

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS

Estación Experimental La Platina

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
Nº 011-92

MUTAGÉNESIS INDUCIDA *IN VITRO* COMO  
MÉTODO DE OBTENCIÓN DE  
VARIEDADES MEJORADAS DE UVA DE MESA

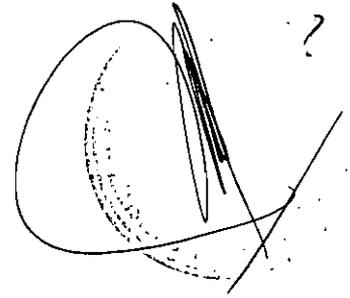
INFORME FINAL  
Fundación Fondo de Investigación Agropecuaria

SEPTIEMBRE, 1995.



FUNDACION PARA LA  
INNOVACION AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA

**FINIQUITO**



**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DENOMINADO “MUTAGÉNESIS INDUCIDA  
IN VITRO COMO MÉTODO DE OBTENCIÓN DE VARIEDADES MEJORADAS DE  
UVA DE MESA”**

**CODIGO 011/92**

En Santiago, **13 MAYO 1996**, entre la **FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA**, en adelante el “**FIA**”, Rut. 70.930.000-8, representada por doña **MARGARITA d’ETIGNY LIRA**, ingeniero agrónomo, Rut. 7.802.842-4, ambos con domicilio en Avda. Santa María 2120, Providencia y el **INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS, INIA**, representado por su Presidente Ejecutivo don Fernando Mujica Castillo, Rut. 3.405.657-9, ambos domiciliados en Fidel Oteiza 1956, piso 12, se ha convenido en el siguiente finiquito:

**PRIMERO** Con fecha 27 de noviembre de 1992, las partes suscribieron un contrato para desarrollar la primera etapa del proyecto de investigación orientado a adaptar y desarrollar técnicas mutagénicas para algunas variedades de uva de mesa cultivadas en el país. Posteriormente, el 05 de junio de 1995 su suscribió el contrato correspondiente a la última etapa.

**SEGUNDO** En cumplimiento de estos contratos, el **FIA** aportó, con fecha 28 de julio de 1995, la suma de \$1.600.000, quedando pendiente un segundo aporte ascendente a \$530.153.

**TERCERO** Con fecha 26 de agosto de 1996, el **FIA** aprobó los informes técnicos financieros finales relativos a este proyecto, no obstante, se estableció una multa de \$297.500 por atrasos en la entrega de estos informes. En consecuencia, el **FIA** quedó adeudando al **INIA** la suma de \$232.653 como saldo del aporte de \$530.153, que no entregó,

**CUARTO** En este acto, el **FIA** entrega al **INIA** la suma antes indicada contra la emisión de la Factura correspondiente.



FUNDACION PARA LA  
INNOVACION AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA

**QUINTO** Encontrándose cumplidas las obligaciones que ambas partes contrajeron en virtud de los contratos antes indicados y aprobados los informes técnicos y financieros finales de este proyecto y no existiendo reclamo alguno pendiente con respecto a él, las partes se otorgan mutuamente el más amplio y completo finiquito, declarando que no existen obligaciones pendientes entre ellas con motivo de estos contratos y que no tienen reclamo alguno que formularse entre sí, por lo cual renuncian a cualquiera acción que pudiese corresponderle.

**SEXTO PERSONERÍAS**

La personería de doña **Margarita d'Etigny Lira** para actuar en representación del **FIA**, consta de la Escritura Pública de fecha 2 de julio de 1996 suscrita ante el Notario de Santiago, don Humberto Quezada Moreno.

La personería de don **Fernando Mujica Castillo** para actuar en representación del **INIA**, consta en el decreto N°295 del 1 de septiembre de 1997 del Ministerio de Agricultura.

**SÉPTIMO** Para todos los efectos de este finiquito, las partes fijan su domicilio en la ciudad y comuna de Santiago. El presente finiquito se extiende en cuatro ejemplares del mismo tenor y dato, quedando dos para cada una de las partes.

*Margarita d'Etigny*

MARGARITA d'ETIGNY LIRA  
DIRECTORA EJECUTIVA  
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN  
AGRARIA



*Fernando Mujica Castillo*

FERNANDO MUJICA CASTILLO  
PRESIDENTE EJECUTIVO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS



# INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Estación Experimental La Platina

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
Nº 011-92

## MUTAGÉNESIS INDUCIDA *IN VITRO* COMO MÉTODO DE OBTENCIÓN DE VARIEDADES MEJORADAS DE UVA DE MESA

INFORME FINAL  
Fundación Fondo de Investigación Agropecuaria

SEPTIEMBRE, 1995.

## INFORME FINAL

Este informe se presenta en conformidad con las obligaciones contraídas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) ante la Fundación Fondo de Investigaciones Agropecuarias (FIA), por el Contrato de Investigación titulado "Mutagénesis inducida *in vitro* como método de obtención de variedades mejoradas de uva de mesa", el cual lleva el N° 011-92 del registro del FIA y que entró en vigencia el 1° de Octubre de 1993.

El informe entrega la información recogida hasta septiembre de 1995 en relación con los tópicos comprometidos en el estudio, que son el establecimiento de técnicas de cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos, la inducción de callos embriogénicos destinados a la mutagenización y el estudio de las dosis de mutágenos químicos necesarias para inducir la mutagenización *in vitro* de material vegetal de vides. Con los resultados obtenidos hasta la fecha, será posible obtener las más de 1.500 plantas mutagenizadas necesarias para poder evaluar, en el futuro y bajo condiciones de campo, su comportamiento y características agronómicas.

CARLOS MUÑOZ S.  
Ingeniero Agrónomo, Ph.D.  
Responsable del Proyecto

## CONTENIDO

	Página
<b>Antecedentes generales</b>	1
<b>Objetivos</b>	2
<b>Establecimiento y cultivo <i>in vitro</i> de cultivares de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) para ser sometidas a mutagénesis química</b>	4
Introducción	4
Materiales y Métodos	5
Presentación y Discusión de los Resultados	8
Resumen	12
Summary	12
Referencias.	13
<b>Inducción de embriogénesis somática a partir del cultivo <i>in vitro</i> de anteras, discos de hoja y trozos de raíz de vid</b>	14
Introducción	14
Materiales y Métodos	16
1. Ensayo 1: Embriogénesis a partir de anteras	16
2. Ensayo 2: Embriogénesis a partir de discos de hoja	17
3. Ensayo 3: Embriogénesis a partir de trozos de raíz	21
Presentación y Discusión de los Resultados	22
1. Ensayo 1: Embriogénesis a partir de anteras	22
2. Ensayo 2: Embriogénesis a partir de discos de hoja	26
3. Ensayo 3: Embriogénesis a partir de trozos de raíz	29
Resumen	30
Summary	30
Referencias	31

	Página
<b>Determinación de las dosis óptimas de Etil Metano Sulfonato (EMS) y Azida Sódica (NaN<sub>3</sub>) para la mutagénesis <i>in vitro</i> de vides de mesa</b>	<b>33</b>
Introducción	33
Materiales y Métodos	34
Presentación y Discusión de los Resultados	38
Etil Metano Sulfonato	38
Azida Sódica	43
Resumen	49
Summary	50
Referencias	51

## ANTECEDENTES GENERALES

La fruticultura chilena depende casi exclusivamente de variedades generadas en el extranjero, las que si bien es cierto han mostrado una adaptación satisfactoria a las condiciones climáticas, de suelo y de mercado, no siempre muestran buena adaptación a las condiciones de cultivo prevalentes en nuestro país y, lo que es más importante, no se adaptan a las condiciones de transporte y de almacenaje, dado lo distante de nuestros mercados consumidores.

Por otra parte, el utilizar variedades importadas implica una dependencia creciente de la tecnología foránea, sobre todo cuando la industria frutícola internacional comienza a utilizar cada vez más variedades patentadas o protegidas, lo que nos obligará en el futuro al pago de regalías cada vez mayores a los países industrializados.

La producción de variedades mejoradas en el país permitiría disminuir la dependencia de la tecnología foránea y nos permitiría incursionar en la exportación de tecnología, que es, probablemente, la siguiente etapa en la que nuestro país debe entrar si queremos mantener el nivel de liderazgo que hoy tenemos en Latinoamérica en materia de desarrollo frutícola.

El Instituto de Investigaciones Agropecuarias inició en el año 1988 un programa de mejoramiento genético de uva de mesa tendiente a la obtención de variedades mejor adaptadas a las condiciones de cultivo y comercialización existentes en Chile, con especial énfasis en el desarrollo de variedades sin semilla. Para ello,

una de las técnicas usadas es la realización de cruzamientos entre variedades sin semilla, rescatando los embriones *in vitro* antes que aborten, con el objeto de producir una progenie mayoritariamente sin semilla.

La mutagénesis inducida *in vitro* podría complementar de manera significativa la velocidad con que podrían generarse nuevas variedades. Está ampliamente demostrado que esta técnica tiene particular aplicación para el desarrollo de nuevas variedades en especies de propagación vegetativa, como son la mayoría de los frutales. [En vid, sin embargo, esta técnica no ha sido utilizada con frecuencia debido a que los protocolos para realizar la mutagénesis no están claramente definidos para los cultivares más cultivados en Chile.] ¿?

## OBJETIVOS

El presente trabajo tuvo por objeto el adaptar y desarrollar, en un plazo de 2 años, técnicas mutagénicas para algunas variedades de uva de mesa cultivadas en Chile, con el objeto de generar una población de mutantes a partir de la cual seleccionar variedades mejor adaptadas a las condiciones de cultivo de nuestro país.

Para el cumplimiento de este objetivo, el trabajo se dividió en tres etapas, que se tratan separadamente a continuación. La primera fue el establecimiento de técnicas de cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos; la segunda, la inducción de callos embriogénicos destinados a la mutagenización *in vitro* y la tercera, la determinación de las dosis de mutágenos químicos necesarias para mutagenizar *in vitro* yemas axilares de vides. A continuación se presentan los detalles de cada una de estas actividades en forma separada.

El personal científico y técnico que participó en el desarrollo de este proyecto se detalla a continuación:

NOMBRE DEL PROFESIONAL	TITULOS	DEDICACIÓN
Carlos Muñoz Schick	Ing. Agrónomo, Ph.D.	20%
Alejandra Bustos Ortiz	Ing. Agrónomo	100%
Nicole Hewstone Oligier	Ing. Agrónomo	20%
Jorge Valenzuela Barnech	Ing. Agrónomo, Ph.D.	25%
Marisol Muñoz Román	Técnico Microbiológico	25%

## ESTABLECIMIENTO Y CULTIVO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE VID (*Vitis vinifera* L.) PARA SER SOMETIDOS A MUTAGÉNESIS QUÍMICA

### INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* ha sido utilizado con éxito para la mutagenización de diversas especies ya que la técnica presenta varias ventajas como son la gran cantidad de explantes que pueden ser mutagenizados simultáneamente, la facilidad de operación, la seguridad de los tratamientos para el operador y, fundamentalmente, el hecho que las plantas que se regeneran, por lo general, no presentan problemas de quimerismo, el presente trabajo se realizó para determinar las mejores condiciones para introducir a cultivo *in vitro* y micropropagar una serie de cultivares de interés para el programa de mejoramiento genético que el Instituto de Investigaciones Agropecuarias realiza en uva de mesa y que permitieran su posterior mutagenización *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental La Platina del Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Las variedades utilizadas fueron Flame Seedless, Italia Pirovano, Moscatel Rosada, Perlette, Red Globe, Red Seedless, Ribier, Ruby Seedless, Superior Seedless y Thompson Seedless. Brotes herbáceos terminales se seleccionaron desde la colección viva de variedades existentes en la Estación Experimental a partir de los cuales se obtuvieron pequeñas estacas de 2 yemas (2-3 cm de longitud), las que se esterilizaron superficialmente dejándolas bajo agua corriente durante 30 minutos con el fin de lavar el material de polvo y otras impurezas contaminantes. Posteriormente, bajo una cámara de flujo laminar, las estacas se trataron con 20% de Hipoclorito de Sodio comercial, que contiene 5 % de cloro, más un agente humectante (tween 20) por 15 minutos. Finalmente se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.

Para ser "sembradas" en el medio de cultivo, a cada microestaca se le renovaron con un bisturí los cortes realizados previamente y se colocaron en una solución antioxidante consistente en una mezcla de ácido cítrico y ácido ascórbico (125 mg/100 ml de cada compuesto). Terminado este tratamiento las estacas se "sembraron" en frascos de 200 ml de capacidad, que contenían 30 ml del medio de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 30 g/l de Sacarosa, 1 mg/l de Bencil Amino Purina (BA) y solidificado con Agar (Cuadro 1). Los frascos se taparon con film de aluminio.

Las estacas así "sembradas" se incubaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C bajo una irradiación de 80  $\mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$  y un fotoperíodo de

16 horas. Cada 45 días los brotes surgidos de las yemas axilares de las estacas se traspasaron a medio fresco hasta lograr un adecuado número y tamaño de brotes.

Una vez que los brotes alcanzaron un desarrollo de 4-5 nudos, se llevaron a medio de enraizamiento (Cuadro 1). Luego del enraizamiento, fueron sometidos a una preaclimatación que consistió en agregar 10 ml de agua destilada estéril a cada frasco reemplazando su tapa de film de aluminio por papel filtro Watman Nº1, el que se fijó usando parafilm. Una vez que se observó la emergencia de 2 hojas adicionales de crecimiento, las plántulas se traspasaron a contenedores con tierra de hoja que se regaron semanalmente con una solución nutritiva equivalente a la de Murashige y Skoog (1962), pero sin vitaminas y que contenía sólo 1/4 de la concentración normal de macronutrientes. Cuando las plantas tuvieron un desarrollo adecuado se plantaron en el campo.

CUADRO 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento en cultivo *in vitro* y enraizamiento de vides (*Vitis vinifera* L.).

Componente	Proliferacion mg/l	Enraizamiento mg/l
<u>Macronutrientes</u>		
KNO <sub>3</sub>	1900	475,0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	92,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	42,5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	412,5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	110,0
<u>Micronutrientes</u>		
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,3	5,575
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6	2,15
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	1,55
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,006
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,063
KI	0,83	0,208
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,006
<u>Fierro</u>		
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8	6,95
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37,3	9,325
<u>Vitaminas</u>		
Ac. Nicotínico	0,5	0,125
Glicina	2,0	0,5
Piridoxina HCl	0,5	0,125
Tiamina HCl	0,1	0,025
<u>Otros</u>		
Myoinositol	100	25
Sacarosa	30.000	30.000
Agar	7.000	7.000
<u>Reguladores de crecimiento</u>		
BA	1,00	-
IAA-K	-	0,03
pH	5,8	5,8

## PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El cultivo *in vitro* ha sido históricamente de gran utilidad en vides. En 1980, Srinivasan y Mullins sugirieron que existía suficiente información técnica que permitía utilizar el cultivo aséptico tanto para fines de micropropagación como para realizar modificaciones genéticas (Srinivasan y Mullins citados por George y Sherrington, 1984).

El cultivo *in vitro* presenta varias modalidades y una de las más usadas es el cultivo de ápices meristemáticos, técnica que ha sido utilizada tanto para la obtención de material libre de virus (Chee *et al.* 1984) como para la micropropagación (Barlass y Skene, 1978).

Uno de los problemas que se presentan al cultivar meristemas de vid es la esterilización superficial, sobre todo cuando se utiliza material de campo. Los ensayos realizados para establecer los diferentes cultivares *in vitro* demostraron que la técnica utilizada fue adecuada, a pesar de que los distintos cultivares reaccionaron en forma distinta al proceso de esterilización, tal como se observa en el Cuadro 2.

Los explantes que no sufrieron contaminación, brotaron rápidamente y transcurridos 30 días de cultivo presentaban hojas expandidas y brotes factibles de subdividir, sin embargo, los diferentes cultivares presentaron distinta adaptación al cultivo *in vitro* (Cuadro 3).

CUADRO 2. Porcentaje de contaminación de explantes de vid tomados del campo 30 días después de sembrados.

Cultivar	Número de Estacas		Porcentaje de contaminación
	Iniciales	Finales	
Flame Seedless	25	10	60
Italia Pirovano	24	10	58
Moscatel Rosada	14	7	50
Perlette	34	17	50
Red Globe	25	7	72
Red Seedless	25	13	48
Ribier	25	18	28
Ruby Seedless	25	23	8
Superior Seedless	25	9	64
Thompson Seedless	25	15	40

CUADRO 3. Tasa de proliferación de varios cultivares de vid micropropagados a partir de ápices meristemáticos.

Cultivar	Número de brotes		Tasa de Proliferación
	Iniciales	Finales	
Flame Seedless	120	269	2,2
Italia Pirovano	60	159	2,7
Moscatel Rosada	240	342	1,4
Perlette	33	90	2,7
Red Globe	90	180	2,0
Red Seedless	261	524	2,0
Ribier	210	315	1,5
Ruby Seedless	186	744	4,0
Superior Seedless	111	252	2,3
Thompson Seedless	72	201	2,8

Tal como se aprecia en el Cuadro 3, el cultivar que mostró la mayor tasa de proliferación fue 'Ruby Seedless' en tanto que 'Moscatel Rosada' y 'Ribier' mostraron las tasas más bajas.

Bajo las condiciones de cultivo utilizadas, los cultivares que mostraron una tasa de proliferación mayor, también mostraron mayores problemas de vitrificación. Con el objeto de solucionar este problema que, por lo general, está asociado al excesivo contenido de humedad dentro de los frascos de cultivo (Böttcher *et al.*, 1988), se colocaron membranas porosas (milipore de 5  $\mu$ ) de 10 mm de diámetro

en las tapas de papel de aluminio de los cultivares 'Flame Seedless', 'Ruby Seedless' y 'Superior Seedless'. Al cabo de 2 meses de crecimiento en estas condiciones se pudo observar que el uso de la membrana mencionada disminuyó la vitrificación de los brotes y que las láminas foliares lograron un mayor desarrollo. También se pudo constatar que las raíces fueron más vigorosas cuando se utilizó esta membrana. Sin embargo, los cultivares que mostraron una menor proliferación, como 'Flame Seedless', no se beneficiaron con el uso de esta membrana. Además, el uso de la membrana produjo una más rápida deshidratación del medio de cultivo, por lo que se requirió de repiques más frecuentes.

## RESUMEN

Apartir de material de campo, se logró poner en cultivo *in vitro* los siguientes 10 cultivares de vid: Flame Seedless, Italia Pirovano, Moscatel Rosada, Perlette, Red Globe, Red Seedless, Ribier, Ruby Seedless, Superior Seedless y Thompson Seedless. Para ello se utilizó una modificación del protocolo descrito por Barlass y Skene (1978). El trabajo permitió determinar que la vid es una especie que se adapta bien al cultivo *in vitro* bajo las condiciones utilizadas en este ensayo y que los diferentes cultivares presentan distintas tasas de proliferación, destacándose 'Ruby Seedless' por su alta tasa de multiplicación.

## SUMMARY

From field-grown plants the following 10 grape cultivars were introduced *in vitro*: Flame Seedless, Italia Pirovano, Moscatel Rosada, Perlette, Red Globe, Red Seedless, Ribier, Ruby Seedless, Superior Seedless and Thompson Seedless. The technique used was a modification of the one described by Barlass and Skene (1978). Results demonstrated that all grape cultivars grew well *in vitro* under the conditions used in this experiment and that 'Ruby Seedless' exhibited the highest proliferation rate of all tested cultivars.

**REFERENCIAS**

BARLASS, M. and SKENE, K.G.M. 1978. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* 17:1335-1340.

BÖTTCHER, I., ZOGLAULER, K. and GÖRING, H. 1988. Introduction and reversion of vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 72:560-564.

CHEE, R., POOL, R.M. and BUCHER, D. 1984. A Method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. *New York's Food and Life Sciences Bulletin* 109.

GEORGE, E.F. and SHERRINGTON, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture; Handbook and directory of commercial laboratories. Exergetics. England. 709p.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

## INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DEL CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS, DISCOS DE HOJA Y TROZOS DE RAÍZ DE VID

### INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es un fenómeno que involucra el desarrollo directo de embriones a partir de células somáticas, sin que ocurra gametogénesis. Estos embriones son estructural y bioquímicamente idénticos a los embriones zigóticos. Este fenómeno, observado por primera vez en 1958 por Reinert y por Steward *et al.* en callos y cultivos en suspensión de *Daucus carota*, permite la propagación rápida y es una herramienta útil en el mejoramiento genético de plantas. Este proceso, sin embargo, presenta algunas limitantes para su uso masivo como son la baja frecuencia de inducción de embriones y en muchas especies que, una vez inducidos éstos a partir de células o de agregados celulares, se encuentran embriones en diferentes estados de desarrollo simultáneamente en un mismo cultivo (Osuga y Komamine, 1994).

En el presente trabajo se trataron de establecer protocolos tendientes a lograr embriogénesis somática a partir del cultivo *in vitro* de tejidos provenientes de anteras, hojas y de raíces de vid, con el objeto de posteriormente mutagenizar el callo embriogénico generado. Dado que está suficientemente demostrado que la embriogénesis somática ocurre a partir de células únicas, usando este método se minimizan las posibilidades de obtener quimeras luego de los tratamientos mutagénicos (FAO, IAEA, 1977) y, por lo tanto, se obtienen mutantes sólidos que pueden ser evaluados rápidamente en busca de caracteres agronómicos de interés.

La embriogénesis somática a partir de anteras *in vivo* ha sido bastante estudiada y el protocolo que ha servido como base a estas investigaciones ha sido el utilizado por Rajasekaran y Mullins (1979). Ellos determinaron que para poder inducir callo embriogénico, las flores debían ser sometidas a un tratamiento de frío a 4°C previamente a ser cultivadas y que, además, las anteras debían ser cultivadas cuando el polen estuviera en el estado uninucleado. El medio de cultivo utilizado por ellos, fue el de Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con 2,4-D y BA y las condiciones de cultivo de las anteras fue de oscuridad a 26 - 27°C hasta que ocurrió la formación de callo.

La embriogénesis a partir de tejido foliar *in vivo*, ha sido estudiada más recientemente por varios investigadores (Hirabayashi, 1983; Stamp y Meredith, 1988; Hirabayashi y Matsuta, 1989; Robacker, 1993). Los explantes utilizados han sido hojas enteras (Stamp, 1988), discos de hoja de 5 a 6 mm de diámetro (Hirabayashi, 1983; Hirabayashi y Matsuta, 1989; Robacker, 1993) y pecíolos (Robacker, 1993). En todos los estudios el medio utilizado ha sido el de Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con 2,4-D y Citoquininas como BA, TAG y TK-30 en distintas dosis para la obtención del callo embriogénico, mientras que para la inducción de los embriones somáticos, los callos han sido llevados a medio sin reguladores de crecimiento.

No existe información publicada respecto a la embriogénesis a partir de tejido radicular *in vivo*, sin embargo, ella ha sido muy exitosa en especies como el arroz. (Zimny y Lortz, 1986) y ajo (M. Escaaff, comunicación personal).

## MATERIALES Y MÉTODO.

### ENSAYO 1: Embriogénesis somática a partir del cultivo de anteras.

Los cultivares utilizados fueron Flame Seedless, Italia Pirovano, Moscatel Rosada, Perlette, Red Globe, Red Seedless, Ribier, Ruby Seedless, Superior Seedless y Thompson Seedless.

Para desarrollar la embriogénesis somática a partir de anteras se utilizó la técnica descrita por Rajasekaran y Mullins (1979). Para ello se recolectaron flores a fines de Octubre de 1993, que poseían anteras con granos de polen en estado de polen maduro y no en uninucleado, que la literatura cita como el más apropiado para la embriogénesis somática. Las flores se almacenaron en frío a 4°C por 72 horas, previo a la esterilización superficial. Esta última se realizó lavando las flores en agua corriente por media hora previo a ser sumergidas en una solución de Hipoclorito de Sodio comercial al 20%, la que contiene 5% de cloro activo, más 2-3 gotas de un agente humectante (Tween 20) por 20 minutos. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Ayudado de elementos de disección y bajo un microscopio estereoscópico, se separaron las anteras con filamento y se colocaron 80 de ellas en frascos Erlenmeyer de 100 ml de capacidad que contenían 25 ml de medio líquido (Cuadro 1) Nitsch & Nitsch (1969), suplementado con 5  $\mu$ M (1,105 mg/l) de 2,4-

Diclorofexiacético (2,4-D) y 1  $\mu\text{M}$  (0,225 mg/l) de 6-Bencilaminopurina (BA) (Rajasekaran y Mullins, 1979, 1982 y 1983). Adicionalmente, se colocaron 35 anteras en frascos cilíndricos de 40 ml de capacidad que contenían 10 ml del mismo medio, pero sólido. Los Erlenmeyers se agitaron en agitador orbital a 80 rev/min. Ambos tipos de frascos se taparon con film de aluminio y se incubaron en oscuridad a 25°C hasta que se formaron callos. Posteriormente se pusieron a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  bajo luz a  $80\mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ , con un fotoperíodo de 16 horas. Quincenalmente las anteras y/o callos en cultivo se traspasaron a medio fresco.

#### **ENSAYO 2: Embriogénesis somática a partir de cultivo *in vitro* de hojas.**

Los cultivares utilizados para este ensayo fueron 'Flame Seedless', 'Italia Pirovano', 'Moscatel Rosada', 'Perlette', 'Red Globe', 'Red Seedless', 'Ribier', 'Ruby Seedless', 'Superior Seedless' y 'Thompson Seedless'. Se utilizó también la variedad japonesa Koshusanjaku que fue introducida *in vitro* desde Japón. Esta variedad fue la utilizada por Hirabayashi y Matsuta (1983; 1989) en sus estudios de embriogénesis somática a partir de hojas de vid.

Para obtener hojas de un tamaño adecuado fue necesario primero cultivar, bajo condiciones especiales, las vides que se tenían *in vitro*. Para ello se sembraron microestacas de 2 yemas en frascos de 200 ml de capacidad con 25 ml de medio líquido de Murashige y Skoog (1962) más 1 mg/l de Bencil Amino Purina (BA), sin embargo, aumentó la vitrificación. En un segundo intento los brotes se colocaron en frascos de mayor capacidad (400 ml) con la misma cantidad de medio y se taparon con film de aluminio, provisto de una membrana de 10 mm de diámetro

con un enrejado de miliporo de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Luego de cuarenta y cinco días en medio líquido e incubadas a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  bajo luz a  $80\mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ , con un fotoperíodo de 16 horas, se obtuvieron hojas expandidas de un diámetro aproximado de 2,5 a 3,0 cms. A partir de éstas, se cortaron discos de 5 a 6 mm de diámetro sin nervio medio, de acuerdo al método descrito por Hirabayashi y Matsuta (1989).

CUADRO1. Composición del medio de cultivo utilizado para el cultivo *in vitro* de anteras de vid (*Vitis vinifera* L.), para inducir la formación de embriones somáticos.

Componentes	mg/l
<u>Macronutrientes</u>	
KNO <sub>3</sub>	950,0
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	185,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68,0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	720,0
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	166,0
<u>Micronutrientes</u>	
MnSO <sub>4</sub> * 4H <sub>2</sub> O	25,0
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	10,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10,0
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,25
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA * 2H <sub>2</sub> O	37,3
<u>Vitaminas</u>	
Ac. Nicotínico	5,0
Glicina	2,0
Piridoxina HCl	0,5
Tiamina HCl	0,5
Acido Fólico	0,5
<u>Otros</u>	
Myoinositol	100
Sacarosa	30.000
Agar	80.000
<u>Reguladores de crecimiento</u>	
BA	0,225
2,4-D	1,105
pH	5,7

Adicionalmente, se recolectaron directamente hojas de plantas que estaban creciendo en la colección de variedades de La Platina. Estas hojas, maduras y totalmente expandidas, se lavaron con jabón neutro para extraer el polvo adherido y posteriormente se sometieron a una esterilización superficial con Hipoclorito de Sodio comercial al 20%. Bajo una cámara de flujo laminar y con ayuda de un sacabocados, se cortaron discos de 5 mm de diámetro desde la lámina de la hoja, excluyendo el nervio medio. Los discos de hoja se "sembraron" con la cara abaxial hacia el medio, en placas petri de 5 cm de diámetro que contenía 10 ml de medio Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con 2,4-D ó 2,4,5T en combinación con las citoquininas Bencil Amino Purina (BA), N-(2-cloro4-piridil)-N'fenilurea (4-CPPU) y Tidiazuron (TDZ), según los tratamientos que aparecen en el Cuadro 2. Los explantes se incubaron en oscuridad a una temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

CUADRO 2. Tratamientos con distintas combinaciones de auxinas y citoquininas para la inducción de callo embriogénico a partir de tejido foliar de vid.

TRATAMIENTO	AUXINA	CITOQUININA
1	5 $\mu\text{M}$ 2,4-D +	5 $\mu\text{M}$ 4-CPPU
2	5 $\mu\text{M}$ 2,4-D +	5 $\mu\text{M}$ BA
3	5 $\mu\text{M}$ 2,4-D +	5 $\mu\text{M}$ TDZ
4	5 $\mu\text{M}$ 2,4,5T+	5 $\mu\text{M}$ 4-CPPU
5	5 $\mu\text{M}$ 2,4,5T+	5 $\mu\text{M}$ BA
6	5 $\mu\text{M}$ 2,4,5T+	5 $\mu\text{M}$ TDZ

Los discos de hoja se subcultivaron a los 40 días de iniciados los tratamientos, colocando la mitad de ellos en el mismo medio de cultivo y en oscuridad, a una temperatura de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La otra mitad se colocó a la misma temperatura en un medio de inducción de embriones somáticos que consistió en las sales de Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con  $1 \mu\text{M}$  de 2,4-D pero sin vitaminas, glicina y myoinositol, de bajo luz a  $80 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$  y con un fotoperíodo de 16 horas.

### **ENSAYO3: Embriogénesis somática a partir de cultivo *in vitro* de raíces.**

Se obtuvieron raíces de plantas creciendo *in vitro* cultivadas de acuerdo a la metodología ya descrita para el ensayo 1. Las raíces de estas plantas *in vitro* se cortaron en trozos de aproximadamente 1 centímetro de longitud, los que se colocaron en placas petri de 5 cm de diámetro que contenían el medio de cultivo Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con 2,4-D ó 2,4,5T en combinación con las citoquininas Bencil Amino Purina (BA), N-(2-cloro4-piridil)-N'fenilurea (4-CPPU) y Tidiazuron (TDZ), según los tratamientos señalados para el ensayo 2 (Cuadro 2). Las placas se cultivaron en oscuridad a una temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta la aparición de callo.

A los 40 días de realizados los tratamientos se colocó la mitad de los trozos de raíz en el mismo medio de cultivo y en oscuridad, a una temperatura de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La otra mitad se colocó a la misma temperatura en un medio de inducción de embriones somáticos que consistió en las sales de Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con  $1 \mu\text{M}$  de 2,4-D pero sin vitaminas, glicina y myoinositol, de bajo luz a  $80 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$  y con un fotoperíodo de 16 horas.

## PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### ENSAYO 1: Embriogénesis somática a partir del cultivo de anteras

Ensayos con medio líquido:

Las anteras colocadas en el medio de cultivo presentaron un alto porcentaje de contaminación, debido a un error en la dosificación del Hipoclorito de Sodio utilizado en la esterilización superficial de las flores. Corregido este problema, se colocaron nuevamente inflorescencias de vid a baja temperatura para su posterior cultivo (Cuadro 3).

CUADRO 3. Cultivo de anteras *in vitro* de vid en Noviembre de 1993.

Cultivar	N°de Frascos sembrados								TOTAL
	3/11	8/11	9/11	10/11	16/11	22/11	23/11	24/11	
Flame Seedless	2	2	0	0	1	2	0	1	10
Italia Pirovano	2	2	2	0	1	2	0	0	9
Moscate/Rosada	2	2	0	1	0	0	4	2	11
Perlette	4	5	0	1	0	2	0	1	13
Red Globe	3	4	1	0	2	0	3	0	13
Red Seedless	2	3	0	1	0	0	4	1	11
Ribier	2	2	2	0	2	2	1	0	11
Ruby Seedless	2	2	0	1	1	2	0	0	8
Sup. Seedless	2	5	2	0	2	0	0	0	11
Thom. Seedless	2	2	2	0	2	0	3	1	12

Los frascos se colocaron en agitador orbital (80 rpm) en oscuridad. Al repicar las anteras a medio fresco se utilizó un menor volúmen de medio por frasco, sólo 15 ml, para lograr una mayor aireación del medio, ya que a esta fecha no se

vislumbraba aún la aparición de callo, en ningun cultivar. Se continuó subcultivando las anteras a medio fresco quincenalmente, pero sólo en 'Superior Seedless', se observó la aparición de callo (Cuadro 4).

CUADRO 4. Embriogénesis somática a partir del cultivo de anteras *in vitro* en vid.

CULTIVAR	Nº Frascos				TOTAL
	Contam	Sin crec.	Filamento engrosado	Callo	
Flame Seedless	2	7	9	0	14
Italia Pirovano	3	9	6	0	12
Moscatel Rosada	4	0	17	0	13
Perlette	0	13	4	0	17
Red Globe	0	15	3	0	18
Red Seedless	3	16	1	0	14
Ribier	4	16	1	0	13
Ruby Seedless	4	8	6	0	10
Superior Seedless	1	15	0	2	16
Thompson Seedless	4	14	4	0	14

Las anteras semanalmente se cambiaron a medio fresco pero no se produjo un cambio en las respuestas. Los callos de 'Superior Seedless' se subdividieron a 4 matraces, dos de ellos se contaminaron y los dos restantes se tornaron parduzcos, sin llegar a diferenciar embriones.

En Octubre de 1994 se repitió el ensayo en medio líquido (Cuadro 5) con anteras en estado uninucleado. Nuevamente se produjeron callos, pero no embriogénesis somática. En esta ocasión se pudo apreciar que los cultivares se comportaron diferente en cuanto a la cantidad de callo producido, destacando 'Superior Seedless' (Cuadro 6).

CUADRO 5. Cantidad de frascos Erlenmeyer sembrados con anteras de vid temporada 1994.

Cultivar	Nº Frascos Erlenmeyer sembrados
Flame Seedless	4
Italia Pirovano	6
Perlette	5
Red Globe	13
Ribier	11
Superior Seedless	8
Thompson Seedless	11
TOTAL	58

CUADRO 6. Cantidad de callo producido a partir del cultivo en medio líquido de anteras de vid.

Cultivar	Cantidad de callo producido
Flame Seedless	Escaso
Italia Pirovano	Escaso
Perlette	Incipiente
Red Globe	Escaso
Ribier	Incipiente
Superior Seedless	Bastante
Thompson Seedless	Escaso

Ensayos en medio sólido:

Las anteras se repicaron a medio fresco al cumplir un mes de cultivadas. En este subcultivo se separaron las anteras que mostraban algún tipo de crecimiento y se llevaron a condiciones de luz. El resto se mantuvo en oscuridad hasta el día 4 de Febrero de 1994, en que se realizó un último recuento de su estado, eliminando las anteras que aún no habían inducido callo.

Los cultivares Flame Seedless, Red Seedless y Superior Seedless fueron los que desarrollaron mayor porcentaje de callo en relación al total de frascos cultivados. Por otra parte, 'Ribier' y 'Moscatel Rosada' no produjeron callo. (Cuadro 7).

CUADRO 7. Recuento del estado de las anteras cultivadas hasta el 4 Febrero 1994.

CULTIVAR	N° Frascos			TOTAL frascos
	Sin crec.	Filamento engrosado	Callo	
Flame Seedless	31	24	21	76
Italia Pirovano	22	17	2	41
Moscatel Rosada	24	1	0	25
Perlette	16	7	2	25
Red Globe	22	5	6	33
Red Seedless	20	25	14	50
Ribier	11	21	0	32
Ruby Seedless	22	19	4	45
Superior Seedless	17	25	22	64

Los callos se llevaron a placas petri con el mismo medio y concentración de hormonas utilizadas previamente y aún no se observa la aparición de embriones somáticos.

## **ENSAYO 2: Embriogénesis somática a partir de cultivo *in vitro* de hojas.**

Los discos de hoja de todos los cultivares colocados en medio Nitsch y Nitsch (1969) más 2,4,5T, necrosaron.

Los discos de Koshusanjaku se contaminaron en el primer repique y se perdió la totalidad del material sembrado. En ensayos preliminares realizados con esta variedad, se pudo constatar la aparición de embriones somáticos en dos discos pero se contaminaron con bacteria imposibilitando su multiplicación y regeneración.

En el momento de realizar el tercer subcultivo, se observó una fuerte contaminación debido al ataque de ácaros, resultando en la pérdida total de los tratamientos con BA y TDZ.

CUADRO 8. Número de placas con discos de hoja que se encuentran *in vitro* en medio NN suplementado con 2,4-D y 4-CPPU

Cultivar	Medio Proliferación		Medio Regeneración		Total
	Nº Placas	Nº Discos	Nº Placas	Nº Discos	
Flame Seedless	2	10	1	5	15
Italia Pirovano	4	21	3	23	44
Moscatel Rosada	4	20	2	10	30
Red Seedless	1	5	2	10	15
Ribier	10	41	6	1	42
Ruby Seedless	4	20	2	11	31
Superior Seedless	3	14	2	16	30
Thompson Seedless	7	34	4	27	61
<b>TOTAL</b>	<b>35</b>	<b>165</b>	<b>22</b>	<b>103</b>	<b>268</b>

En el ensayo en medio de Nitsch y Nitsch suplementado con 5  $\mu$ M de 2,4-D más 4-CPPU (Cuadro 8), las placas con discos de hoja formaron callo, pero hasta la fecha no se ha observado la aparición de embriones somáticos en ninguno de los cultivares estudiados.

### ENSAYO 3: Embriogénesis somática a partir cultivo *in vitro* de raíces

En el ensayo en medio de cultivo de Nitsch y Nitsch (1969) suplementado con 5 $\mu$ M de 2,4D más las citoquininas BA, TDZ y 4CPPU (Cuadro 10), las placas con trozos de raíces habían formado callo, pero no se ha observado la aparición de embriones somáticos en ninguno de los cultivares estudiados.

CUADRO 9. Número de placas con trozos de raíces *in vitro*

Cultivar	Medio Proliferación		Medio Regeneración		TOTAL NºTrozos
	Nº Placas	NºTrozos	NºPlacas	NºTrozos	
Flame Seedless	3	17	0	0	17
Italia Pirovano	9	25	1	6	31
Moscatel Rosada	6	15	1	4	19
Red Globe	6	14	1	5	19
Red Seedless	1	2	0	0	2
Ribier	5	13	0	0	13
Ruby Seedless	5	11	1	4	15
Perlette	5	10	1	4	14
Thompson Seedless	2	4	0	0	4
TOTAL	42	111	5	23	134

CUADRO 10. Número de placas con trozos de raíces colocadas *in vitro*, según los distintos tratamientos utilizados.

Cultivar	Medio Proliferación			TOTAL
	2,4-D+BA Nº Placas	2,4-D+TDZ NºPlacas	2,4-D+4CPPU NºPlacas	NºPlacas
Flame Seedless	2	2	2	6
Italia Pirovano	2	2	2	6
Moscatel Rosada	1	1	1	3
Red Globe	1	1	1	3
Red Seedless	2	2	2	6
Ribier	7	7	7	21
Ruby Seedless	1	1	1	3
Perlette	3	3	3	9
Superior Seedless	1	2	1	4
Thompson Seedless	1	1	1	3
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>21</b>	<b>64</b>

Hasta Septiembre de 1995 ningún tratamiento ni cultivar produjo embriones somáticos.

## RESUMEN

Con el propósito de inducir callo embriogénico y embriones somáticos se realizaron varios ensayos utilizando como explantes de anteras, tejido foliar y tejido radicular de los cultivares de uva de mesa Flame Seedless, Italia Pirovano, Moscatel Rosada, Perlette, Red Globe, Red Seedless, Ribier, Ruby Seedless, Superior Seedless, Thompson Seedless y Kojusanjaku. Los explantes se colocaron en medio Nitsch y Nitsch (1969) líquido y sólido, suplementado con  $5\mu\text{M}$  de 2,4-D y  $5\mu\text{M}$  de BA en el caso de las anteras y con las auxinas  $5\mu\text{M}$  2,4-D y 2,4,5T mas  $5\mu\text{M}$  de las citoquininas BA, TDZ y 4-PPU, en los tratamientos con tejido foliar y radicular, todos los tratamientos se incubaron en oscuridad y a  $26^{\circ}\text{C}$ . Ningún cultivar ni ninguno de los tratamientos realizados produjo embriones somáticos.

## SUMMARY

With the aim to produce embriogenic callus and somatic embriogenesis some essays were done using anthers, leaf and root tissue from ten grape cultivars Flame Seedless, Italia Pirovano, Moscatel Rosada, Perlette, Red Globe, Red Seedless, Ribier, Ruby Seedless, Thompson Seedless and Superior Seedless. The explants were cultivated in liquid and solid Nitsch and Nitsch medium supplemented with  $5\mu\text{M}$  2,4-D and  $5\mu\text{M}$  BA in the anthers culture with  $5\mu\text{M}$  of the auxins 2,4-D and 2,4,5-T plus the citoquinines BA, TDZ and 4-PPU in the leaf and root tissue. The cultures were kept in darkness under  $26^{\circ}\text{C}$ . Nor cultivar or treatment used produced embriogenic callus nor somatic embriogenesis.

## REFERENCIAS

FAO/IAEA. 1977. Manual on Mutation Breeding. 2e. International Atomic Energy Agency, Vienna. 288p.

HIRABAYASHI, T. and MATSUTA, N. 1989. Embryogenic cell lines from somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell Report 7: 684-687.

MATSUTA, N. 1992. Effect of auxin on somatic embryogenesis from leaf callus in grape (*Vitis* spp.). Japan J. Breed. 42 (4): 879-883.

NITSCH, J.P. and NITSCH, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163:85-87.

OSUGA, K. and KOMAMINE, A. 1994. Synchronization of somatic embryogenesis from carrot cells at high frequency as a basis for the mass production of embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39: 125-135.

RAJASEKARAN, K. and MULLINS, M.G. 1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. Journal of Experimental Botany 30(116):399-407.

RAJASEKARAN, K. and MULLINS, M.G. 1983. Influence of genotype and sex-expression on formation of plantlets by cultured anthers of grapevines. Agronomie 3(3): 233-238.

REINERT, J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. Naturwissenschaft. 45: 344-345.

ROBACKER, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from Muscadine grape leaf explants. HortScience 28(1):53-55.

STAMP, J.A. and MEREDITH. 1988. Somatic Embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. Scientia Horticulturae, 35: 235-250.

STEWART, F.C., MAPES, M.O., and MEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am. J. Bot. 45: 705-708.

ZIMNY, J AND LORZ, H. 1986. Plant regeneration and initiation of cell suspension from root-tip derived callus of *Oryza sativa* L. Plant Cell Rep. 5:89-92.

<sup>D</sup>  
DETERMINACIÓN DE LAS DOSIS ÓPTIMAS DE ETIL METANO SULFONATO (EMS) Y X  
AZIDA SÓDICA ( $\text{NaN}_3$ ) PARA LA MUTAGENESIS *IN VITRO* DE VIDES DE MESA.

## INTRODUCCIÓN

Cambio a Reschwo?  
 $\text{NaN}_3$  por DES  
diethylsulfate

El uso de la mutagénesis inducida *in vitro* presenta varias ventajas como método para mejorar variedades. En primer lugar, existe la posibilidad de cambiar sólo un carácter de una buena variedad sin alterar demasiado el genotipo de ésta (Pierik, 1990). Además, la técnica es rápida, si se la compara con otros métodos de mejoramiento genético. Las técnicas de cultivo *in vitro*, por otro lado, potencian las técnicas mutagénicas, ya que minimizan las posibilidades de obtener quimeras, debido a que la mayoría de los procesos de organogénesis que ocurren *in vitro* lo hacen a partir de una sola célula (Broertjes y Van Harten, 1988).

Se ha estimado que la mutagénesis puede ser muy útil, particularmente si se mutagenizan variedades semilladas con el objeto de inducir la apirenia. Diversos estudios similares han demostrado, por ejemplo, que en uva de mesa se pueden obtener mutaciones valiosas para mejoramiento genético, como las realizadas por Braditescu *et al.*, (1987) quienes obtuvieron en el cultivar 'Galbeona de Odobesti', un mutante con mayor resistencia a *Botrytis cinerea*.

El presente trabajo tiene por objetivo determinar las dosis y los tiempos adecuados de exposición de estacas de vid *in vitro* a los mutágenos Etil Metano Sulfonato (EMS,  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$ ) y Azida Sódica ( $\text{NaN}_3$ ), determinar la capacidad regenerativa de los tejidos o células mutagenizadas y establecer técnicas de aclimatación que permitan obtener un número adecuado de plantas a partir de las cuales se puedan seleccionar caracteres de interés.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La determinación de las dosis óptimas de los mutágenos químicos Etil Metano Sulfonato (EMS) y Azida Sódica ( $\text{NaN}_3$ ), se realizaron mediante el protocolo utilizado para suspensiones celulares por Sung (1976).

*existe o no un protocolo que permita desarrollo y la técnica.*

Para este ensayo se utilizaron 4 cultivares de uva de mesa, 2 semilladas ('Moscatel Rosada' y 'Ribier') y 2 sin semilla ('Red Seedless' y 'Ruby Seedless').

De estos 4 cultivares, que ya estaban establecidos *in vitro*, se prepararon microestacas de una yema, las que se colocaron por 2 horas en soluciones con distintas concentraciones de los mutágenos (0,32 M, 0,16 M, 0,08 M, 0,04 M, 0,008 M, 0 M para EMS y 0,008 M, 0,004 M, 0,002 M, 0,001 M, 0,0005 M, 0 M para  $\text{NaN}_3$ ).

La preparación de las soluciones mutagénicas se hizo bajo una cámara de flujo laminar, utilizando como solvente el medio nutritivo de Murashige y Skoog (1962) sin hormonas. Las soluciones fueron esterilizadas mediante filtración, utilizando filtros estériles de  $0,2 \mu\text{m}$  (Minisart NML, Sartorius) y jeringas estériles de 5 ml.

Los brotes se colocaron en las soluciones mutagénicas bajo la misma cámara de flujo laminar. Como los agentes alquilantes (EMS) son muy reactivos e incluso pueden reaccionar con el agua (hidrólisis), las soluciones de Etil Metano Sulfonato se prepararon al momento de ser utilizadas y no se almacenaron (Brunner, 1983). Una vez utilizadas, las soluciones mutagénicas fueron neutralizadas con Bicarbonato de Sodio en el caso de Etil Metano Sulfonato y con Nitrato de Amonio en Azida Sódica, previo a ser eliminadas (FAO/IAEA, 1977).

Quince micro estacas por variedad y dosis se colocaron en tubos de ensayo de 60 ml de capacidad, que contenían 15 ml de las distintas soluciones mutagénicas. Luego, los frascos con las microestacas y el mutágeno se llevaron a un agitador rotativo por 2 horas. Al cabo de este período, las microestacas se enjuagaron con agua destilada estéril y luego se "sembraron" en frascos de 40 ml de capacidad que contenían 10 ml del medio de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 30 g/l de Sacarosa, 1 mg/l de Bencil Amino Purina (BA) y solidificado con Agar (Cuadro 1). Los frascos se taparon con film de aluminio.

Las estacas se incubaron en cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C bajo una irradiación de  $80 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$  y un fotoperíodo de 16 horas. Cada 45 días, los brotes surgidos de las yemas axilares de las estacas, se traspasaron a medio fresco hasta lograr un adecuado número y tamaño de brotes.

Semanalmente se evaluó la brotación de las microestacas y, transcurridas 6 semanas, se determinó la proliferación de brotes. Estos datos se sometieron a un análisis de varianza con regresión lineal para la determinación de la dosis óptima del mutágeno, mediante el cálculo de las dosis letales que afectaron al 30 y 50 % de los explantes ( $\text{LD}_{30}$  y  $\text{LD}_{50}$ ), dosis generalmente determinadas como óptimas para trabajos con mutagénesis inducida (Sonnino *et al*, 1986; Sharma y Majumdar, 1988).

Una vez que los brotes alcanzaron un tamaño de 4-5 nudos, se subdividieron en altura en estacas de una yema. Posteriormente, al alcanzar nuevamente 4-5 cms de altura, se llevaron a medio de enraizamiento (Cuadro 1). Luego, fueron sometidos a una preaclimatación que consistió en agregar 10 ml de agua destilada estéril a los frascos y taparlos con papel filtro Watman N° 1. Una vez

que se observó la emergencia de 2 hojas adicionales, las plántulas se trasladaron a contenedores con tierra de hoja, regándolas semanalmente con una solución nutritiva equivalente a la de Murashige y Skoog, pero sin vitaminas y que contenía sólo 1/4 de la concentración normal de macronutrientes.

CUADRO 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento del cultivo *in vitro* y enraizamiento de vides (*Vitis vinifera* L.).

Componente	Proliferacion mg/l	Enraizamiento mg/l
<u>Macronutrientes</u>		
KNO <sub>3</sub>	1900	475,0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	92,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	42,5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	412,5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	110,0
<u>Micronutrientes</u>		
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,3	5,575
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6	2,15
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	1,55
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,006
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,063
KI	0,83	0,208
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,006
<u>Fierro</u>		
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8	6,95
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37,3	9,325
<u>Vitaminas</u>		
Ac. Nicotínico	0,5	0,125
Glicina	2,0	0,5
Piridoxina HCl	0,5	0,125
Tiamina HCl	0,1	0,025
<u>Otros</u>		
Myoinositol	100	25
Sacarosa	30000	30000
Agar	7000	7000
<u>Reguladores de crecimiento</u>		
BA	1,00	-
IAA-K	-	0,03
pH	5,8	5,8

## PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El presente ensayo de dosimetría permitió la determinación de las dosis óptimas de los mutágenos químicos Etil Metano Sulfonato (EMS) y Azida Sódica ( $\text{NaN}_3$ ) a través de la evaluación semanal de la brotación y proliferación de brotes a partir de microestacas de 4 cultivares de vid cultivados *in vitro*.

### Etil Metano Sulfonato

En el Cuadro 2, se presentan los resultados de los distintos tratamientos en el tiempo. Se observa que, en general, al aumentar la dosis del mutágeno, disminuye el porcentaje de brotación. Por otra parte, si se observa la evolución del porcentaje de brotación en el tiempo, se ve que en general, este aumenta y luego se estabiliza dependiendo de la dosis utilizada.

La dosis 0,32 M fue letal para 'Ribier' y 'Red Seedless'. En 'Ruby Seedless' y 'Moscatel Rosada', esta dosis, a pesar de no ser letal, afectó fuertemente la brotación, obteniéndose niveles inferiores a 16%. La menor de las dosis utilizadas (0,008 M) no tuvo efecto en disminuir el porcentaje de brotación ni en el número de brotes emitidos por los explantes.

En el Cuadro 3 se presenta la proliferación de brotes a las seis semanas de tratamiento. En él se aprecia que al aumentar la dosis de mutágeno, disminuye la proliferación de brotes en todos los cultivares. Esto concuerda con lo observado por Kim *et al.* (1989), quienes aplicaron EMS (0,1-2,0%) o Etionina (1-10 mM) en vides 'Muscat Bailey A', 'Riesling' y 'S 9110' y también observaron una disminución en la proliferación de los brotes en comparación con testigos no tratados.

CUADRO 2. Evolución del porcentaje de brotación en vides tratadas por 2 hrs. con distintas dosis de Etil Metano Sulfonato (EMS) y cultivadas *in vitro* durante seis semanas después del tratamiento.

Cultivar	Dosis (Molar)	Porcentaje de brotación					
		Fecha 6/5	13/5	20/5	27/5	3/6	10/6
Ribier	0,320	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0,160	0,0	28,6	35,7	57,1	57,1	57,1
	0,080	26,6	85,7	92,9	92,9	92,3	92,3
	0,040	18,8	68,8	70,6	88,2	88,2	88,2
	0,008	80,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,000	63,2	89,5	89,5	100,0	100,0	100,0
Ruby Seedless	0,320	0,0	0,0	6,3	6,3	6,3	6,3
	0,160	12,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
	0,080	23,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,040	26,6	93,3	93,3	100,0	100,0	100,0
	0,008	75,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,000	66,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Red Seedless	0,320	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0,160	0,0	84,6	84,6	84,6	84,6	84,6
	0,080	42,9	78,6	78,6	85,7	85,7	85,7
	0,040	53,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,008	53,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,000	50,0	88,9	88,9	88,9	88,9	88,9
Moscatel Rosada	0,320	0,0	0,0	7,1	15,4	15,4	15,4
	0,160	0,0	53,3	80,0	80,0	80,0	80,0
	0,080	26,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,040	40,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,008	45,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,000	75,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

CUADRO 3. Número de brotes por yema axilar, en vides tratadas por 2 hrs. con distintas dosis de Etil Metano Sulfonato (EMS) y cultivadas *in vitro* luego de seis semanas de realizado el tratamiento mutagénico.

Cultivar	Dosis (Molar)	Proliferación (brotes/explante)
Ribier	0,320	0,0
	0,160	1,6
	0,080	1,6
	0,040	2,4
	0,008	4,4
	0,000	3,1
Ruby Seedless	0,320	0,0
	0,160	1,7
	0,080	1,2
	0,040	1,7
	0,008	4,6
	0,000	5,8
Red Seedless	0,320	0,0
	0,160	1,3
	0,080	2,0
	0,040	2,6
	0,008	3,5
	0,000	3,8
Moscatel Rosada	0,320	0,0
	0,160	0,0
	0,080	2,0
	0,040	2,7
	0,008	2,5
	0,000	3,2

Tal como se aprecia en el Cuadro 3, el cultivar que mostró la mayor tasa de proliferación fue 'Ruby Seedless', en tanto que 'Moscatel Rosada' y 'Ribier' presentaron las tasas más bajas.

Las dosis letales para el 30 y 50 % de los explantes (LD<sub>30</sub> y LD<sub>50</sub>) se presentan en el Cuadro 4. Ellas fueron calculadas sobre la base de las ecuaciones de regresión lineal que allí se presentan. En las cuatro variedades, la dosis LD<sub>30</sub> osciló entre 0,11 y 0,15M, en tanto que la dosis LD<sub>50</sub> varió entre 0,17 y 0,22 Molar. Por otra parte, el índice de correlación entre los valores de brotación y la recta asociada ( $r^2$ ) fue cercana al 90% en todos los cultivares analizados. Los valores LD<sub>50</sub> fueron bastante similares entre cultivares, de modo que se determinó que para futuros trabajos de tratamientos masivos, se utilizará una dosis de 0,2 M. Esta dosis es similar a la obtenida en ensayos de dosimetría con EMS realizados por Sharma y Majumdar (1988) en Mango, donde la dosis LD<sub>50</sub> fue de 0,12 M.

*Existe un protocolo*

CUADRO 4. Dosis LD<sub>30</sub> y LD<sub>50</sub>, ecuación de regresión e índice de correlación obtenidos por cultivar.

Cultivar	Dosis LD <sub>30</sub> (Molar)	Dosis LD <sub>50</sub> (Molar)	Ecuación de regresión	r <sup>2</sup>
Ribier	0,11	0,17	y=1,052-0,25x	0,98
Ruby Seedless	0,13	0,19	y=1,065-0,23x	0,91
Red Seedless	0,12	0,20	y=1,056-0,23x	0,84
Moscatel Rosada	0,15	0,22	y=1,093-0,21x	0,90
Promedio	0,13	0,20		

En julio de 1995 se realizó un tratamiento masivo con EMS utilizando las dosis

promedio de LD<sub>30</sub> y LD<sub>50</sub> (Cuadro 5). Estas plantas se encuentran aún en cámara de crecimiento.

CUADRO 5. Tratamiento masivo de microestacas *in vitro* de vid con las dosis LD<sub>30</sub> y LD<sub>50</sub>.

Cultivar	Nºestacas tratadas con dosis LD <sub>30</sub> .	Nºestacas tratadas con dosis LD <sub>50</sub> .
Flame Seedless	---	137
Italia Pirovano	112	13
Moscatel Rosada	179	70
Perlette	71	---
Red Globe	71	17
Red Seedless	---	62
Ribier	180	216
Ruby Seedless	---	86
Superior Seedless	---	88
Thompson Seedless	---	11
TOTAL	613	700

**Azida Sódica.**

En el Cuadro 6 se presentan los resultados de los distintos tratamientos con Azida Sódica ( $\text{NaN}_3$ ) en el tiempo. En él se observa que, al igual que con Etil Metano Sulfonato (EMS), al aumentar la dosis de mutágeno disminuye el porcentaje de brotación. Por otra parte, el porcentaje de brotación en el tiempo aumenta para luego estabilizarse dependiendo de la dosis utilizada.

A diferencia de lo observado con Etil Metano Sulfonato, la mayor dosis de Azida Sódica (0,008 M) no fue letal para ningún cultivar. Sin embargo, el comportamiento de los 4 cultivares fue similar al del tratamiento con EMS, ya que 'Ribier' y 'Red Seedless' presentaron también los niveles más bajos de brotación (12,5 y 13,3% respectivamente con Azida Sódica y 0% ambos con EMS), seguidos por 'Ruby Seedless' (37,5% con Azida Sódica y 6,3% con EMS) y finalmente 'Moscatel Rosada', que presentó los mayores niveles de brotación con ambos mutágenos (75% con Azida Sódica y 15,4% con EMS).

CUADRO 6 Evolución del porcentaje de brotación en vides tratadas por 2 hrs. con distintas dosis de Azida Sódica ( $\text{NaN}_3$ ) y cultivadas *in vitro* durante seis semanas después del tratamiento.

Cultivar	Dosis (Molar)	Porcentaje de brotación Fecha					
		17/8	24/8	31/8	7/9	14/9	21/9
Ribier	0,0080	6,2	6,2	6,2	12,5	12,5	12,5
	0,0040	6,2	12,5	25,0	25,0	25,0	25,0
	0,0020	25,0	43,7	50,0	50,0	50,0	50,0
	0,0010	23,0	53,8	53,8	53,8	53,8	53,8
	0,0005	31,0	62,5	81,2	87,5	87,5	93,7
	0,0000	75,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Ruby Seedless	0,0080	6,2	6,2	25,0	37,5	37,5	37,5
	0,0040	18,7	37,5	50,0	62,5	62,5	62,5
	0,0020	46,6	60,0	66,6	73,3	73,3	73,3
	0,0010	56,2	93,7	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,0005	66,6	93,3	93,3	93,3	93,0	93,3
	0,0000	86,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Red Seedless	0,0080	0,0	0,0	0,0	13,3	13,3	13,3
	0,0040	20,0	33,3	33,3	33,3	33,3	33,3
	0,0020	20,0	46,6	53,3	53,3	53,3	53,3
	0,0010	53,3	73,3	80,0	86,6	86,6	93,3
	0,0005	60,0	73,3	73,3	73,3	73,3	73,3
	0,0000	46,6	93,3	93,3	100,0	100,0	100,0
Moscatel Rosada	0,0080	0,0	25,0	62,5	75,0	75,0	75,0
	0,0040	31,2	87,5	93,7	93,7	93,7	93,7
	0,0020	62,5	93,7	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,0010	81,2	87,5	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,0005	83,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,0000	81,2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

En el Cuadro 7 se presenta la proliferación de brotes a las seis semanas de tratamiento. En él se aprecia que, al igual que con Etil Metano Sulfonato, al aumentar la dosis de Azida Sódica, disminuye la proliferación de brotes en todos los cultivares. El cultivar 'Ruby Seedless' fue nuevamente el que presentó la mayor tasa de proliferación, mas es 'Red Seedless', en esta ocasión, el que presentó la tasa más baja.

La dosis letal para el 30 y 50% de los explantes ( $LD_{30}$  y  $LD_{50}$ ) se presenta en el Cuadro 8. En él se observa que dicha dosis no es la misma para todos los cultivares, como en el caso del tratamiento con Etil Metano Sulfonato. Con Azida Sódica, 'Ribier' y 'Red Seedless' presentaron una dosis  $LD_{50}$  de 0,003 Molar, mientras que en 'Ruby Seedless' esta dosis se elevó a 0,006 Molar. En 'Moscatel Rosada', la dosis  $LD_{50}$  se estimó por la extrapolación realizada en el análisis de regresión lineal utilizado y fue de 0,16 Molar, dosis que no fue empleada en el ensayo.

Las microestacas utilizadas para la dosimetría de los mutágenos Azida Sódica ( $NaN_3$ ) y Etil Metano Sulfonato (EMS), se subcultivaron y subdividieron en altura en estacas de una yema. En la actualidad se cuenta con plantas en distintas etapas de crecimiento, enraizamiento, en fase de pre aclimatación en cámara de cultivo y con plantas en aclimatación en invernadero (Cuadros 9 y 10).

CUADRO 7. Número de brotes por yema axilar, en vides tratadas por 2 hrs. con distintas dosis Azida Sódica ( $\text{NaN}_3$ ) y cultivadas *in vitro* luego de seis semanas de realizado el tratamiento mutagénico.

Cultivar	Dosis (Molar)	Proliferación (brotes/explante)
Ribier	0,0080	0,1
	0,0040	0,4
	0,0020	0,8
	0,0010	0,9
	0,0005	1,8
	0,0000	2,4
Ruby Seedless	0,0080	1,1
	0,0040	1,9
	0,0020	2,0
	0,0010	4,0
	0,0005	2,8
	0,0000	3,3
Red Seedless	0,0080	0,3
	0,0040	0,9
	0,0020	1,3
	0,0010	2,5
	0,0005	1,6
	0,0000	1,8
Moscatel Rosada	0,0080	1,0
	0,0040	1,4
	0,0020	2,3
	0,0010	2,7
	0,0005	2,8
	0,0000	2,1

CUADRO 8. Dosis LD<sub>50</sub>, ecuación de regresión e índice de correlación obtenidos por cultivar para Azida Sódica.

Cultivar	Dosis LD <sub>30</sub> (Molar)	Dosis LD <sub>50</sub> (Molar)	Ecuación de regresión	r <sup>2</sup>
Ribier	0,0012	0,003	y=0,82-102,84x	0,76
Ruby Seedless	0,0030	0,006	y=0,98- 80,12x	0,93
Red Seedless	0,0017	0,003	y=0,88-104,08x	0,84
Moscatel Rosada	0,0100	0,016	y=1,03- 31,91x	0,91

CUADRO 9. Existencia de plantas mutagenizadas con distintas dosis de EMS según las etapas de desarrollo.

Cultivar	Dosis (Molar)	Crec.	Enraizam. (N° de plántulas)	Pre-Aclimat.	Aclimat.	Total
Moscatel Rosada	0.008	46	4	5	-	55
	0.040	31	10	8	-	49
	0.080	57	2	-	-	59
	0.160	83	1	-	-	84
	0.320	1	-	-	-	1
Red Seedless	0.008	1	-	3	-	4
	0.040	10	-	1	-	11
	0.080	9	-	1	-	10
	0.320	142	3	2	-	147
Ruby Seedless	0.008	2	-	5	11	18
	0.040	2	-	-	3	5
	0.080	2	-	-	2	4
	0.320	4	-	-	-	4
Ribier	0.008	4	1	12	2	19
	0.040	4	-	4	2	10
	0.080	1	-	2	-	3
	0.320	1	-	-	-	1
TOTAL		400	21	43	20	484

CUADRO 10. Existencia de plantas mutagenizadas con distintas dosis de  $\text{NaN}_3$ , según etapa de desarrollo.

cultivar	Dosis (Molar)	Crec.	Enraizam. (Nº de plántulas)	Pre-aclimat.	Total
MoscatelRosada	0.0005	18	-	5	23
	0.0010	22	2	5	29
	0.0020	23	5	11	39
	0.0040	30	1	1	32
	0.0080	11	2	3	16
Red Seedless	0.0005	6	4	1	11
	0.0010	36	1	5	42
	0.0020	12	-	1	13
	0.0040	5	1	1	7
	0.0080	--	-	-	-
Ruby Seedless	0.0005	46	7	1	54
	0.0010	24	14	4	42
	0.0020	24	10	1	35
	0.0040	12	1	-	13
	0.0080	4	-	1	5
Ribier	0.0005	8	7	12	27
	0.0010	7	2	8	17
	0.0020	15	4	1	20
	0.0040	4	3	1	8
	0.0080	3	-	1	4
TOTAL		310	64	63	437

La segunda etapa de este ensayo se realizará en el campo, ahí se evaluarán las mutaciones obtenidas y la persistencia de éstas en el tiempo.

## RESUMEN

Se realizó un ensayo utilizando los cultivares de uva de mesa 'Moscatel Rosada', 'Ribier', 'Red Seedless' y 'Ruby Seedless', establecidos *in vitro*, para determinar las dosis óptimas de los mutágenos químicos Etil Metano Sulfonato (EMS) y Azida Sódica ( $\text{NaN}_3$ ) establecidos *in vitro*. Para tal efecto, se prepararon microestacas de una yema y se colocaron por 2 hrs. en soluciones con distintas concentraciones de EMS (0,32 M, 0,16 M, 0,08 M, 0,04 M, 0,008 M y 0 M) y Azida Sódica (0,008 M, 0,004 M, 0,002 M, 0,001 M, 0,0005 M y 0 M). Posteriormente se trasladaron a cámara de crecimiento, donde semanalmente se evaluó la brotación y se contó el número de brotes emitidos por los explantes. Para EMS, el valor  $\text{LD}_{30}$  varió entre 0,11 y 0,15M, en tanto que el  $\text{LD}_{50}$  osciló entre 0,17 y 0,22 M en todos los cultivares, observándose que la dosis 0,32 M fue letal para 'Ribier' y 'Red Seedless', en cambio, en 'Ruby Seedless' y 'Moscatel Rosada', aunque no resultó letal, se observó menos de 16 % de brotación. La menor de las dosis utilizadas (0,008 M) no tuvo efecto sobre el porcentaje de brotación ni sobre el número de brotes emitidos por los explantes. Con Azida Sódica, el  $\text{LD}_{50}$  no fue similar para todos los cultivares (0,003 M para 'Ribier' y 'Red Seedless', 0,006 M para 'Ruby Seedless' y 0,016 M para 'Moscatel Rosada') y la mayor de las dosis (0,008 M), no fue letal para ningún cultivar.

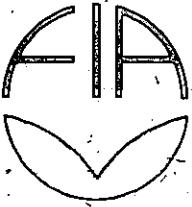
## SUMMARY

In order to determine the optimal dose for *in vitro* mutagenesis of 'Moscatel Rosada', 'Red Seedless', 'Ribier' and 'Ruby Seedless' grape cultivars, 1-bud microcuttings were cultured for 2 hours in 0,32; 0,16; 0,08; 0,04; 0,008 and 0 Molar concentration of EMS and 0,008; 0,004; 0,002; 0,001; 0,0005 and 0 Molar concentration of Sodium Azide. After treatment, microcuttings were incubated for 60 days and weekly evaluated for sprouting. For EMS LD<sub>50</sub> varied from 0,17 - 0,22 and LD<sub>30</sub> from 0,11 to 0,15 for all cultivars with the highest concentration being totally lethal only for 'Ribier' and 'Red Seedless', whereas in 'Ruby Seedless' and 'Moscatel Rosada' there was a 16 % sprouting. The lower dose (0,008 M) did not decreased sprout number or % sprouting in any of the tested cultivars. With Sodium Azide, LD<sub>50</sub> and LD<sub>30</sub> values were not similar between cultivars (LD<sub>50</sub> 0,003 M for 'Ribier' and 'Red Seedless', 0,006 M for 'Ruby Seedless' and 0,016 M for 'Moscatel Rosada') and the highest dose used was not lethal for any cultivar.

## REFERENCIAS

- BADITESCU, D; BRANDUSA, E. e IONESCU, M. 1987. Aspects of the use of somatic mutagenesis in improving grape vines. Plant Breeding Abstracts 1987. 057-06463 (Resumen).
- BARLASS, M. y SKENE, K.G.M. 1978. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. Vitis 17:1335-1340.
- BROETJES, C. y VAN HARTEN, A. M. 1988. Applied mutation breeding for vegetative propagated crops. Elsevier Scientific Publishing Company Inc. New York, U.S.A. 345p.
- BRUNNER, H. 1983. Methods of induction of mutations. International Atomic Energy Agency Seibersdorf Laboratory, Austria. 70p.
- FAO/IAEA. 1977. Manual on Mutation Breeding. 2e. International Atomic Energy Agency, Vienna. 288p.
- KIM, S.K; HWANG, J.K, KO, K.C. y LEE, Y.I. 1989. *in vitro* growth and mutagenesis of grape shoot tips as affected by chemical and physical mutagens. Horticultural Abstracts 1989. 059-089 (Resumen).
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15:473-497.
- SHARMA, D.K. and MAJUMBAR, P.K. 1988. Induction of variability in Mango through physical and chemical mutagens. Acta Horticulturae 231. 112-116.
- SONNINO, A., ANCORA, G. and LOCARDI, C. 1986. *In vitro* mutation breeding of potato. Research paper N°. 91 of the Divisione Tecnologie Agrarie of ENEA.
- SUNG, Z.R. 1976. Mutagenesis of cultured plant cells. Genetics 84: 51-57.
- PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 326p.





MINISTERIO DE AGRICULTURA  
FUNDACIÓN FONDO DE INVESTIGACION AGROPECUARIA

MEMORANDUM INTERNO 008

DE Sr. Antonio Corvalán M.  
Vicepresidente

Fecha : 12.02.96

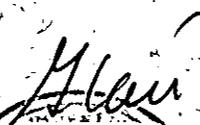
A Sr. Pablo Lailhacar M.  
Supervisor de Proyecto

Con fecha 09.02.96, ha ingresado al FIA el Informe final del proyecto de investigación, registrado por FIA bajo el N° 011/92, denominado: **"Mutagénesis inducida in vitro, como método de obtención de variedades mejoradas de uva de mesa"**.

Ruego a usted proceder, a la brevedad, a su revisión en base a la propuesta aprobada por el Consejo Directivo del FIA.

El Convenio entre el FIA y la Unidad Ejecutora, establece un plazo máximo de 60 días para la aprobación de estos Informes, por lo tanto, la fecha límite para la entrega de su revisión a la Secretaría del FIA, corresponde al 09.04.96.

Le saluda atentamente,

  
Vicepresidente



maa.



N° 542 /

Santiago, 03 FEB 1996

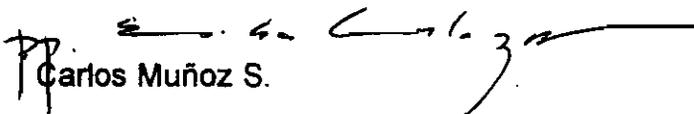
Señora  
Margarita D'Etigny  
Secretaria Ejecutiva  
Fundación Fondo de Investigación Agropecuaria  
Presente

De mi consideración:

Sírvase encontrar adjunto informe final del proyecto de investigación N° 011-92 titulado Mutagénesis Inducida in vitro como método de obtención de variedades mejoradas de uva de mesa.

Dicho informe debió ser entregado con fecha 29 de Septiembre de 1995, sin embargo, debido al recargo de actividades que debí realizar a fines del año pasado olvidé este compromiso a pesar de que la parte experimental del proyecto estaba totalmente concluida a fines de Agosto. Ruego a Ud. disculpe las inconveniencias que este retraso puede haberle ocasionado, pero le garantizo que el trabajo realizado ha sido acucioso y nos permitirá avanzar decididamente en nuestro programa de mejoramiento genético de uva de mesa.

Atentamente,

  
Carlos Muñoz S.

