

Efecto de la intensidad de la poda en el desarrollo *in vitro* de embriones de vides estenospermocárpicas

Effect of pruning intensity on *in vitro* development of embryos from stenospermocarpic grapes

María Teresa Ponce ¹

Magdalena Ocvirk ²

Cecilia Agüero ¹

Originales: Recepción: 12/09/2008 - Aceptación: 09/03/2009

RESUMEN

La técnica del rescate de embriones permite la obtención de plantas por cruzamiento directo entre cultivares sin semillas, no obstante el número de plántulas obtenidas es bajo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la intensidad de la poda en dos cultivares estenospermocárpicas de vid (Emperatriz y Fantasy Seedless) sobre el desarrollo *in vitro* de los embriones y correlacionar el desempeño de los mismos con distintas características de las plantas. La respuesta a los tratamientos estuvo altamente afectada por el cultivar. En Fantasy S. se obtuvo un mayor cantidad de plántulas *in vitro* disminuyendo el número de yemas dejadas en la poda.

Palabras clave

uva de mesa • *Vitis vinifera* • estenospermia

ABSTRACT

The embryo rescue technique allows obtaining plants by crossing seedless cultivars, however the number of plantlets obtained is low. The aim of this work was to evaluate the effect of pruning intensity on *in vitro* embryo development in two stenospermocarpic cultivars (Emperatriz and Fantasy Seedless) and to correlate the embryo performance with different traits. Differences were observed between cultivars. In cv. Fantasy S. the number of plantlets obtained increased while decreasing intensity of pruning.

Keywords

table grapes • *Vitis vinifera* • stenospermy

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El desarrollo de nuevos cultivares de vid sin semilla es uno de los principales objetivos del mejoramiento de uva de mesa con el fin de satisfacer el creciente interés de los consumidores por uvas con estas características (5, 7). En estos cultivares

1 Cátedra de Fisiología Vegetal. Dpto. de Ciencias Biológicas.

2 Cátedra de Viticultura. Dpto. de Producción Agropecuaria.

Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. mponce@fca.uncu.edu.ar

estenospérmicocárpico se produce la fecundación pero el embrión aborta en distintos estados según el cultivar. Por ello, los programas tradicionales incluyen cultivares con semilla como plantas madre, aunque la proporción de progenie sin semilla no supera el 10%. La técnica del rescate de embriones ha sido adaptada a la vid y permite la obtención de plantas por cruzamiento directo entre cultivares sin semilla; el porcentaje promedio de plántulas obtenidas es bajo, alrededor del 10 % (5, 6).

Los intentos por aumentar el número de plántulas obtenidas tuvieron un éxito relativo. A tal efecto se estudió el uso de retardantes del crecimiento (2), pulverizaciones con ácido giberélico (3), poliaminas (16) y benciladenina en prefloración (4), el agregado al medio de cultivo de distintos reguladores del crecimiento (10, 13, 17), el efecto del frío, el ácido giberélico y la manipulación de la chalaza (1); el uso de luz enriquecida en las longitudes de onda del rojo lejano, el cambio a medio fresco frecuente y el estudio de los distintos sectores del racimo en función del rendimiento en plantas (15).

Sobre la base de los resultados obtenidos se puede concluir que los factores más importantes que determinan la mayor proporción entre plántulas obtenidas y semillas estenospermocárpicas cultivadas es el cultivar utilizado como madre (8, 14) y la época de recolección (10, 14).

Por otra parte se detectó variabilidad en el número de embriones finales obtenidos (3), por lo que se planteó la siguiente hipótesis: al modificar sensiblemente la expresión vegetativa de la planta mediante la intensidad de poda sería posible modificar el desarrollo *in vitro* de los embriones.

Objetivos

Evaluar el efecto de la intensidad de la poda sobre el desarrollo *in vitro* de los embriones de cultivares estenospermocárpico de vid.

Correlacionar el comportamiento *in vitro* de embriones con características externas de la planta madre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con los cultivares Fantasy S. y Emperatriz, localizados en la colección varietal de uvas de mesa de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Junín del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Mendoza.

Se seleccionaron veinte plantas homogéneas de cada cultivar que se sortearon en dos grupos de diez cada uno. Se realizó en un grupo una poda mixta con pitón a dos yemas francas y cargador a cinco yemas y en el otro grupo, poda mixta con pitón a dos yemas francas y cargador a diez yemas. En todas las plantas se permitió la fecundación libre. Se cosecharon tres racimos por planta. La cosecha se realizó en la octava semana después del cuaje en Fantasy S., y a madurez en Emperatriz.

Las variables determinadas a campo fueron: número de feminelas en los tres brazos de donde se cosecharon cada uno de los tres racimos, largo de feminelas, número de racimos por planta, peso de los racimos, número de yemas brotadas, número de chupones (brote del año nacido de madera de más de dos años) y peso de la poda.

Luego se determinó el área foliar de los tres brazos de donde se cosecharon los racimos, el peso seco de las hojas de cada brazo, el peso de los racimos, el número de bayas por racimo, el peso medio de las bayas, el peso fresco y peso seco del raquis y el peso seco de 100 bayas (sólo en el caso de Emperatriz).

En el laboratorio se separaron las bayas del raquis y se descartaron todas aquellas dañadas. Se esterilizaron con hipoclorito de sodio comercial al 20% durante 25 minutos, (55 g.L^{-1} de cloro activo), luego se enjuagaron dos veces con agua estéril. Las semillas inmaduras se extrajeron de las bayas en forma aséptica y se sembraron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro, treinta por caja. Las cajas contenían 25 ml de medio de cultivo NN (12) adicionado con ácido giberélico (10^{-6} M), ácido indol acético (10^{-5} M), 20 g.L^{-1} de sacarosa y $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel (figura 1).

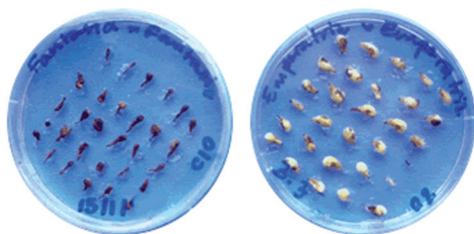


Figura 1. Semillas inmaduras *in vitro* de cultivares Fantasy S. (izquierda) y Emperatriz (derecha).
Figure 1. *In vitro* immature seed of Fantasy Seedless (left) and Emperatriz (right) cultivars.

A continuación las cajas sembradas se colocaron en cámaras de cultivo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y $25 \mu\text{moles.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, con un fotoperíodo de 16 horas. Luego de tres meses de cultivo se abrieron las semillas bajo lupa y se extrajeron los embriones, se colocaron en tubos de ensayo con 15 ml de medio de cultivo MS (11), con macronutrientes MS diluidos a la mitad, adicionado con 20 g.L^{-1} de sacarosa y solidificado con $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel. Los tubos con embriones permanecieron una semana en oscuridad y luego se llevaron a cámaras de cultivo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y $50 \mu\text{moles.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, con un fotoperíodo de 16 horas. Se determinó el número de semillas por baya expresado como porcentaje y el número de embriones rescatados cada cien semillas.

Los embriones extraídos se categorizaron como menores que torpedos (cuando presentaban las formas globoso y corazón), torpedos, germinados y deformes cuando presentaban anomalías en alguno de sus órganos y se determinó qué porcentaje de cada categoría originó plántulas normales.

El diseño estadístico utilizado fue de parcelas al azar. Los resultados se sometieron a análisis de la varianza, las medias se compararon por medio del Test de Tukey y la homogeneidad de la varianza se determinó por medio del la Prueba de Bartlett; cuando no existió homogeneidad de varianza se transformaron los datos. Los porcentajes se compararon por la prueba de comparación de proporciones utilizando el software Sthraphics plus 4.0.

También se realizaron análisis de correlación entre los porcentajes de embriones-semillas, germinaciones directas-embriones, germinaciones directas-semillas, plántulas-embriones y plántulas-semillas. Los coeficientes de correlación fueron sometidos a la Prueba de *t* para determinar su significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cultivar Fantasy S. el número promedio de yemas dejadas por plantas fue 64 para el tratamiento de cargador de cinco yemas y 91 para el tratamiento de cargador con diez yemas. El número total de racimos por planta fue mayor en el tratamiento con cargador de diez yemas, debido probablemente a una mayor cantidad de yemas fértiles por cargador. El peso de los racimos en Fantasy S. fue mayor en cargadores con diez yemas que en los de cinco yemas. Este comportamiento se podría atribuir a que el tratamiento de poda más corto produce racimos de menor tamaño debido a una menor fertilidad de las yemas basales; esta menor fertilidad no sólo se refleja en una menor producción de racimos sino también en racimos más pequeños.

Las demás variables no presentaron diferencias, por lo que se infiere que el largo del cargador no afecta el resto de los parámetros medidos a campo (tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la intensidad de la poda sobre distintos parámetros de crecimiento en los cultivares Fantasy Seedless y Emperatriz (valores promedio para cada tratamiento).

Table 1. Effect of pruning intensity on different growth parameters in Fantasy Seedless and Emperatriz cultivars (values averages for each treatment).

Variables	Fantasy Seedless		Emperatriz	
	Cargador con 5 yemas	Cargador con 10 yemas	Cargador con 5 yemas	Cargador con 10 yemas
N° de feminelas	32,7 a	25,5 a	19,1 a	14,1 a
Longitud feminelas (cm)	8,57 a	6,73 a	6,46 a	4,12 a
N° de racimos	44,3 b	68,5 a	41,5 a	45,4 a
Peso de racimos (kg)	4,4 b	7,3 a	11,9 a	11,7 a
Peso poda (kg)	4,96 a	4,35 a	2,56 a	2,08 a
Brotación (%)	70,93 a	69,37 a	62,4 a	58,16 a
Área foliar (dm ²)	151,4 a	126,5 a	404,3 a	314,5 b
Peso seco hojas (g)	111,2 a	83,32 a	33,8 a	24,8 b
N° de bayas/racimo	224 a	241 a	224,2 a	221,4 a
Semillas/baya (%)	70,8 a	92,6 a	156,4 a	128,3 a

Letras distintas en la fila (cuadros sombreados) indican diferencias significativa para $p < 0,05$ (comparaciones hechas entre tratamientos dentro de cada cultivar por separado).

En el cultivar Emperatriz el número promedio de yemas dejadas por planta fue 76,4 para el tratamiento de cargador de cinco yemas y 105,9 para el tratamiento de cargador de diez yemas. En este cultivar no se modificó en forma significativa ninguna de las variables analizadas en la planta a excepción del área foliar y de la materia seca, siendo ambas superiores en el tratamiento de poda con cargador de cinco yemas. Es probable que la poda intensa haya provocado un aumento del vigor lo que se reflejó en un aumento en el área foliar.

En el cultivar Fantasy S. se sembraron *in vitro* 2260 semillas inmaduras, se rescataron 109 embriones y se obtuvieron 16 plántulas normales. En el cultivar Emperatriz se sembraron 4039 semillas inmaduras, se rescataron 766 embriones y se obtuvieron 296 plántulas normales. La eficiencia general (plántulas/semillas sembradas) fue de 0,7% para Fantasy S. y 7,3% para Emperatriz. Estas diferencias podrían deberse tanto a causas genéticas (2, 14) como ambientales (8).

En el cultivar Fantasy S. se obtuvo un porcentaje mayor de germinaciones directas y plántulas normales provenientes de racimos cosechados de cargadores con cinco yemas (tabla 2). Este comportamiento podría deberse a una mayor relación área foliar y número de racimos totales que es casi el doble que en el caso de la poda más larga. En el resto de las variables medidas no se observaron diferencias. En el cultivar Emperatriz no se encontraron diferencias para ninguna de las variables evaluadas *in vitro* (tabla 2).

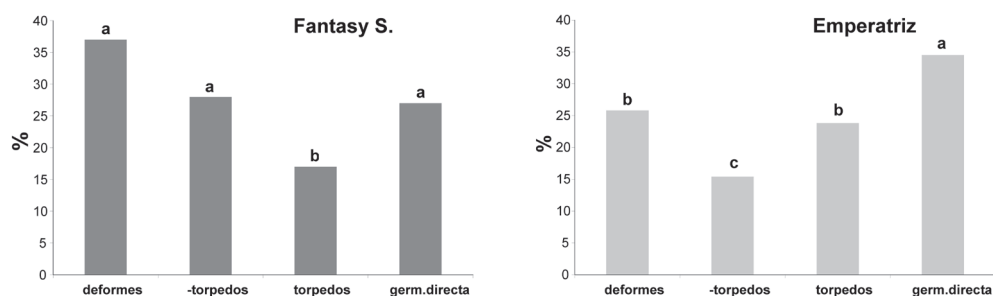
Tabla 2. Efecto de la intensidad de la poda sobre el porcentaje de embriones, porcentaje de embriones al estado de torpedo, porcentaje de embriones con un estado de desarrollo menor a torpedo (globoso y corazón), porcentaje de germinaciones directas, porcentaje de embriones deformes y porcentaje de plántulas, en los cultivares Fantasy S. y Emperatriz.

Table 2. Effect of the intensity of the pruning on the percentage of embryos, percentage of embryos on torpedo state, percentage of embryos smaller than torpedo, percentage of direct germinations, percentage of deformed embryos and percentage of plants in Fantasy Seedless and Emperatriz cultivars.

Cargador	Fantasy Seedless		Emperatriz	
	5 yemas	10 yemas	5 yemas	10 yemas
% embriones semillas	5,12 a	4,24 a	20,6 a	16,8 a
% <torpedos-semillas	0,19 a	0,10 a	3,1 a	2,0 a
% torpedos-semillas	0,46 a	0,75 a	4,5 a	5,0 a
% germ.dirrec.- semillas	1,45 a	0,48 b	8,4 a	5,9 a
% deformes-semillas	1,49 a	1,22 a	4,3 a	5,1 a
% plántulas-semillas	1,50 a	0,50 b	7,4 a	7,0 a

Letras distintas en la fila (cuadros sombreados) indican diferencias significativas para $p < 0,05$ (comparaciones entre tratamientos dentro de cada cultivar por separado).

En Fantasy S. la proporción de embriones al estado de torpedo fue menor que en las otras categorías mientras que en Emperatriz la proporción de germinaciones directas fue mayor que el resto de los estados de desarrollo (figura 2). Tal vez el haber cosechado Fantasy S. a ocho semanas de la polinización, frente a Emperatriz que se cosechó a madurez (aproximadamente veinte semanas después del cuaje), motivó que al mismo tiempo de cultivo *in vitro*, este último cultivar presentara embriones con un estado de desarrollo superior al primero. La cosecha de Fantasy S. con posterioridad a la octava semana después del cuaje no aumenta la cantidad de embriones obtenidos (14).



Letras distiantas en la barra indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

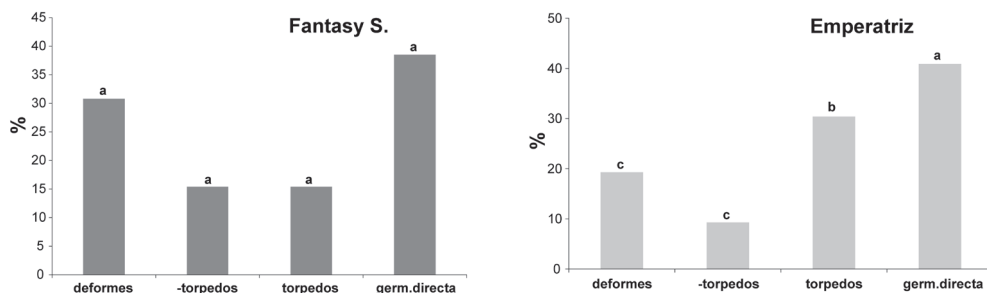
Figura 2. Porcentaje de germinaciones directas, de embriones al estado de torpedo, embriones al estado de desarrollo menor a torpedo y de embriones deformes en los cultivares Fantasy S. y Emperatriz.

Figure 2. Percentage of direct germination, embryos at torpedo stage, embryos smaller than torpedo and deformed embryos in Fantasy Seedless and Emperatriz cultivars.

El porcentaje de plántulas normales según la categoría de embrión que la origina fue altamente dependiente del cultivar (figura 3, pág. 51).

En el cultivar Fantasy S. no se observaron diferencias en la eficiencia para generar plántulas normales de las distintas categorías de embriones. Los embriones deformes, al momento de la separación de los tejidos de la traza seminal, generaron plántulas normales con igual eficiencia que el resto de las categorías, justificando someter los mismos a cultivo *in vitro*. En Emperatriz se obtuvo mayor número de plántulas normales provenientes de germinaciones directas, luego los más eficientes fueron los embriones al estado de torpedo y los embriones al estado de desarrollo menor que torpedo; los deformes fueron los menos eficientes.

Estos resultados no son coincidentes con los de otros autores, por ejemplo Valdez (18), quien trabajando con seis cultivares diferentes demostró que los embriones rescatados fueron más eficientes en producir plántulas normales que aquellos que germinaron directamente, reforzando la dependencia del cultivar.



Letras distintas en la barra indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

Figura 3. Porcentaje de plantas provenientes de germinaciones directas, de embriones al estado de torpedo, embriones al estado de desarrollo menor a torpedo y de embriones deformes en los cultivares Fantasy S. y Emperatriz.

Figure 3. Percentage of plants from direct germination, from embryos at torpedo stage, from embryos smaller than torpedo and from deformed embryos in Fantasy Seedless and Emperatriz cultivars.

Cuando se compararon los porcentajes de embriones rescatados y de plántulas normales obtenidos de cada planta, se encontraron diferencias para las dos variables. Por ejemplo, en Emperatriz una planta produjo 13,1% de plántulas mientras que otra sólo 1,6%. En el cultivar Fantasy S. se detectó una planta que produjo 2,7% de plántulas normales, mientras que la media general para ese cultivar fue 0,63%, repitiéndose en este cultivar lo observado por Agüero *et al.* (3) en Emperatriz y Perlón. Al comparar estos porcentajes con el rendimiento general del ensayo se advierte que en el caso de Emperatriz la eficiencia se duplica, mientras que en Fantasy S. casi se cuatricula lo que justifica la necesidad de detectar estas plantas para mejorar la proporción de plántulas obtenidas.

Los análisis de correlación sólo presentaron valores significativos entre las variables plántulas/semillas y número de semillas por baya, embriones semillas y germinaciones directas/ semilla, en el caso de Fantasy S. y sólo con las dos últimas variables en el caso de Emperatriz. Se esperaba encontrar un mayor número de correlaciones que permitieran establecer relaciones causa efecto entre la planta madre y el desarrollo *in vitro* de los embriones. La falta de correlaciones podría deberse a que las intensidades de poda ensayadas no fueron lo suficientemente diferentes para provocar grandes modificaciones en la expresión vegetativa.

En próximos ensayos se deberían realizar tratamientos de poda más intensos, como así también raleo de racimos o raleo en el racimo de manera de provocar mayores variaciones en la relación entre los racimos y la expresión vegetativa que podría poner de manifiesto la existencia de relaciones causa efecto, que no se pudieron establecer bajo las condiciones de este ensayo. Encontrar relaciones en este sentido sería un gran aporte al momento de seleccionar los racimos en los cuales se realizarán las castraciones para su posterior polinización, determinando la importancia o no de castrar racimos en el mismo cargador.

En el cultivar Fantasy S. el porcentaje de plantas/semillas correlacionó en forma negativa y significativa con el número de semillas por baya (-0,56), explicando esta variable el 32% de la variabilidad observada y podría estar relacionado con un efecto de competencia entre las semillas por reguladores del crecimiento y nutrientes, de manera que mientras más semillas por baya habría menor posibilidad de originar una planta viable. También se encontraron correlaciones positivas y significativas entre el porcentaje de plantas y el de embriones y germinaciones directas, tanto en el cultivar Fantasy S. (0,72 y 0,85 respectivamente) como en Emperatriz (0,71 y 0,72 respectivamente). Estas correlaciones son esperables ya que a mayor cantidad de embriones y a mayor estado de desarrollo, mayor es la probabilidad de obtener plantas normales (9).

CONCLUSIONES

El desarrollo *in vitro* de los embriones fue altamente dependiente del cultivar, indicando un fuerte efecto genético.

En el cultivar Fantasy S. es posible aumentar la cantidad de plántulas normales obtenidas aumentando la intensidad de la poda. Los embriones rescatados y las germinaciones directas presentaron la misma eficiencia para producir plántulas normales.

En el cultivar Emperatriz no se encontró respuesta a la intensidad de poda. Los embriones con un mayor estado de desarrollo fueron más eficientes para producir plántulas normales.

No se pudieron establecer correlaciones entre la respuesta *in vitro* de los embriones con aspectos relacionados con el crecimiento, productividad y vigor de las plantas, probablemente debido a que los tratamientos aplicados no afectaron sustancialmente estos parámetros.

En ambos cultivares se encontraron plantas que se diferenciaron en su capacidad para la producción de plántulas *in vitro* a partir de semillas inmaduras, aunque resta observar si esta situación se mantiene en temporadas siguientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agüero, C.; Gregori, M. T.; Ponce, M. T.; Iandolino, A.; Tizio, R. 1996. Improved germination of stenopermic ovules by low temperatures. *Biocell* 20(2): 123-126.
2. _____; Riquelme, C.; Tizio, R. 1995. Embryo rescue from seedless grapevines (*Vitis vinifera* L.) treated with growth retardants. *Vitis* 34(2): 73-76.
3. _____; Vigliocco, A.; Abdala, G.; Tizio, R. 2000. Effect of gibberelic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenopermic grape cultivars Emperatriz and Perlón. *Plant Growth Regul.* 30: 9-16.
4. Bharathy, P. V.; Karibasappa, G. S.; Patil, S. G.; Agrawal, D. C. 2005. *In ovulo* rescue of hybrid embryos in Flame Seedless grapes - Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. *Scientia Agriculturae* 109(3): 353-359.

5. Bouquet, A.; Davis, H.P. 1989. Culture *in vitro* d'ovules et d'embryons de vigne (*Vitis vinifera* L.) appliquée à la sélection de variétés de raisins de table sans pépins. *Agronomie* 9: 565-574.
6. Cain, D. W.; Emershad, R. L.; Tarailo, L. E. 1983. *In ovulo* embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 22: 9-14.
7. Emershad, R. L.; Ramming, D. W. 1984. *In ovulo* embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. 'Thompson seedless'. *Amer. J. Bot.* 71(6): 873-877.
8. Hewstone, N.; Valenzuela, B.; Muñoz Sch., C. 2006. Efecto de la variedad en el desarrollo de embriones *in vitro* de vides estenospermocárpicas. *Agricultura Técnica (Chile)*. 66(2): 124-132.
9. Leite Do Amaral, A.; Dias de Olivera, P. R; Costa, A. B.; Camargo, U. A. 2001. Estádios de desenvolvimento de embriões na obtenção de plantas em cruzamentos entre genitores apirenos de videira. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP* 23(3): 647-651.
10. Liu, S. M.; Sykes, S. R.; Clingeffer, P.R. 2003. Improved *in ovulo* embryo culture for stenospemcarpic grape (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Agric. Res.* 54(9): 869-876.
11. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
12. Nitsch, J.; Nitsch, C. 1969. Haploids plant from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
13. Ponce, M. T., Agüero, C.; Gregori, M. T.; Iandolino, A.; Tizio, C. 1995. Factores que afectan el cultivo *in vitro* de óvulos de cultivares estenospermicos de vid. II- Ácido giberélico y Ácido indol acético. En: Resúmenes de las XV Jornadas de Investigación de la UNCuyo, Mendoza, 7 al 11 de agosto de 1995. p 130.
14. _____; _____; _____; Tizio, R. 2000. Factors affecting development of stenospemcarpic grape (*Vitis vinifera*) embryo cultured *in vitro*. *Acta Hortic.* 528(2): 667-671.
15. _____; _____; Tizio, R. 1998. Efecto de la calidad de la luz y del repique frecuente sobre el desarrollo *in vitro* de embriones de vides estenospermicas. En: Actas de la XXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 23 al 25 de septiembre de 1998. Mar del Plata. Argentina. p. 398-399.
16. _____; Guiñazú, M. E.; Tizio, R. 2002. Effect of putrescine on embryo development in the stenospemcarpic grape cvs Emperatriz and Fantasy. *Vitis* 41(1): 53-54.
17. _____; _____; _____. 2002. Improved *in vitro* embryo development of stenospemcarpic grape by putrescine. *Biocell* 26(2): 263-266.
18. Valdez, J. G. 2005. Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L.) after an extended period of seed trace culture. *Vitis* 44(1): 17-23.