



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Protocolo para la micropropagación de la uva variedad “Cabernet Franc”: Resultados preliminares

Protocol for the micropropagation of grape variety “Cabernet Franc”: Preliminary results

Magaña-González, M.^a, Pérez-Álvarez, S.^{a*}, Escobedo-Bonilla, C.M.^b, Sánchez-Chávez, E.^c, Rascón-Solano, J.^a, Hernández-Campos, R.^d, Magallanes-Tapia, M.A.^b

^a Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales; Universidad Autónoma de Chihuahua; C.P. 33000, Cd. Delicias Chihuahua, México.

^b Instituto Politécnico Nacional; CIIDIR Unidad Sinaloa; C.P. 81101, Guasave, Sinaloa, México.

^c Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Delicias; C.P. 33089, Delicias, Chihuahua, México.

^d Universidad Autónoma Metropolitana; Departamento de Biotecnología; Unidad Iztapalapa; C.P. 09340, Ciudad de México, México.

a310612@uach.mx; spalvarez@uach.mx*; cesar_escobedomx@yahoo.com; esteban@ciad.mx; jsolano@uach.mx; reinierhc86@hotmail.com; mmagallanes@ipn.mx

Innovación tecnológica: Metodología de micropropagación de la vid.

Área de aplicación industrial: Agrícola, vivero, industrial, cultivo *in vitro*.

Recibido: 10 octubre 2023

Aceptado: 02 abril 2024

Abstract

Micropropagation is a technique that allows producing disease-free plants, in large quantities and in a short time. The aim of this study was to establish the protocol for disinfection and *in vitro* multiplication of the grape (*Vitis vinifera* L.) of the Cabernet Franc variety using axillary buds as a source of explant. The buds received the following three disinfection treatments: (T1) Captan and Triadimefon for 10 min and 9% sodium hypochlorite (NaClO) for 10 min, (T2) 75% ethyl alcohol for 5 min and 2% NaClO for 20 min and (T3) 75% ethyl alcohol for 10 min and 2% NaClO for 20 min. Then they were established in Murashige and Skoog (MS) culture medium with four treatments for multiplication: (T1) 6-benzylaminopurine (6BAP) 1.0 mg L⁻¹ + Kinetin 0.5 mg L⁻¹;

(T2) Kinetin 3.0 mg L⁻¹ + gibberellic acid (AG3) 1.0 mg L⁻¹; (T3) 6BAP 1.0 mg L⁻¹ + Kinetin 0.5 mg L⁻¹ + indole acetic acid (IAA) 0.2 mg L⁻¹; and (T4) Kinetin 1.5 mg L⁻¹ + naphthalene acetic acid (ANA) 0.5 mg L⁻¹. The disinfection percentage, bud development (multiplication) and multiplication coefficient were evaluated in five subcultures. The best response obtained in the disinfection treatments was with T2 and T3, obtaining 100% of the buds free of pathogens. In the multiplication phase, T4, obtained a vine bud multiplication frequency of 8.57 was obtained and T1 a multiplication coefficient of 3.8. Finally, with this research, a protocol for the disinfection and *in vitro* multiplication of vine buds of the “Cabernet Franc” variety was established.

Key words: Disinfection, *In vitro* multiplication, Plant growth regulators, *Vitis vinifera* L.

Resumen

La micropropagación es una técnica que permite producir plantas libres de enfermedades, en grandes cantidades y en corto tiempo. El objetivo de este estudio fue establecer el protocolo de desinfección y multiplicación *in vitro* de la uva (*Vitis vinifera* L.) de la variedad Cabernet Franc utilizando yemas axilares como fuente de explante. Las yemas recibieron los siguientes tres tratamientos de desinfección: (T1) Captan y Triadimefón por 10 min e hipoclorito de sodio (NaClO) al 9% por 10 min, (T2) alcohol etílico al 75% por 5 min y NaClO al 2% por 20 min y (T3) 75% alcohol etílico durante 10 min y NaClO al 2% durante 20 min. Luego se establecieron en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) con cuatro tratamientos para la multiplicación: (T1) 6-bencilaminopurina (6BAP) 1.0 mg L⁻¹ + Kinetina 0.5 mg L⁻¹; (T2) Kinetina 3.0 mg L⁻¹ + ácido giberélico (AG3) 1.0 mg L⁻¹; (T3) 6BAP 1.0 mg L⁻¹ + Kinetina 0.5 mg L⁻¹ + ácido indolacético (AIA) 0.2 mg L⁻¹; y (T4) Kinetina 1.5 mg L⁻¹ + ácido naftalenacético (ANA) 0.5 mg L⁻¹. Se evaluaron el porcentaje de desinfección, desarrollo de los brotes (multiplicación) y el coeficiente de multiplicación en cinco subcultivos. La mejor respuesta obtenida en los tratamientos de desinfección fue con T2 y T3 obteniendo el 100% de las yemas libres de patógenos. En la fase de multiplicación en el T4 se obtuvo una frecuencia de multiplicación de las yemas de vid de 8.57 y el T1 un coeficiente de multiplicación de 3.8. Finalmente, con esta investigación se estableció un protocolo para la desinfección y la multiplicación *in vitro* de yemas de vid variedad “Cabernet Franc”.

Palabras clave: Desinfección, Multiplicación *in vitro*, Reguladores del crecimiento vegetal, *Vitis vinifera* L.

1. Introducción

La uva (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más antiguos y de mayor importancia económica a nivel mundial (1) y su producción en México se compone de tres sectores, para uso industrial, uva fruta y uva pasa (2).

México cuenta con más de 35,000 hectáreas sembradas y en el año 2021 se obtuvo una producción mayor a las 450,000 toneladas (3). Con los volúmenes de exportación, México se ubica en el 26° lugar como productor de uva fruta a nivel mundial (2),

mientras que Chihuahua se encuentra dentro de los 10 estados con mayor producción de uva industrial en 2022.

Las zonas de Bachiniva, Delicias, Sacramento, Encinillas y Chihuahua capital, son las mejores para cosechar uva, puesto que son zonas que cuentan con la gran ventaja de tener un clima semiárido frío con lluvias escasas, suelos arcillosos y gravosos (4). El cultivo se desarrolla entre los 22° y 23° latitud norte (centro-norte del país), donde el suelo es arcilloso, mayormente de mediana a poca profundidad (5).

La micropropagación es una herramienta esencial para la investigación de plantas ya que ofrece múltiples ventajas en comparación con los métodos convencionales de propagación, como la siembra de semillas, el uso de esquejes, injertos o acodos aéreos. Se trata de un proceso más rápido que facilita la producción y propagación de material vegetal genéticamente uniforme y sin enfermedades (6). Esta es una técnica que se utiliza para producir plántulas clonadas a partir de pequeñas secciones de tejidos vegetales en medios de cultivo adecuados, bajo condiciones asépticas controladas (7).

Hasta el momento existen pocas investigaciones que abordan el tema de la micropropagación de la uva en México principalmente por la inexistencia de biofábricas que le proporcione al productor las plántulas. Una de estas investigaciones utilizó la embriogénesis somática con ácido diclorofenoxiacético (2.4 D) (0.2 mg L^{-1}) en la variedad Cabernet Franc (8). En otro estudio se analizó el comportamiento de los brotes de los cultivares Red globe y Superior en tres medios de cultivo diferentes [Murashige y Skoog (MS), Chee y Pool (C2D), y Medio para Plantas Leñosas (WPM por su traducción al Inglés Woody Plant Medium] durante la fase de establecimiento y la influencia de cuatro citoquininas [6BAP, 2-

isopenteniladenina (2iP), kinetina (Kin) y thidiazuron (TDZ)] en la multiplicación, obteniéndose como resultado que en el medio WPM se observaron los brotes de mayor tamaño y hojas de 4 a 5 cm y en los medios C2D y WPM la media del tamaño de los brotes y del número de hojas fue mayor. Así mismo, al utilizar 6BAP a 1 mg L^{-1} se obtuvieron brotes de mayor tamaño y número de hojas (9).

A pesar que se ha presentado información sobre la micropropagación en el cultivo de la vid, persiste una falta de claridad de esta técnica aplicada a ciertas variedades adaptadas a la región centro-sur del Estado de Chihuahua, con yemas como material vegetal de propagación. El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de desinfección y multiplicación *in vitro* de la uva (*Vitis vinifera* L.) de la variedad Cabernet Franc utilizando yemas axilares como fuente de explante.

2. Materiales y métodos experimentales

2.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado en esta investigación fueron yemas axilares de vid recolectadas de plantas sembradas en la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales (FCAyF) de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), ubicado en Km. 2.5 carretera a Rosales, Poniente, 33000 Delicias, Chih.

2.2 Métodos de desinfección

Para la desinfección de las yemas seleccionadas se utilizaron tres tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos utilizados en la fase de desinfección.

Tratamiento	Reactivos	Tiempo
1	Captán 2.5g Triadimefón 3g	10 min
	Hipoclorito de sodio 9%	10 min
2	Alcohol etílico 75%	5 min
	Hipoclorito de sodio 2%	20 min
3	Alcohol etílico 75%	10 min
	Hipoclorito de sodio 2%	20 min

Las yemas axilares se lavaron muy bien con agua corriente y detergente y se procedió a colocarlas en los tratamientos de desinfección. Para el T1 se preparó una solución de 2.5 g de Captán (fungicida) y 3 g de Espectrum (Triadimefón + Azufre) en 200 ml de agua destilada más dos gotas de Tween 80. Las yemas axilares con la solución preparada se colocaron en la placa agitadora durante 10 min, después se enjuagaron tres veces con agua destilada y se les agregó el hipoclorito de sodio (NaClO) al 9% durante 10 min más. En el caso de los T2 y T3 al colocar las yemas después de lavadas en el alcohol etílico al 75% y unas gotas de Tween 80 se llevaron a la placa agitadora por 5 y 10 min, respectivamente. Después se enjuagaron tres veces con agua destilada y se añadió el NaClO 2% durante 20 min.

Al final las yemas axilares procedente de los tres tratamientos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar y se colocaron en cajas Petri con papel filtro para dejarlas secar durante 20 min para luego sembrarlas, 10 yemas por frasco, en los medios de multiplicación que se detallan en el apartado 2.3. Finalmente, los frascos se incubaron en condiciones controladas con temperatura constante de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas de iluminación con ocho horas de oscuridad.

Semanalmente, durante el mes de la fase de establecimiento, se evaluó el porcentaje de efectividad de los diferentes agentes desinfectantes utilizados mediante análisis visual, los frascos contaminados se eliminaban del proceso.

2.3 Metodología de multiplicación *in vitro*

El material vegetal, después de la desinfección, se estableció en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (10) suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa, 2.5 g L^{-1} de phytogel, 100 mg L^{-1} de mioinositol, 2.5 g L^{-1} de carbón activado y los reguladores del crecimiento según el tratamiento correspondiente (Tabla 2). El pH se reguló a 5.8.

Tabla 2. Tratamientos utilizados en la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamiento	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg L^{-1})
1	MS	6-BAP (1.0) Kin (0.5)
2	MS	Kin (3.0) AG3 (1.0)
3	MS	6-BAP (1.0) Kin (0.5) AIA (0.2)
4	MS	Kin (1.5) ANA (0.5)

Los explantes fueron incubados en condiciones controladas con temperatura constante de $26 \pm 2^\circ \text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas de iluminación con ocho horas de oscuridad realizando subcultivos cada 21 días. Se realizaron cinco subcultivos y las variables evaluadas fueron desarrollo de los brotes (multiplicación) y el coeficiente de multiplicación.

2.4 Análisis estadístico

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar. Los datos resultantes fueron analizados para determinar si eran normales mediante la prueba de normalidad Shapiro-Wilk

(<https://www.statskingdom.com/shapiro-wilk-test-calculator.html>).

Donde:

La prueba estadística tiene la siguiente forma:

$$B = \frac{(N - k) \ln \sum_{i=1}^k \frac{(n_i - 1) s_{2i}}{N - k} - \sum_{i=1}^k (n_i - 1) \ln(S_{2i})}{1 + \frac{1}{(3k - 1) \left[\left(\sum_{i=1}^k \frac{1}{1^{n_i - 1}} \right) - \frac{1}{N - k} \right]}}$$

Donde: N es la suma de todas las muestras.

K es el número de categorías o grupos.

La prueba B tiene distribución asintótica χ^2 con $(k - 1)$ grados de libertad.

Donde: N es la suma de todas las muestras.

K es el número de categorías o grupos.

La prueba B tiene distribución asintótica χ^2 con $(k - 1)$ grados de libertad.

Si los datos no tienen distribución normal, se hará la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual es una prueba que determina si la diferencia entre los rangos de dos o más grupos es significativa, usando los datos de las muestras.

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)} \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

W = estadístico de normalidad de Shapiro-Wilk.

$(a_i x_{(i)})^2$ es el valor del dato i del tratamiento i elevado al cuadrado.

$(x_i - \bar{x})^2$ la diferencia del dato x_i respecto a la media del tratamiento i, elevado al cuadrado.

La prueba de hipótesis fue:

H0: los datos tienen distribución normal.

Ha: los datos tienen otra distribución.

La prueba de homoscedasticidad de Bartlett se utilizó para determinar si los datos entre tratamientos tienen homogeneidad de varianza.

La prueba de hipótesis fue:

H0: $s^2_1 = s^2_2 = \dots = s^2_n$

La prueba de hipótesis es:

H0: La media de rangos entre grupos es igual

Ha: La media de rangos entre grupos es diferente

El estadístico de prueba es:

$$H' = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{j=1}^n \left(\frac{R_j^2}{n_j} \right) - 3(n+1)$$

Donde:

R_j – la suma de rangos del grupo j.

n_j – el tamaño de muestra del grupo j.

n – el tamaño de muestra total entre todos los grupos, $n = n_1 + \dots + n_j$.

Posteriormente, se hizo la corrección de H' :

$$H = \frac{H'}{1-(0.05)}$$

(<https://www.statskingdom.com/kruskal-wallis-calculator.html>)

Para establecer las comparaciones múltiples entre tratamientos se usó la prueba U de Mann-Whitney con la corrección post hoc de Bonferroni.

El estadístico U de Mann-Whitney se usa para evaluar la probabilidad de que dos muestras vengan de la misma población comparando sus medianas.

La prueba de hipótesis es:

$$\begin{aligned} H_0: \mu_1 &= \mu_2 \\ &\text{entre grupos} \\ &\text{independientes.} \\ H_a: \mu_1 &\neq \mu_2 \\ &\text{entre grupos} \\ &\text{independientes} \end{aligned}$$

La prueba estadística U de Mann Whitney es el menor de dos valores: U_1 y U_2 , definidos como:

$$\begin{aligned} U_1 &= n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1 \\ U_2 &= n_2 n_1 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2 \end{aligned}$$

Donde:

n_1 = es el número de datos del grupo 1

n_2 = es el número de datos del grupo 2

R_1 = es la suma de rangos del grupo 1

R_2 = es la suma de rangos del grupo 2

Si los datos son normales se realizó un análisis de varianza y las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$) utilizando el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.4.

En la fase de establecimiento el tamaño de la muestra fue de diez yemas por tratamiento, sembrándose diez yemas por cada frasco. Para la fase de multiplicación se colocaron diez explantes por frasco y se realizaron tres repeticiones en ambas fases.

3. Discusión de resultados

3.1 Métodos de desinfección

En la figura 1 se muestran los resultados de la efectividad de los tratamientos utilizados en la fase de desinfección después de 72 horas de establecidas las yemas axilares *in vitro*. Para esto se evaluaron yemas vivas y libres de contaminación.

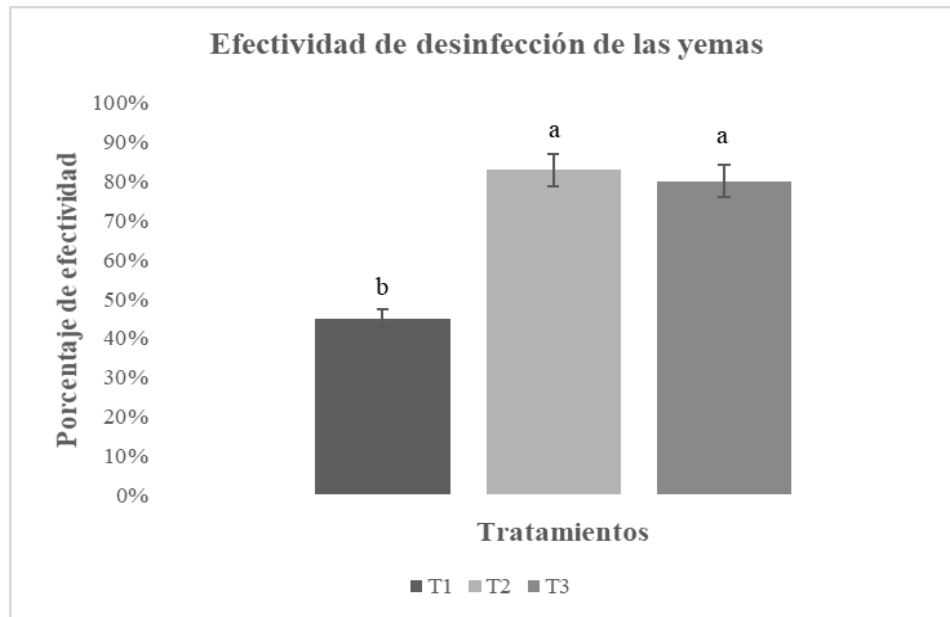


Figura 1. Porcentajes de efectividad en los tratamientos de desinfección para las yemas de vid donde T1= Captán y Triadimefón por 10 min y NaClO 9% por 10 min; T2= Alcohol etílico 75% por 5 min y NaClO 2% por 20 min; T3= Alcohol etílico 75% por 10 min y NaClO 2% por 20 min.

Los mejores tratamientos fueron el T2 y T3 sin diferencias significativas entre ambos, obteniéndose un 83 y 80% de desinfección, respectivamente. La micropropagación, que implica el cultivo de tejidos vegetales en condiciones controladas, es especialmente susceptible a la contaminación debido a las condiciones ideales para el crecimiento de hongos y bacterias por lo que una falla en los tratamientos de desinfección puede implicar que no se pueda establecer la metodología *in vitro* (11). Los contaminantes que trae el material vegetal provenientes del ambiente externo se eliminan normalmente con agua corriente y agentes desinfectantes como lo es el hipoclorito de sodio, ampliamente utilizado con estos fines por su actividad antimicrobiana (12, 13).

En un estudio previo los segmentos nodales de *V. vinifera* var. Cabernet Franc se

desinfectaron utilizando agua con jabón por 5 min, alcohol 70% por 3 s e hipoclorito de sodio 15% por 20 min y obtuvieron un 88% de material limpio (8), coincidiendo con los resultados informados en esta investigación. Otros autores también lograron reducir la contaminación al utilizar hipoclorito de sodio y los enjuagues con agua destilada estéril (12, 14).

Respecto al crecimiento de las yemas, se observó que, en el T1 la mayoría no presentó crecimiento, a diferencia de los otros dos tratamientos y aunque algunas yemas se observaron sanas y sin contaminación, no lograron pasar al proceso de multiplicación, posiblemente porque el captán y triadimefón inhibieron el desarrollo del material vegetal (Figura 2).

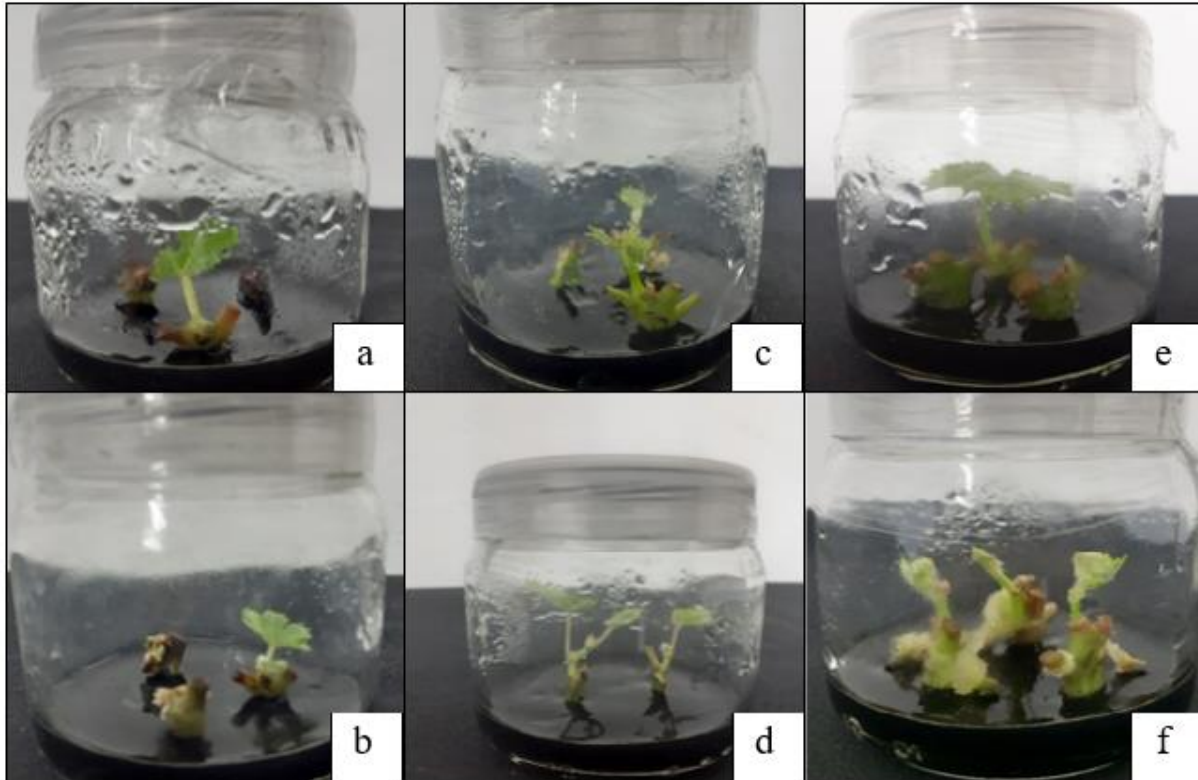


Figura 2. Desarrollo de las yemas en cada uno de los tratamientos de desinfección utilizados donde: a) y b) T1= Captán y Triadimefón por 10 min y NaClO 9% por 10 min; c) y d) T2= Alcohol etílico 75% por 5 min y NaClO 2% por 20 min; e) y f) T3= Alcohol etílico 75% por 10 min y NaClO 2% por 20 min.

El resultado obtenido es similar a lo informado por (6), quien utilizó como medio de desinfección en la variedad de vid “Parvana”, hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) y alcohol etílico al 70%, haciendo mención que a mayor concentración de los reactivos y tiempo en que se someten las yemas en los tratamientos de desinfección, se observa menos contaminación; pero a su vez, no hay crecimiento de los explantes. El impacto

negativo de la exposición de los explantes por largos periodos a los diferentes agentes de desinfección también fue señalado por (11).

3.2 Metodología de multiplicación *in vitro*

Los datos de frecuencia de multiplicación de yemas en cada tratamiento se presentan en la figura 3.

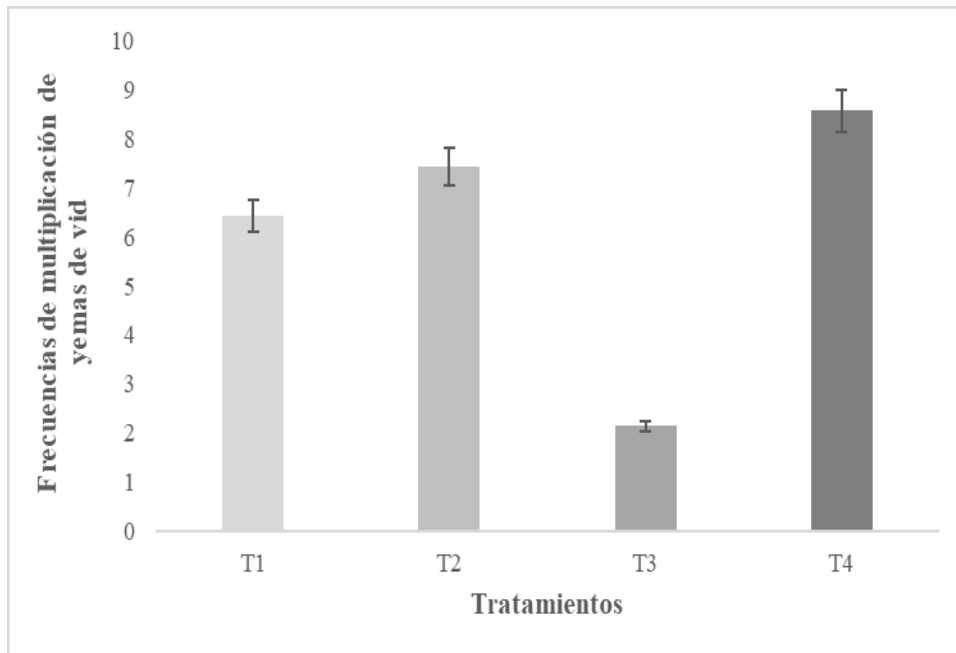


Figura 3. Frecuencia de multiplicación de las yemas de vid en cada uno de los medios de multiplicación donde: T1= 6-BAP 1.0 mg L⁻¹ y Kin 0.5 mg L⁻¹; T2= Kin 3.0 mg L⁻¹ y AG₃ mg L⁻¹; T3= 6-BAP 1.0 mg L⁻¹, Kin 0.5 mg L⁻¹ y AIA 0.2 mg L⁻¹; T4= Kin 1.5 mg L⁻¹ y ANA 0.5 mg L⁻¹.

El tratamiento con la mayor frecuencia de multiplicación de las yemas de vid fue el T4 con una frecuencia de 8.57, seguido por el T2 con frecuencia de 7.43, T1 con frecuencia de 6.43 y por último el T3 con una frecuencia de 2.14. En los tratamientos T2 y T4 se utilizó

Kin complementada con AG₃ y ANA, respectivamente, obteniéndose frecuencia de multiplicación de las yemas mayores a 7 y también, en estos tratamientos, se observó el mayor crecimiento y desarrollo (Figura 4).

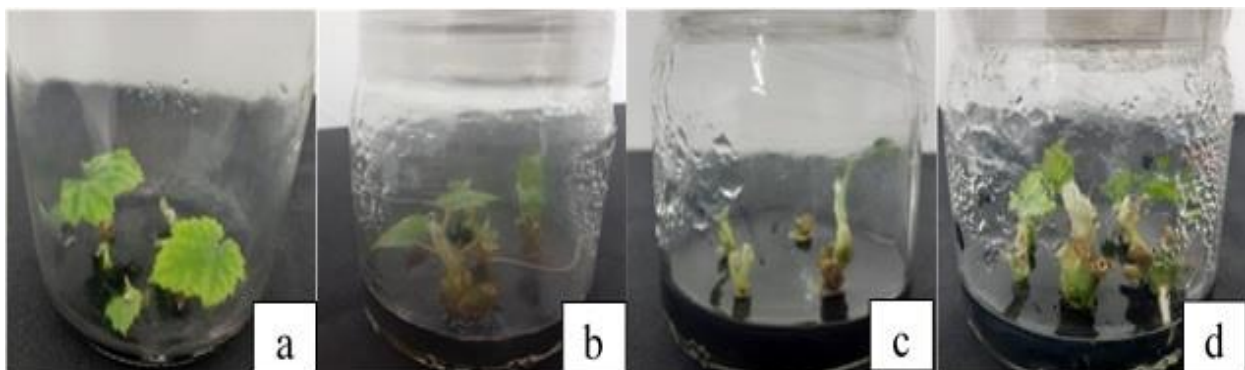


Figura 4. Desarrollo de las yemas en cada uno de los medios de multiplicación donde: a) T1= 6-BAP 1.0 mg L⁻¹ y Kin 0.5 mg L⁻¹; b) T2= Kin 3.0 mg L⁻¹ y AG₃ mg L⁻¹; c) T3= 6-BAP 1.0 mg L⁻¹, Kin 0.5 mg L⁻¹ y AIA 0.2 mg L⁻¹; d) T4= Kin 1.5 mg L⁻¹ y ANA 0.5 mg L⁻¹.

El análisis de normalidad de Shapiro-Wilk mostró un valor W de 0.7591, el cual es menor que el W esperado para una muestra de n= 40; p < 0.001.

Este análisis indica que los datos no se ajustan a una curva normal, por lo que el análisis estadístico fue el no paramétrico de Kruskal-Wallis. El valor H' calculado fue de 6.9962, y el valor H (corregido) fue de 7.8151, el cual

está fuera del valor esperado 7.82 ($p = 0.05$). Este resultado indica que hay diferencias significativas ($p < 0.02$) en los rangos entre algunos grupos.

El análisis U de Mann-Whitney se usó para comparar los rangos entre grupos. Este análisis encontró diferencias significativas entre los rangos medios entre los grupos T2 - T3 y entre los grupos T3 - T4 (Tabla 3).

Tabla 3. Comparaciones múltiples entre rangos de grupos.

Grupos	Diferencia	Valor H	Valor crítico	Valor p
T ₁ -T ₂	2	0.5139	3.8415	0.4735
T ₁ -T ₃	6.5	2.4301	3.8415	0.119
T ₁ -T ₄	3.5	1.029	3.8415	0.3104
T₂-T₃	8.5	5.3801	3.8415	0.02037
T ₂ -T ₄	1.5	0.173	3.8415	0.6774
T₃-T₄	10	6.0895	3.8415	0.0136

En los tratamientos T2 y T4 durante los primeros 22 días de establecimiento en los medios de cultivo se observó más crecimiento y desarrollo que en los otros dos tratamientos (Figura 4). La utilización de citoquininas para el desarrollo exitoso de explantes de vid se ha utilizado en varias investigaciones. En un estudio realizado por (16) utilizaron nódulos como material vegetal en variedades de *V. vinifera*, “Chenin blanc”, “Canonnanon” y “Ugni blanc” y la multiplicación se realizó en medio MS y 6BAP obteniendo un buen crecimiento en cuatro semanas. De forma similar (9, 17) obtuvieron el mayor número de brotes al utilizar 6BAP.

En el presente estudio, al utilizar el 6BAP se obtuvieron buenos resultados, aunque el mayor desarrollo de las yemas se observó con Kin combinada con auxinas. El establecimiento de explantes tiene una buena respuesta con el uso de citoquininas en el medio de cultivo (18), como se muestra en los resultados de los tratamientos T1, T2 y T4.

La utilización de auxinas en el medio de cultivo para la multiplicación en explantes de vid no se ha informado, se han utilizado mayormente para formar callos y raíces. La

utilización de ANA para la multiplicación *in vitro* de vid cultivar “Shine Muscat” inhibió la formación de brotes e indujo el desarrollo de callos y el AIA se utilizó para formar raíces (19). En esta investigación la combinación de Kin y ANA, estando en mayor proporción la citoquinina, favoreció la multiplicación de los explantes de vid coincidiendo esto con la fisiología de los reguladores del crecimiento donde una mayor proporción de citoquinina en relación con una auxina promueve el desarrollo de brotes (20). Las auxinas pueden inducir la formación de brotes y raíces (21), razón por la cual se combinaron ambos reguladores del crecimiento en este estudio.

En un estudio realizado por (14), se emplearon brotes axilares y tejidos meristemáticos como materiales de partida para la propagación en cultivo *in vitro* de las cepas Cabernet Sauvignon y Merlot. Estos explantes se cultivaron en un medio MS suplementado con fitohormonas, y se observaron resultados más favorables con una concentración de 1,0 mg L⁻¹ de 6BAP.

El número de brotes multiplicados obtenidos en cada uno de los tratamientos, se muestra en

la figura 5. En ella, se observa que la cantidad oscila entre 1.6 y 3.8 brotes multiplicados por yema establecida en el medio de cultivo.

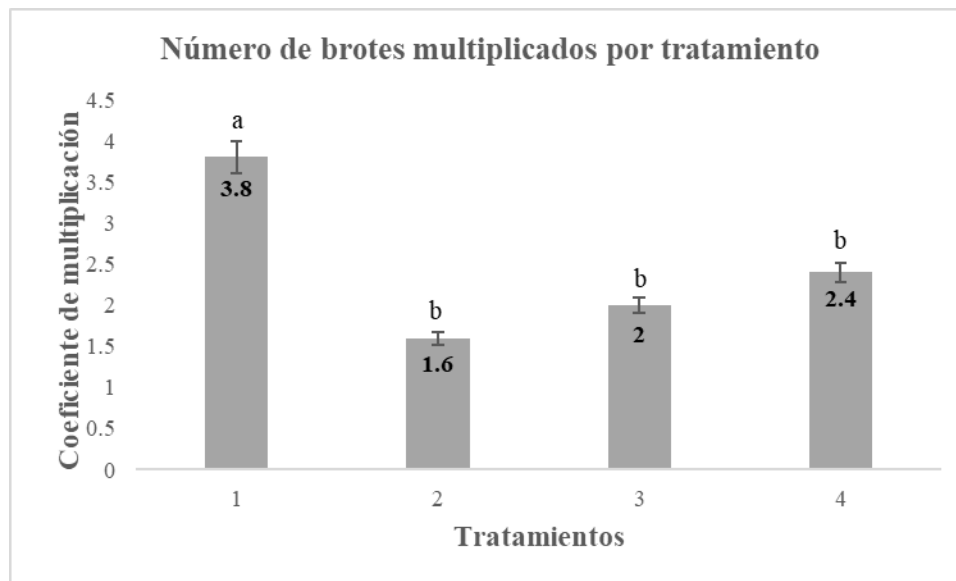


Figura 5. Coeficiente de multiplicación en cada uno de los medios donde: T1= 6-BAP 1.0 mg L⁻¹ y Kin 0.5 mg L⁻¹; T2= Kin 3.0 mg L⁻¹ y AG₃ mg L⁻¹; T3= 6-BAP 1.0 mg L⁻¹, Kin 0.5 mg L⁻¹ y AIA 0.2 mg L⁻¹; T4= Kin 1.5 mg L⁻¹ y ANA 0.5 mg L⁻¹.

Los resultados obtenidos por (8) difieren con los de esta investigación, ya que ellos obtuvieron un mayor número de brotes en variedades de vid Ugni blanc (5.3 ± 1.9), Chenin blanc (5.0 ± 0.9) y Canonanon (5.6 ± 1.7), con 0.5 mg L⁻¹ de 6-BAP. En otra investigación realizada con uva (19) obtuvieron 2.14 brotes por explante con 2.0 μM BA (Benciladenina) en medio MS, siendo diferente a los resultados de este estudio donde el mayor coeficiente de multiplicación (3.8 brotes por explante) se obtuvo al combinar dos citoquininas (1.0 mg L⁻¹ de 6BAP combinado con Kin 0.5 mg L⁻¹) coincidiendo con investigaciones anteriores donde emplearon citoquininas para la proliferación de brotes *in vitro* (22, 23).

En todos los medios de cultivo se adicionó el carbón activado (CA) como suplemento debido a que algunos investigadores plantean que el CA puede liberar gradualmente ciertos productos adsorbidos, como nutrientes y

reguladores del crecimiento vegetal, además de adsorber y eliminar compuestos no deseados en el medio de cultivo como fenoles (18). La adición de CA a medios de cultivo en general es una práctica reconocida y su influencia en el crecimiento y el desarrollo de las plántulas puede atribuirse principalmente a la adsorción de sustancias inhibitoras en el medio de cultivo (18), la disminución del estrés oxidativo (24), y el establecimiento de un ambiente oscurecido en el medio (25).

4. Conclusiones

Para el protocolo de micropropagación de la uva variedad "Cabernet Franc se establece como método de desinfección para yemas axilares alcohol etílico al 75% durante 5 min, e hipoclorito de sodio al 2% durante 20 min (T2) y para la fase de multiplicación el medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa 30 g L⁻¹, phytogel 2.5 g L⁻¹, carbón activado 2.5 g L⁻¹, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, Kin 1.5 mg L⁻¹ y ANA 0.5 mg L⁻¹ (T4), esto

para el desarrollo de los brotes durante los primeros 21 días de establecido el cultivo (primer subcultivo) y para aumentar el número brotes (coeficiente de multiplicación) adicionar 6BAP 1.0 mg L⁻¹ y Kin 0.5 mg L⁻¹ (T1) en los subcultivos siguientes.

5. Referencias

1. Borja-Bravo, M., García-Salazar, J. A., Reyes-Muro, L. and Arellano-Arciniega, S. (2016). Rentabilidad de los sistemas de producción de uva (*Vitis vinífera*) para mesa e industria en Aguascalientes, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 13(1): 151-168. <https://doi.org/10.22231/asyd.v13i1.285>
2. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2022). *Panorama agroalimentario*. https://drive.google.com/file/d/1jVW_S4EFKK7HGwQOBpGeljUyaDT8X8Iyz/view (Consultado el 19 de Junio de 2023).
3. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2021). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consultado el 03 de Mayo de 2023).
4. CMV (Consejo Mexicano Vitivinícola). (2018). *Producción del vino en México*. https://uvayvino.org.mx/html/docs/produccion_consumo_vino.pdf (Consultado el 15 de Octubre de 2023).
5. CEDRSSA (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria). (2017). Investigación interna: La vid en México. Cámara de Diputados, LXIII Legislatura, Ciudad de México, 19p.
6. Gallino, J.P. (2023). Cultivo de tejidos vegetales y sus aplicaciones en el mejoramiento de cultivos. *Revista INIA*, 75: 89-92.
7. Ramírez-Mosqueda, M. A., Sánchez-Segura, L., Hernández-Valladolid, S. L., Bello-Bello, E. and Bello-Bello, J. J. (2020). Influence of silver nanoparticles on a common contaminant isolated during the establishment of *Stevia rebaudiana* Bertoni culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 143: 609-618. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01945-9>
8. García, Y.S., González, E. A., Ruíz, O. M., Insausti, M.C.P., Gutiérrez, M.H., Fernandez, E.S. and Pedranzani, H.E. (2023). *In vitro* micropropagation of *Vitis vinifera* L. var. Cabernet Franc and callus production. *Asian Journal of Agriculture and Allied Sciences*, 6(1): 30-38.
9. Osama, S. S. (2022). Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cvs. Red globe and superior. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 53(4):833-849. <https://doi.org/10.36103/ijas.v53i4.1596>
10. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15(3): 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
11. Bello-Bello, J. J., Schettino-Salomón, S., Ortega-Espinoza, J. and Spinoso-Castillo, J. L. (2021). A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *3 Biotech*, 11: 437.

- <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02984-5>
12. Mahmoud, S.N. and Al-Ani, N.K. (2016). Effect of different sterilization methods on contamination and viability of nodal segments of *Cestrum nocturnum* L. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 4(1): 4-9. <http://dx.doi.org/10.20431/2349-0365.0401002>
 13. Echenique-Quezada, M. A. y Condori Almanza, L. L. (2023). Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de inmersión de hipoclorito de sodio en el establecimiento *in vitro* de Asaí (*Euterpe precatoria* Mart). *Apthapi*, 9(3): 2572-2582
 14. Cavazos-Galindo, J.M., Alvarado-Gómez, O.G., Santos-Haliscak, J.A., Moreno-Degollado, G., Rodríguez Fuentes, H. y Ojeda-Zacarías, M. del C. (2018). Propagación clonal de dos cultivares adultos de vid (*Vitis vinifera* L.) para su conservación *in vitro*. *Polibotánica*, 45: 181-190. <http://dx.doi.org/10.18387/polibotani.ca.45.13>
 15. Tarinejad, A. and Amiri, S. (2019). Influence of plant growth regulators, carbohydrate source and concentration on micropropagation and other physiological traits of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Shahroudi) under *in vitro* conditions. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 9(1):75-82.
 16. Kine, B., Feyssa, T., and Bedada, G. (2017). *In vitro* micropropagation of grape vine (*Vitis vinifera* L.) from nodal culture. *African Journal of Biotechnology*, 16(43): 2083-2091.
 17. Asim-Hashemi, S.A., Sathyanarayana, B. N. y Sharaf, Z. (2020). *In Vitro* Propagation of Grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Thompson Seedless. *Indian Journal of Pure Applied Bioscience*, 8(5):421-428.
 18. Poniewozik, M., Parzymies, M., Szot, P. (2022). Effect of activated charcoal and ascorbic acid on *in vitro* morphogenesis and o-dihydroxyphenols content in *Paphiopedilum insigne*. *Horticultural Science* (Prague), 49(1): 48-51. <https://doi.org/10.17221/68/2020-HORTSCI>
 19. Kim, S.-H., Zebro, M., Jang, D.-C., Sim, J.-E., Park, H.-K., Kim, K.-Y., Bae, H.-M., Tilahun, S., Park, S.-M. (2023). Optimization of plant growth regulators for *in vitro* mass propagation of a disease-free 'Shine Muscat' grapevine cultivar. *Current Issues in Molecular Biology*, 45, 7721-7733. <https://doi.org/10.3390/cimb45100487>
 20. Jing, H. and Strader, L.C. (2019). Interplay of auxin and cytokinin in lateral root development. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 486. <https://doi.org/10.3390/ijms20030486>
 21. Ribeiro, Y.R. de S., Aragão, V.P.M., Sousa, K.R. de, Macedo, A.F., Floh, E.I.S., Silveira, V., Santa-Catarina, C. (2022). Involvement of differentially accumulated proteins and endogenous auxin in adventitious root formation in micropropagated shoot cuttings of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 148:119-135.
 22. Qiu, Y., Guan, S.C., Wen, C., Li, P., Gao, Z. and Chen, X. (2019). Auxin and cytokinin coordinate the dormancy and outgrowth of axillary bud in strawberry runner. *BMC Plant Biology*, 19:528. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2151-x>
 23. Nowakowska, K., Pińkowska, A., Siedlecka, E. and Pacholczak, A.

- (2022). The Effect of Cytokinins on Shoot Proliferation, Biochemical Changes and Genetic Stability of Rhododendron 'Kazimierz Odnowiciel' in the in Vitro Cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 149:675-684.
<https://doi.org/10.1007/s11240-021-02206-z>
24. Zhang, Y., Lin, Z., Wang, L., Guo, X., Hao, Z., Li, Z., Johnston, L.J., Dong, B. (2022). Cooperative interaction of phenolic acids and flavonoids contained in activated charcoal with herb extracts, involving cholesterol, bile acid, and FXR/PXR activation in broilers fed with mycotoxin-containing diets. *Antioxidants* (Basel), 11(11):2200.
<https://doi.org/10.3390/antiox11112200>
25. Díaz Lezcano, M. I., Flor Benítez, B.A., Enciso Garay, C.R. y González Segnana, L. R. (2016). El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad Nanicão. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVIII (2):140-146.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55618>