109.
143. Singh, SR; Singh, R; Kalia, S; Dalal, S; Dhawan, AK; Kalia, RK. 2012. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo—a plant with extraordinary qualities. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19(1): 21–41.

144. Sluis, CJ. 2006. Integrating automation technologies with commercial micropropagation. In Plant tissue culture engineering. Eds. Das Gupta S y Ibaraki Y. Springer, Dordrecht.
145. Somkuwar, RG; Bondage, DD; Surange, MS y Ramteke, SD. 2011. Rooting behaviour, polyphenol oxidase activity, and biochemical changes in grape rootstocks at different growth stages. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 35: 281-287.
146. Sreenivasula, P; Naidu, RA y Nayudu, MV. 1989. Secondary metabolism. In Physiology of virus infected plants. South Asian Publisher. Ed. New Delhi, IN. p 110-123.
147. Stamo, JA y Meredith, CP. 1988. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. Scientia Horticulturæ 35: 235-250.
148. Stepanova, AN; Robertson-Hoyt, J; Yun, J; Benavente, LM; Xie, DY; Dolezal, K; Schlereth, A; Jurgens, G y Alonso, JM. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell 133: 177–191.
149. Stuepp, CA; Wendling, I; Trueman, SJ; Koehler, HS y Zuffellato-Ribas, KC. 2017. The Use of Auxin Quantification for Understanding Clonal Tree Propagation. Forests 8(27): 2-15.
150. SUNAT (Superintendencia Nacional de Administración Tributaria, PE). 2016. Tratamiento arancelario por subpartida nacional. (en línea). Lima, PE. Consultado 14 set. 2016. Disponible en: <http://www.aduanet.gob.pe/itarancel/arancelS01Alias>
151. Tabiyeh, DT; Bernard, F y Shacker, H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in Pistacia vera shoot tips culture. Acta Horticulturæ 726: 201-204.
152. Tao, Y; Ferrer, JL; Ljung, K; *et al.* 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. Cell 133: 164–176.
153. Tehrim, S; Mirza, MY y Sajid, GM. 2013. Comparative study of different growth regulators for efficient plant regeneration in grapes. Pakistan Journal of Agricultural Research., 26: 275-289.
154. Thrope, TA; Harry, IS y Kumar, PP. 1991. Application of micropropagation to forestry. In Micropropagation Technology and Applications, (London, UK). Eds. PC Debergh y RH Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. p. 311-336.
155. Tilkat, E, Onay, A; Yildirim, H; Ayaz, E. 2009. Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, Pistacia vera L. Scientia Horticulturæ 121(3): 361-365.
156. Tomar, UK; Negi, U; Sinha, AK y Dantu, PK. 2008. Economics and factors influencing cost of micropropagated plants. My Forest 44: 135-147.
157. Towler, MJ; Kim, Y; Wyslouzil, BE; Correll, MJ y Weathers, PJ. 2006. Design, development, and applications of mist bioreactors for micropropagation and hairy

- root culture. In Plant Tissue Culture Engineering, (Dordrecht, NL). Eds. SD Gupta e Y Ibaraki. Springer. p. 119-131.
158. UC Integrated Viticulture, US. 2013. Rootstock Selection (en línea). California, US. Consultado 30 mar. 2016. Disponible en <http://ucanr.org/sites/intvit/files/24347.pdf>.
  159. Ureta, P. 1993. Influencia de los portainjertos sobre el crecimiento vegetativo, productividad y calidad de la uva de algunas variedades de uva de mesa. Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 80p.
  160. Van Staden, J; Zazimalova, E y George, EF. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In Plant propagation by tissue culture, (Dordrecht, NL). Eds. EF George; MA Hall y GJ De Klerk. 3 ed. Springer. v. 1, C6.
  161. Vieira, A. 1985. Injertación, Enfermedades Virales, Nemátodos y Filoxera en Vid: Un complejo biológico que no se puede descuidar. Aconex 9: 23-28.
  162. Vinterhalter, D y Vinterhalter, BS. 1997. Micropropagation of Dracena sp. In Biotechnology in agriculture and forestry 40, High-tech. and Micropropagation VI, (Berlin, DE). Ed YPS Bajaj. Springer. p.131-146.
  163. Wang, H; Li, M; Yang, Y; Dong, J y Jin, W. 2015. Histological and endogenous plant growth regulators changes associated with adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. 'Honeoye'). Journal of Plant Biotechnology 123(3): 479-488.
  164. Walker, A. 2004. Potencial rootstocks for use in Chile with regard to soil conditions and limitations. Asociación Gremial de Viveros Frutales de Chile. Seminario Vides Injertadas. Santiago, 4 de agosto 2004. pp.1-13
  165. Walker, GE y Stirling, GR. 2008. Plant-parasitic nematodes in Australian viticulture: key pests, current management practices and opportunities for future improvements. Australian Plant Pathology 37: 268-278.
  166. Walker, MA y Golino, DA. 1999. Rapid propagation of grape planting stock. Practical Winery & Vineyard. May/June 1999.
  167. Washington State University. 2012. Rootstock vs Own-rooted, Taste Washington, Auction of Washington Wines, Wine Cruise. (en línea). Washington, EU. Consultado 14 set. 2016. Disponible en: <http://cahnrs.wsu.edu/blog/2012/03/grafted-vs-own-rooted-taste-washington-auction-of-washington-wines-wine-cruise/>
  168. Weaver, RJ. 1976. Grape growing. California, US, Wiley. 371 p.
  169. Weinberger, JH y Harmon, FN. 1966. Harmony, a new nematode and phylloxera resistant rootstock for vinifera grape. Fruit Varieties and Horticultural Digest 20: 63-65.
  170. Werner, T; Motyka, V; Laucou, V; Smets, R; Van Onckelen, H y Schmülling, T. 2003. Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple

- Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinin in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.
171. Whiting, J. 2012. Review August 2012: Rootstock breeding and associated R&D in the viticulture and wine industry. Grape and Wine research and development corporation. Australian Government. 55 p.
  172. Wolpert, JA. 2005. Selection of Rootstocks: Implications for Quality. In *Grapevine Rootstocks: Current use, Research, and Applications*, (2005, Osage Beach, Missouri, US). Proceedings of the 2005 Rootstock Symposium. Eds. P. Cousins y RK. Striegler. Missouri. p. 25-33.
  173. Woodward, AW y Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735.
  174. WTEEx (World's Top Exports, US). 2016. Grapes Exports by Country. (en línea). Consultado 14 set. 2016. Disponible en: <http://www.worldstopexports.com/grapes-exports-by-country/>
  175. Yerbolova, LS; Ryabushkina, NA; Oleichenko, SN; Kampitova, GA y Galiakparov NN. 2013. The effect of growth regulators on in vitro culture of some *Vitis vinifera* L. cultivars. *World Applied Science Journal* 23: 76-80.
  176. Zhang, JL; Xu, R; Cao, ZY; Wang, SM y Ren, JZ. 2006. Factors affecting *in vitro* propagation of a Chinese wild grape (*Vitis piasezkii* var. *pagnucii*): shoot production and rhizogenesis. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 343: 217-223.
  177. Zhang, LM. 2000. Prune and fruits control technology on the *Platanus occidentalis* L. *Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology* 27(3): 37-38.
  178. Zhang, R; Wang, B; Ouyang, J; Li, J y Wang, Y. 2008. Arabidopsis indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1070–1077.
  179. Zohary, D. y Hopf, M. 2000. *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford University Press, London.
  180. Zobayed, SMA; Afreen-Zobayed, F; Kubota, C; y Kozai, T. 2000. Mass Propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a Scaled-up Vessel Under *In vitro* Photoautotrophic Condition *Ann Bot* (2000) 85 (5): 587-592

## IX. ANEXOS

### ANEXO 1

<b>Medio de cultivo MS/2 (CIRGEBB)</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
Macronutrientes	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• MgSO<sub>4</sub></li> <li>• NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></li> <li>• KNO<sub>3</sub></li> <li>• CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O</li> <li>• KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.9035g/L</li> <li>• 8.25 g/L</li> <li>• 9.5 g/L</li> <li>• 2.2 g/L</li> <li>• 0.85 g/L</li> </ul>
Micronutrientes	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></li> <li>• MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</li> <li>• ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</li> <li>• KI</li> <li>• Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</li> <li>• CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</li> <li>• CuSO<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 310 ppm</li> <li>• 925.5 ppm</li> <li>• 430 ppm</li> <li>• 41.5 ppm</li> <li>• 12.5 ppm</li> <li>• 1.25 ppm</li> <li>• 1.25 ppm</li> </ul>
Fe-EDTA	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Na<sub>2</sub>EDTA</li> <li>• Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3.73 g/L</li> <li>• 2.78 g/L</li> </ul>
Constituyentes orgánicos	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicina</li> <li>• Ácido nicotínico</li> <li>• Piridoxina</li> <li>• Tiamina</li> <li>• Mio-Inositol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 80 ppm</li> <li>• 20 ppm</li> <li>• 20 ppm</li> <li>• 4 ppm</li> <li>• 0.4 v/v %</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar 7.5 g/L</li> <li>• Azúcar comercial 30 g/L</li> <li>• pH 5.5</li> </ul>	

FUENTE: CIRGEBB, 2016

## ANEXO 2

Constituent	Form of availability	Role
Potassium	K <sup>+</sup>	Necessary for normal cell division, and synthesis of proteins and chlorophyll
Magnesium	Mg <sup>2+</sup>	Component of chlorophyll molecule
Calcium	Ca <sup>2+</sup>	Constituent of cell wall; involved in the regulation of hormone responses and could have a pre-emptive role in morphogenesis; deficiency may cause shoot tip necrosis
Nitrogen	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Organic Nitrogen (vitamins/ amino acids)	Important constituent of amino acids, vitamins, nucleic acids and proteins; indirectly affects growth by its influence on pH of the medium; NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> is necessary for somatic embryogenesis in cell and callus cultures
Phosphorus	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Vital for cell division; storage and transfer of energy (part of AMP, ADP and ATP)
Sulphur	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Present in some amino acids (cysteine, cystine and methionine) and proteins
Iron	Fe <sup>2+</sup>	Part of certain enzymes; functions as respiratory electron carrier through such compounds as cytochrome and oxidative enzymes, peroxidases and catalase
Copper	Cu <sup>2+</sup>	Part of certain oxidative enzymes such as cytochrome oxidases, tyrosinase and ascorbic oxidase which serve to oxidize phenolic substances
Zinc	Zn <sup>2+</sup>	Component of the enzyme concerned with the synthesis of the IAA precursor tryptophan; deficiency of zinc may cause rosetting/leaf chlorosis
Molybdenum	MoO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Component of some plant enzymes, such as nitrate reductase, and therefore, essential for nitrogen metabolism
Boron	BO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Exact role not known but implicated in enhancing the rate of sugar movement in plants
Thiamine	Vitamin B <sub>1</sub>	Involved in biosynthesis of certain amino acids; an essential cofactor in carbohydrate metabolism could have synergistic interaction with cytokinins.
Ascorbic acid	Vitamin C	An antioxidant, prevents blackening during explant isolation
<i>Myo</i> -inositol		Phosphatidyl-inositol is important in signal transduction; inositol phosphate may be acting as a second messenger to the primary action of auxins; probable role as a carrier and in storage of IAA as IAA- <i>myo</i> -inositol ester; a crucial precursor in the formation of pectin and hemicelluloses required for cell wall; may have role in the uptake and utilization of ions
Sucrose		Serves as carbon and energy as well as osmotic agent

FUENTE: Bhojwani y Dantu, 2013



## ANEXO 3

### 3.1 Reporte de resultados totales de cada unidad experimental de las variables Longitud y Número de hojas en cada cultivar a los 15 días y 45 días

“Harmony”

Tratamiento	Longitud (cm) 15 días									Número de Hojas 15 días								
	Rep 1			Rep 2			Rep 3			Rep 1			Rep 2			Rep 3		
Control (MS/2)	1.3	1.4	1.2	1.1	1.5	1.3	1.0	1.6	1.3	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0
BAP 0.0 + ANA 0.05	1.3	1.0	0.9	1.0	1.2	1.0	0.9	0.8	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
BAP 0.0 + ANA 0.075	0.7	0.8	0.7	0.9	0.7	1.0	0.6	0.7	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	0.0	1.0	2.0
BAP 0.0 + ANA 0.1	1.2	1.0	1.2	0.9	1.2	1.3	1.2	1.0	1.3	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0
BAP 0.0 + ANA 0.5	1.1	1.2	1.0	1.3	1.4	0.8	1.1	1.2	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
BAP 0.5 + ANA 0.0	1.1	1.0	0.8	1.1	1.0	1.2	1.2	0.9	1.2	1.0	1.0	2.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	1.0
BAP 0.5 + ANA 0.05	0.9	0.8	1.3	1.2	0.9	1.2	1.2	1.2	1.1	0.0	0.0	0.0	2.0	1.0	2.0	0.0	1.0	0.0
BAP 0.5 + ANA 0.075	0.6	0.7	0.6	0.5	0.9	0.6	0.4	0.8	0.6	1.0	1.0	2.0	1.0	0.0	0.0	1.0	3.0	1.0
BAP 0.5 + ANA 0.1	1.2	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1	0.9	1.2	0.9	1.0	2.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0
BAP 0.5 + ANA 0.5	0.7	0.6	0.8	0.8	0.7	0.9	0.7	0.8	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
BAP 1.0 + ANA 0.0	0.9	1.1	1.0	0.9	1.0	0.9	0.8	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.1	0.9	1.1	1.0	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1	2.0	3.0	2.0	3.0	2.0	3.0	2.0	2.0	2.0
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.1	1.2	1.1	1.2	1.1	0.9	0.8	1.2	1.3	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	1.0	1.0	0.0
BAP 1.0 + ANA 0.1	0.9	0.9	0.7	0.9	1.1	0.9	1.0	0.8	0.9	2.0	1.0	0.0	1.0	0.0	2.0	1.0	1.0	1.0
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.3	1.2	1.3	1.2	1.3	1.1	1.3	1.4	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0
BAP 2.0 + ANA 0.0	1.0	1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	3.0	1.0	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	2.0	2.0
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.1	0.9	1.1	1.0	1.1	1.1	1.2	1.1	1.0	3.0	2.0	3.0	2.0	3.0	2.0	3.0	3.0	0.0
BAP 2.0 + ANA 0.075	0.9	1.0	1.2	1.0	1.1	1.0	1.1	0.9	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0	0.0	1.0	1.0
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.0	1.2	1.0	1.1	0.9	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	2.0	1.0
BAP 2.0 + ANA 0.5	0.5	0.6	0.7	0.6	0.4	0.6	0.7	0.6	0.6	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0

FUENTE: Elaboración propia

Tratamiento	Longitud (cm) 45 días									Número de Hojas 45 días								
	Rep 1			Rep 2			Rep 3			Rep 1			Rep 2			Rep 3		
Control (MS/2)	3.2	3.3	3.2	3.5	3.2	3.3	3.2	3.2	3.2	4	5	4	3	5	6	4	5	4
BAP 0.0 + ANA 0.05	3.3	3.1	3.3	3.2	3.3	3.4	3.3	3.3	3.5	5	5	6	5	4	5	5	5	5
BAP 0.0 + ANA 0.075	4.3	4.2	4.3	4	4.3	4.5	4.3	4.5	4.3	6	5	5	6	4	6	7	5	6
BAP 0.0 + ANA 0.1	2.9	4.3	4.5	4.3	4.3	4.4	4.3	4.4	4.3	5	6	5	7	5	6	5	6	5
BAP 0.0 + ANA 0.5	4.8	4.6	4.7	4.6	4.8	4.6	4.8	4.6	4.8	5	5	6	5	7	6	5	5	6
BAP 0.5 + ANA 0.0	3.2	3.2	3.3	3.3	3.4	3.1	3.2	3.1	3.2	4	6	3	4	4	4	4	5	4
BAP 0.5 + ANA 0.05	3.7	3.8	3.7	3.7	3.6	3.8	3.7	3.7	3.8	4	4	4	4	4	4	4	4	4
BAP 0.5 + ANA 0.075	3.8	3.9	3.6	4	3.8	3.9	3.8	3.9	3.8	2	2	1	2	3	2	3	2	2
BAP 0.5 + ANA 0.1	4.2	4.4	4.3	4.2	4.2	4	4.2	4.1	4.2	5	5	6	5	5	6	5	7	5
BAP 0.5 + ANA 0.5	3.8	4	4	4.2	4.1	4	3.8	4	4.1	6	4	5	5	4	5	4	5	5
BAP 1.0 + ANA 0.0	0.8	0.5	0.8	1	0.8	1	0.8	0.7	0.8	4	5	4	4	6	4	4	5	4
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.2	1	1.1	0.9	1.2	1.1	1.3	1.1	1.1	5	5	6	5	5	6	6	5	5
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.2	1.4	1.3	1.3	1.1	1.1	1.1	1.3	1.4	8	7	8	9	8	8	9	8	8
BAP 1.0 + ANA 0.1	1.2	1.5	1.3	1.5	1.7	1.5	1.5	1.4	1.5	5	6	5	7	5	6	5	6	5
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.6	1.8	1.6	1.4	1.6	1.6	1.5	1.3	1.7	8	7	8	7	9	7	8	7	9
BAP 2.0 + ANA 0.0	0.9	1	0.9	0.7	0.9	1	0.9	1.2	0.6	7	6	7	6	7	6	6	7	7
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	5	6	5	6	5	5	6	5	5
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.3	1.2	1.1	1.2	1	1.4	1.2	1.3	1.3	5	4	6	5	4	5	4	5	4
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.3	1.4	1.3	1.2	1.3	1.2	1.4	1.3	1.5	4	3	3	4	3	3	4	3	3
BAP 2.0 + ANA 0.5	0.7	0.4	0.6	0	0.5	0.5	0.6	0.7	0.5	2	2	2	2	2	2	3	2	3

FUENTE: Elaboración propia

## “Freedom”

Tratamiento	Longitud (cm) 15 días						Número de Hojas 15 días					
	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 1		Rep 2		Rep 3	
Control (MS/2)	1.4	1.2	1	1.2	1.4	1	2	3	2	3	3	2
BAP 0.0 + ANA 0.025	0.8	0.9	0.8	0.9	0.8	0.9	2	2	1	2	0	2
BAP 0.0 + ANA 0.05	1.3	1.5	1.5	1.7	1.5	1.5	2	2	2	2	2	2
BAP 0.0 + ANA 0.075	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.4	2	2	2	2	2	2
BAP 0.0 + ANA 0.1	1.8	1.7	1.8	1.9	1.8	1.8	1	1	0	1	2	1
BAP 0.0 + ANA 0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	1	1	2	1	1	1
BAP 0.5 + ANA 0.0	1.4	1.2	1.4	1.3	1.4	1.4	1	1	1	1	1	1
BAP 0.5 + ANA 0.05	1.6	1.6	1.5	1.6	1.7	1.6	2	2	2	2	2	2
BAP 0.5 + ANA 0.075	1.2	1	1.2	1.2	1.1	1.2	1	1	1	1	1	1
BAP 0.5 + ANA 0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	1	1	1	1	1	1
BAP 0.5 + ANA 0.5	1.1	1	1.1	0.9	1.1	1.1	1	1	1	1	1	1
BAP 1.0 + ANA 0.0	1	0.9	1	1	1.2	1.2	1	2	2	1	2	1
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.6	1.5	1.6	1.5	1.8	1.6	2	2	1	2	3	2
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.8	2	1.8	1.9	2	1.9	1	1	0	1	2	1
BAP 1.0 + ANA 0.1	1.2	1	1.2	1.4	1.2	1.2	2	1	2	1	2	1
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.2	0.9	1	1.1	1	1.1	1	0	1	1	2	1
BAP 2.0 + ANA 0.0	1.8	1.8	2	1.8	1.6	1.8	3	3	2	3	4	3
BAP 2.0 + ANA 0.05	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	2	2	1	2	0	2
BAP 2.0 + ANA 0.075	1	1	1.2	1.2	1.3	1.2	3	3	2	4	3	3
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1	1	1	1	1	1
BAP 2.0 + ANA 0.5	1.4	1.4	1.6	1.4	1.5	1.4	1	1	1	1	1	1

FUENTE: Elaboración propia

Tratamiento	Longitud (cm) 45 días						Número de Hojas 45 días					
	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 1		Rep 2		Rep 3	
Control (MS/2)	2.8	2.8	2.8	2.9	2.9	2.9	4	4	5	5	4	5
BAP 0.0 + ANA 0.025	4.5	4.4	4.3	4.5	4.8	4.5	4	5	3	4	3	5
BAP 0.0 + ANA 0.05	6.4	6.3	6.4	6.4	6.5	6.4	6	6	6	6	6	6
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.6	5.6	5.5	5.5	5.6	5.5	5	5	5	5	5	5
BAP 0.0 + ANA 0.1	5	5	5.2	5	5.2	5.2	5	5	5	5	5	5
BAP 0.0 + ANA 0.5	0.9	0.9	0.7	0.7	0.9	0.9	1	2	1	1	1	1
BAP 0.5 + ANA 0.0	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5	5
BAP 0.5 + ANA 0.05	5.7	5.6	5.7	5.6	5.7	5.6	5	5	6	6	6	5
BAP 0.5 + ANA 0.075	4	4	4	4	4	4	7	5	5	5	6	5
BAP 0.5 + ANA 0.1	0.9	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	1	1	1	1	1	1
BAP 0.5 + ANA 0.5	1.2	1.2	1.2	1.4	1.4	1.4	1	1	1	1	1	1
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	4	4	3	4	3	3
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.6	1.5	1.7	1.6	1.6	1.6	12	12	11	12	11	11
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.8	1.9	1.9	2	1.9	1.9	4	3	4	5	4	4
BAP 1.0 + ANA 0.1	3.6	3.6	3.6	3.8	3.8	3.8	5	6	5	5	5	4
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.4	1.3	1.4	1.4	1.2	1.4	0	1	1	2	1	1
BAP 2.0 + ANA 0.0	2	2.2	1.8	2	2	2	9	8	9	9	9	10
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	10	9	10	0	15	11
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.4	1.4	1.3	1.4	1.3	1.3	13	13	12	12	13	12
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1	1	1	1	1	1
BAP 2.0 + ANA 0.5	1.6	1.6	1.7	1.7	1.9	1.7	2	3	3	3	2	2

FUENTE: Elaboración propia

## “Paulsen”

Tratamiento	Longitud (cm) 15 días						Número de Hojas 15 días					
	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 1		Rep 2		Rep 3	
Control (MS/2)	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	1	1	2	2	2	1	1
BAP 0.0 + ANA 0.05	1.2	1	1	1	1.2	0.9	2	2	2	2	2	2
BAP 0.0 + ANA 0.075	1.2	1.2	1	1	1.4	1.4	2	1	2	2	1	1
BAP 0.0 + ANA 0.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BAP 0.0 + ANA 0.5	0.6	0.6	0.5	0.6	0.6	0.5	0	0	0	0	0	0
BAP 0.5 + ANA 0.0	1	1	0.8	0.8	1	0.8	1	1	1	1	1	1
BAP 0.5 + ANA 0.05	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	1	1	1	1	1	1
BAP 0.5 + ANA 0.075	1.2	1	1.2	1.2	1.1	1.2	1	1	1	1	1	1
BAP 0.5 + ANA 0.1	1	1.2	1.2	1.5	1.3	1.3	2	2	3	1	1	0
BAP 0.5 + ANA 0.5	0.7	0.5	0.7	0.7	0.7	0.6	1	1	1	1	1	1
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.5	1.5	1	1.3	1	1.5	2	3	3	2	2	3
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.2	2	2	2	2	2	2
BAP 1.0 + ANA 0.075	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2	2	2	2	2	2
BAP 1.0 + ANA 0.1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
BAP 1.0 + ANA 0.5	0.9	1	1	0.9	0.8	0.8	2	3	1	1	2	0
BAP 2.0 + ANA 0.0	0.8	1	0.5	1	0.8	1	1	0	0	1	1	0
BAP 2.0 + ANA 0.05	1	1	1	1	0.5	0.9	2	0	2	1	2	2
BAP 2.0 + ANA 0.075	0.8	0.8	1	1.2	1.5	1	3	3	1	2	3	3
BAP 2.0 + ANA 0.1	0.5	0.5	0.5	0.8	0.8	0.5	2	1	2	2	1	2
BAP 2.0 + ANA 0.5	1.4	1	0.6	1	1	1	1	0	1	1	0	0

FUENTE: Elaboración propia

Tratamiento	Longitud (cm) 45 días						Número de Hojas 45 días					
	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 1		Rep 2		Rep 3	
Control (MS/2)	3	2.5	3	2.8	2.5	3	4	5	5	3	3	4
BAP 0.0 + ANA 0.05	4	4.2	3.8	4.5	4.4	4.3	5	5	6	5	4	5
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.5	5.5	5.2	5.2	5.5	5.5	5	5	5	5	5	5
BAP 0.0 + ANA 0.1	5.2	4.5	4.5	5	4.8	4.8	5	5	4	5	4	4
BAP 0.0 + ANA 0.5	3	3	2.8	3	3	3.2	3	3	2	3	3	4
BAP 0.5 + ANA 0.0	1.4	1.2	1	1.3	1	1	3	2	3	3	2	2
BAP 0.5 + ANA 0.05	2	2	2.5	1.5	2	2	3	4	4	4	3	3
BAP 0.5 + ANA 0.075	2.4	2	1.8	2	2	2.4	4	4	4	4	4	4
BAP 0.5 + ANA 0.1	2.5	1.7	1.5	2.2	2.5	2.2	6	6	7	4	6	4
BAP 0.5 + ANA 0.5	0.9	0.7	0.9	0.9	0.8	0.6	1	2	2	1	2	1
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.8	1.8	1.2	1.3	1.2	1.7	6	5	5	4	4	6
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.2	10	9	10	9	11	8
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.6	1.2	1.3	1.3	1	2	8	8	8	8	8	8
BAP 1.0 + ANA 0.1	1.5	1.5	1.2	1.5	1.5	1.2	3	2	2	3	2	3
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.2	1	1	1.2	1.3	1.5	2	3	1	1	2	0
BAP 2.0 + ANA 0.0	0.9	1	0.7	1	0.8	1	3	2	3	3	3	4
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.2	1	1	1	1	1.4	5	4	5	4	5	4
BAP 2.0 + ANA 0.075	1	1	1.2	1.5	1.8	1	3	3	1	2	3	3
BAP 2.0 + ANA 0.1	1	1.2	0.8	1	1	1	3	2	3	3	2	2
BAP 2.0 + ANA 0.5	1.6	1.2	1	1.5	1	1.5	1	0	1	1	0	0

FUENTE: Elaboración propia

### 3.2 Reporte de resultados en los tratamientos de reevaluación en cada unidad experimental de las variables Longitud y Número de hojas para cada cultivar a los 45 días

#### “Harmony”

Tratamiento	Longitud (cm) 45 días						Número de hojas 45 días					
	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 1		Rep 2		Rep 3	
Control (MS/2)	2.5	2.7	2.5	2.3	2.5	2.5	3	2	4	3	3	3
BAP 0.0 + ANA 0.025	4	4.3	3.8	4.2	4.4	4	4	5	4	3	4	4
BAP 0.0 + ANA 0.05	5.5	5.2	5.3	5.4	5.6	5.4	6	7	5	6	5	5
BAP 0.0 + ANA 0.075	3	2.8	3	2.5	2.8	2.8	4	3	3	4	3	4
BAP 0.0 + ANA 0.1	2.5	2.4	2.5	2.3	2.4	2.4	5	6	6	5	6	5
BAP 0.5 + ANA 0.0	2.7	2.5	2.7	3	2.7	2.7	6	5	5	6	5	6
BAP 0.5 + ANA 0.05	5	4.5	4.8	4.8	4.8	5	5	4	6	6	5	5

FUENTE: Elaboración propia

#### “Freedom”

Tratamiento	Longitud (cm) 45 días						Número de hojas 45 días					
	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 1		Rep 2		Rep 3	
Control (MS/2)	2.5	2.7	2.5	2.3	2.5	2.5	3	2	4	3	3	3
BAP 0.0 + ANA 0.025	4	4.3	3.8	4.2	4.4	4	4	5	4	3	4	4
BAP 0.0 + ANA 0.05	5.5	5.2	5.3	5.4	5.6	5.4	6	7	5	6	5	5
BAP 0.0 + ANA 0.075	3	2.8	3	2.5	2.8	2.8	4	3	3	4	3	4
BAP 0.0 + ANA 0.1	2.5	2.4	2.5	2.3	2.4	2.4	5	6	6	5	6	5
BAP 0.5 + ANA 0.0	2.7	2.5	2.7	3	2.7	2.7	6	5	5	6	5	6
BAP 0.5 + ANA 0.05	5	4.5	4.8	4.8	4.8	5	5	4	6	6	5	5

FUENTE: Elaboración propia

#### “Paulsen”

Tratamiento	Longitud (cm) 45 días						Número de hojas 45 días					
	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 1		Rep 2		Rep 3	
Control (MS/2)	3	2.8	2.6	3.2	2.8	2.5	3	4	3	4	3	4
BAP 0.0 + ANA 0.05	2.6	3	2.8	2.8	2.6	3	4	4	4	4	4	4
BAP 0.0 + ANA 0.075	6	5	6	7	5	5	7	6	7	5	7	6
BAP 0.0 + ANA 0.1	4	3.8	4	3.5	3.8	3.6	5	5	4	6	5	5

FUENTE: Elaboración propia

## ANEXO 4

### 4.1 Cuadros de los Analisis de Varianza y resultados de prueba estadística Tukey realizados para las variables de Longitud (izquierda) y Número de hojas (derecha) a los 45 días para cada cultivar

#### “Harmony”

##### Longitud (cm)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud (cm)	60	0.98	0.98	8.68

##### Cuadro de Analisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	116.29	19	6.12	134.51	<0.0001
Tratamiento	116.29	19	6.12	134.51	<0.0001
Error	1.82	40	0.05		
Total	118.11	59			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.65981

Error: 0.0455 gl: 40

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 0.0 + ANA 0.5	4.67	3	0.12	A
BAP 0.0 + ANA 0.075	4.30	3	0.12	A B
BAP 0.5 + ANA 0.1	4.20	3	0.12	A B
BAP 0.0 + ANA 0.1	4.19	3	0.12	A B
BAP 0.5 + ANA 0.5	4.00	3	0.12	B C
BAP 0.5 + ANA 0.075	3.47	3	0.12	C D
BAP 0.5 + ANA 0.05	3.41	3	0.12	C D
BAP 0.0 + ANA 0.05	3.30	3	0.12	D
Control (MS/2)	3.26	3	0.12	D
BAP 0.5 + ANA 0.0	3.02	3	0.12	D
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.87	3	0.12	E
BAP 1.0 + ANA 0.1	1.46	3	0.12	E E
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.32	3	0.12	E F
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.24	3	0.12	E E
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.22	3	0.12	E F
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.20	3	0.12	E F
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.11	3	0.12	E F
BAP 2.0 + ANA 0.0	0.90	3	0.12	F G
BAP 1.0 + ANA 0.0	0.80	3	0.12	F G
BAP 2.0 + ANA 0.5	0.50	3	0.12	G

##### Número de hojas

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de hojas	60	0.98	0.97	5.52

##### Cuadro de Analisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	128.10	19	6.74	88.56	<0.0001
Tratamiento	128.10	19	6.74	88.56	<0.0001
Error	3.05	40	0.08		
Total	131.15	59			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.85349

Error: 0.0761 gl: 40

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 1.0 + ANA 0.075	8.11	3	0.16	A
BAP 1.0 + ANA 0.5	7.78	3	0.16	A
BAP 2.0 + ANA 0.0	6.56	3	0.16	B
BAP 1.0 + ANA 0.1	5.55	3	0.16	C
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.55	3	0.16	C
BAP 0.0 + ANA 0.1	5.55	3	0.16	C
BAP 0.0 + ANA 0.5	5.55	3	0.16	C
BAP 0.5 + ANA 0.1	5.44	3	0.16	C D
BAP 1.0 + ANA 0.05	5.33	3	0.16	C D
BAP 2.0 + ANA 0.05	5.33	3	0.16	C D
BAP 0.0 + ANA 0.05	5.00	3	0.16	C D E
BAP 0.5 + ANA 0.5	4.78	3	0.16	C D E F
BAP 2.0 + ANA 0.075	4.67	3	0.16	D E F
Control (MS/2)	4.44	3	0.16	E F
BAP 1.0 + ANA 0.0	4.44	3	0.16	E F
BAP 0.5 + ANA 0.0	4.22	3	0.16	E F
BAP 0.5 + ANA 0.05	4.00	3	0.16	F G
BAP 2.0 + ANA 0.1	3.33	3	0.16	G
BAP 2.0 + ANA 0.5	2.22	3	0.16	H
BAP 0.5 + ANA 0.075	2.11	3	0.16	H

FUENTE: Elaboración propia

#### “Freedom”

##### Longitud (cm)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud (cm)	63	1.00	1.00	2.37

##### Cuadro de Analisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	214.92	20	10.75	2238.04	<0.0001
Tratamiento	214.92	20	10.75	2238.04	<0.0001
Error	0.20	42	4.8E-03		
Total	215.12	62			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.21533

Error: 0.0048 gl: 42

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 0.0 + ANA 0.05	6.40	3	0.04	A
BAP 0.5 + ANA 0.0	6.00	3	0.04	B
BAP 0.5 + ANA 0.05	5.65	3	0.04	C
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.55	3	0.04	C
BAP 0.0 + ANA 0.1	5.10	3	0.04	D
BAP 0.0 + ANA 0.025	4.50	3	0.04	E
BAP 0.5 + ANA 0.075	4.00	3	0.04	F
BAP 1.0 + ANA 0.1	3.70	3	0.04	G
Control (MS/2)	2.85	3	0.04	H
BAP 2.0 + ANA 0.0	2.00	3	0.04	I
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.90	3	0.04	I J
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.80	3	0.04	I J K
BAP 2.0 + ANA 0.5	1.70	3	0.04	J K
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.70	3	0.04	J K
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.60	3	0.04	K L
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.40	3	0.04	L M
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.35	3	0.04	M
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.35	3	0.04	M
BAP 0.5 + ANA 0.5	1.30	3	0.04	M
BAP 0.5 + ANA 0.1	0.95	3	0.04	N
BAP 0.0 + ANA 0.5	0.77	3	0.04	N

##### Número de hojas

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de hojas	63	0.95	0.92	19.51

##### Cuadro de Analisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	667.75	20	33.39	36.58	<0.0001
Tratamiento	667.75	20	33.39	36.58	<0.0001
Error	38.33	42	0.91		
Total	706.08	62			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.96882

Error: 0.9127 gl: 42

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 2.0 + ANA 0.075	12.50	3	0.55	A
BAP 1.0 + ANA 0.05	11.50	3	0.55	A B
BAP 2.0 + ANA 0.05	9.17	3	0.55	B
BAP 2.0 + ANA 0.0	9.00	3	0.55	B
BAP 0.0 + ANA 0.05	6.00	3	0.55	C
BAP 0.5 + ANA 0.075	5.50	3	0.55	C
BAP 0.5 + ANA 0.05	5.50	3	0.55	C
BAP 1.0 + ANA 0.1	5.00	3	0.55	C D
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.00	3	0.55	C D
BAP 0.0 + ANA 0.1	5.00	3	0.55	C D
BAP 0.5 + ANA 0.0	5.00	3	0.55	C D
Control (MS/2)	4.50	3	0.55	C D
BAP 1.0 + ANA 0.075	4.00	3	0.55	C D E
BAP 0.0 + ANA 0.025	4.00	3	0.55	C D E
BAP 1.0 + ANA 0.0	3.50	3	0.55	C D E F
BAP 2.0 + ANA 0.5	2.50	3	0.55	D E F
BAP 0.0 + ANA 0.5	1.17	3	0.55	E F
BAP 0.5 + ANA 0.1	1.00	3	0.55	F
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.00	3	0.55	F
BAP 0.5 + ANA 0.5	1.00	3	0.55	F
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.00	3	0.55	F

FUENTE: Elaboración propia

## “Paulsen”

Longitud (cm)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud (cm)	63	0.99	0.98	8.79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	102.76	19	5.41	172.66	<0.0001
Tratamiento	102.76	19	5.41	172.66	<0.0001
Error	1.35	43	0.03		
Total	104.10	62			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.53462

Error: 0.0313 gl: 43

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.40	3	0.10	A
BAP 0.0 + ANA 0.1	4.80	3	0.10	B
BAP 0.0 + ANA 0.05	4.20	3	0.10	C
BAP 0.0 + ANA 0.5	3.00	3	0.10	D
Control (MS/2)	2.80	3	0.10	D
BAP 0.5 + ANA 0.1	2.10	3	0.10	E
BAP 0.5 + ANA 0.075	2.10	3	0.10	E
BAP 0.5 + ANA 0.05	2.00	3	0.10	E F
BAP 1.0 + ANA 0.0	1.50	3	0.10	F G
BAP 2.0 + ANA 0.5	1.43	4	0.09	G H
BAP 1.0 + ANA 0.1	1.40	3	0.10	G H
BAP 1.0 + ANA 0.075	1.40	3	0.10	G H
BAP 1.0 + ANA 0.05	1.30	3	0.10	G H I
BAP 2.0 + ANA 0.075	1.26	4	0.09	G H I
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.20	3	0.10	G H I
BAP 2.0 + ANA 0.1	1.18	4	0.09	G H I
BAP 0.5 + ANA 0.0	1.15	3	0.10	G H I
BAP 2.0 + ANA 0.05	1.10	3	0.10	G H I
BAP 2.0 + ANA 0.0	0.90	3	0.10	H I
BAP 0.5 + ANA 0.5	0.80	3	0.10	I

Número de hojas

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de hojas	63	0.76	0.65	35.89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	270.78	19	14.25	7.05	<0.0001
Tratamiento	270.78	19	14.25	7.05	<0.0001
Error	86.88	43	2.02		
Total	357.65	62			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.29369

Error: 2.0203 gl: 43

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 1.0 + ANA 0.05	9.50	3	0.82	A
BAP 1.0 + ANA 0.075	8.00	3	0.82	A B
BAP 0.5 + ANA 0.1	5.50	3	0.82	A B C
BAP 1.0 + ANA 0.0	5.00	3	0.82	B C D
BAP 2.0 + ANA 0.075	5.00	4	0.71	B C D
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.00	3	0.82	B C D
BAP 0.0 + ANA 0.05	5.00	3	0.82	B C D
BAP 0.0 + ANA 0.1	4.50	3	0.82	B C D
BAP 2.0 + ANA 0.05	4.50	3	0.82	B C D
BAP 0.5 + ANA 0.075	4.00	3	0.82	B C D
Control (MS/2)	4.00	3	0.82	B C D
BAP 0.5 + ANA 0.05	3.50	3	0.82	C D
BAP 2.0 + ANA 0.0	3.00	3	0.82	C D
BAP 0.0 + ANA 0.5	3.00	3	0.82	C D
BAP 1.0 + ANA 0.1	2.50	3	0.82	C D
BAP 0.5 + ANA 0.0	2.50	3	0.82	C D
BAP 2.0 + ANA 0.1	2.13	4	0.71	C D
BAP 0.5 + ANA 0.5	1.50	3	0.82	C D
BAP 1.0 + ANA 0.5	1.50	3	0.82	C D
BAP 2.0 + ANA 0.5	0.87	4	0.71	D

FUENTE: Elaboración propia

## 4.2 Cuadros de los Analisis de Varianza y resultados de prueba estadística Tukey realizados para las variables de Longitud (izquierda) y Número de hojas (derecha) en los ensayos de repetición a los 45 días

### “Harmony”

Longitud (cm)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud (cm)	36	0.99	0.99	6.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	131.25	5	26.25	670.24	<0.0001
Tratamiento	131.25	5	26.25	670.24	<0.0001
Error	1.18	30	0.04		
Total	132.43	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.34754

Error: 0.0392 gl: 30

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 0.0 + ANA 0.5	5.83	6	0.08	A
BAP 0.0 + ANA 0.1	4.82	6	0.08	B
BAP 0.0 + ANA 0.075	4.10	6	0.08	C
Control (MS/2)	3.43	6	0.08	D
BAP 0.5 + ANA 0.5	0.80	6	0.08	E
BAP 0.5 + ANA 0.1	0.80	6	0.08	E

Número de hojas

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de hojas	36	0.69	0.64	15.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	41.47	5	8.29	13.21	<0.0001
Tratamiento	41.47	5	8.29	13.21	<0.0001
Error	18.83	30	0.63		
Total	60.31	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.39137

Error: 0.6278 gl: 30

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 0.5 + ANA 0.1	7.00	6	0.32	A
BAP 0.0 + ANA 0.5	6.00	6	0.32	A B
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.00	6	0.32	B C
BAP 0.0 + ANA 0.1	4.83	6	0.32	B C
Control (MS/2)	4.00	6	0.32	C
BAP 0.5 + ANA 0.5	4.00	6	0.32	C

FUENTE: Elaboración propia

## “Freedom”

Longitud (cm)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud (cm)	42	0.98	0.98	4.58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	53.80	6	8.97	340.50	<0.0001
Tratamiento	53.80	6	8.97	340.50	<0.0001
Error	0.92	35	0.03		
Total	54.72	41			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.29287

Error: 0.0263 gl: 35

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 0.0 + ANA 0.05	5.40	6	0.07	A
BAP 0.5 + ANA 0.5	4.82	6	0.07	B
BAP 0.0 + ANA 0.025	4.12	6	0.07	C
BAP 0.0 + ANA 0.075	2.82	6	0.07	D
BAP 0.5 + ANA 0.0	2.72	6	0.07	D E
Control (MS/2)	2.50	6	0.07	E F
BAP 0.0 + ANA 0.1	2.42	6	0.07	F

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	41.47	5	8.29	13.21	<0.0001
Tratamiento	41.47	5	8.29	13.21	<0.0001
Error	18.83	30	0.63		
Total	60.31	35			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.39137

Error: 0.6278 gl: 30

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 0.5 + ANA 0.1	7.00	6	0.32	A
BAP 0.0 + ANA 0.5	6.00	6	0.32	A B
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.00	6	0.32	B C
BAP 0.0 + ANA 0.1	4.83	6	0.32	B C
Control (MS/2)	4.00	6	0.32	C
BAP 0.5 + ANA 0.5	4.00	6	0.32	C

Medias con una letra común no son significativamente d

FUENTE: Elaboración propia

## “Paulsen”

Longitud (cm)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud (cm)	24	0.89	0.87	11.92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	32.68	3	10.89	54.07	<0.0001
Tratamiento	32.68	3	10.89	54.07	<0.0001
Error	4.03	20	0.20		
Total	36.71	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.72539

Error: 0.2015 gl: 20

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 0.0 + ANA 0.075	5.67	6	0.18	A
BAP 0.0 + ANA 0.1	3.78	6	0.18	B
Control (MS/2)	2.82	6	0.18	C
BAP 0.0 + ANA 0.05	2.80	6	0.18	C

Número de hojas

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de hojas	24	0.80	0.78	12.41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28.13	3	9.38	27.44	<0.0001
Tratamiento	28.13	3	9.38	27.44	<0.0001
Error	6.83	20	0.34		
Total	34.96	23			

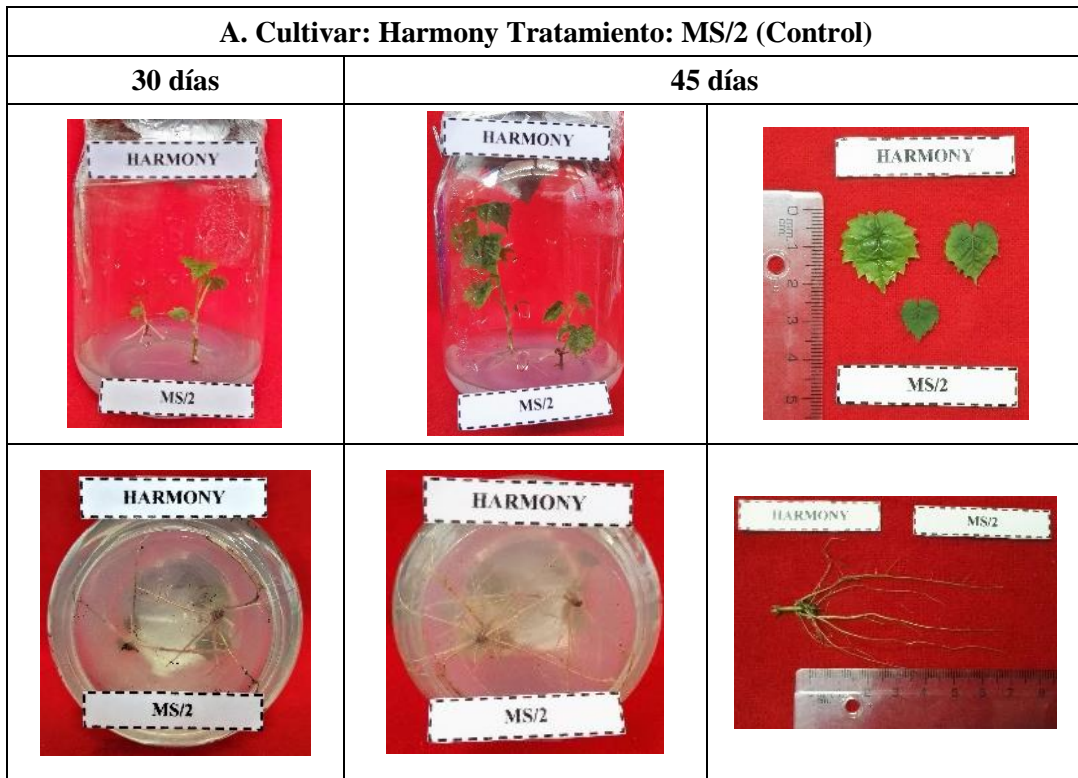
Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.94457

Error: 0.3417 gl: 20

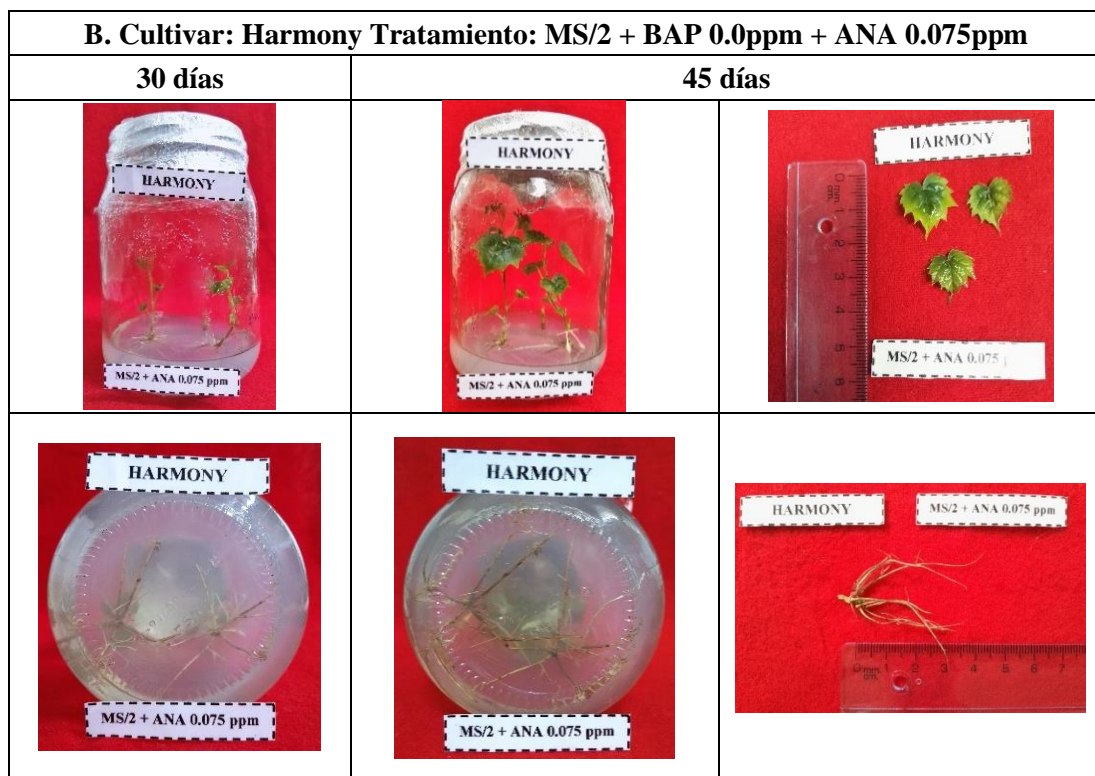
Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BAP 0.0 + ANA 0.075	6.33	6	0.24	A
BAP 0.0 + ANA 0.1	5.00	6	0.24	B
BAP 0.0 + ANA 0.05	4.00	6	0.24	C
Control (MS/2)	3.50	6	0.24	C

FUENTE: Elaboración propia

## ANEXO 5


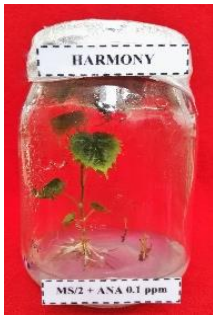






FUENTE: Elaboración propia









FUENTE: Elaboración propia









<b>C. Cultivar: Harmony Tratamiento: MS/2 + BAP 0.0ppm + ANA 0.1ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		


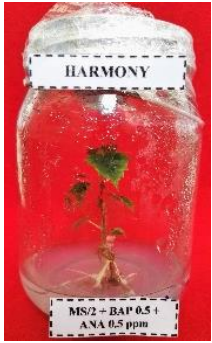


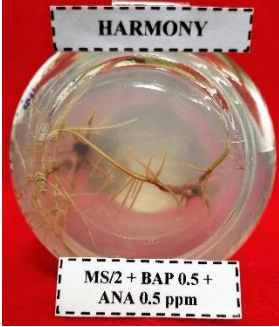

FUENTE: Elaboración propia

<b>D. Cultivar: Harmony Tratamiento: MS/2 + BAP 0.0ppm + ANA 0.5ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		

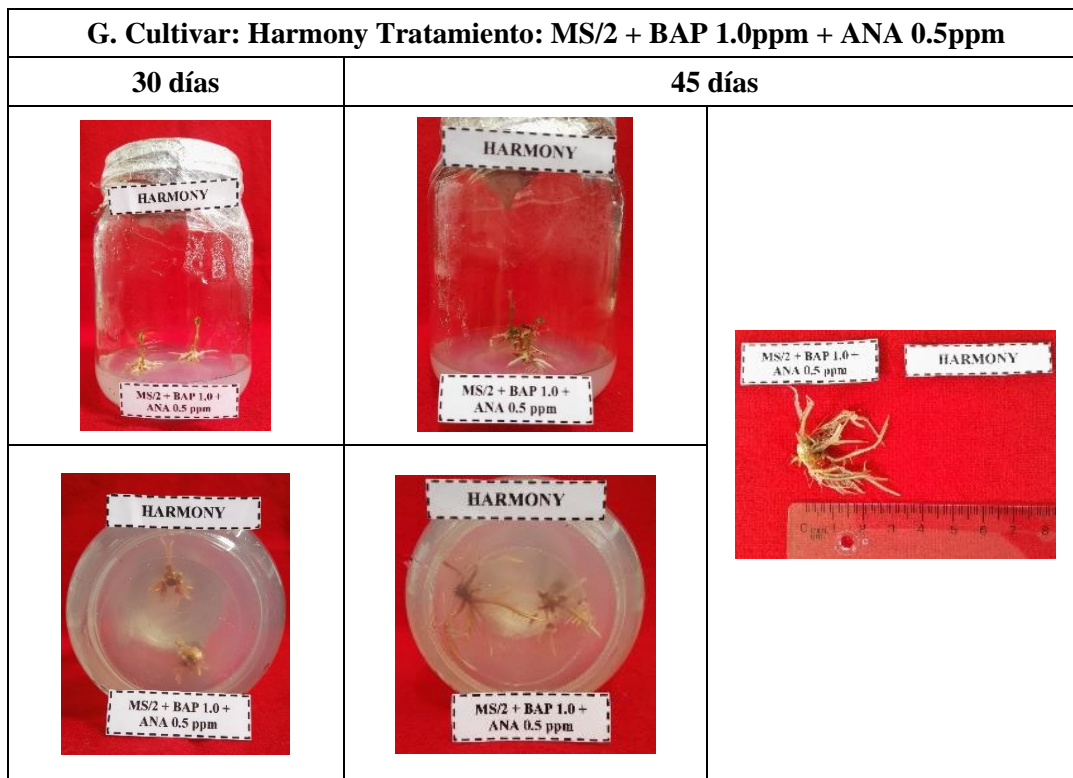
FUENTE: Elaboración propia

<b>E. Cultivar: Harmony Tratamiento: MS/2 + BAP 0.5ppm + ANA 0.1ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		

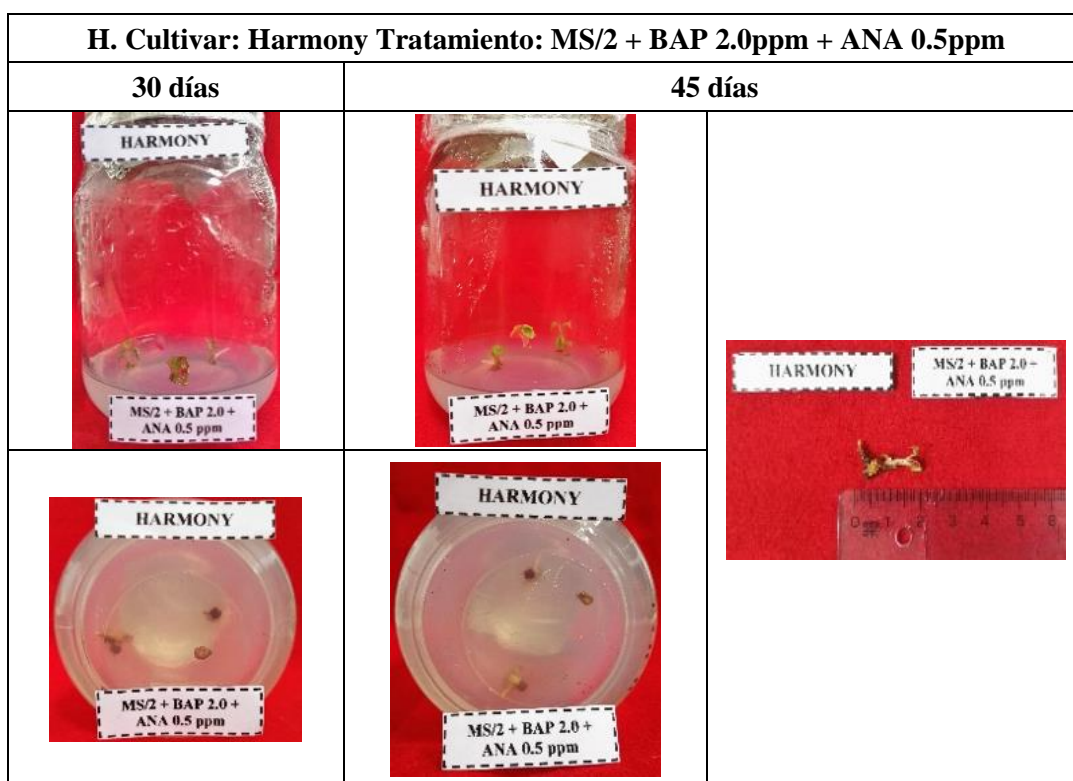
FUENTE: Elaboración propia

<b>F. Cultivar: Harmony Tratamiento: MS/2 + BAP 0.5ppm + ANA 0.5ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		

FUENTE: Elaboración propia









FUENTE: Elaboración propia





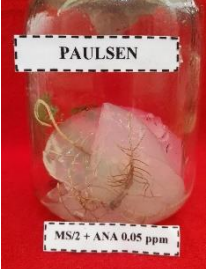
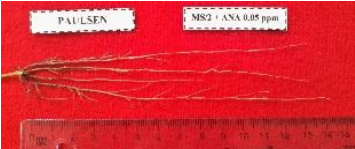


FUENTE: Elaboración propia

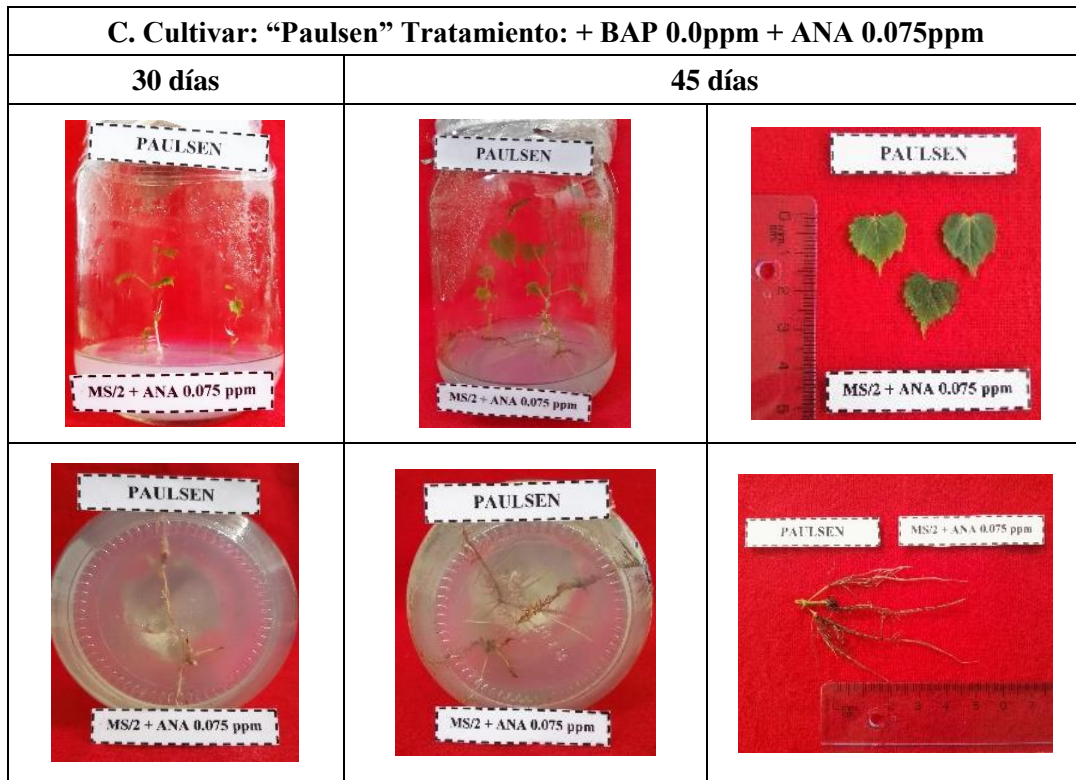
## ANEXO 6

<b>A. Cultivar: "Paulsen" Tratamiento: MS/2 (Control)</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
 <p>PAULSEN MS/2</p>	 <p>PAULSEN MS/2</p>	 <p>PAULSEN MS/2</p>
 <p>PAULSEN MS/2</p>	 <p>PAULSEN MS/2</p>	 <p>PAULSEN      MS/2</p>

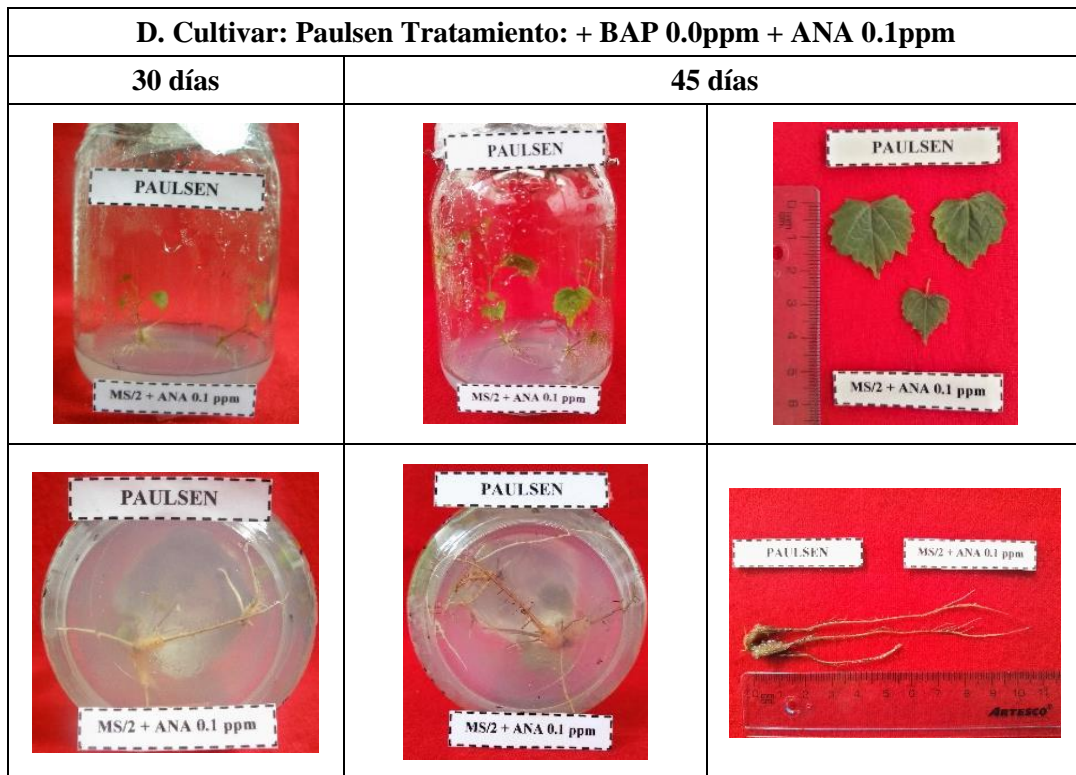
FUENTE: Elaboración propia

<b>B. Cultivar: "Paulsen" Tratamiento: + BAP 0.0ppm + ANA 0.05ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
 <p>PAULSEN MS/2 + ANA 0.05 ppm</p>	 <p>PAULSEN MS/2 + ANA 0.05 ppm</p>	 <p>PAULSEN MS/2 + ANA 0.05 ppm</p>
 <p>PAULSEN MS/2 + ANA 0.05 ppm</p>	 <p>PAULSEN MS/2 + ANA 0.05 ppm</p>	 <p>PAULSEN      MS/2 + ANA 0.05 ppm</p>

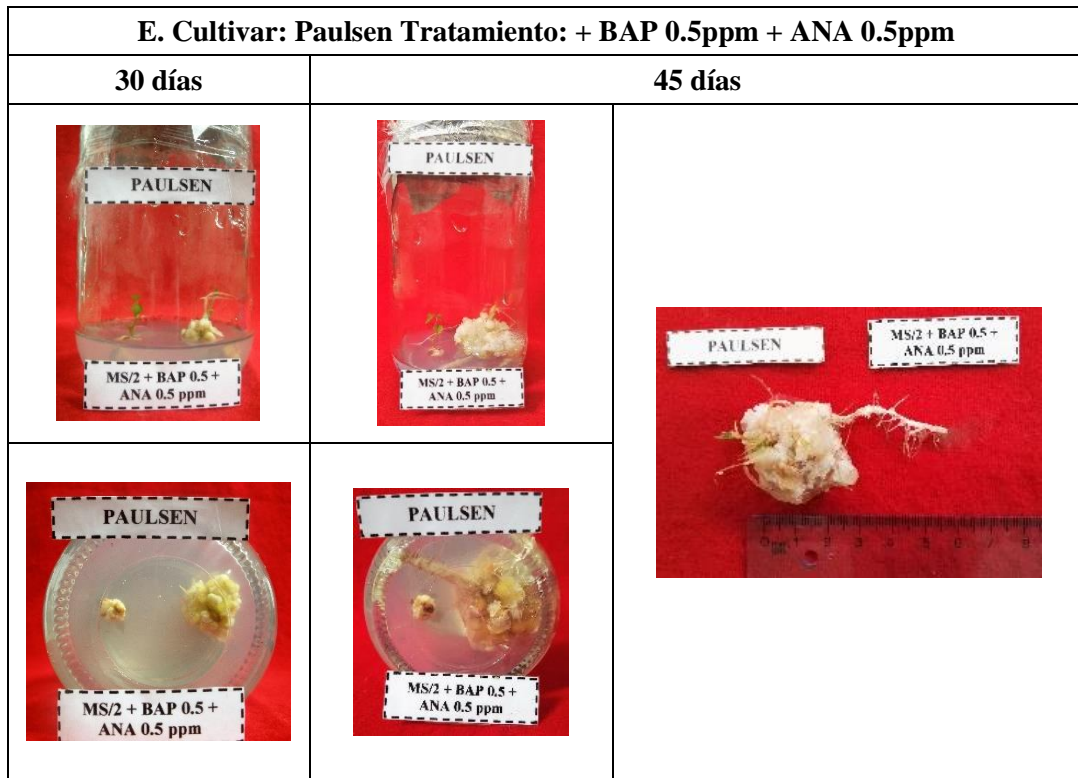
FUENTE: Elaboración propia



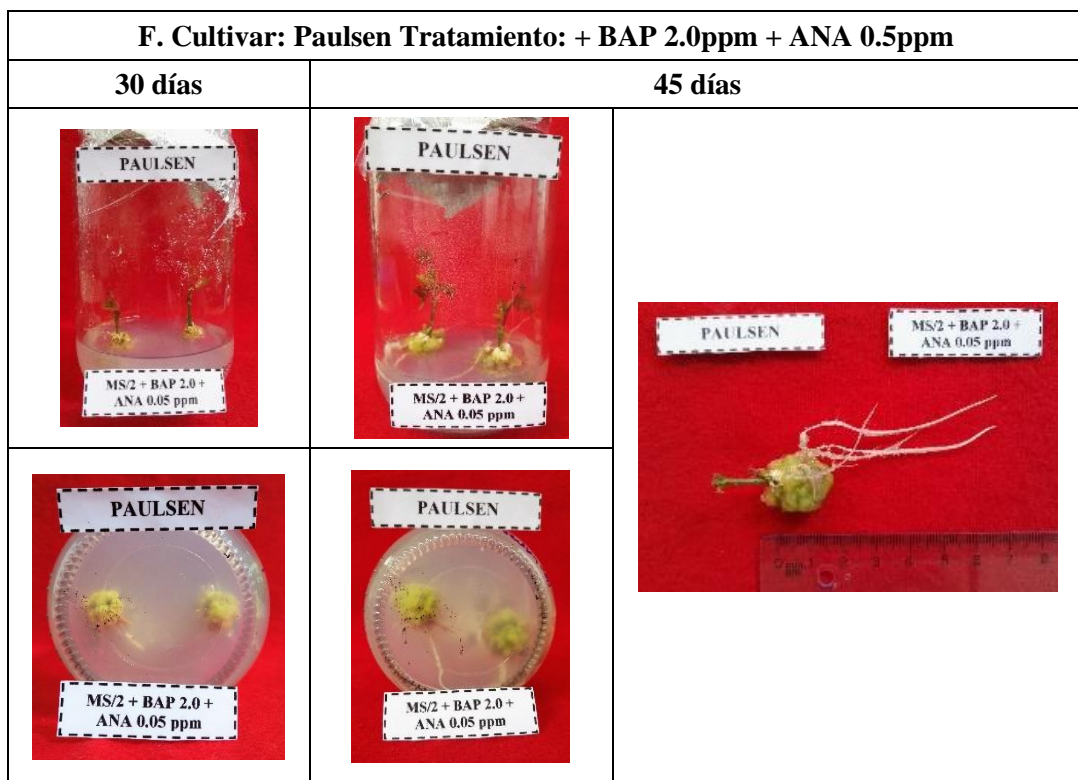
FUENTE: Elaboración propia



FUENTE: Elaboración propia









FUENTE: Elaboración propia









FUENTE: Elaboración propia

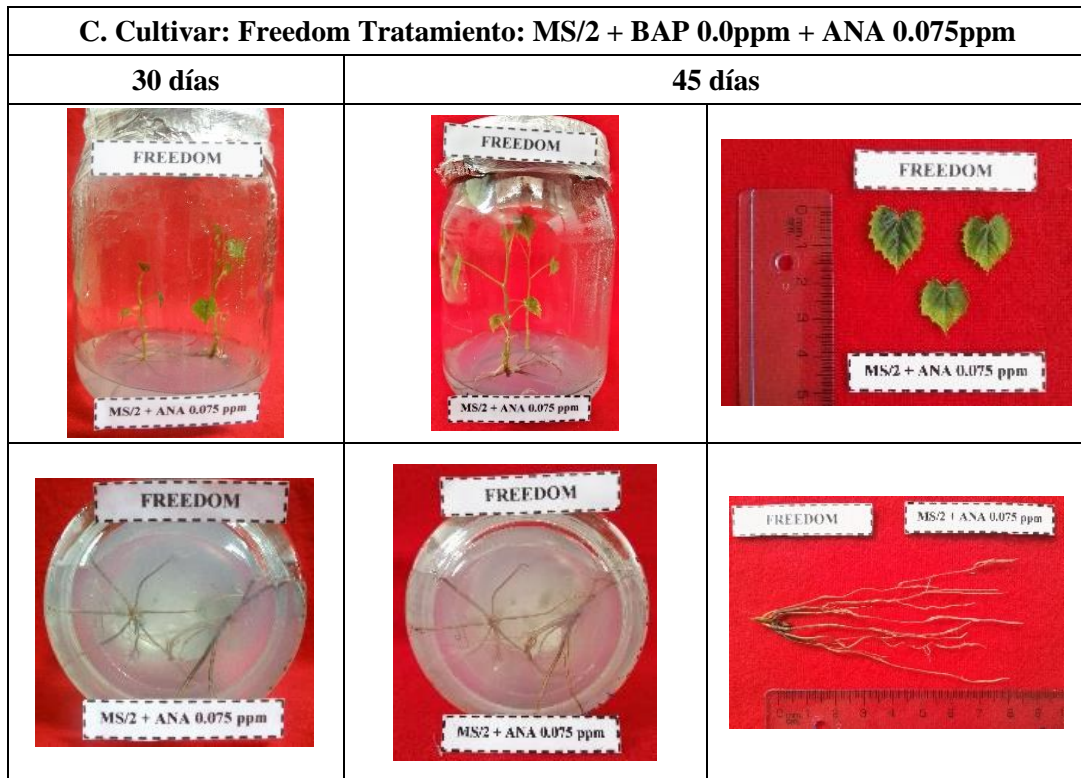
## ANEXO 7

<b>A. Cultivar: Freedom Tratamiento: MS/2 (Control)</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		

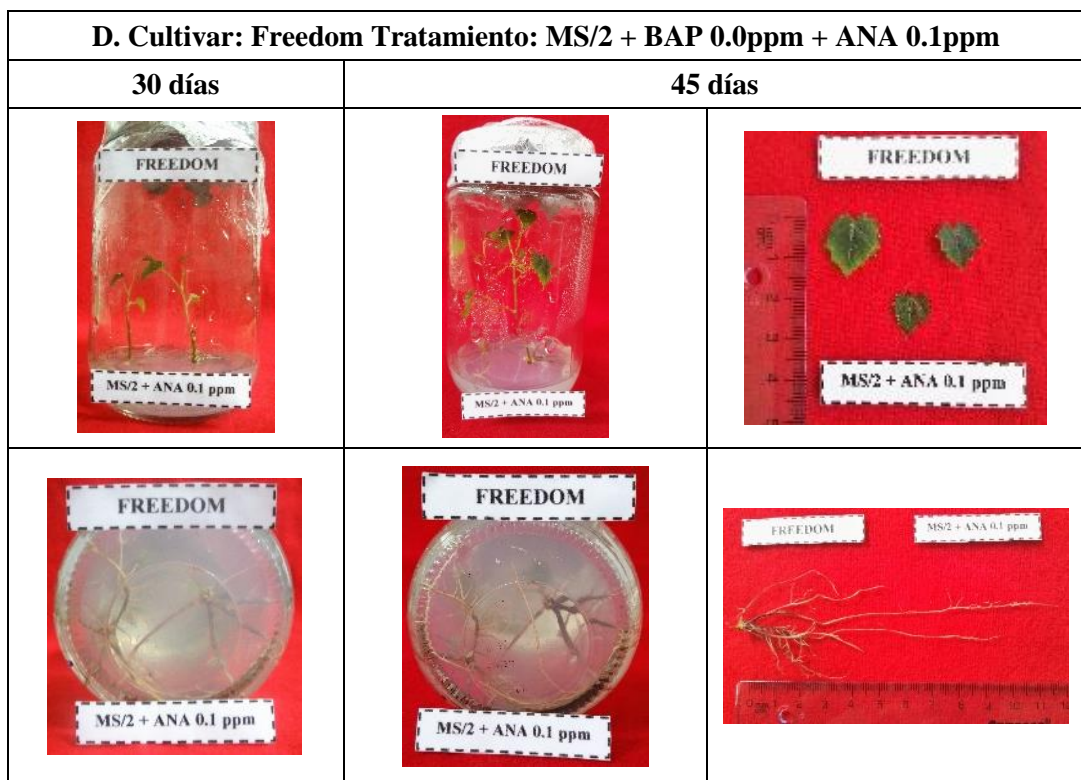
FUENTE: Elaboración propia

<b>B. Cultivar: Freedom Tratamiento: MS/2 + BAP 0.0ppm + ANA 0.05ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		

FUENTE: Elaboración propia





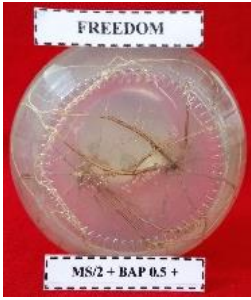



FUENTE: Elaboración propia









FUENTE: Elaboración propia


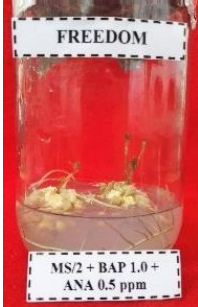





<b>E. Cultivar: Freedom Tratamiento: MS/2 + BAP 0.5ppm + ANA 0.0ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		






FUENTE: Elaboración propia

<b>F. Cultivar: Freedom Tratamiento: MS/2 + BAP 0.5ppm + ANA 0.05ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		

FUENTE: Elaboración propia

<b>G. Cultivar: Freedom Tratamiento: MS/2 + BAP 0.5ppm + ANA 0.0ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		

FUENTE: Elaboración propia

<b>H. Cultivar: Freedom Tratamiento: MS/2 + BAP 2.0ppm + ANA 0.5ppm</b>		
<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	
		
		

FUENTE: Elaboración propia