

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 grapevine varieties utilized for pisco making

Eugenio González¹, Diego Pignataro¹, Gisella Orjeda¹, Wilfredo L. González² y Daniel Clark^{*1}

¹ Unidad de Genómica, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia

Avenida Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, (Apartado Postal 4314, Lima 100), Perú

² Laboratorio de Ecología Evolutiva, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia

Email Eugenio González: egoncla@gmail.com

Email Diego Pignataro: jose.pignataro.i@upch.pe

Email Gisella Orjeda: gisella.orjeda@upch.pe

Email Wilfredo González: wilfredo.gonzales@upch.pe

*Autor para correspondencia
Email Daniel Clark: daniel.clark@upch.pe

Resumen

Los protocolos y medios disponibles para la propagación y enraizamiento *in vitro* de la vid no han sido ajustados todavía a las variedades “criollas” con las que se elabora el pisco. En este trabajo se exploró el uso de medios para la propagación de las variedades Quebranta, Negra Criolla, Albilla, Italia y Torontel, así como para el enraizamiento de las variedades Quebranta, Albilla y Torontel, a partir de los medios estándares reportados en la literatura científica. Para ello, se pusieron a prueba 11 variantes del medio estándar de propagación de vid (medio Murashige y Skoog 1X, 3% de sucrosa, 1 mg/L de benzilaminopurina y 0,8% de agar) en las que se combinaron reducciones en la fuerza del medio con reducciones en la concentración de hormona. Para el enraizamiento posterior, se probaron el ácido naftalen acético y el ácido indol acético a 5 concentraciones distintas por cada hormona. Los resultados mostraron que el mejor medio para la propagación de las variedades Quebranta, Albilla e Italia es el estándar; las variedades Negra Criolla y Torontel tuvieron mejor desempeño con una reducción de la concentración de benzilaminopurina a 0,25 y 0,5 mg/L, respectivamente. El mejor enraizamiento en la variedad Quebranta ocurrió con 80 µg/L de ácido naftalen acético y 2 mg/L de ácido indol acético; las variedades Albilla y Torontel tuvieron una mejor respuesta al ácido indol acético a concentraciones de 2 y 1 mg/L, respectivamente.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, propagación, enraizamiento, vides criollas, pisco.

Abstract

The protocols and culture media available for *in vitro* propagation and rooting of grapevine have not yet been adjusted to the creole varieties used for pisco making. In this paper we explored the use of culture media for the propagation of varieties Quebranta, Negra Criolla, Albilla, Italia and Torontel and for rooting varieties of Quebranta, Albilla and Torontel based on known standard culture media. To address this issue, 11 media derived from the standard propagation medium for grapevine (1X Murashige & Skoog medium, 3% sucrose, 1 mg/L benzilaminopurine, and 0,8% agar) with diminished medium strength and/or hormone concentration were tested. In addition, 5 concentrations of naphthalen acetic acid or indol acetic acid were tested for rooting. We found that Quebranta, Albilla, and Italia varieties show a better growth in the standard propagation medium; by contrast, Negra Criolla and Torontel grew better in media with diminished benzilaminopurine concentrations (0,25 and 0,5 mg/L, respectively). Quebranta rooted better with 80 µg/L naphthalen acetic acid or 2 mg/L indol acetic acid, while Albilla and Torontel showed better rooting results with 2 and 1 mg/L indol acetic acid, respectively.

Keywords: Tissue culture, propagation, rooting, creole grapevines, pisco

Presentado: 25/02/2011
Aceptado: 23/12/2011
Publicado online: 08/02/2012

Introducción

La vid (*Vitis vinifera*) es una dicotiledónea leñosa cuyos frutos se utilizan tanto para consumo directo como para la elaboración de bebidas alcohólicas. El cultivo de la vid fue introducido en el Perú por los españoles durante el siglo XVI (Lacaste 2004) para la elaboración de vinos. A partir del siglo XVII se empezó a producir un destilado que se denominó pisco, nombre de la localidad en la que se producía el destilado de mayor calidad. En la actualidad el pisco es uno de los productos bandera del Perú y su producción ha venido creciendo de forma sostenida hasta llegar a los 6,67 millones de litros en el año 2009 (CONAPISCO 2010). El pisco se produce a partir de un grupo de variedades “criollas” de vid que se dividen en aromáticas (Albilla, Italia, Moscatel y Torontel) y no aromáticas (Mollar, Negra Criolla, Quebranta y Uvina). De todas ellas, la única variedad que se distingue genéticamente de aquellas cultivadas en otros países es la Quebranta (Pignataro y Orjeda, resultados no publicados).

Un paso importante para mejorar el rendimiento cualitativo y cuantitativo del viñedo es la selección clonal de los mejores

especímenes. Ello implica una evaluación de las plantas en un territorio determinado, la selección de los mejores individuos de acuerdo a criterios sanitarios y productivos, la evaluación de clones de estos individuos en parcelas experimentales y del producto obtenido a partir de ellos, y la propagación vegetativa a escala masiva para reemplazar las plantas de menor rendimiento en el campo (Muñoz-Organero et al. 2001). Una estrategia utilizada para la multiplicación a gran escala de clones de vid en condiciones asépticas es la propagación *in vitro* (Chee et al. 1984). Ella consiste en introducir yemas apicales o axilares esterilizadas de forma superficial en un medio sólido suplementado con hormonas vegetales que inducen la formación de nuevos brotes, cada uno de los cuales puede, a su vez, originar una nueva planta. La metodología permite entonces una multiplicación geométrica cuyo límite es impuesto por la eventual pérdida de vigor de los nuevos brotes. El procedimiento se completa con el enraizamiento de los brotes en medio sólido, la transferencia de las plántulas a un substrato nutritivo y su posterior adaptación a las condiciones de vivero (Chee et al. 1984).

Las investigaciones realizadas en los últimos 30 años con variedades 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* (Chee et al. 1984; Sim 2006). Si bien la mayoría de variedades estudiadas muestran una buena respuesta con los medios estándares, algunas crecen de manera anormal o son incapaces de desarrollar los nuevos brotes indispensables para la propagación. En estos casos es necesario cambiar la composición del medio para optimizar el procedimiento (Sim 2006).

Los esfuerzos por introducir y propagar *in vitro* las variedades “criollas” utilizadas para la elaboración del pisco en el Perú han sido aislados y poco sistemáticos, por lo que en la actualidad no se dispone de protocolos para llevar a cabo este trabajo. Ello debe subsanarse si es que se pretende mejorar el viñedo destinado a la producción de pisco a través de un proceso de selección clonal. En este trabajo hemos llevado a cabo la optimización del medio para la propagación de las variedades Quebranta, Negra Criolla, Albilla, Italia y Torontel, así como para el enraizamiento de las variedades Quebranta, Albilla y Torontel, a partir de los medios estándares reportados en la literatura científica.

Material y métodos

Material vegetal

Se trabajó con una planta adulta de cada una de las variedades Quebranta, Negra Criolla, Albilla, Italia y Torontel, donadas por el Centro de Innovación Tecnológica Vitivinícola (CITE-vid). La identidad varietal fue confirmada por tipificación con 9 marcadores de microsatélites (This et al. 2004; Pignataro y Orjeda, resultados no publicados) y las plantas se mantuvieron en condiciones de vivero con aplicación mensual de insecticidas, fungicidas y estimulantes foliares.

Preparación de las yemas y obtención de brotes por propagación *in vitro*

Con un escalpelo se cortaron fragmentos de 1,5 – 2 cm que contenían una yema apical o una yema axilar a partir de brotes vigorosos. Estos fragmentos fueron colocados en agua, llevados inmediatamente al laboratorio y lavados en agua corriente con detergente líquido para vajilla (1 gota por litro) y 1,5 g/L de FARMATE (fungicida) en un frasco bajo agitación por 10 min. Luego de enjuagarlos en agua corriente fueron tratados por 10 min con hipoclorito de sodio (lejía comercial) al 2% en un frasco bajo agitación. Los fragmentos se lavaron 3 veces con agua desionizada estéril por 10 min bajo agitación y fueron colocados en placas petri (2 cm de altura x 9 cm de diámetro) con medio estándar sólido (macronutrientes, micronutrientes y vitaminas de Murashige y Skoog [MS], suplementados con 3% de sucrosa, 1 mg/L de benzilaminopurina [BA] y 0,8% de agar). Las placas se colocaron en un cuarto de cultivo bajo 4000 lux (tubos fluorescentes de 36 watt Eco Lumilux Osram), con un fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 de oscuridad y a una temperatura de 24 °C. Los fragmentos fueron transferidos a medio fresco cada 2 semanas. Los brotes generados a partir de cada fragmento fueron utilizados para llevar a cabo los experimentos de optimización de medios.

Optimización de los medios de propagación

Para aproximarse al medio óptimo para la propagación de cada variedad, se probaron 12 medios de propagación en los que

se varió la composición del medio estándar tal como se describe a continuación:

Medio	MSX	BA (mg/L)
1*	1	1
2	1	0,5
3	1	0,25
4	1	0
5	0,5	1
6	0,5	0,5
7	0,5	0,25
8	0,5	0
9	0,25	1
10	0,25	0,5
11	0,25	0,25
12	0,25	0

*Medio estándar

Todos los medios contuvieron 3% de sucrosa y 0,8% de agar. Cinco brotes de entre 0,5 y 1,6 cm de longitud obtenidos a partir de cultivos *in vitro* (ver sección anterior) se colocaron en placas con cada uno de los medios a ser probados. Las placas fueron colocadas en un cuarto de cultivo bajo 4000 lux, con un fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 de oscuridad y a una temperatura de 24 °C. Además de evaluarse la evolución en el tiempo de su apariencia general, se midieron 3 parámetros asociados al éxito de la propagación: (1) crecimiento del explante (diferencia entre la longitud final y la longitud inicial); (2) número de hojas; y (3) el producto del número de brotes por la longitud de los mismos. Se excluyeron del análisis los brotes contaminados durante el experimento. Los tiempos de evaluación se establecieron en función a la velocidad de crecimiento de cada variedad.

Optimización de los medios de enraizamiento

Para el enraizamiento se pusieron a prueba 10 medios que consistieron de las concentraciones estándar de medio MS suplementadas con 3% de sucrosa y 0,8% de agar a las que se añadieron las concentraciones de ácido naftalen acético (NAA) o ácido indol acético (IAA) de acuerdo al esquema siguiente:

NAA	IAA
Medio 1: 40 µg/L	Medio 6: 0,5 mg/L
Medio 2: 60 µg/L	Medio 7: 0,75 mg/L
Medio 3: 80 µg/L	Medio 8: 1 mg/L
Medio 4: 100 µg/L	Medio 9: 1,5 mg/L
Medio 5: 120 µg/L	Medio 10: 2 mg/L

Las concentraciones de NAA de 80 µg/L y de IAA de 1 mg/L son las que se utilizan con mayor frecuencia para el enraizamiento *in vitro* de la vid. En cada medio se probaron 5 brotes obtenidos en medio estándar de propagación (ver sección anterior), los cuales fueron colocados individualmente en tubos que contuvieron 10 mL del medio de enraizamiento. El parámetro que se midió en el tiempo fue el producto del número de raíces por la longitud de las mismas; además, se registró el porcentaje de plantas enraizadas. Como en el caso de los medios de propagación, se excluyeron del análisis los brotes contaminados durante el experimento y los tiempos de evaluación se establecieron en función a la velocidad de crecimiento de cada variedad.

Análisis estadístico

Se realizaron los análisis para cada tipo de cada variedad por separado. En el caso de los medios de propagación, se realizó un

análisis de varianza de 2 factores con el propósito de evaluar el efecto de los cambios en las concentraciones de MS y BA sobre la propagación de los brotes (crecimiento del explante, número de hojas y el producto del número de brotes por la longitud de los mismos). Para los medios de enraizamiento, se utilizó un análisis de varianza anidado considerando como factores las hormonas (NAA e IAA) y las diferentes concentraciones de hormona en el medio (anidadas dentro de cada tipo de hormona). De esta manera se calculó el efecto del tipo de hormona y su concentración sobre el crecimiento radicular (número de raíces por longitud de las mismas).

Resultados y discusión

Optimización de medios de propagación

Los experimentos de optimización de medios de propagación tuvieron duraciones distintas según la velocidad de crecimiento *in vitro* de cada variedad: 30 días para Quebranta, 17 días para Albilla, 19 días para Italia, 16 días para Negra Criolla y 23 días para Torontel. Los resultados se muestran en la Figura 1 y en la Tabla 1. El comportamiento de los parámetros cuantificados en relación a las variaciones de fuerza del medio MS y de concentración de BA permiten distinguir 2 grupos de variedades: (1) las variedades Quebranta, Albilla e Italia, en las cuales el medio estándar favoreció con claridad un mejor desempeño y en las que las variaciones de fuerza de MS o concentración de BA hechas en el resto de medios dieron resultados similares y de menor eficacia (Fig. 1 A, C y D); y (2) las variedades Negra Criolla y Torontel,

en las que se observó un efecto mayor de la fuerza del medio MS, y un efecto variable y más modesto de la concentración de BA (Fig. 1B y E). En la variedad Negra Criolla la influencia de la fuerza del medio MS sobre el crecimiento del explante fue clara en las 4 concentraciones de BA, en tanto lo fue sobre el número de hojas y el producto del número de brotes por la longitud de los mismos con las concentraciones de 1, 0,5 y 0,25 mg/L de BA (Fig. 1B); en la variedad Torontel la influencia de la fuerza del medio MS sobre el crecimiento del explante y el número de hojas fue evidente con 1, 0,5 y 0,25 mg/L de BA, y sobre el producto del número de brotes por la longitud de los mismos con 1 y 0,5 mg/L de BA (Fig. 1E). Por otro lado, los efectos de la concentración de BA muestran que, con una fuerza de medio 1X MS, una concentración de 0,25 mg/L de BA permite obtener los mejores resultados para el conjunto de los 3 parámetros en la variedad Negra Criolla (Fig. 1B), mientras que en la variedad Torontel la mejor concentración fue de 0,5 mg/mL (Fig. 1E).

Se ha reportado que la disminución de la fuerza del medio MS puede aumentar el número de brotes en algunas especies y por ello suele probarse su efecto en los experimentos de optimización de medios (Frett 1987). Si bien en el caso de las variedades Negra Criolla y Torontel la disminución de la fuerza del medio MS tuvo un efecto en el número de brotes (datos no mostrados y producto del número de brotes por la longitud de los mismos), el efecto fue opuesto al reportado, es decir, se observó un mayor número de brotes conforme mayor era la fuerza del medio. En cuanto al uso de citoquininas como la BA, su efecto en la

Tabla 1. Análisis de varianza de dos factores del efecto de la fuerza del medio MS y la concentración de benzilaminopurina (BA) sobre el crecimiento del explante, el número de hojas y el producto del número de brotes por su longitud en las variedades "criollas" de vid estudiadas.

	Crecimiento del explante				N° de hojas			N° de brotes x longitud.		
	G L	MS	F	P	MS	F	P	MS	F	P
<i>Quebranta</i>										
MS	1	0,36	6,81	0,0125	9,03	7,36	0,0096	0,51	3,27	0,0779
BA	2	0,04	0,72	0,4929	32,33	26,38	<0,0001	1,92	12,37	0,0001
MS X BA	5	0,05	1,00	0,4287	21,81	17,80	<0,0001	2,42	15,58	<0,0001
Error	42	0,05			1,23			0,16		
<i>Negra criolla</i>										
MS	2	2,22	130,14	<0,0001	39,22	30,96	<0,0001	8,95	42,96	<0,0001
BA	3	0,07	4,29	0,0092	13,39	10,57	<0,0001	3,00	14,39	<0,0001
MS X BA	6	0,03	1,67	0,1493	1,86	1,47	0,2088	0,95	4,58	0,0009
Error	48	0,02			1,27			0,21		
<i>Albilla</i>										
MS	2	1,83	48,92	<0,0001	24,12	13,04	<0,0001	1,85	18,33	<0,0001
BA	3	0,33	8,93	0,0001	19,79	10,70	<0,0001	4,14	41,06	<0,0001
MS X BA	6	0,39	10,56	<0,0001	41,96	22,68	<0,0001	5,21	51,64	<0,0001
Error	48	0,04			1,85			0,10		
<i>Italia</i>										
MS	2	0,28	14,23	<0,0001	12,95	9,59	0,0003	1,19	10,98	0,0001
BA	3	0,08	4,28	0,0093	5,53	4,10	0,0114	0,03	0,29	0,8356
MS X BA	6	0,05	2,78	0,0210	17,55	13,00	<0,0001	0,39	3,63	0,0047
Error	48	0,02			1,35			0,11		
<i>Torontel</i>										
MS	2	2,25	12,14	<0,0001	3,29	115,91	<0,0001	54,05	25,42	<0,0001
BA	3	1,28	6,91	0,0006	0,39	13,84	<0,0001	19,33	9,09	0,0001
MS X BA	6	0,40	2,14	0,0657	0,13	4,55	0,0010	5,45	2,56	0,0314
Error	47	0,19			0,03			2,13		

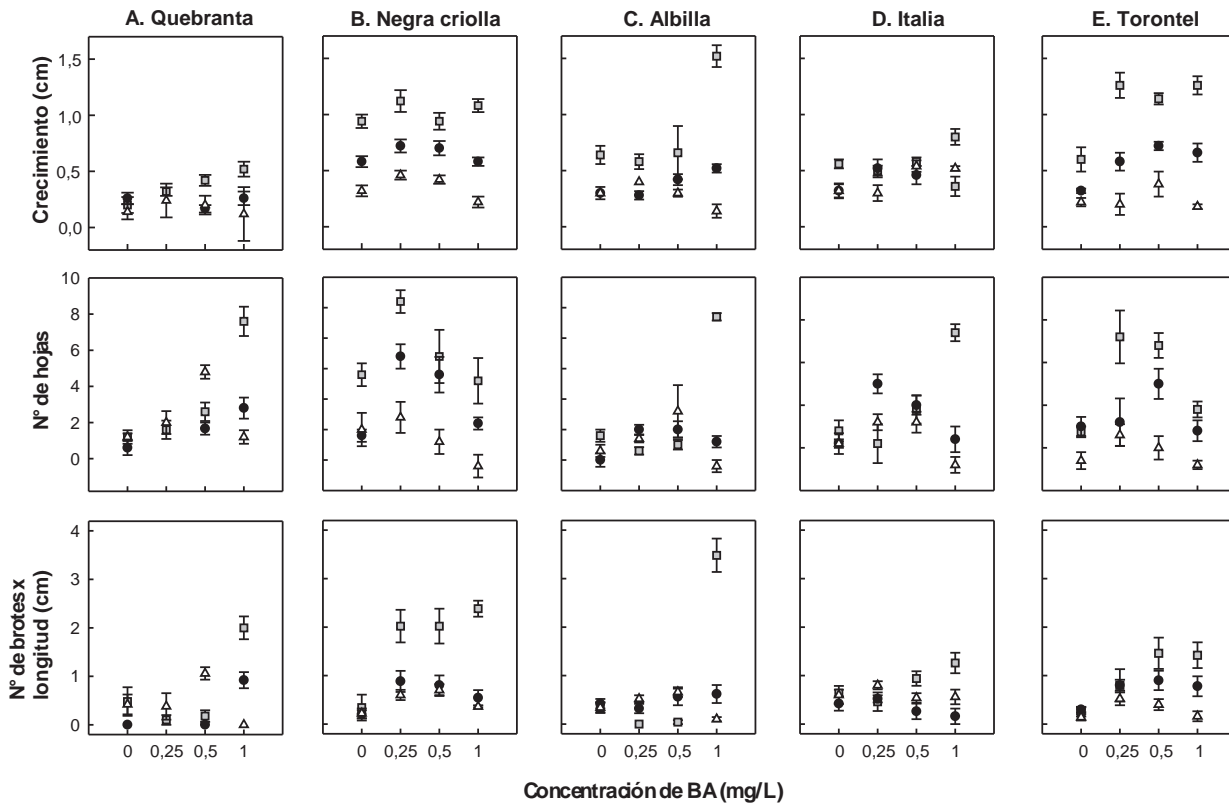


Figura 1. Efecto de la fuerza del medio MS (macronutrientes, micronutrientes y vitaminas de Murashige y Skoog) y la concentración de benzilaminopurina (BA, mg/L) sobre el crecimiento del explante, el número de hojas y el producto del número de brotes por la longitud de 5 variedades "criollas" de vid: (A) Quebranta, (B) Negra criolla, (C) Albilla, (D) Italia y (E) Torontel. Las fuerzas de MS fueron 1X (cuadrado), 0,5X (círculo) y 0,25X (triángulo). Se muestra el promedio \pm 1EE.

proliferación de brotes axilares ha sido demostrado en múltiples trabajos de propagación *in vitro* (van Staden et al. 2008). En general, las variedades "criollas" con las que hemos trabajado mostraron un mayor número de brotes con la concentración más alta de BA (1 mg/L), con excepción de los casos ya señalados de las variedades Negra Criolla y Torontel. No obstante, debemos señalar que cuando la fuerza del medio MS fue menor a 1X, el efecto de dicha concentración de BA en el número de brotes no fue evidente, lo que sugiere una fuerte dependencia de la respuesta a BA en relación a la fuerza del medio en estas variedades de vid. En su conjunto, estos hallazgos confirman la complejidad de la respuesta de las distintas especies o variedades a las variaciones en la composición del medio y la dificultad para establecer patrones generales.

Nuestros resultados permiten concluir que para las variedades Quebranta, Albilla e Italia, el medio óptimo de propagación fue el estándar (medio 1), en tanto el medio 3 lo fue para la variedad Negra Criolla y el medio 2 para la variedad Torontel. Si bien la contaminación de los fragmentos nos impidió tener resultados para el medio 7 en la variedad Quebranta, mediciones hechas antes de que ocurriera la contaminación (20 días luego de iniciado el experimento) revelaban ya una menor eficacia en relación al medio estándar (datos no mostrados). Se debe enfatizar también que no se han considerado medios de propagación con fuerza de medio MS o concentraciones de BA superiores a las del medio estándar por 2 razones: (1) está reportado que medios de cultivo con alto contenido de sales suelen estar asociados a la formación de tejidos rígidos y de formas distorsionadas (vitrificación) y que las concentraciones altas de BA promueven una formación no

deseada de callos (Sim 2006); y (2) en experimentos preliminares hechos en nuestro laboratorio con la variedad Quebranta se encontró que el crecimiento en medios con 2X MS, 2 mg/L de BA o ambos a la vez, era muy pobre en relación al medio estándar (datos no mostrados).

Optimización de los medios de enraizamiento

El tiempo para los experimentos de optimización de los medios de enraizamiento se empezó a contar a partir de la aparición de las primeras raíces en cada experimento, lo cual ocurrió entre los 10 y 18 días de colocados los brotes en los medios con las 3 variedades evaluadas. La duración de los experimentos fue de 18 días para Quebranta, 14 días para Albilla y 22 días para Torontel. Los resultados se muestran en la Figura 2 y la Tabla 2. Un primer examen revela que el efecto de las hormonas y los tratamientos utilizados fue distinto en las 3 variedades. El ANOVA anidado no indicó diferencias significativas entre el tratamiento con ambas hormonas ni permitió identificar un mejor tratamiento entre todos los administrados en la variedad Quebranta. No obstante, los mejores promedios para el parámetro medido se obtuvieron con 80 μ g/L de NAA y con 2 mg/L de IAA (Fig. 2A). En la variedad Albilla el análisis no establece una diferencia significativa entre el grupo de tratamientos con NAA y el grupo con IAA, pero sí identifica al tratamiento con 2 mg/L de IAA como el mejor (Fig. 2B). En la variedad Torontel hay una diferencia significativa entre los tratamientos con NAA y aquellos con IAA, estos últimos con mejores resultados. No obstante no identificarse un tratamiento significativamente superior en el análisis, fue el medio con 1 mg/L de IAA el que permitió obtener los mejores

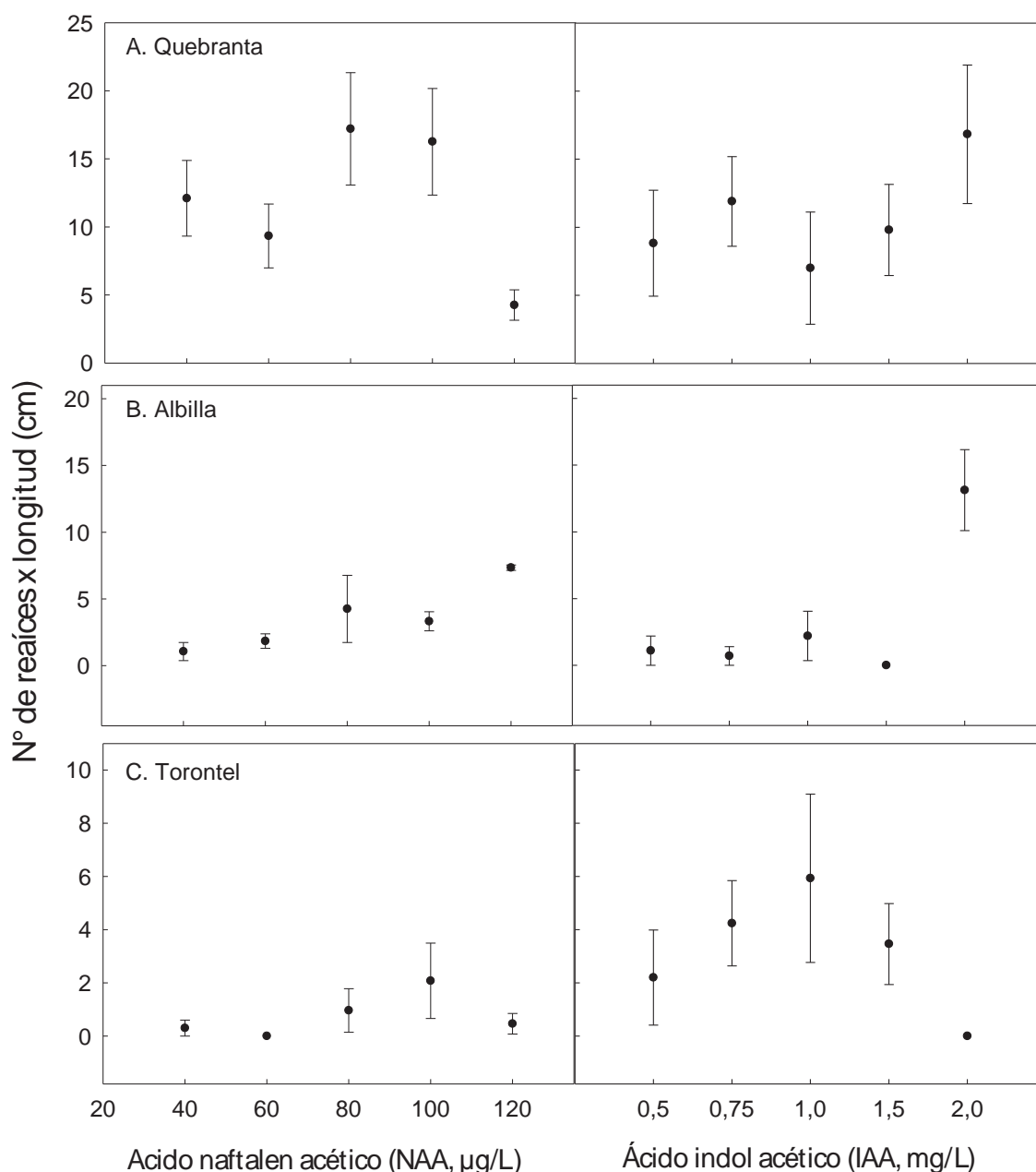


Figura 2. Comparación del efecto de diferentes concentraciones de ácido naftalen acético (NAA) o ácido indol acético (IAA) sobre el crecimiento radicular de 3 variedades “criollas” de vid: (A) Quebranta, (B) Albilla y (C) Torontel. Se muestra el promedio \pm 1EE.

promedios para el parámetro medido (Fig. 2C). El porcentaje de plantas enraizadas observado con los mejores medios para cada variedad fue de 100%, excepto para la variedad Torontel en la que se llegó a un 75%.

En términos generales, se obtuvieron mejores resultados con IAA en 2 de las 3 variedades estudiadas (Albilla y Torontel); en la variedad Quebranta, el desempeño con las 2 hormonas fue comparable (Fig. 2 y Tabla 2). Cabe señalar que los mejores resultados con IAA en las variedades Quebranta y Torontel se obtuvieron con una concentración que fue el doble de la que se suele utilizar (1 mg/mL). A diferencia del NAA, que es una auxina sintética muy estable en el medio de cultivo, el IAA es una auxina natural cuya concentración tiende a caer al oxidarse bajo condiciones de cultivo. Esta propiedad ha sido aprovechada en casos como el enraizamiento de micro-cortes de manzana, en el que se ha determinado que la formación de las raíces re-

quiere concentraciones de auxina mayores que las que requiere el posterior crecimiento de las mismas (Machakova et al. 2008). Nuestros resultados sugieren que un fenómeno similar podría ocurrir con las variedades “criollas” de vid evaluadas.

La concentración de sucrosa utilizada en el medio de enraizamiento en este trabajo fue de 3%. Dado que algunos medios utilizados para el enraizamiento de otro tipo de vides tienen concentraciones algo menores (1 – 1,5%) (Chee et al. 1984; Sim 2006), será importante determinar en un futuro si este factor ejerce una influencia significativa en el enraizamiento de las variedades “criollas” de vid y en su respuesta a los 2 tipos de auxina.

Consideraciones finales

El trabajo que se presenta debe considerarse como un estudio preliminar por el número limitado de plantas de las que se obtuvo el material de partida y por no abarcar la totalidad de

Tabla 2. Análisis de varianza anidado del efecto de las auxinas ácido naftalen acético (NAA) y ácido indol acético (IAA) sobre el crecimiento radicular de 3 variedades “criollas” de vid.

	GL	MS	F	P
<i>Quebranta</i>				
Hormona	1	10,6	0,19	0,6653
Medio(Hormona)	8	95,6	1,72	0,1257
Error	37	55,5		
<i>Albilla</i>				
Hormona	1	0,2	0,03	0,8704
Medio(Hormona)	8	77,8	9,39	<0,0001
Error	38	8,3		
<i>Torontel</i>				
Hormona	1	63,5	8,44	0,0063
Medio(Hormona)	8	10,6	1,41	0,2260
Error	35	7,5		

las variedades “criollas” de vid utilizadas en la elaboración del pisco. No obstante, consideramos que la información incluida es una importante contribución para el manejo *in vitro* de estas variedades y deberá complementarse con estudios posteriores en los que se tenga acceso a una mayor cantidad de especímenes.

Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Innovación Tecnológica Vitivinícola (CITEvid) por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo, en particular a los ingenieros Manuel Morón y Manuel Gómez, y a la bióloga Hanna Cáceres. La realización de este trabajo fue posible gracias a los fondos otorgados por el Programa de Ciencia y Tecnología (Contrato N° 004-FINCYT-PIBAP-2007) y por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Contrato 266-2007-CONCYTEC-OAJ).

Literatura citada

- Chee R., R.M. Pool & D. Bucher. 1984. A method for large scale *in vitro* propagation of Vitis. New York's Food and Life Sciences Bulletin. (109): 1-9.
- CONAPISCO. 2010. (en línea). Estadísticas de la Comisión Nacional del Pisco. <<http://www.conapisco.org.pe/estadisticas.htm>>. Acceso 17/02/2011.
- Frett J.F. 1987. Influence of nutrient salts, auxins and cytokinins on the *in vitro* growth of *Salvia greggii*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 9: 89-93.
- Lacaste P. 2004. La vid y el vino en América del Sur: el desplazamiento de los polos vitivinícolas (siglos XVI al XX). Revista Universum. 2(19): 62-93.
- Machakova I., E. Zazimalova & E.F. George. 2008. Plant growth regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and inhibitors. In E.F. George, M.A. Hall, and G-J. De Klerk, eds. Plant propagation by tissue culture. Springer, Dordrecht. Pp. 205-226.
- Muñoz-Organero G., I. Rodríguez-Torres & F. Cabello. 2001. Importancia de la selección clonal de variedades de vid. Acenología. (12).
- Sim S.T. 2006. Virus elimination from grape selections using tissue culture. FPS Grape Program Newsletter. Pp. 30-31.
- This P., A. Jung, P. Bocacci, et al. 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. Theor. Appl. Genet. 109: 1448-1458.
- van Staden J., E. Zazimalova & E.F. George. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In E.F. George, M.A. Hall, and G-J. De Klerk, eds. Plant propagation by tissue culture. Springer, Dordrecht. Pp. 205-226.