

NIVELES DE SACAROSA Y PÉRDIDA DE AGUA DEL MEDIO DE CULTIVO DURANTE EL ENRAIZAMIENTO *in vitro* DE DOS PORTAINJERTOS DE VID

R. Paz-Silva^{1¶}; A. Villegas-Monter¹; C. Trejo-López²; T. Terrazas-Salgado²; C. Cervantes-Martínez³

¹Programa de Fruticultura, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO. Correo-e: raquel_paz@colpos.mx ([¶]Autor responsable).

²Programa de Botánica, Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

³División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el enraizamiento *in vitro* de brotes apicales de los portainjertos de vid R110 y SO4, utilizando 0, 15, 30, 45 y 60 g·litro⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo y contenedores con o sin, con intercambio gaseoso complementario. Después de establecidos, los explantes se mantuvieron en cuarto de incubación con 25 ± 2 °C, intensidad luminosa de 76 µmol·m⁻²·s⁻¹ y 16 h de fotoperiodo. A los 13 días de cultivo, el porcentaje de enraizamiento y número de raíces por explante presentaron valores superiores en el medio sin sacarosa, donde había mayor potencial osmótico. El medio de cultivo, en los contenedores sin intercambio gaseoso complementario, perdieron en promedio tres veces menos agua y los explantes presentaron mayor enraizamiento y número de raíces, que los desarrollados en contenedores con intercambio gaseoso. El enraizamiento inició a los siete y ocho días después de establecidos los explantes, pero el portainjerto R110 fue superior al SO4 en todos los días de evaluación.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: cultivo de tejidos, fuente de carbono, ventilación, *Vitis berlandieri* x *V. rupestris*, *Vitis berlandieri* x *V. riparia*.

SUCROSE LEVELS AND CULTURE MEDIUM WATER LOSS DURING *in vitro* ROOTING OF TWO GRAPE ROOTSTOCKS

ABSTRACT

In the present study were evaluated *in vitro* rooting of apical buds of grape rootstocks R110 and SO4, using 0, 15, 30, 45 y 60 g·liter⁻¹ of sucrose in the media culture and containers with and without complementary gas exchange. After establishment, the explants were kept in an incubation room at 25 ± 2 °C, with a luminous intensity of 76 µmol·m⁻²·s⁻¹ and a 16-hour photoperiod. After 13 days of growth, rooting percentage and number of roots per explant showed superior values for the medium without sucrose, where there was a higher osmotic potential. The culture medium, in the containers without gas exchange, lost three times less water and the explants showed higher rooting and number of roots, than those developed in containers with gas exchange. Rooting started at seven and eight days after the explants were established, but rootstock R110 was superior to SO4 during all evaluation days.

ADDITIONAL KEY WORDS: tissue culture, carbon source, ventilation, *Vitis berlandieri* x *V. rupestris*, *Vitis berlandieri* x *V. riparia*.

INTRODUCCIÓN

Las plántulas propagadas *in vitro* poseen características anatómicas y fisiológicas diferentes a las cultivadas convencionalmente. Lo anterior se debe a la presencia de carbohidratos en el medio de cultivo, reducida intensidad luminosa en el cuarto de incubación, humedad relativa alta, inadecuado suplemento de CO₂ dentro de los

contenedores, entre otros (Desjardins, 1995). Una forma de evitar los problemas es eliminar o reducir la fuente de carbohidratos en la etapa de enraizamiento, pero se considera que la presencia de ese elemento en esa etapa es fundamental (Thomas y Schiefelbein, 2001). Los trabajos donde se han evaluado niveles de sacarosa, tratando de explicar su efecto en el enraizamiento de vid *in vitro*, son

limitados. Por otra parte, en diversas especies se han enraizado explantes sin la presencia de carbohidratos en el medio de cultivo (Nguyen *et al.*, 1999) o con menor cantidad que la utilizada en la etapa de multiplicación (Chée y Pool, 1983). Es importante considerar que la sacarosa además de actuar como carbohidrato, funciona como potenciador osmótico (George, 1993), lo que muchas veces afecta el enraizamiento (Calamar y Klerk, 2002). Otro factor que tiene influencia, es el tipo de contenedor en el que son enraizados los explantes; que de manera general, crecen en recipientes cerrados, con limitado intercambio gaseoso. Por lo tanto, se ha propuesto utilizar contenedores que permitan mayor ventilación y de esa manera, mejorar las características de los explantes propagados *in vitro* (Nguyen *et al.*, 1999; Majada *et al.*, 2000) y con ello aumentar la tasa de aclimatización durante el establecimiento en suelo. Si bien es cierto que la concentración de sacarosa y el intercambio gaseoso entre el ambiente interno y externo del contenedor durante el enraizamiento, son factores importantes, la respuesta también está en función de la especie y cultivar, tal como se ha observado al estudiar otros factores *in vitro* (Tewary *et al.*, 2000), por lo que es importante investigar la respuesta de dos portainjertos. Por lo que en el estudio se planteó como objetivo evaluar diferentes concentraciones de sacarosa y contenedores con o sin intercambio gaseoso complementario, en el enraizamiento *in vitro* en los portainjertos de vid R110 (*Vitis berlandieri* x *V. rupestris*) y SO4 (*Vitis berlandieri* x *V. riparia*).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Programa de Fruticultura del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México, México. Como modelo biológico se utilizaron brotes apicales de los portainjertos de vid R110 y SO4 de aproximadamente 1.5 cm multiplicados *in vitro*, subcultivados cada 30 días, durante ocho meses. Los explantes se establecieron en contenedores de policarbonato de 7.62 x 7.62 x 10.16 cm (Magenta GA-7, Sigma), con dos variantes. El primero compuesto de contenedores intactos y el segundo con perforaciones de 1.33 cm² en los lados opuestos del contenedor, a 5 y 6 cm de la base (Aguilar *et al.*, 2000). La perforación a 5 cm de la base se cubrió con dos papeles filtro Whatman Núm. 42 con poros de 2.5 µm, que se pegaron con silicón comercial resistente a altas temperaturas; el otro lado se cubrió con tapón de hule. Se depositaron en los contenedores, 50 ml de medio de cultivo preparado como lo indicó Villegas *et al.* (1991), con modificaciones en la concentración de Ca (NO₃)₂ 4 H₂O de 1.27 a 3.0 mM, complementado con 0.1 µM de ácido indol acético (AIA), 6.5 g-litro⁻¹ de agar (Merck) y cinco niveles de sacarosa (0, 15, 30, 45 y 60 g-litro⁻¹) de la marca Sigma. Estos niveles correspondieron a los potenciales osmóticos calculados de -0.113, -0.210, -0.332, -0.429 y -0.533 MPa, respectivamente. La sacarosa y el

agar se incorporaron al medio antes de ajustar el pH a 5.7 y se procedió a la esterilización del mismo a 121 °C (20 lb de presión) por 15 minutos. En condiciones asépticas, se establecieron ocho explantes por contenedor. Los contenedores se mantuvieron por 13 días en un cuarto de incubación con 25 ± 2 °C, 16 h de fotoperíodo con intensidad luminosa de 76 µmol·m⁻²·s⁻¹, producida por lámparas fluorescentes blancas frías.

Las variables evaluadas fueron: Porcentaje de enraizamiento y número de raíces por explante: diariamente se contaron los explantes enraizados por contenedor para calcular el porcentaje de enraizamiento y cuantas raíces se producían por explante. De esa manera se pudo determinar el momento que se inició el enraizamiento. Pérdida de agua del medio de cultivo: durante los 13 días del experimento, se pesaron diariamente y a la misma hora todos los contenedores para calcular la pérdida de agua diaria del medio de cultivo (g) en cada contenedor. Para obtener el valor diario, se restó el peso del primer día, del segundo y así hasta el último día.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 5 x 2 x 2. Los factores fueron: concentraciones de sacarosa (0, 15, 30, 45 y 60 g-litro⁻¹), tipos de contenedores (con y sin intercambio gaseoso complementario) y portainjertos de vid (R110 y SO4). El día de evaluación se consideró como un factor de medias repetidas (Gomez y Gomez, 1984). Se utilizaron cuatro repeticiones por tratamiento; cada repetición estuvo compuesta por una caja Magenta con ocho explantes, totalizando 320 explantes para cada portainjerto. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de la diferencia mínima significativa protegida por la prueba de F (Chew, 1976) con el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 1999), por ser el adecuado para analizar datos desbalanceados (Littell *et al.*, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El enraizamiento, el número de raíces por explante y la pérdida de agua diaria del medio de cultivo, fueron significativos para los tres factores principales ($P \leq 0.05$; Cuadro 1).

Efecto del portainjerto

El portainjerto R110 superó en porcentaje de enraizamiento y número de raíces por explante al SO4 (Cuadro 1); esto comprueba la influencia del genotipo en el enraizamiento *in vitro*. La diferencia en respuesta se puede deber a la interacción del portainjerto con el medio de cultivo; eso enfatiza la necesidad de desarrollar un medio de cultivo específico para cada genotipo (Tewary *et al.*, 2000). De igual forma, Chée y Pool (1983) determinaron respuestas diferentes entre especies y cultivares de *Vitis*,

con resultados que variaron entre 20 y 100 % de enraizamiento. Cabe indicar que los autores, no se consideraron la sobrevivencia de los explantes en condiciones *ex vitro*.

Efecto de la sacarosa

La concentración de sacarosa afectó negativamente el enraizamiento y el número de raíces por explante (Cuadro 1). Lo anterior se puede deber a que al incrementar la sacarosa disminuyó el potencial osmótico, pasando de -0.113 en medio sin sacarosa a -0.533 MPa con 60 g·litro⁻¹; estos valores del potencial osmótico dificultan la absorción de agua y nutrimentos por el explante tal como indicaron Cárdenas y Villegas (2002). El efecto negativo del potencial osmótico en el enraizamiento ha sido comprobado en *Vitis* (Dami y Hughes, 1995) y *Saintpaulia* sp. (Sawwan *et al.*, 1998). Se debe indicar que además del efecto de la sacarosa en el enraizamiento *in vitro* se tiene que considerar a la especie ya que dependiendo de ésta, la concentración exigida es diferente. Así, en ausencia de sacarosa se lograron enraizar explantes de *Coffea robusta* (Nguyen *et al.*, 1999) pero se requirieron 40 g·litro⁻¹ para *Gerbera jamesonii* (Olivera *et al.*, 2000) y 20 g·litro⁻¹ para *Salvia leucantha* Cav. (Hosoki y Tahara, 1993).

Efecto del contenedor

El enraizamiento y el número de raíces por explante aumentaron cuando se utilizaron contenedores sin intercambio gaseoso complementario (Cuadro 1). Estos resultados son contrarios a los obtenidos por otros autores, quienes señalaron que la utilización de contenedores con ventilación favorece el enraizamiento de *Chenopodium rubrum* L. (Blazkova *et al.*, 1989) y *Rehmannia glutinosa* (Cui *et al.*, 2000). Además, el medio de cultivo de los contenedores con intercambio gaseoso complementario perdió más agua, lo que implica reducción del potencial osmótico, que seguramente dificultó el enraizamiento. En este sentido, Aguilar *et al.* (2000), en el cultivo de *Tagetes erecta* en cajas Magenta, observaron disminución en el potencial osmótico de 73 y 33 % en contenedores con y sin intercambio gaseoso complementario. Debido a la diferencia entre especies y etapas, es importante que se realicen estudios con relación al intercambio gaseoso en los contenedores para cada etapa de la propagación *in vitro*.

Las interacciones concentración de sacarosa x portainjerto, concentración de sacarosa x contenedor, fueron significativas para la variable enraizamiento, mientras que para número de raíces por explante, solamente fue significativa la interacción concentración de sacarosa x contenedor. Todas las interacciones fueron significativas para pérdida diaria de agua del medio de cultivo, excepto portainjerto x contenedor, donde las diferencias existen entre contenedores para el mismo portainjerto ($P \leq 0.05$, Cuadro 2).

Concentración de sacarosa x portainjerto

Se observó que ambos portainjertos tuvieron descenso en enraizamiento y número de raíces por explante, mostrando mayor reducción para el portainjerto SO4, principalmente en la concentración de 60 g·litro⁻¹ de sacarosa (Cuadro 2). Esos resultados indican que cada genotipo, mismo que presenten parentesco, responden de diferente manera a la sacarosa. Con relación al enraizamiento de vid *in vitro*, resultados semejantes al presente trabajo, fueron relatados por Couprie *et al.* (2000) quienes obtuvieron desde cero hasta 100 % de enraizamiento en diferentes genotipos de vid, dependiendo de la concentración utilizada, 10 o 20 g·litro⁻¹ de sacarosa. Según Xiong y Zhu (2002) eso se debe a que las plantas responden al estrés osmótico, en parte por la modulación de la expresión genética, que eventualmente dirige la restauración de la homeostasis celular, y está íntimamente relacionado a la especie.

Concentración de sacarosa x contenedor

El enraizamiento y número de raíces por explante disminuyeron al incrementar la concentración de sacarosa, independiente del tipo de contenedor; sin embargo, con 60 g·litro⁻¹ de sacarosa, hay reducción acentuada en ambas variables al utilizarse contenedores con intercambio gaseoso complementario. Eso probablemente porque se pierde más agua y se disminuye el potencial osmótico que es afectado directamente por la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, dificultando aun más la absorción de agua y consecuentemente, el enraizamiento. Aguilar *et al.* (2000) observaron reducción del potencial osmótico del medio de cultivo de -0.12 MPa a -0.50 y -0.88 MPa, en contenedores sin y con intercambio gaseoso complementario, después de 21 días de cultivar *in vitro* *Tagetes erecta*.

Portainjerto x contenedor

Tanto el portainjerto R110 como el SO4, no presentaron diferencias en enraizamiento y número de raíces por explante cuando se cultivaron los explantes en contenedores sin o con intercambio gaseoso complementario; sin embargo, el portainjerto R110 fue superior al SO4. Aunque no hubo diferencias en enraizamiento y número de raíces por explante entre los tipos de contenedores, en la interacción, se debe considerar la "calidad" de las plántulas obtenidas. Referente a lo anterior, Dantas *et al.* (2001) no obtuvieron diferencias en tamaño y número de brotes por explante de *Dianthus caryophyllus* propagados *in vitro*, en contenedores con mayor o menor intercambio gaseoso complementario. Sin embargo, los explantes cultivados en ambiente con mayor intercambio, presentaron 36.17 % de hiperhidratación en contraste con los crecidos con poca ventilación, con 78.33 %.

Comportamiento de enraizamiento

El enraizamiento, el número de raíces por explante y la pérdida de agua del medio de cultivo mostraron diferencias para los días de evaluación. Hubo interacción entre los factores portainjertos, concentración de sacarosa y contenedores con el día de evaluación, excepto en el caso de día x contenedor y día x contenedor x portainjerto para número de raíces por explante, y la interacción de día x concentración de sacarosa para la variable pérdida de agua del medio de cultivo (datos no mostrados).

Efecto del portainjerto

En ambos portainjertos, las raíces empezaron a emerger a los siete días, con 7.2 y 0.31 % hasta 82.8 y 50 % en el último día de evaluación para R110 y SO4, respectivamente. El portainjerto R110 fue superior en todos los días de evaluación, lo cual fue evidente después de siete días, superando, al final, en 62.5 % (Figura 1a). El número de raíces por explante también aumentó con el tiempo, siendo evidentes las diferencias a partir de los ocho días (Figura 1b). A los 13 días, ambos portainjertos presentaron raíces con más de 1 cm de longitud, suficiente para realizar el trasplante a condiciones *ex vitro*. Dami y Hughes (1995) observaron aumento en el número de raíces por explantes de vid 'Valiant', de 6.4, 10.0 y 11.3 a las dos, cuatro y seis semanas de cultivo, respectivamente. Cabe destacar que los explantes de vid enraizados, generalmente son transplantados a partir de los 28 días de cultivo *in vitro* (Slavtcheva y Dimitrova, 2000; Thomas y Schiefelbein, 2001); así, los datos se presentan para esta fecha, sin detallar la dinámica de enraizamiento. En consecuencia, las raíces tienen mayor longitud, lo que dificulta el trasplante y afecta la sobrevivencia. Además, se debe considerar que al disminuir el tiempo de permanencia en el cuarto de incubación, hay ahorro de energía.

Efecto de la concentración de sacarosa

La emisión de raíces comenzó a los siete días en medio sin sacarosa y a los ocho, para las demás concentraciones. A partir de esas fechas el enraizamiento se incrementó, y en los tratamientos de 0 y 15 g·litro⁻¹ de sacarosa, presentaron mayor enraizamiento y número de raíces por explante (Figura 2a y 2b). Otros investigadores también encontraron que al aumentar la concentración de sacarosa, los explantes tardaron más tiempo para enraizar. Tal es el caso indicado por Olivera *et al.* (2000) al examinar el proceso de rizogénesis de brotes de *Gerbera jamesonii* H. *in vitro*, donde la emergencia se presentó a los 4.8 días y 5.7 días con 20 g·litro⁻¹ y 40 g·litro⁻¹ de sacarosa. Eso se puede deber a que, cuando se incrementa la concentración de sacarosa, los explantes tienen mayor dificultad para absorber los nutrimentos del medio de cultivo, retrasando el enraizamiento.

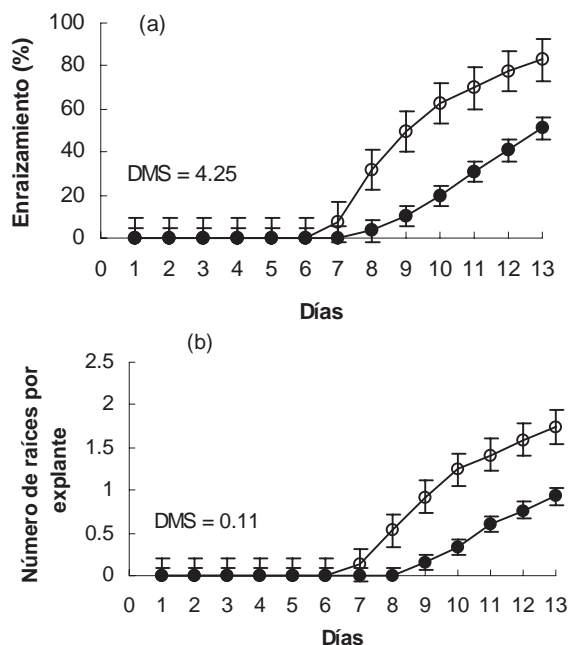


FIGURA 1. (a) Porcentaje de enraizamiento y (b) número de raíces por explante durante 13 días, en los portainjertos de vid R110 (-o-) y SO4 (-e-). DMS: diferencia mínima significativa a una $P \leq 0.05$ para comparar medias de portainjertos por día. Cada punto representa el promedio de 320 repeticiones \pm error estándar.

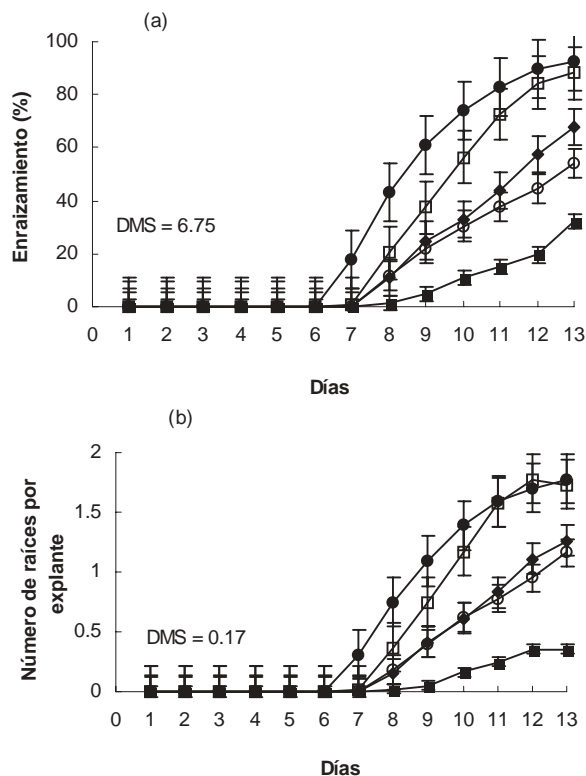


FIGURA 2. (a) Porcentaje de enraizamiento y (b) número de raíces por explante en diferentes concentraciones de sacarosa, durante 13 días, en portainjertos de vid enraizados *in vitro*. Concentraciones de sacarosa en g·litro⁻¹ (0 -●-; 15 -□-; 30 -◆-; 45 -○-; 60 -■-). DMS: diferencia mínima significativa a una $P \leq 0.05$ entre medias de concentraciones de sacarosa por día. Cada punto representa el promedio de 128 repeticiones \pm error estándar.

Efecto del contenedor

El intercambio gaseoso entre el contenedor y el ambiente, propiciado por la perforación de 1.33 cm² cubierta con papel filtro, probablemente tuvo influencia significativa en la dinámica de enraizamiento, debido a la pérdida de agua del medio de cultivo. En los contenedores sin intercambio gaseoso complementario se presentaron los porcentajes mayores de enraizamiento y número de raíces, a partir del día 7 (Figura 3a y 3b). Estos resultados son opuestos a los de Cui *et al.* (2000) quienes señalaron que la utilización de contenedores con ventilación aumentó significativamente el número de raíces de *Rhemannia glutinosa*. Si sólo se toma en cuenta esta variable, se puede llegar a una conclusión errónea, ya que se deben considerar aspectos anatómicos y fisiológicos de los explantes. Tomando en cuenta lo anterior, Majada *et al.* (2000) propagaron *Dianthus caryophyllus* L. en contenedores con perforación y obtuvieron hojas más gruesas, con menores espacios intercelulares, con mayor capacidad fotosintética y en consecuencia brotes más resistentes al transplante. Los beneficios de la utilización de ese tipo de contenedor para la mejor aclimatización también fueron mencionados por Zobayed *et al.* (2000). Dichas características coinciden con lo observado en los explantes de vid aquí obtenidos (datos no mostrados).

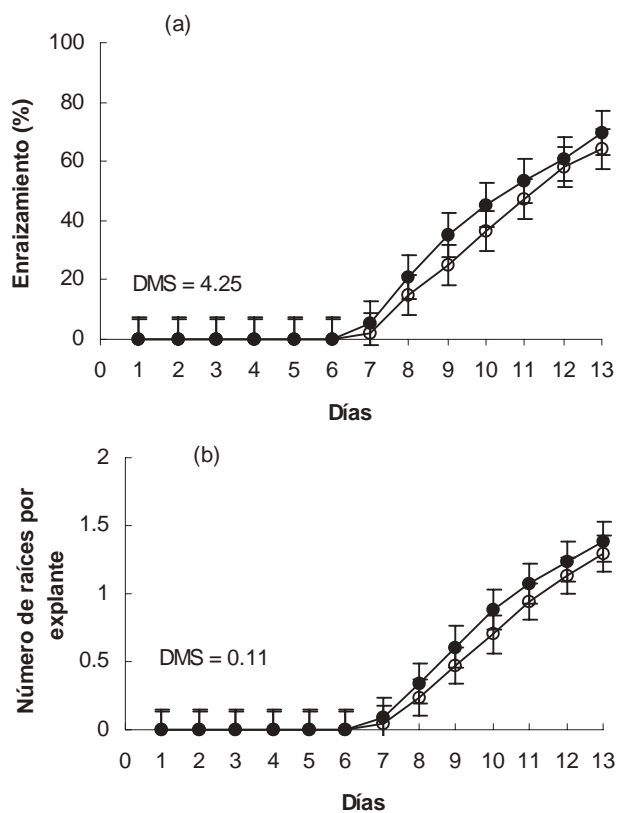


FIGURA 3. (a) Porcentaje de enraizamiento y (b) número de raíces por explante, en contenedores con (-o-) o sin (-●-) intercambio gaseoso complementario, durante 13 días, en portainjertos de vid. DMS: diferencia mínima significativa a una $P \leq 0.05$ para comparar entre medias de contenedores. Cada punto representa el promedio de 320 repeticiones \pm error estándar.

Pérdida de agua del medio de cultivo

La pérdida de agua del medio de cultivo, al final de la evaluación, fue en media tres veces mayor en contenedores con intercambio gaseoso complementario, que en los sin intercambio (Cuadro 1). Independiente de la concentración de sacarosa y del portainjerto, la pérdida de agua del medio de cultivo fue mayor en contenedores con intercambio gaseoso complementario (Cuadro 2). Tomando en cuenta que la pérdida de agua del contenedor está relacionada con los cambios que se den en el cuarto de incubación, es de esperarse que la variación sea mayor donde existe más intercambio, que se da en los contenedores con perforación. Es importante indicar que la ventilación en los contenedores permite que reduzca la humedad relativa de los mismos, mejorando el funcionamiento estomático (Shackel *et al.*, 1990) y aumenta la producción de ceras epicuticulares (Sutter y Langhans, 1982), además permite el incremento de CO₂, si no es limitante en el cuarto de incubación (Seon *et al.*, 1999). Los contenedores con intercambio gaseoso complementario perdieron más agua durante los 13 días de cultivo, con 7.95 g en comparación con 3.06 g en los contenedores sin intercambio gaseoso. Se pudo notar que en estos últimos, la

CUADRO 1. Porcentaje de enraizamiento, número de raíces por explante y pérdida de agua del medio de cultivo por efecto de portainjertos de vid R110 y SO₄, concentración de sacarosa y tipo de contenedor.

Factor	Enraizamiento (%)	Número de Raíces por Explante	Pérdida de Agua Diaria del Medio de Cultivo (g)
Portainjerto			
R110	82.51 a ²	1.73 a	0.44 a
SO ₄	50.93 b	0.93 b	0.41 b
DMS	7.29	0.21	0.004
Sacarosa (g·litro⁻¹)			
0	92.18 a	1.92 a	0.41 c
15	88.28 a	1.78 a	0.42 b
30	67.96 b	1.26 b	0.44 a
45	53.90 b	1.15 b	0.44 a
60	32.03 c	0.53 c	0.42 b
DMS	16.20	0.48	0.006
Contenedor			
SIG	74.06 a	1.73 a	0.23 b
CIG	59.68 b	0.93 b	0.61 a
DMS	7.29	0.21	0.004
Significancia			
Portainjerto	**	**	**
Sacarosa	**	**	**
Contenedor	*	*	**

²Medias con la misma letra en la misma columna para el mismo factor, son iguales de acuerdo a la prueba de diferencia mínima significativa a una $P \leq 0.05$. DMS: diferencia mínima significativa. SIG: sin intercambio gaseoso; CIG: con intercambio gaseoso. *, **, significativo a una $P \leq 0.05$ y 0.01, respectivamente.

CUADRO 2. Interacciones concentración de sacarosa x portainjerto, concentración de sacarosa x contenedor y portainjerto x contenedor en el enraizamiento de vid.

Factor	Factor	Enraizamiento (%)	Número de Raíces por Explante	Pérdida de Agua Diaria del Medio de Cultivo (g)
Sacarosa (g·litro ⁻¹)				
Portainjerto				
0	R110	98.43 a ^z	1.92 ab	0.42 a
	SO4	85.93 ab	1.64 abc	0.40 b
15	R110	98.43 a	2.39 a	0.42 a
	SO4	78.12 abc	1.46 bcd	0.41 b
30	R110	90.62 a	1.82 ab	0.46 a
	SO4	45.31 cde	0.70 de	0.42 b
45	R110	73.43 abc	1.67 abc	0.44 a
	SO4	34.37 ed	0.64 de	0.42 b
60	R110	53.12 bcd	0.85 cde	0.43 a
	SO4	10.93 e	0.20 e	0.41 b
DMS		35.22	0.86	0.009
Sacarosa (g·litro ⁻¹)				
Contenedor				
0	SIG	100.00 a	1.89 ab	0.21 b
	CIG	84.37 abc	1.67 ab	0.60 a
15	SIG	95.31 ab	2.10 a	0.23 b
	CIG	81.25 abc	1.75 ab	0.61 a
30	SIG	68.75 abc	1.29 ab	0.25 b
	CIG	67.18 abc	1.23 ab	0.62 a
45	SIG	50.00 c	1.03 bc	0.42 b
	CIG	57.81 bc	1.28 ab	0.45 a
60	SIG	56.25 bc	0.98 bc	0.60 a
	CIG	7.81 d	0.07 c	0.24 b
DMS		41.35	1.07	0.009
Portainjerto				
Contenedor				
R110	SIG	92.50 a	1.88 a	0.25 b
	CIG	77.50 ab	1.65 a	0.62 a
SO4	SIG	55.62 bc	1.04 b	0.22 b
	CIG	46.25 b	0.81 b	0.60 a
DMS		24.78	0.67	0.006
Significancia				
SAC x PINJ	*	NS	*	
SAC x CONT	**	*	**	
PINJ x CONT	NS	NS	NS	

^zMedias con la misma letra en la misma columna para la misma concentración, son iguales de acuerdo a la prueba de diferencia mínima significativa a una $P \leq 0.05$.

SAC: sacarosa; PINJ: portainjerto; CONT: contenedor; SIG: sin intercambio gaseoso; CIG: con intercambio gaseoso.

NS, *, **; no significativo, significativo a una $P \leq 0.05$ y 0.01, respectivamente.

pérdida se dio de manera constante; mientras que, en los que tenían intercambio gaseoso complementario, hubo mayor oscilación (Figura 4). Kozai *et al.* (1991) utilizaron cajas Magenta cubiertas con polimetilpenteno y en cuatro extremidades con polipropileno con poros de 0.2 a 0.02 μm , para propagar *Fragaria x ananassa* Duch. y registraron pérdida de agua de 9.75 a 12 g en 21 días de cultivo. En cajas Magenta, pero con dos perforaciones cubiertas con papel filtro y sin la presencia de explantes, se encontró pérdida de 1.36 y 10.5 g en contenedores con y in intercambio gaseoso, respectivamente (Aguilar *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

Los tres factores estudiados tuvieron influencia en el enraizamiento. Así, cuando se aumentó la sacarosa, hubo reducción en el enraizamiento. El medio de cultivo perdió más agua en los contenedores con intercambio gaseoso complementario, lo que ocasionó disminución del enraizamiento. El portainjerto R110 superó al SO4 tanto en porcentaje de enraizamiento como número de raíces producidas por explante.

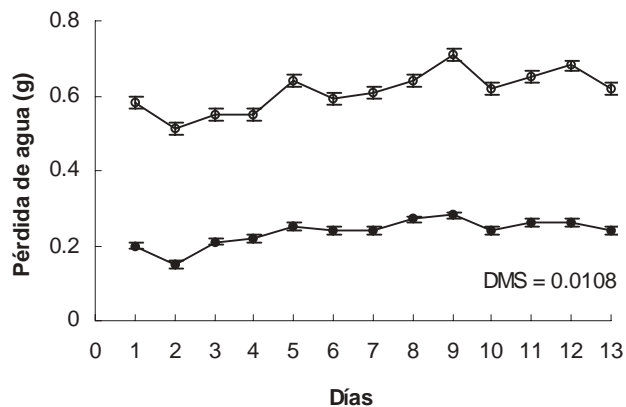


FIGURA 4. Pérdida de agua del medio de cultivo con (-o-) o sin (-●-) intercambio gaseoso complementario, durante el enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid. DMS: diferencia mínima significativa a una $P \leq 0.05$ para comparar medias de contenedores por día. Cada punto representa el promedio de 80 repeticiones \pm error estándar.

LITERATURA CITADA

- AGUILAR M., L.; ESPADAS F., L.; COELLO, J.; MAUST, B. E.; TREJO, C.; ROBERT, M. L.; SANTAMARÍA J., M. 2000. The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. *Journal of Experimental Botany* 51(352): 1861-1866.
- BLAZKOVÁ, A.; ULLMANN, J.; JOSEFUSOVÁ, Z.; MACHÁCKOVÁ, I.; KREKULE, J. 1989. The influence of gaseous phase on growth of plants *in vitro* the effect of different types of stoppers. *Acta Horticulturae* 251: 209-214.
- CALAMAR, A.; KLERK, G. J. 2002. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 207-212.
- CÁRDENAS L., A.; VILLEGAS M., A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnica Mexicana* 25(2): 213-217.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. 1983. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis* 22: 363-374.
- CHEW, V. 1976. Comparing treatment means: a compendium. *HortScience* 11(4): 348-357.
- COUPRIE, I.; OLLAT, N.; TANDONNET, J.P.; POIZAT, C.; DOAZAN, J.P. 2000. *In vitro* rhizogenesis aptitudes of the petiole of different grapevine genotypes – comparison with hardwood cuttings. *Acta Horticulturae* 528: 415-421.
- CUI, Y.Y.; HAHN, E.J.; KOZAI, T.; PAK, K.Y. 2000. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 219-226.
- DAMI, I.; HUGHES, H. 1995. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 179-184.
- DANTAS, A.K.; MAJADA, J.P.; FERNÁNDEZ, B.; CAÑAL M.J. 2001. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. *Plant Growth Regulation* 33: 237-243.
- DESJARDINS, Y. 1995. Photosynthesis *in vitro* – on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Horticulture* 393: 45-57.
- GÓMEZ, K. A.; GÓMEZ, A. A. 1984. *Statistical Procedures for Agricultural Research*. 2.ed. John Wiley-Interscience Publication. New York, USA. 680 p.
- GEORGE, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 2. Exegetics Ltd. Edington. London, England. 1361 p.
- HOSOKI, T.; TAHARA, Y. 1993. *In vitro* propagation of *Salvia leucantha* Cav. *HortScience* 28 (3): 226.
- KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANABE, I. 1991. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 107-115.
- LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. A.; WOLFINGER, R. D. 1996. *SAS System for mixed models*. SAS. Inst. Inc., Cary, NC. 633 p.
- MAJADA, J.P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; TAMÉS, S.R. 2000. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 207-214.
- NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T.; NGUYEN U. V. 1999. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 51-57.
- OLIVERA, O. V. Z.; GUTIÉRREZ, E. M. A.; GUTIÉRREZ, E. J. A.; ANDRADE, R. M. 2000. Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H.Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro* 12(3): 75-80.
- SAS. 1999. *SAS. OnlineDoc, version 8*. CD-ROM. SAS Institute, Inc, Cary, NC., USA.
- SAWWAN, J.S.; ABU-QAOD, H.; HOZAIN, M.I. 1998. Light acclimatization of *Schefflera arboricola*. *Advances Horticultural Science* 13: 151-155.
- SEON, J. H.; CUI, C. H.; PACK, K. Y.; YANG, C. S.; GAO, W. Y.; PARK, C. H.; SUNG, S.N. 1999. Effects of air exchange, sucrose, and PPF on growth of *Rehmannia glutinosa* under enriched CO₂ concentration *in vitro*. *Acta Horticulturae* 502: 313-317.
- SHACKEL, K.A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E.G. 1990. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. *Journal American Horticultural Science* 115(3): 468-472.
- SLAVTICHEVA, T.; DIMITROVA, V. 2000. Gas exchange with *in vitro* cultivated grapevine plants during acclimatization period. *Acta Horticulturae* 526: 357-363.
- SUTTER, E.; LANGHANS, R. W.; 1982. Formation of epicuticular wax and its effects on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Canadian Journal of Botany* 60: 2896-2902.
- TEWARY, P. K.; SHARMA, A.; RAGHUNATH, M. K.; SARKAR, A. 2000. *In vitro* response of promising mulberry (*Morus* sp.) genotypes for tolerance to salt and osmotic stresses. *Plant Growth Regulation* 30: 17-21.
- THOMAS, P.; SCHIEFELBEIN, J. W. 2001. Combined *in vitro* and *in vivo* propagation for rapid multiplication of grapevine cv. Arka Neelamani. *HortScience* 36(6): 1107-1110.
- VILLEGAS M., A.; MAZUELOS, C.; TRONCOSO, A. 1991. Influence of N-NO₃ and N-NH₄ on the mineral composition of grapevine rootstocks cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae* 300: 119-121.
- XIONG, L.; ZHU, J. K. 2002. Molecular and genetic aspects responses to osmotic stress. *Plant Cell and Environment* 25: 131-139.
- ZOBAYED, S. M. A.; ZOBAYED, F. A.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. 2000. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. *Annals of Botany* 85: 587-592.