**Propagación clonal de dos cultivares adultos de vid (*Vitis vinifera* L.) para su conservación *in vitro***

**Clonal propagation of two adult grapevines cultivars (*Vitis vinifera* L.) for *in vitro* conservation**

**Resumen:**

La propagación *in vitro* de dos cultivares de vid (*Vitis vinifera* L.), Cabernet Sauvignon y Merlot, se inició utilizando yemas axilares y meristemos como fuente de explante, estos se establecieron en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) más 6-bencilaminopurina (BAP) al 0.5, 1.0 y 1.5 mg L-1. Las variables evaluadas fueron: número y longitud de brotes. La mayor respuesta se presentó con 1.0 mg L-1 de BAP en ambos explantes. Para la etapa de multiplicación de brotes y enraizamiento fueron subcultivados los explantes en medio de cultivo MS al 50 y 100% adicionados con 0.5 y 1.0 mg L-1 de BAP, más 0.5 mg L-1 ácido indol-3-butírico (AIB) y vitaminas. La mejor respuesta para número de brotes fue de 6.37, mientras que para longitud de brotes de 2.72 cm, ambos en el medio MS al 50% con 1.0 mg L.1 de BAP. Los valores más altos obtenidos para número y longitud de raíces fueron en el medio MS al 50% adicionado con 0.5 mg L-1 de BAP donde se obtuvo el 100% de enraizamiento en ambos cultivares.

Palabra clave: Micropropagación, Cabernet Sauvignon, Merlot.

**Abstract:**

The *in vitro* propagation of two cultivars of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Cabernet Sauvignon and Merlot, began using axillary buds and meristems as explants source, these were established in Murashige and Soog (MS) medium plus 6-benzylamino purine (BAP) at 0.5, 1.0 and 1.5 mg L-1. The variables evaluated were number and length of buds. The greatest response was provided with 1.0 mg L-1 of BAP in both explants. For multiplication and shoot rooting, explants were subcultured on MS medium at 50 and 100% and added with 0.5 and 1.0 mg L-1, 0.5 mg L-1 indolebutyric acid (IBA) and vitamins. The best response for bud numbers was 6.37, while for shoot length 2.72 cm, both in the MS medium at 50% with 1.0 mg L-1 of BAP. The highest value obtained for number and length of roots was in MS medium at 50% with 0.5 mg L-1 BAP that obtained 100% rooting in both cultivars.

Keywords: Micropropagation, Cabernet Sauvignon, Merlot.

**Introducción**

El cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.), es uno de los cultivos más antiguos y de mayor importancia económica (Borja-Bravo et al., 2016). En el 2014 se cultivaron más de 7.5 millones de hectáreas de vid en el mundo, obteniendo más de 271 millones de hectolitros para la producción de vinos(OIV, 2014). México es uno de los centros de origen del género *Vitis*, albergando gran diversidad de especies, las cuales presentan amplia distribución, desde zonas cálidas hasta templadas, en altitudes de 120 a 2500 msnm (Jiménez-Martínez et al., 2013). La vid se cultiva en 19 estados de la República, siendo Sonora el principal productor, con 76.2% de la producción total nacional; otros estados son Zacatecas, Baja California Norte, Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí y Nuevo León (SAGARPA, 2016).

Considerando la superficie plantada a nivel mundial, se ha incluido en bancos de germoplasma para mantener la diversidad genética necesaria para programas de fitomejoramiento (Schuck et al., 2011), estas plantas *elite* pueden ser resguardadas a corto, mediano y largo plazo como material libre de patógenos (Engelmann, 2011).

Por la importancia antes mencionada, se recomienda hacer uso de métodos biotecnológicos como el cultivo de tejidos vegetales, que se utiliza como herramienta exitosa en diversos países del mundo y que han logrado desplazar los sistemas tradicionales de producción de plántulas como la propagación por sarmiento (Melyan et al., 2015).

Las investigaciones realizadas con cultivares de vid para consumo de mesa o para la elaboración de vinos han permitido definir medios y condiciones de cultivo estándares para la propagación *in vitro* (Melyan et al., 2015); los factores que suelen estar relacionados con la respuesta puede ser la variedad utilizada (Hewstone et al., 2006), tipo de poda (Ponce et al., 2009), el genotipo y medio de cultivo (Valdez, 2005), y los reguladores de crecimiento vegetal (Nookaraju et al., 2008).

La conservación *in vitro* consiste en el cultivo de plantas o explantes, obtenidos mediante micropropagación en condiciones de asepsia que son mantenidos en condiciones controladas en cámaras de cultivo. Sin embargo, es importante regenerar frecuentemente la colección mantenida *in vitro* para evitar el envejecimiento fisiológico del material vegetal (Cubero, 2013).

Por los factores expuestos anteriormente, el objetivo de esta investigación fue evaluar la concentración del medio de cultivo y BAP, que permitan la propagación clonal de brotes *in vitro* en dos cultivares adultos de vid (*Vitis vinifera* L.) “Cabernet Sauvignon” y “Merlot” para su conservación.

**Materiales y Métodos**

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Unidad Marín, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, durante 2015. El material vegetal utilizado se recolectó del Centro de Investigación en Producción Agropecuaria, UANL, Linares, N. L., de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot de cuatro años de edad. El material vegetal recolectado fueron varetas de 15 cm de longitud, las cuales se seccionaron en segmentos nodales con yemas axilares (microestacas) de 1.0 cm (Figura 1).

**Establecimiento *in vitro* de los explantes**

Bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar, las microestacas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.28% más 0.2% de Tween-20 durante 5 y 10 min. Concluido el tiempo se realizaron tres enjuagues con agua bidestilada esterilizada. Por último, los explantes se colocaron en una solución antioxidante de PVP (polivinilpirrolidona) 400 mg L-1 durante el proceso de la siembra. Los explantes utilizados fueron, yemas axilares y meristemos, los cuales fueron sembrados en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 1.0 mg L-1 de BAP, 100 mg L-1 de mioinositol, 30 g de sacarosa y 4.3 g L-1 de Phytagel™. El pH se ajustó a 5.7 utilizando KOH o HCl 1.0 N. Posteriormente, el medio de cultivo se colocó en tubos de ensaye y se esterilizó a 121 ºC y 1.2 kg cm-2 durante 15 min, continuando con el establecimiento de un explante por tubo de ensaye. Finalizada la siembra, las unidades experimentales fueron incubadas en condiciones controladas de temperatura de 26 ± 2 °C, y fotoperiodo de 16 horas luz con 8 horas de oscuridad (Figura 1). El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2, donde el factor A fueron los cultivares y el factor B el tipo de explante con 10 repeticiones por tratamiento. En estas condiciones permanecieron por cuatro semanas. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación y porcentaje de viabilidad de los explantes a cuatro semanas de la siembra, utilizando tablas de contingencia y la prueba de Ji-cuadrada (*X*2).

**Inducción de brotes en los cultivares**

Los explantes viables provenientes de la etapa de establecimiento, se subcultivaron en medio MS adicionado con tres concentraciones de BAP (0.5, 1.0 y 1.5 mg L-1) más 0.5 mg L-1 de ácido indolacético (AIA), 100 mg L-1 mioinositol, 30 mg L-1 de ácido ascórbico, 1.5 g L-1 de carbón activado, 30 g L-1 de sacarosa y 4.3 g L-1 de PhytagelTM. El pH se ajustó a 5.7. Los medios de cultivo se colocaron en recipientes de vidrio de 150 mL y se esterilizaron bajo las condiciones descritas anteriormente. Concluida la transferencia, las unidades experimentales se incubaron en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo similares a la etapa anterior, El experimento fue establecido bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2x2x3, donde el factor A fueron los cultivares, factor B los explantes y factor C las dosis de BAP con ocho repeticiones. Las variables evaluadas fueron: número de brotes por explante y longitud de brotes por ocho semanas.

**Multiplicación de brotes**

Brotes provenientes de la etapa de inducción de 1.0 a 1.5 cm de longitud, se transfirieron a medio de cultivo MS al 50 y 100% de concentración, adicionados con 0.5 y 1.0 mg L-1 de BAP y suplementado con 0.5 mg L-1 de AIB, 1.5 g L-1 de carbón activado, 30 g L-1 de sacarosa y 4.3 g L-1 de Phytagel™, ajustando el pH a 5.7. Los medios de cultivo se esterilizaron como se describe anteriormente. Las condiciones de incubación fueron iguales que en las etapas previas. El experimento fue establecido bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2x2, donde el factor A fueron los cultivares, el factor B la concentración del medio y el factor C las dosis de BAP con 8 repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas fueron: número de brotes por explante, longitud de brotes, número y longitud de raíces después de ocho semanas de la transferencia. Con la finalidad de controlar la vitrificación y oscurecimiento de los brotes, se realizaron subcultivos cada dos semanas a medio de cultivo nuevo.

**Análisis estadístico**

Un análisis de varianza fue realizado con los datos obtenidos de las etapas de inducción y multiplicación de brotes. La comparación de medias se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey sig. *p ≤* 0.05. Los datos de ambas etapas se analizaron utilizando el paquete estadístico Statistical Package for the Social Science (SPSS) versión 17.



**Figura 1. Recolecta de material vegetal y establecimiento *in vitro* de los cultivares “Cabernet Sauvignon” y “Merlot”. a) Plantas adultas de vid de ambos cultivares; b) Selección de varetas de vid; c) Microestacas de ambos cultivares de vid; d) Proceso de desinfección de microestacas de ambos cultivares.**

**Resultados y Discusiones**

**Establecimiento in vitro de los explantes**

Con respecto a la variable contaminación después de cuatro semanas del establecimiento *in vitro*, los porcentajes oscilaron entre 20 a 32% cuando se utilizaron los meristemos, mientras que en yemas axilares fueron del 20 a 40% (Cuadro 1); la contaminación fue provocada principalmente por hongos. Esta respuesta es contrastante con lo mencionado por Hernández et al. (2013), quienes reportaron que la principal fuente de contaminación fueron bacterias y muy baja incidencia de hongos. Los resultados aquí mostrados son similares a lo alcanzado por Jaskani et al. (2008), quienes trabajaron con la variedad de uva Perlette, reportando contaminación de 19.3% al someter los explantes a una solución de blanqueador comercial al 10% (v/v) por 10 y 15 min.

Con respecto a la viabilidad de los explantes, la sobrevivencia fue mayor en el cultivar Cabernet Sauvignon cuando se utilizaron meristemos, con hasta 80% de viabilidad en ambos tratamientos de desinfección; mientras que cuando se utilizaron yemas axilares, los porcentajes oscilaron entre 68 a 80% en los tratamientos (Cuadro 1). Estos resultados son semejantes a lo reportado por Abido et al., (2013), donde obtuvieron un 80% en sus explantes del cultivar Muscat de Alexandria. Mientras que para el cultivar Merlot, se presentaron porcentajes de viabilidad entre un 68 a 76% en los tratamientos de desinfección cuando se utilizaron los meristemos como fuente de explante y fue de 60 a 72% cuando se utilizaron las yemas axilares. En cuanto a las tablas de contingencia, las variables de contaminación y viabilidad mostraron ser independientes a los cultivares, es decir, no existe relacion significativa entre la contaminación y viabilidad con los cultivares utilizados (*p ≤* 0.05) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Porcentajes de contaminación y viabilidad en explantes de vid (*Vitis vinifera* L.) en dos tiempos al NaClO, después de cuatro semanas del establecimiento *in vitro*.**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tratamiento** | **Cultivar** | **Explante** | ***X2*** | **Sig. *p ≤* 0.05** | **Contaminación** | **Viabilidad** |
| T1 | Cabernet Sauvignon | Meristemo | 1.33 | 0.248 | 20 | 80 |
| T2 | Cabernet Sauvignon | Meristemo | 1.19 | 0.275 | 20 | 80 |
| T1 | Merlot | Meristemo | 1.33 | 0.248 | 32 | 68 |
| T2 | Merlot | Meristemo | 1.19 | 0.28 | 24 | 76 |
| T1 | Cabernet Sauvignon | Yemas Axilares | 0.05 | 0.82 | 32 | 68 |
| T2 | Cabernet Sauvignon | Yemas Axilares | 0.05 | 0.81 | 20 | 80 |
| T1 | Merlot | Yemas Axilares | 0.298 | 0.58 | 40 | 60 |
| T2 | Merlot | Yemas Axilares | 0.5 | 0.47 | 28 | 72 |

†T1: 5 min, T2: 10 min de exposición a NaClO.

**Inducción de brotes en los cultivares**

De acuerdo a la comparación de medias, se presentó diferencia significativa (*p ≤* 0.05) entre los explantes (Cuadro 2); en el caso de las yemas axilares se observó que el medio de cultivo adicionado con 1.0 mg L-1 de BAP, el número de brotes fue de 2.38, mientras que cuando se utilizó 0.5 mg L-1 de BAP fue de 1.5 brotes por explante (Cuadro 2). Estos resultados no son similares a los reportados por Mukherjee et al. (2010), quienes obtuvieron 2.73 brotes utilizando 0.5 mg L-1 de BAP en el medio de cultivo después de cuatro semanas del subcultivo. Mientas que, en meristemos la mejor respuesta se obtuvo cuando se adicionó 1.0 mg L-1 de BAP al medio de cultivo con promedio de 1.88 brotes (Cuadro 2), lo cual es similar a lo reportado por Abido et al. (2013), en donde evaluaron el efecto del BAP en combinación con diferentes concentraciones de ácido 1-naftalenacético (ANA) en medio MS, obteniendo resultados de 1.9 a 2.4 brotes, en el cultivar Muscat de Alexandria.

Para la longitud de brotes los medios que fueron adicionados con 1.5 y 0.5 mg L-1 de BAP, obtuvieron valores promedio de 1.74 y 1.78 cm para yemas y de 1.04 a 1.23 cm para meristemos (Cuadro 2), similar a lo obtenido por Nookaraju et al. (2008), en el cultivar Crimson. Al utilizar el medio MS adicionado con 1.0 mg L-1 de BAP se obtuvieron los mayores valores con 2.45 cm para yemas y 2.15 cm para meristemos (Cuadro 2) (Figura 2). Melyan et al. (2015) obtuvieron en el cultivar Parvana en el medio Gamborg (B5), adicionado con BAP (0.5-1.0 mg L-1) después de cinco semanas del establecimiento, resultados de 1.9 a 3.8 cm.

**Cuadro 2. Comparación de medias en las variables número y longitud de brotes en dos cultivares de vid (*Vitis vinifera* L.) en yemas axilares y meristemos, suplementado con BAP a ocho semanas del subcultivo.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | **Número de Brotes** | **Longitud de Brotes\***  |
| **Medios** | **Dosis mg L-1** | **Yemas** | **Meristemos** | **Yemas** | **Meristemos** |
| M1 | MS + BAP 1.5 | 1.75 ab | 1.15 b | 1.74 b | 1.04 b |
| M2 | MS + BAP 1.0 | 2.38 a | 1.88 a | 2.45 a | 2.15 a |
| M3 | MS + BAP 0.5 | 1.5 b | 1.05 b | 1.78 b | 1.23 b |

†Medias con la misma letra no muestran diferencia significativa. Tukey sig. *p ≤* 0.05.

\*Longitud en cm.



**Figura 2. Etapa de inducción de meristemos y yemas axilares de los cultivares “Cavernet Sauvignon” y “Merlot”. a) Extracción del meristemo; b) Establecimiento de los meristemos; c) Desarrollo de los meristemos en la etapa de inducción; d) Disección de yema axilar; e) Establecimiento de yemas axilares; f) Desarrollo de las yemas axilares en la etapa de inducción.**

**Multiplicación de brotes**

Durante ocho semanas se evaluó la multiplicación de brotes y la formación de nuevas raíces, con la citocinina BAP, obteniendo los mejores resultados para la multiplicación de brotes al utilizar los medios M2y M1 con 6.37 y 5.06 brotes respectivamente (Cuadro 3), esto es similar a lo reportado por Chee et al. (1984), quienes trabajaron los cultivares Cabernet Sauvignon y Chardonnay obteniendo multiplicación de 5 y 11 brotes después de ocho semanas utilizando BAP a una concentración de 0.5 mg L-1.

En la longitud de los brotes Nookaraju et al. (2008), utilizaron una concentración de 2.22 mg L-1 de BAP más 0.49 mg L-1 de AIB obteniendo 2.99 cm de longitud en promedio, similar a lo obtenido en esta investigación que fue de 2.72 cm (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Comparación de medias en las variables número de brotes, longitud de brotes, número de raíces y longitud de raíces a las ocho semanas del subcultivo.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Medios Dosis mg L-1** | **Número Brotes** | **Longitud Brotes\*** | **Número Raíces** | **Longitud Raíces\*** |
| M1 MS 50% + BAP 0.5 | 5.06 b | 2.34 b | 3.81 a | 2.70 a |
| M2 MS 50% + BAP 1.0 | 6.37 a | 2.72 a | 4.06 a | 3.34 a |
| M3 MS 100% + BAP 0.5 | 4.75 b | 1.72 b | 3.00 b | 1.01 b |
| M4 MS 100% + BAP 1.0 | 4.87 b | 1.67 b | 2.56 b | 1.31 b |

†Medias con la misma letra no muestran diferencia significativa. Tukey sig. *p ≤* 0.05.

\*Longitud en cm.

La formación de raíces inicio a partir de la segunda semana semejante a lo reportado por González et al. (2011) y Yerbolova et al. (2013), donde el portainjerto Saltcreek y algunas variedades criollas iniciaron a partir de la segunda semana, pero diferente a lo obtenido con el portainjerto Freedom el cual inició a la semana y media. Esto se puede deber a las diferencias en la respuesta marcado por la variedad y genotipo de los cultivares (Hewstone et al., 2006). En nuestro experimento los mejores resultados obtenidos en la comparación de medias, fueron en el M2y M1, con 4.06 y 3.81 (Cuadro 4), respectivamente. Sin embargo, difiere con lo obtenido con González et al. (2011), quienes obtuvieron enraizamientos por encima de 10 raíces agregando a los medios auxinas como ANA y AIA a diferentes concentraciones.

Para la inducción de raíces se obtuvieron los mejores resultados en el medio M1, teniendo el 100% de enraizamiento, mientras que el menor porcentaje se obtuvo en el medio M3alcanzando solo el 50% (Cuadro 4) (Figura 3). Jaskani et al. (2008),aumentaron el porcentaje de 30 a 80% al incrementar la cantidad de AIB de 0.5 a 1.0 mg L-1. Mukherjee et al. (2010), probó en un medio de cultivo MS a diferentes concentraciones de AIB de 0.1-0.7 mg L-1 obteniendo resultados de 21.3 a 78.9%, estando por encima nuestros resultados. Melyan et al. (2015)*,* al igual que en nuestra investigación, obtuvieron el valor óptimo de porcentaje de enraizamiento (84.4%) al utilizar el medio MS al 50%, pero adicionando 0.4 mg L-1 de AIA, en el cultivar Parvana.



**Figura 3. Etapa de multiplicación de meristemos y yemas axilares de los cultivares “Cavernet Sauvignon” y “Merlot”. a) Desarrollo de los meristemos en medio de multiplicación de brotes; b) Desarrollo de las yemas axilares en medio de multiplicación de brotes; c) Multiplicación de brotes de yema axilar del cultivar “Merlot”.**

**Cuadro 4. Porcentaje de enraizamiento de los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot en los medios de cultivo después de ocho semanas del subcultivo.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Cabernet Sauvignon** | **Merlot** |
|  | **BAP (mg L-1)** |
| **Medio** | **0.5** | **1.0** | **0.5** | **1.0** |
| MS 50 % | 100 | 87.5 | 100 | 75 |
| MS 100 % | 75 | 62.5 | 75 | 62.5 |

Por su parte, Abido et al. (2013) combinaron las auxinas ANA y AIB en el medio MS, para la variedad Muscat de Alejandria, en diferentes concentraciones obteniendo porcentajes de formación de raíces del 50 al 73%.

**Conclusiones**

El medio de cultivo MS suplementado con 1.0 mg L-1 de BAP, presentó los mejores resultados para el número y longitud de brotes en los cultivares Cabernet Sauvignon y Merlot, en el tiempo evaluado.

Cuando el medio de cultivo MS se reduce al 50% y se adiciona con 1.0 mg L-1 de BAP, la tasa de multiplicación de brotes en ambos cultivares, es superior. En el caso del enraizamiento *in vitro*, el medio MS al 50% más 0.5 y 1.0 mg L-1 de BAP, permiten la formación y desarrollo de raíces en los cultivares de estudio.

En la presente investigación, la aplicación del medio de cultivo MS adicionado con el regulador de crecimiento BAP, en diferentes concentraciones, permite obtener mejores resultados en la etapa de inducción de brotes y multiplicación para conservar *in vitro* los cultivares de vid Cabernet Sauvignon y Merlot.

**Agradecimientos**

\*Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Unidad Marín, FAUANL, por las facilidades brindadas durante el desarrollo de esta investigación \*A Fundación Produce Nuevo León por el apoyo económico a la investigación \*Al Centro de Investigación en Producción Agropecuaria de la UANL, por el material vegetal \*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención durante la realización de este estudio.

**LITERATURA CITADA**

Abido, A., Aly, M., Hassanen, S., & Rayan, G. (2013). In vitro Propagation of Grapevine (Vitis vinifera L.) Muscat of Alexandria cv. For Conservation of Endangerment. *Middle East Journal …*, *13*(3), 328–337.

Borja-Bravo, M., García-Salaza, J. A., Reyes-Muro, L., & Arellano-Arciniega, S. (2016). Rentabilidad de los sistemas de producción de uva (. *Agricultura, Sociedad Y Desarrollo13*, *13*(1), 151–168.

Chee, R., Pool, R., & Bucher, D. (1984). A method for large scale in vitro propagation of Vitis. *Shoot*, (109), 1–9.

Cubero, J. I. (2013). Introducción a la mejora genética vegetal. 3era edición. Mundi-Prensa. 365pp.

Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant. 47*: 5-16

González, E., Pignataro, D., Orjeda, G., Gonzáles, W., & Clark, D. (2011). Optimización de los medios de propagación y enraizamiento in vitro de las variedades “ criollas ” de vid para elaborar pisco Optimization of media for in vitro propagation and rooting of creole. *Revista Peruana de Biología*, *18*(3), 361–366.

Hernández, C., Salazar, Y., & Restrepo, L. (2013). Rescate de embriones para la obtención de vitroplantas de vid (Vitis vinífera L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, *15*(2), 193–201.

Jaskani, M., Abbas, H., Sultana, R., Khan, M., Qasim, M., & Khan, I. (2008). Effect of Growth Hormones on Micropropagation of Vitis Vinifera L . Cv . Perlette, *40*(1), 105–109.

Jiménez-Martínez, J. H., Gutiérrez-Martínez, M. G., Franco-Mora, O., González-Huerta, A., & Gutiérrez-Ibáñez, A. T. (2013). micropropagación de vides silvestres (*Vitis* spp.) del centro de México. *Phyton*, *82*, 107–112.

Melyan, G., Sahakyan, A., & Harutyunyan, A. (2015). Micropropagation of grapevine (Vitis vinifera L.) seedless cultivar “Parvana” through lateral bud development. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, *54*(Special Issue), 253–255.

Mukherjee, P., Husain, N., Misra, S. C., & Rao, V. S. (2010). In vitro propagation of a grape rootstock, deGrasset (Vitis champinii Planch.): Effects of medium compositions and plant growth regulators. *Scientia Horticulturae*, *126*(1), 13–19.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures.pdf. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473–497.

Nookaraju, A., Barreto, S. M., & Agrawal, D. C. (2008). Rapid in vitro propagation of grapevine cv . Crimson Seedless — In fl uence of basal media and plant growth regulators, *10*(1), 44–49.

Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2014). En línea: www.oiv.int

Ponce, M., Ocvirk, M., & Agüero, C. (2009). Efecto de la intensidad de la poda en el desarrollo in vitro de embriones de vides estenospermocárpicas. *Revista FCA UNCuyo*, *41*(1), 45–53.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos (SAGARPA). (2016). En línea: http://www.sagarpa.gob.mx/delegaciones/distritofederal/boletines/2016/diciembre/documents/JAC0519-30.pdf

Schuck, M. R., Biasi, L. A., Mariano, A. M., Lipski, B., Riaz, S., & Walker, M. A. (2011). Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *46*(11), 1480–1488.

Valdez, J. G. (2005). Immature embryo rescue of grapevine (Vitis vinifera L) after an extended period of seed trace culture. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, *44*(1), 17–23.

Yerbolova, L., Ryabushkina, N., Oleichenko, S., Kampitova, G., & Galiakparov, N. (2013). Effect of some growth regulators on “ in vitro ” culture of two Vitis vinifera. *Romanian Biotechnological Letters*, *23*(1), 76–80.