



Universitat de les Illes Balears

Escola Politècnica Superior

Memòria del Treball de Fi de Grau

Sanejament de virosis i revalorització de les varietats minoritàries de vinya Esperó de Gall i Vinater Blanc

Joan Miquel Truyols Mas

Grau d'Enginyeria Agroalimentària i del Medi Rural

Any acadèmic 2017-18

DNI de l'alumne: 41585655-E

Treball tutelat per la Dra. Josefina Bota Salort i supervisat pel Dr. Pedro Balda
Departament de Biologia

| | | | | |
|---|-------|----|-------|----|
| S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació | Autor | | Tutor | |
| | Sí | No | Sí | No |
| | X | | X | |

Paraules clau del treball:

Cultiu *in vitro*, Vinya, Virus, Virosis, Medi de cultiu, *Vitis vinifera* L.

ÍNDIX

| | |
|---|----|
| Acrònims..... | 1 |
| Llista de figures..... | 1 |
| Llista de taules..... | 2 |
| Resum..... | 3 |
| 1. Introducció..... | 4 |
| 1.1. Recuperació de varietats locals minoritàries..... | 4 |
| 1.1.1. Història de la viticultura balear..... | 4 |
| 1.1.2. Importància de les varietats locals i minoritàries..... | 8 |
| 1.2. Problemàtica per a l'autorització de noves varietats: Per què sanejam?..... | 9 |
| 1.2.1. Normativa..... | 9 |
| 1.2.2. Problemes què causen els virus a la vinya..... | 10 |
| 1.3. Sanejament mitjançant el cultiu <i>in vitro</i> | 13 |
| 1.4. Les dues varietats locals minoritàries..... | 14 |
| 1.4.1. Esperó de Gall..... | 17 |
| 1.4.2. Vinater Blanc..... | 20 |
| 2. Objectius..... | 22 |
| 3. Material i mètodes..... | 23 |
| 3.1. Material vegetal i descripció de la parcel·la..... | 23 |
| 3.2. Avaluació de l'estat sanitari..... | 25 |
| 3.3. Establiment i propagació <i>in vitro</i> | 26 |
| 3.4. Sanejament vegetal..... | 28 |
| 3.4.1. Termoteràpia natural..... | 28 |
| 3.4.2. Cultiu d'apex caulinars..... | 28 |
| 3.4.3. Transplantament i aclimatació..... | 31 |
| 3.5. Caracterització agronòmica..... | 33 |
| 3.6. Caracterització del potencial enològic: qualitat del most..... | 34 |
| 4. Resultats i discussió..... | 35 |
| 4.1. Estat inicial de les varietats objecte d'estudi en la col·lecció actual de Sa Granja respecte a la virosi..... | 35 |
| 4.2. Resposta front el cultiu <i>in vitro</i> de les varietats objecte d'estudi..... | 39 |
| 4.3. Èxit en el sanejament de les dues varietats objecte d'estudi..... | 44 |
| 4.4. Estudi de les característiques agronòmiques i de paràmetres de qualitat de fruit..... | 45 |

| | |
|----------------------|----|
| 5. Conclusions..... | 48 |
| 6. Bibliografia..... | 50 |
| Annexe..... | 55 |

Resum

El mercat enològic, i concretament la seva globalització, està portant a una homogeneïtzació de les varietats de vinya (*Vitis vinifera* L.) cultivades arreu del món. Aquest incident és un dels principals problemes que esdevé en forma de pèrdua de varietats més minoritàries i arrelades al territori fet que hauria d'aturar-se per, entre moltes raons, conservar el patrimoni.

Nous estils de vins basats en l'originalitat i qualitat, així com també el valorat producte local, són demandats actualment pels consumidors en un constant mercat canviant. Les varietats minoritàries, la majoria de les quals es troben en perill d'extinció, podrien ser una font de riquesa i tenir un elevat potencial enològic. Encara que moltes d'aquestes característiques es troben en estudi, és sabut que aquestes varietats es troben millor adaptades a les condicions locals i mediambientals fet que garanteix un millor maneig i reacció enfront de les possibles adversitats.

En la recuperació de les diferents varietats, el sanejament és una de les primeres fases per les quals han de passar per poder ser inscrites en el registre de varietats comercials i afavorir la seva proliferació en les plantacions i en el seu posterior ús. En aquest treball s'ha estudiat el sanejament a dues varietats de vinya minoritàries de les Illes Balears, com són el Vinater Blanc (blanca) i l'Esperó de Gall (tinta), mitjançant la utilització de cultiu *in vitro*. També s'ha pres informació de les característiques agronòmiques i de paràmetres de qualitat de fruit per poder ampliar la descripció sobre les dues varietats locals que es troben poc estudiades.

Acrònims

- GFKV: Grapevine Fleck Virus (jaspiat)
- GFLV: Grapevine Fanleaf Virus (entrenús curt infecció)
- GLRaV: Grapevine Leafroll associated Virus (enrotllat)
- IRFAP: Institut de recerca i formació agrària i pesquera
- MS-0: Medi Murashige & Skoog comercial (Duchefa ref.M0221.91)
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (assaig per immunoabsorció lligat a enzims)
- AIB: Àcid indol-butíric (auxina)
- BAP: 6-Benzylaminopurine (citoquinina)

Llista de figures

- Figura 1. % inicial d'infecció de les diferents virosis al total de plantes mare de Vinater Blanc.....36
- Figura 2. % inicial d'infecció de les diferents virosis sobre el total de plantes mare d'Esperó de Gall.....37
- Figura 3. Percentatge d'infecció simple i múltiple dels virus presents al material inicial.....38
- Figura 4. Evolució de les sembres en les diferents dates de control en l'Esperó de Gall al medi MS-0.....39
- Figura 5. Evolució de les sembres en les diferents dates de control en l'Esperó de Gall al medi ½ MS-0.....40
- Figura 6. Evolució de les sembres en les diferents dates de control en Vinater Blanc al medi MS-0.....41
- Figura 7. Evolució de les sembres en les diferents dates de control en Vinater Blanc al medi ½ MS-0.....42

Llista de taules

- Taula 1. Resultats test ELISA de les plantes inicials de Vinater Blanc.....36
- Taula 2. Resultats test ELISA de les plantes inicials d'Esperó de Gall.....37
- Taula 3. Evolució de les sembres en les diferents dates de control en l'Esperó de Gall al medi MS-0 i ½ MS-O.....39
- Taula 4. Percentatge de contaminació segons el medi en Esperó de Gall.....40
- Taula 5. Evolució de les sembres en les diferents dates de control en Vinater Blanc al medi MS-0 i ½ MS-O.....41
- Taula 6. Percentatge de contaminació segons el medi a Vinater Blanc.....43
- Taula 7. Quantitat de plantes vives i mortes durant el procés de sanejament a ambdues varietats.....43
- Taula 8. Quantitat de plantes vives i mortes durant el procés de sanejament comparant els dos medis de cultiu.....44
- Taula 9. Resultats de la tècnica Elisa de les plantes obtingudes en el procés.....44
- Taula 10. Paràmetres agronòmics del Vinater Blanc.....45
- Taula 11. Paràmetres raïm i most del Vinater Blanc i Esperó de Gall els anys 2016 i 2017.....46
- Taula 12. Paràmetres raïm i most del Vinater Blanc i Esperó de Gall els anys 2006 i 2007.....47
- Taula 13. Valoració obtinguda en el tast anys 2007 i 2008.....47

Resum

El mercat enològic, i concretament la seva globalització, està portant a una homogeneïtzació de les varietats de vinya (*Vitis vinifera* L.) cultivades arreu del món. Aquest incident és un dels principals problemes que esdevé en forma de pèrdua de varietats més minoritàries i arrelades al territori fet que hauria d'aturar-se per, entre moltes raons, conservar el patrimoni.

Nous estils de vins basats en l'originalitat i qualitat, així com també el valorat producte local, són demandats actualment pels consumidors en un constant mercat canviant. Les varietats minoritàries, la majoria de les quals es troben en perill d'extinció, podrien ser una font de riquesa i tenir un elevat potencial enològic. Encara que moltes d'aquestes característiques es troben en estudi, és sabut que aquestes varietats es troben millor adaptades a les condicions locals i mediambientals fet que garanteix un millor maneig i reacció enfront de les possibles adversitats.

En la recuperació de les diferents varietats, el sanejament és una de les primeres fases per les quals han de passar per poder ser inscrites en el registre de varietats comercials i afavorir la seva proliferació en les plantacions i en el seu posterior ús. En aquest treball s'ha estudiat el sanejament a dues varietats de vinya minoritàries de les Illes Balears, com són el Vinater Blanc (blanca) i l'Esperó de Gall (tinta), mitjançant la utilització de cultiu *in vitro*. També s'ha pres informació de les característiques agronòmiques i de paràmetres de qualitat de fruit per poder ampliar la descripció sobre les dues varietats locals que es troben poc estudiades.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Recuperació de varietats locals minoritàries

1.1.1. Història de la viticultura balear

Al llarg de la història, l'expansió del conreu de vinya ha tengut els seus alts i baixos. Així i tot, es fa difícil trobar un sector dins la nostra cultura en la qual el vi no es troba, directe o indirectament, present: les arts, la religió, les ciències, l'economia, l'agricultura, etc.

Els primers indicis de vi a Mallorca els trobam cap als segles VII i VI aC, amb la presència de llavors al poblat talaiòtic de Ses Païsses d'Artà (Aramburu, 2007), també vasos i altres recipients de fang que s'utilitzaven per a la comercialització del vi a tota la mar Mediterrània a diferents assentaments talaiòtics d'arreu de Mallorca.

Foren els romans que l'any 123 aC conqueriren l'illa de Mallorca per part de Quint Cecili Metel i introduïren el conreu de vinya i l'elaboració del vi. A l'obra "*Història natural*" escrita entre els anys 77 i 79 dC per Plini el Vell, es cita al llibre XIV que els vins balearics són comparables amb els millors d'Itàlia. Això fa pensar amb la gran importància i la repercussió del vi de Mallorca arreu de tot l'Imperi Romà.

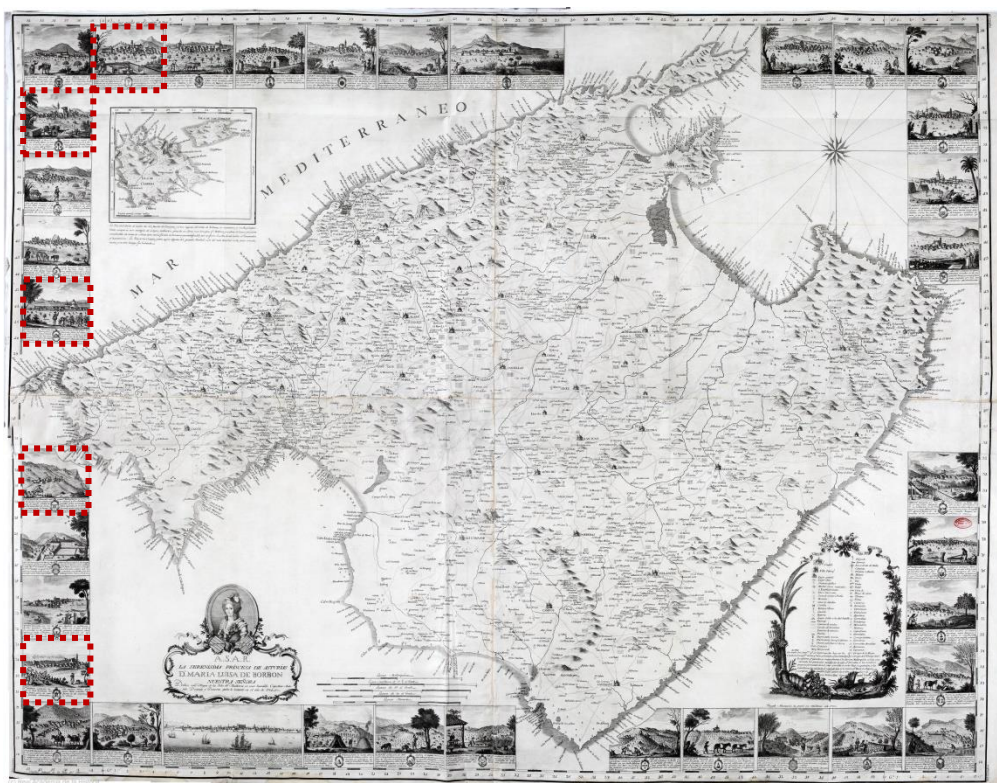
Durant la dominació musulmana a Mallorca (902-1229), la presència del conreu de la vinya està documentat tot i que tengué una reducció important per culpa del desprestigi que originava el consum del vi. En canvi, la ingestió de panses era un element important dins la dieta islàmica.

El 1229, amb l'arribada del rei Jaume I i dels repobladors catalans, el cultiu de la vinya s'incrementà extraordinàriament a causa de la concessió de llicències pel seu cultiu per part del rei, normalment, a terres més marginals deixant les més productives per a gra. A gairebé totes les comarques de Mallorca la vinya era un cultiu estès com ho testimonia l'existència del delme, que es tractava d'un impost en el qual s'havia d'entregar la desena part de la collita.

En el segle XIV trobam documentats els primers cellers que es trobaven en mans del rei, dels nobles i del clergat, els quals eren exempts de pagar impostos. S'ubicaven a gairebé tota l'illa de Mallorca, i s'utilitzaven els ports de Palma i Alcúdia per l'exportació del vi.

Durant els segles XV i XVI, el desenvolupament de la vinya va anar prosperant malgrat les diferents plagues que atacaven puntualment la vinya mallorquina. Aquest afavoriment de l'extensió es va anar allargant fins a gairebé el primer terç del segle XIX gràcies els diferents atorgaments de beneficis i/o exempció d'impostos.

A finals del segle XVIII i principis del XIX, hi va haver diferents crisis com la manca d'especialització de la vinya, l'aparició de la plaga de pugó (*Rhynchites betulei*) el 1830, alguns episodis bèl·lics de caire general i l'aprovació d'un impost. Això, va provocar una minva en la producció vinatera de l'illa.



Mapa de Mallorca del Cardenal Despuig, 1785. On es pot apreciar tots els pobles, possessions i llocs d'arreu de Mallorca i les diferents activitats agrícoles més importants. Trobam marcats en vermell sobre el mapa els pobles com Binissalem, Santa Maria, Porreres, Felanitx i Banyalbufar apareixen realitzant l'activitat més representativa; com la recol·lecció, el transport i l'elaboració de vi. Mapa extret de la Biblioteca digital de la Real Academia de la Historia (<http://bibliotecadigital.rah.es>).

Passat aquest període de crisi, apareixen canvis a l'agricultura, ja que els primers símptomes d'industrialització són evidents. No obstant això, la societat pagesa de Mallorca evoluciona lentament per culpa de l'estructura de la societat agrària de grans propietaris.

El 1860, trobam una distribució igualitària entre terres no cultivades i terres cultivades de les quals el 7.4% era destinada a vinya (Diversos autors: *Història de Mallorca*, 1982). Trobam una extensió de 15.543 Ha de vinya que aniran augmentant fins a arribar al 1887 a un total de 30.000 Ha (Manera, 1995).

A finals del segle, l'agricultura a Mallorca i a les Pitiüses es basa en els conreus comercials, la vinya viurà un moment de gran prosperitat abans de la plaga de la fil·loxera (*Phylloxera vastatrix*), 1891. La plaga va acabar amb tota la vinya de Mallorca, que desembocà una forta crisi econòmica i que va afectar moltes famílies, tant propietaris com jornalers.

A la cançó popular “Felanitx 1893” ens parla del drama que va assolir Mallorca i concretament el poble de Felanitx amb la plaga de la fil·loxera.

“[...] Te vares embarcar
quan sa vinya se moria,
per mor d'una malaltia
que ca teva va enfonsar.
Però saps que vendrà un dia
que, composta aquella ferida,
a Felanitx tornaràs [...]”

Cançó “Felanitx 1893” del Grup S’Estol des Gericó

A principi del segle XX, es pot parlar d'una nova etapa a l'agricultura de Mallorca arran de la fil·loxera. Moltes famílies que es dedicaven al cultiu de la vinya decidiren emigrar a Amèrica, altres, optaren per replantar les seves terres amb ametlers i figueres, i unes poques reconstruïren les vinyes repoblant amb ceps americans empeltats amb varietats autòctones i foranes.

A partir de l'any 1910 fins al 1936, s'inicia una lenta recuperació. Alguns cellers mantenen la seva producció i en sorgeixen alguns de nous. Es crea l'Estació enològica de Felanitx (1913) que difongué tècniques, estudis de conreu de les vinyes i de producció més científiques. Anys més tard, el 1919, es crea el Celler Cooperatiu de Felanitx que apostaria per una nova manera de fer vi i aportaria nova maquinària. El 1920, l'extensió de la vinya a Mallorca era de 7.845 Ha. (Manera, 1995).



Fotografia de principis del segle XX on es pot apreciar l'instant de l'embotellament del vi.

Arxiu de Josep Pons i Frau que es conserva a l'Arxiu Municipal de Palma.

En el moment en què estellà el conflicte bèl·lic de la Guerra Civil espanyola (1936-1939) i els anys successius a la postguerra, el cultiu de la vinya minva a causa de la poca demanda de consum respecte a altres aliments de més necessitat, com els cereals.

Els anys 50 i 60, gràcies al boom turístic hi ha una notable recuperació als municipis amb més tradició vinícola com Binissalem i voltants, mentre que la resta de Mallorca el creixement del turisme provocarà un abandonament progressiu del camp. Aquest fet s'anirà accentuant fins als anys 80 que començarà la modernització del sector i millora del producte i es reprèn l'exportació del vi.

Actualment, el vi de Mallorca és reconegut internacionalment, ja que el sector s'ha especialitzat notablement i s'aposta per la qualitat i no per la quantitat, cosa que succeïa anteriorment. Funcionen aproximadament 60 cellers, entre tradicionals i molts altres de nova creació. Tots ells aposten per una diferenciació i millora del seu producte combinant la tradició amb els avanços actuals. L'interès per preservar les varietats locals amb l'exploració de les seves característiques vitivinícoles és un dels punts forts on es destinen una gran part dels esforços.

1.1.2. Importància de les varietats locals i minoritàries

Existeixen més de 10.000 varietats de vinya arreu del món (OIV, 2009). El fet de ser tan altament distribuïda i ser un dels cultius més antics, ha propiciat el fet que trobem aquesta gran variabilitat dins la mateixa espècie. A les Illes Balears, aquest fet encara és més notable. La condició d'illa i el fet de ser un punt d'encreuament de les expansions de les diferents cultures en un lloc estratègic de la mediterrània, ha fomentat la riquesa varietal existent especialment en el cas de la vinya. Malgrat això, per motius diversos com puguin ser les greus malalties, els forts interessos de les varietats comercials, la replantació amb varietats foranes, etc, ha provocat que les varietats locals s'hagin vist greument afectades i moltes d'elles han anat desapareixent. La recol·lecció realitzada el 1999 demostra que el nombre de varietats era significativament menor que el de dècades anteriors (Bota, 1999). L'establiment de les denominacions d'origen amb les seves respectives restriccions respecte a les varietats a utilitzar tampoc va ajudar gaire a la seva recuperació. Actualment trobam la DO Pla i Llevant i la DO Binissalem, així com les diverses denominacions de "vins de la terra".

De forma general, durant aquestes darreres dècades, l'exploració de les varietats minoritàries quasi oblidades, l'interès en fomentar-les, estudiar-les i en conèixer les seves característiques agronòmiques i enològiques, així com aconseguir la seva inclusió a la llista de varietats comercials han estat els punts clau en què la majoria del sector ha coincidit.

Tot això ha fomentat l'ús i la revalorització de gran part de les varietats locals, i ha estat gràcies a la recerca de les peculiaritats dels vins de la nostra terra, d'excel·lent qualitat i on el sentiment de recuperar els vins diferenciats de la pròpia zona no només és compartit pels cellers i productors, sinó que també és valorat en gran mesura pels consumidors.

1.2. Problemàtica per a l'autorització de noves varietats: Per què sanejam?

1.2.1. Normativa

Perquè una varietat pugui ser cultivada i multiplicada s'ha d'aconseguir el seu sanejament sanitari, i d'aquesta forma, poder-la incloure en el Registre de Varietats Comercials de vinya d'Espanya. El material vegetal inicial per a la propagació vegetativa ha de ser lliure dels següents virus, el virus de l'entrenús curt infecció (GFLV), el virus del mosaic Arabis (ArMV), el virus del jaspiat (GFkV), només a patrons, i el virus del enrotllat (GLRaV-3 i GLRaV-1).

Tota la comercialització de les varietats de raïm i la producció està basada en una sèrie de normes europees, estatals i autonòmiques que les regulen:

- **Directiva 68/193/CEE** de comercialització del material de multiplicació de la vinya (modificada per la D 2002/11/CE).
- **Reglament general del Registre de varietats comercials de plantes**, regulat per l'ordre ministerial del 30/04/1974. Estableix el procediment d'inscriure una varietat al registre.
- **Reglament d'inscripció de varietats de vinya**, ordre ministerial del 23/05/1986. Fixa el procediment d'inscripció, els assajos i els caràcters per la identificació, la inscripció provisional i la inscripció definitiva.
- **Reial Decret 1472/2000**, pel que regula el potencial vitícola. Estableix que totes les varietats classificades a les plantacions han d'estar incloses en el registre de varietats comercials de vinya d'Espanya amb excepció les que estiguessin en cultiu abans de 1986.
- **Reial Decret 170/2011**, de l'11 de febrer, a l'annex VIII, pel que s'aprova el Reglament general del registre de varietats comercials.
- **Ordre del conseller de Presidència**, de 20 de setembre de 2016, pel qual modifica la classificació de varietats de vinya autoritzades a les Illes Balears i hi incorpora les darreres varietats inscrites.

En resum, els aspectes legals bàsics serien (Chomé, 2003):

1. Cada varietat tindrà una sola denominació que permeti distingir-la de les altres. S'admeten sinònims locals en el cas que estiguin confirmades.
2. Només es podrà comercialitzar material de multiplicació provinent de varietats de vinya que es trobin inscrites al Registre de Varietats Comercials de plantes.

3. El material de multiplicació es comercialitzarà sempre etiquetat d'acord amb la seva categoria, indicant en aquest cas, la varietat i el clon.
4. A cada regió només es podran comercialitzar i plantar les varietats de vinya registrades que es trobin a la llista d'autoritzades o recomanades.

Els vivers només poden multiplicar material provinent de plantes inspeccionades i certificades pels organismes competents. Aquestes han d'estar sanes i lliures de malalties transmissibles, absents d'elements nocius. També és important un certificat d'un laboratori autoritzat que demostrï el resultat negatiu de les virosis fixades en el Reglament Tècnic de Control i Certificació de plantes de viver de vinya per a la categoria certificada.

1.2.2. Problemes què causen els virus a la vinya

Abans del 1950 es creia que tots els símptomes observats a les vinyes no atribuïbles a cap patògen conegut era causat per un únic virus (Branas, 1948). Amb el desenvolupament i la intensificació de les investigacions en el camp de la virologia vegetal es va rebutjar aquesta hipòtesi i van passar a ser set virus els causants de tantes malalties.

Actualment, més de 65 (Martelli, 2014) són els virus que s'han aconseguit aïllar que afecten el cultiu de la vinya. A diversos estudis (Mannini et al., 1999) s'ha intentat relacionar els efectes perjudicials dels virus amb el nivell de producció, comparant diferents varietats, tipus de vinya, combinacions patró-empelt, en diverses zones i sistemes de cultiu, encara que resulta complicat extrapolar els resultats a altres sistemes (Cabaleiro i Segura, 1996). Per altra banda, s'han avaluat els paràmetres fisiològics que comporta la infecció en plantes asimptomàtiques arribant a la conclusió que la mala assimilació del CO₂ és una de les limitacions principals per l'activitat de la Rubisco i dur a terme la fotosíntesi (Montero et al. 2017).

També, s'ha estudiat l'efecte de l'estrès hídric combinat amb els virus, un fet important a tenir present amb el canvi climàtic, on s'explica que no es va veure una interacció directa entre l'estat hídric i el nivell d'infecció de la planta poguent, fins i tot la sequera, amagar l'efecte de la virosi (Bota et al., 2017).

La importància de les virosis ve donada a causa que no es poden combatre mitjançant l'ús de productes fitosanitaris sinó que l'eliminació dels ceps afectats i la lluita contra els possibles vectors són les poques eines que hi ha per fer-hi front.

Encara que a Espanya s'hagin fet pocs estudis importants sobre la rellevància que tenen les malalties causades per virus, sí que s'ha vist la gran repercussió econòmica que té la seva presència (García de Luján, 1996).

Entre els més importants a les Balears destacam:

1.2.2.1. GFLV (Grapevine Fanleaf Virus) o entrenús curt infecció

És considerat dels virus més importants que afecta la vinya. És un virus patogen vegetal de la família Secoviridae i gènere *Nepovirus*. Afecta els peus americans, a les varietats viníferes i també als híbrids (Ibáñez, 2004). Aquests virus tenen una repercussió comercial directe, ja que es veu minvada la longevitat de la planta afectada, el seu rendiment fins a un 80%, la producció i la qualitat del raïm, etc (Prota et al., 1996). Es transmet per nematodes que actuen com a organisme vector com són la *Xiphinema index* i la *X. Italiae* durant la seva alimentació d'una planta a l'altra en les arrels. També, l'ús de material vegetal contaminat durant la multiplicació vegetativa és un altre punt de transmissió (Fernández, 2013).

Com a simptomatologia trobaríem una fulles més dentades de l'habitual, amb una nervació principal amb tendència a l'aproximació i la pigmentació de les fulles pot presentar variacions. En els sarments, el nombre de raïms disminueix, els ceps afectats presenten bifurcacions, dobles nusos, entrenusos anormalment curts, així com també, els raïms mostren corriments i la maduració alterada (Ibáñez, 2004).



Il·lustració 1. Bifurcació a un cep d'Esperó de Gall

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols a Sa Granja

1.2.2.2. GFKV (Grapevine Fleck Virus) o jaspiat

Aquest es troba estès per tot el món i quasi totes les varietats i portaempelts. És considerada de les malalties greus i el fet d'haver-hi ceps infectats portadors del virus asimptomàtics fa que encara sigui més difícil la seva identificació. Presenta sinergisme amb altres virus (Padilla, 1998). La principal via de transmissió es produeix mitjançant la multiplicació vegetativa o mitjançant vectors com nematodes i insectes presents al sòl.

Es caracteritza per la presència de clapes cloròtiques i translúcides a les nervacions de tercer i quart ordre de les fulles joves que confereix a aquestes un aspecte reticulat. Aquestes poden arribar a deformar-se si el motejat és abundant (Fernández, 2013). El reticulat és més perceptible a l'inici del període del clima càlid de tal forma que seria recomanable detectar-lo tan prest sigui possible. Aquest virus s'allotja al floema de la planta i té com a conseqüències principals, la pèrdua de vigor, la formació d'arrels per rizogènesi, incompatibilitats patró-empelt, etc. La planta també pren un port més arbustiu a causa de l'excés de ramificacions (Salazar i López, 2005).

1.2.2.3. GLRaV (Grapevine Leafroll associated Virus) o Enrotllat

És dels més importants i dels que comporta majors pèrdues econòmiques. Comporta una disminució en el rendiment d'entre un 10-70%, una mala qualitat del fruit i del vi a causa de l'increment de l'acidesa i un menor contingut en sucres en el moment de la collita (Ibáñez, 2004). Són coneguts diversos ecotips encara que en les nostres condicions reben major transcendència el GLRaV-1 i el GLRaV-3. Es transmet principalment amb l'ús de material vegetal contaminat durant la multiplicació vegetativa encara que també pot ser transmès per alguns artròpodes de les famílies Pseudococcidae i Coccidae.

En referència a la simptomatologia general trobam un enrogiment de les fulles en varietats tintes i un engrogiment a les zones internervals a les varietats blanques. Les fulles són de menor mida enrotllant-se cap al revés al voltant dels tres eixos i sol començar per la part inferior de la planta. Els símptomes són més acusats a la tardor encara que no es descarta que puguin ser visibles abans. En els casos més agressius pot produir la interrupció del teixit floemàtic



Il·lustració 2. Enrogiment de les fulles a Esperó de Gall

Imatge extreta en línia <http://www.gizmodo.com>

1.3. Sanejament mitjançant el cultiu *in vitro*

Per aconseguir complir amb la legislació europea vigent de plantes lliures de virus i poder autoritzar les varietats i registrar els clons, ha estat necessari trobar formes per sanejar les plantes de vinya. Existeixen diverses tècniques per obtenir material vegetal lliure de virus, les més comunes són la termoteràpia, el cultiu *in vitro* d'apexs i/o meristemes o la combinació de vàries.

La **termoteràpia** consisteix amb l'ús de la calor sobre la planta amb l'objectiu de curar-la o obtenir material lliure d'infecció. Les plantes resisteixen majors temperatures que els virus fet que ens proporciona més facilitat a l'hora de destruir-los o d'obtenir material vegetal sa aprofitant la disminució de la velocitat de replicació causada per les altes temperatures. Això fa que els nous teixits tinguin més probabilitats d'estar sans sobretot en plantes amb bon creixement actiu (Martínez i Cañameras, 1988).

Hi ha dues maneres d'aplicar la termoteràpia, segons la intensitat del calor i la duració de la seva aplicació (Llacer, 1974):

- **Termoteràpia per aigua calenta:** Alta intensitat de calor/ poca duració de l'aplicació.

Consisteix a submergir els òrgans en estat de latència durant un temps, que pot variar entre uns pocs minuts a algunes hores. Les temperatures utilitzades solen estar entre 50-60°C. Aquest mètode no és aplicable en fase vegetativa activa, ja que els teixits podrien sortir perjudicats. El tractament, la temperatura i els períodes d'exposició depenen de molts factors, principalment del patogen al qual ens afrontam.

- **Termoteràpia per aire calent:** Baixa intensitat/ llarga duració de l'aplicació.

El fonament d'aquesta tècnica recau sobre l'acció de la calor sobre la multiplicació dels virus. La velocitat de replicació d'aquests disminueix molt a certes temperatures possibilitant així l'obtenció de brots o meristemes no contaminats. Aquests brots podrien ser arrelats per intentar obtenir plantes lliures de virus (Nyland, 1962).

El millor tractament tèrmic es defineix com aquell que aconsegueix aturar la multiplicació dels virus sense que el creixement vegetatiu de la planta es vegi afectat. La duració del tractament enfront del mateix virus pot ser diferent segons l'espècie o la varietat (Refatti et al., 1999).

Diversos estudis duits a terme demostraren que només l'11% dels brots es trobaven lliures de virosis pel que els autors manifestaren que l'obtenció de plantes sanes a partir de plantes mare infectades per aquest mètode no era molt efectiu i comportava molt de temps (Goheen i Luhn, 1973).

A grans trets, el **cultiu *in vitro*** és el cultiu d'òrgans, teixits o cèl·lules vegetals (explants) realitzat sobre un medi de cultiu nutritiu adient, en condicions estèrils i on les condicions ambientals, d'humitat, fotoperíode, temperatura i irradiància es troben controlades. Una de les propietats més importants de les cèl·lules vegetals perquè aquesta tècnica pugui ser possible és la totipotencialitat d'aquestes. Aquesta és la capacitat que comporta que cada cèl·lula té una còpia del material genètic de la planta mare i per tant el poder de regenerar-la igual i sencera. Aquest fet és important ja que interessa conservar els genotips d'interès agrícola sense variació.

El cultiu d'àpex caulinars o teixit meristemàtic mitjançant *in vitro* és una tècnica cada cop més utilitzada degut a la poca efectivitat de les altres tècniques. Aquesta es fonamenta amb l'absència en gran part de títols virals a les zones meristemàtiques que es regeix per diverses hipòtesis que intenten explicar-ho: l'alta activitat mitòtica de les cèl·lules meristemàtiques necessitaria un alt nivell de replicació d'ARN viral (Hu i Wang, 1983), l'absència d'un sistema vascular a la zona que dificultaria en gran mesura el transport (Meshi i Okada, 1986) i major grau d'activitat a la regió apical comparat amb altres regions, protegint així les cèl·lules de la regió meristemàtica de la infecció (Ibáñez, 2004). Per totes aquestes raons es té constància que l'àpex és de les millors zones on tenim majors probabilitats d'èxit per poder arribar a desenvolupar individus sans.

La majoria d'autors coincideixen en el fet que el tractament amb millors resultats és la **combinació d'ambdues tècniques (termoteràpia i cultiu *in vitro*)**, incorporant el doble de garantia de sanejament. Trobam estudis que demostren que les elevades temperatures que s'assoleixen durant l'època estival, poden actuar com una termoteràpia natural donant també resultats positius en l'eliminació dels virus (Valero et al., 2003; Bota et al., 2014).

Si el comparem amb els mètodes clàssics, el cultiu *in vitro* té els següents avantatges (Torregrosa i Bouquet, 1993):

- Control de medi ambient
- Reducció de l'espai utilitzat
- Reducció del temps de resposta
- Disponibilitat de material vegetal durant tot l'any

La tècnica del cultiu *in vitro* de fragments d'àpex de vinya, va ser posada en marxa per Barlass el 1982, els quals van aconseguir regenerar plantes lliures del virus de l'entrenús curt infecció, enrotllat i jaspiat al combinar el cultiu de meristemes amb la termoteràpia (Martinez y Cañameras, 1988).

No obstant els seus avantatges, trobam una sèrie de limitacions les quals és important tenir-les presents així com queden citades per Ibáñez a la seva publicació l'any 2004:

- En alguns sistemes de propagació *in vitro*, l'estabilitat genètica és força feble.
- Les plantes produïdes *in vitro*, poden mostrar característiques poc comunes *in vivo*: excessiva producció de branques laterals i regressió a la fase juvenil.
- En el cas de les plantes llenyoses, la inducció d'arrels, és amb freqüència difícil. En altres ocasions, les arrels formades *in vitro* poden resultar no funcionals i necessiten ser reemplaçades *in vivo* per noves arrels adaptades al sòl.
- En algunes espècies, l'aclimatació de les plantes del tub d'assaig al sòl és difícil d'aconseguir.
- En alguns casos, l'esterilització del material vegetal és extremadament difícil de realitzar a causa de l'aparició de contaminacions d'origen endogen.

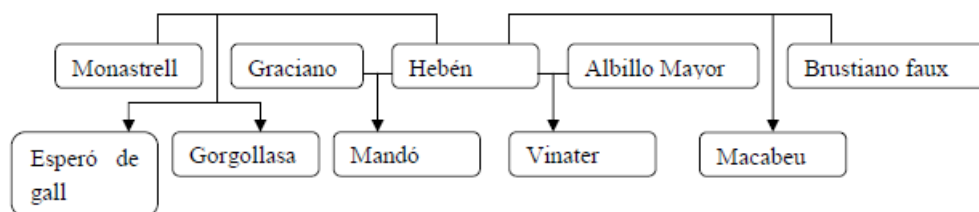
Algunes plantes en aparença sana, poden tenir contaminants interns (endògens) com a bacteris o fongs, que no es manifesten fins a un determinat moment del procés de micropropagació.

- El procés de clonació *in vitro* exigeix una aportació de mà d'obra important, cost de les instal·lacions i sofisticació de les tècniques, la qual cosa redunda en preus relativament elevats per a les plantes que es produeixen d'aquesta manera.
- Enfosquiment dels medis de cultiu. Determinats materials vegetals *in vitro* traspuen substàncies fenòliques, les quals es polimeritzen i s'oxiden en el mitjà i en la mateixa planta. Aquests polifenols oxidats són d'alta toxicitat i poden provocar la mort del material vegetal.
- Vitrificació o alteració fisiològica que es presenta amb relativa freqüència en la micropropagació *in vitro*; les tiges i les fulles presenten hipertròfia i la lignificació dels gots és deficient. Aquest fenomen comporta la inviabilitat del material vegetal i pot ser el responsable d'unes pèrdues en la producció del 20 al 50% en la micropropagació de llenyoses.

Aquestes tècniques són, normalment, la base per obtenir plantes sanes d'on poder agafar les mostres per poder fer la multiplicació dels clons per estaquetes, o empelts sobre peus resistents a diferents estressos o plagues. Un exemple que trobam és l'empelt mallorquí (veure Annex 1).

1.4. LES DUES VARIETATS LOCALS MINORITÀRIES

El treball es centra amb dues varietats minoritàries de vinya de les Illes Balears com són l'Esperó de Gall i el Vinater Blanc. Les dues mostraren una compatibilitat completa per ambdós parentals de la varietat Hebén en tots els microsatèl·lits nuclears i cloroplàstics estudiats, com estudià García-Muñoz (2011) i ens menciona Martorell a la *“Història i evolució de les varietats de raïm de les Illes Balears”*(2011) la qual cosa voldria dir que són línies genèticament força emparentades, com es pot apreciar a l'esquema següent:



1.4.1. Esperó de Gall

Localització

Varietat citada al final del segle XIX, actualment conreada a Mallorca de forma molt aïllada i en petites col·leccions privades. Bàsicament es troba conservada als bancs de germoplasma.

Breu història

La varietat Esperó de Gall la trobam referenciada per primer cop al segle XIX, concretament l'any 1869, al llibre *“Die Balearen”* de l'arxiduc Lluís Salvador d'Àustria (1847-1915). Queda citada aquesta varietat com a “de color blanc i negre” fent referència a la seva doble finalitat enològica. A Menorca, l'arxiduc la localitza al terme de Maó, concretament a la zona del camí de Font d'en Simó on explica que hi ha uns pocs ceps d'aquesta varietat i tenen un baix rendiment.

Antoni Martorell, 2011, a la *Història i evolució de les Illes Balears* parla sobre la proximitat de l'Esperó de Gall amb les formes silvestres.

Caracterització enològica

A la tesi doctoral de Sonia García Muñoz *“Estudio de variedades minoritarias de vid (Vitis vinifera L.): Descripción, caracterización agronómica y enológica de material procedente de las Islas Baleares”* de 2011, basant-se amb els resultats obtinguts, situa

l'Escursach, Sabater i l'Esperó de Gall entre les varietats negres que mostren bon potencial de color, fet important que sol manca a les varietats mallorquines.

Pel que fa a la valoració qualitativa s'explica al llibre de *Varietats de vinya de les Illes Balears* (Escalona et al., 2016) que la intensitat de color és mitjana amb tonalitats que van des del picota al granat, l'aroma es caracteritza per una intensitat mitjana on predominen els aromes vegetals, de fruits del bosc i especiats. Mentre a la boca es comporta molt expressiu, intens, llarg i corpulent.

Descripció ampelogràfica

Les fulles joves tenen un color verd amb la presència de zones antociàniques de caràcter dèbil amb una densitat important de pèls al revers entre les nervadures principals.

En fulla adulta, la dimensió del limbe és gran de forma pentagonal. Està composta per cinc lòbuls lleugerament superposats al sinus peciolar. La longitud de les dents és mitjana i destaquen per la barreja en forma de rectilínies i convexes (Escalona et al., 2016).



Il·lustració 3. Anvers de la fulla de l'Esperó de Gall
Imatge extreta del llibre de *Varietats de vinya a les Illes Balears*
(Escalona et al., 2016)



Il·lustració 4. Revers de la fulla de l'Esperó de Gall
Imatge extreta del llibre de *Varietats de vinya a les Illes Balears*
(Escalona et al., 2016)

Els circells són curts, amb una distribució discontinua sobre el sarment jove. Els sarments són verds amb ratlles vermelles a la cara ventral dels nusos i verds a la dorsal. El raïm és de mida mitjana, de longitud considerable i amb una densitat mitjana. Les baies, per norma general, són mitjanes, bastant uniformes i de forma globosa. El seu

aspecte extern és de coloració negra-blavosa. La polpa té absència de color amb una fermesa lleugera i un gust tirant a herbaci.



Il·lustració 5. Meristem apical amb els circells

Imatge extreta del llibre de Varietats de vinya a les Illes Balears

(Escalona et al., 2016)



Il·lustració 6. Raïm d'Esperó de Gall

Imatge extreta del llibre de Varietats de vinya a les Illes Balears

(Escalona et al., 2016)



Il·lustració 7. Raïm d'Esperó de Gall

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols a Sa Granja

1.4.2. VINATER BLANC

Localització

Amb les prospeccions es va localitzar a les zones de Porreres i Montuïri. Molecularment és la mateixa que la del banc de germoplasma d'El Encín (Escalona et al., 2016).

Breu història

La varietat Vinater Blanc la trobam referenciada per primer cop al segle XIX, concretament l'any 1869, al llibre “*Die Balearen*” de l'arxiduc Lluís Salvador d'Àustria (1847-1915). Queda citada aquesta varietat com a “de color blanc” fent referència a la seva finalitat enològica.

Uns anys més tard, l'il·lustrat Francisco Satorras, 1876, redactà l'informe sobre l'agricultura de les Illes Balears on hi apareix un llistat de 45 varietats “*prefiloxéricas*”. L'any 1892, a l'informe de l'*Agrícola de Mallorca*, on trobam nombroses varietats locals citades. El Vinater Blanc es descriu com una de les varietats “*superiores o finas*” utilitzada per a la realització de “*vinos de pasto*” (Martorell, A., 2011).

Ja entrat el segle XX trobam referenciada la varietat amb el nom de “*Vinaté*” per Arnesto Mestre, director de l'estació enològica de Felanitx.

Caracterització enològica

Pel que fa a la valoració qualitativa del Vinater Blanc s'explica al llibre de *Varietats de vinya de les Illes Balears* (Escalona et al., 2016) que la intensitat de color és intensa amb tonalitats de groc daurat, mostra aromes amb una intensitat mitjana que es caracteritzen pels aromes de fruita blanca (poma, pera) i codony amb records a flor blanca.

Descripció ampelogràfica

Les fulles noves tenen un color verd sense zones antociàniques amb una densitat important de pilositat al revers entre les nervadures principals. Quan la fulla és adulta, la mida del limbe és molt gran de forma orbicular.



Il·lustració 8. Anvers de la fulla de Vinater Blanc
Imatge extreta del llibre de Varietats de vinya a les Illes Balears
(Escalona et al., 2016)



Il·lustració 9. Revers de la fulla de Vinater Blanc
Imatge extreta del llibre de Varietats de vinya a les Illes Balears
(Escalona et al., 2016)

Està composta per cinc lòbuls fortament superposats al sinus peciolar. La longitud de les dents és mitjana i els seus dos costats rectilinis.

Els cirrells són de longitud mitjana, amb una distribució discontinua sobre el sarment més jove. Els sarments són verds tant a la cara ventral dels nusos com a la dorsal. El raïm és de mida i longitud mitjana amb una compactació de baies solta (Escalona et al., 2016).



Il·lustració 10. Meristem apical i cirrells de Vinater Blanc
Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols a Sa Granja



Il·lustració 11. Raïm de Vinater Blanc
Imatge extreta del llibre de Varietats de vinya a les Illes Balears
(Escalona et al., 2016)

Les baies, per norma general, són mitjanes, bastant uniformes i de forma globosa. El seu aspecte extern és de color verd grogós. La polpa té absència de color amb una fermesa tova o lleugerament ferma i insípida.

2. OBJECTIUS

General

Sanejament de virosis de les varietats minoritàries de vinya Esperó de Gall i Vinater Blanc per la seva inclusió en la llista oficial de varietats comercials del Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació, així com ampliar els coneixements del comportament agronòmic i enològic d'aquestes varietats

Específics

- Avaluar l'estat inicial de les varietats objecte d'estudi en la col·lecció actual de Sa Granja respecte virosis
- Estudiar la resposta enfront del cultiu *in vitro* de les varietats objecte d'estudi
- Sanejar de virosis mitjançant el cultiu *in vitro* les dues varietats objecte d'estudi
- Estudi de les característiques agronòmiques i de paràmetres de qualitat de fruit

Les plantes tenen una edat de 18 anys. Hi ha 10 plantes per varietat empeltades sobre el patró R-99, amb un marc de plantació de 2,50 m x 1,20 m. Emprat el sistema de conducció en espatllera a 3 altures i una poda de doble cordó de dotze gemmes franques establides a sis polzes per planta. El sistema de cultiu va ser d'una labor profunda a l'inici del cicle amb 2 segues anuals per controlar la coberta espontània. El reg va ser a saturació a l'inici del cicle passant a un reg de suport de 3-4 vegades durant els mesos de juny i juliol, no superant els 80 litres anuals per planta. Es realitzaren diferents podes en verd per controlar la vegetació. La prevenció va ser la base de control per a les malalties criptogàmiques. Aquesta plantació de l'any 1999 ja es troba força envellida i maltractada per la quantitats de plagues i malalties presents (*Yesca*, *Empoasca spp.*, etc). Per sort, encara que en aquest treball no es pogueren utilitzar, l'any 2017 es va fer una nova plantació, sobre el patró R-110, on s'hi plantaren 320 plantes de les 30 varietats presents a la plantació antiga, de 5 en 5 amb un total de 2 repeticions, que seràn molt útils per a propers treballs i estudis.



Il·lustració 15. Nova plantació de vinya del banc de germoplasma a Sa Granja

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols

En referència al sòl de la parcel·la, presenta una textura franca, té més d'un metre de profunditat, la matèria orgànica en forma un 1,40% del total, el pH és bàsic de 8,18 amb una concentració de calç activa de l'11,62% (Llabrés, 2014). La conductivitat està a un valor de 0,32 dS/m i la CIC de 12,69 meq/100g.

Pel que fa a la climatologia de la zona, presenta a un clima típic mediterrani caracteritzat per un règim amb dèficit hídric durant la part càlida de l'any, uns hiverns

relativament suaus, on l'època de pluges es concentra durant la tardor i la primavera i unes temperatures màximes estivals podent arribar als 40 °C durant les hores de més insolació. La temperatura mitjana és de 26,5 °C mentre que la precipitació mitjana anual és d'aprox. 450 mm. Concretament, els mesos en què vam recollir le mostres van destacar per unes màximes de 36°C i unes mínimes de 24°C.

També es va comptar amb el suport de la finca de Can Axartell (39°50'12,6"N i 3°01'28,1"E; Pollença) on es van posar tot el material i ajuda a la nostra disposició.

En referència a les condicions de Can Axartell, la finca és una antiga possessió d'unes 185 Ha., on antigament el cultiu predominant era el de l'olivar, encara que hi ha documentat el cultiu de la vinya des del segle XV. Pel que fa al tipus de cultiu, aposten pel cultiu en ecològic i es basa en el bon maneig de la plantació, amb dues o tres llaurades a l'any i l'aplicació de productes amb finalitat insecticida i antifúngica de caràcter ecològic, si s'escau.

El sistema de plantació de la vinya és amb espatllera amb un marc de plantació de 2,50 m x 1,20 m. L'edat dels ceps de les diferents parcel·les no és uniforme, ja que aquestes s'han anat plantant al llarg dels anys. L'Esperó de Gall va ser empeltat el març de l'any 2014. Quant a patró utilitzat difereixen entre R-110 a l'Esperó i B-41 al Vinater Blanc.

Pel que fa al sòl de la parcel·la, presenta una textura franca-argilosa amb poc més de mig metre de profunditat. La matèria orgànica en forma un 1,82% del total mentre que el pH és bàsic de 8,34 amb una concentració de calcària activa de 11,97%. La conductivitat es troba a 0,19 dS/m i la CIC de 20,94 meq/100g.

Quan a la meteorologia de la zona, el juny de l'any 2017 va registrar uns 60 l/m² mentre que el juliol va destacar per l'absència de pluges. Les temperatures màximes que s'assoliren durant aquests mesos foren de 36,7°C mentre que les mínimes se situaren al voltant dels 23°C.

3.2. AVALUACIÓ DE L'ESTAT SANITARI

Per conèixer l'estat sanitari inicial de les plantes "mare" i l'estat final de les noves plantes resultants de tot aquest experiment, es va utilitzar la tècnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Clark i Adams, 1977).

La tècnica ELISA és una tècnica d'immunologia o immuno-assaig en la qual un antigen immobilitzat és detectat per un anticòs enllaçat a un enzim capaç de generar un producte fàcilment localitzable, com un canvi de color.

Varen ser analitzades pels següents virus: Enrotllat (GLRaV-1, GLRaV-3), Entrenús curt infecció (GFLV), Jaspiat o Fleck (GFkV), mitjançant la tècnica ELISA indirecta (Clark i Adams, 1977). El Jaspiat només és obligatori per a patrons. Un altre virus com és l'*Arabic mosaic virus* (ArMV) també és contemplat per la legislació europea i espanyola però no s'ha descrit mai a Espanya i per aquest motiu no s'han tengut en compte.

Segons la virosi que interressi analitzar, s'ha de tenir en compte l'època de l'any en què ens trobem i l'estat fenològic de la planta per a poder realitzar una detecció més precisa:

- GFLV (Grapevine Fanleaf Virus) o Entrenús curt infecció. Tot l'any, i a qualsevol part de la planta.
- GFkV (Grapevine Fleck Virus) o Jaspiat. Primavera, abans de l'increment de temperatura i un estat de fulla més primerenca. La part de la planta a triar és fulla jove estesa.
- GLRaV (Grapevine Leafroll associated Virus) o Enrotllat. A partir de l'estiu fins als primers dies de fred, en fulla adulta preferentment amb pecíol i nervacions primàries.

3.3. ESTABLIMENT I PROPAGACIÓ *IN VITRO*

Abans de realitzar l'asèpsia del material vegetal que s'ha d'introduir *in vitro*, és necessari disposar d'un medi de cultiu esterilitzat i dosificat en recipients adients. Una part important del cultiu *in vitro* són els medis de cultiu, ja que allà es troben les substàncies necessàries pel creixement i desenvolupament dels teixits vegetals. Un medi de cultiu és una solució aquosa on es troben dissoltes sals minerals que aporten els elements essencials: macronutrients (N, P, K, S, Ca i Mg) i micronutrients (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo i Co). Normalment és imprescindible una font de carboni, generalment la sacarosa, per suplir l'escassa activitat fotosintètica del teixit *in vitro*. A més, el medi pot ser enriquit amb aminoàcids, vitamines i reguladors del creixement.

Per establir el cultiu *in vitro* s'utilitzaren dos medis de cultiu diferents. Per una banda el medi MS (Murashige i Skoog, 1962) de la casa comercial Duchefa que s'elabora amb tota la concentració recomanada pel fabricant mentre que l'altre medi, ½ MS, només conté la meitat d'aquesta. Segons la finalitat en què es preparava el medi s'afegia un regulador del creixement o altre. Els reguladors de creixement utilitzats foren:

- **AIB** (Àcid indol-3-butíric). Es va incorporar en una concentració de 2 mg/l. Forma part de la família de les auxines, concretament és una auxina sintètica la qual té un gran nombre d'efectes *in vitro* com poden ser:
 - Allargament i engrandiment cel·lular
 - Diferenciació del xilema
 - Inhibició del creixement radical
 - Promoure la divisió cel·lular i la formació de call
 - Formació d'arrels adventícies
 - Afavorir la dominància apical (inhibeix el creixement de les gemmes laterals)

- **BAP** (Bencilaminopurina) és una de les citoquinines més usades i efectives. Es troba dins el grup de les sintètiques que presenten una major estabilitat *in vitro*. La concentració emprada fou d'1 mg/l. Com a respostes fisiològiques que presenten les plantes front aquest regulador de creixement podem trobar:
 - Manté l'equilibri hídric dels teixits
 - Multiplicació i qualitat dels brots
 - La dominància apical està determinada per un balanç entre auxines i citoquinines on les auxines funcionen com a repressor i les citoquinines com a promotor de la inducció de les gemmes laterals i de manera inversa en les arrels

Per la preparació del medi, es va afegir sacarosa amb una proporció de 30 g/l i es van dissoldre dins aigua Milli-Q. A continuació s'afegiren 2,150 mg/l (en el cas de ½ MS) o 4,300 mg/l (en el cas de MS) de medi de cultiu MS comercial enrasant i ajustant el pH a $5,6 \pm 0,1$ amb NaOH 0,5N. Per separat, en un erlenmeyer a concentració de 7 g/l d'agar i es mesclaren amb aigua Milli-Q portant aquesta mescla al microones fent agafar el bull tres cops i agitant cada vegada perquè quedi ben homogènia, sense grums. Per

acabar, es van agafar les dues dissolucions i 1 ml de vitamines i es va barrejar tot amb l'ajuda d'un imant i l'agitador (en el cas de l'addició dels reguladors de creixement s'inclourien en aquest moment).

Cada litre de medi es dispensà en 48 tubs de vidre de 150 x 24 mm els quals es taparen amb taps de plàstic de 25 mm de diàmetre, varen ser convenientment etiquetats i passaren a l'autoclau on foren esterilitzats uns 30 min a 120 °C a pressió d'1 atm.

3.4. SANEJAMENT VEGETAL

Per a l'obtenció de material sa lliure de virus es va utilitzar el cultiu d'àpex caulinars combinat amb la tècnica de la termoteràpia natural.

3.4.1. Termoteràpia natural

La recol·lecció dels brots es va dur a terme a mitjans d'estiu, majoritàriament durant el mes de juliol, on les temperatures assoleixen els seus màxims i d'aquesta manera actuen en forma de termoteràpia natural entre els 33-38 °C. Es va mirar la previsió de l'AEMET per preveure quan era més favorable fer la recollida de les mostres. Per si no era suficient, es van escollir els dies de més calor i les hores de més insolació (14-15 p.m). Aquests fets combinats amb el reg que es va aportar a les plantes de 4,6 litres/hora i planta en un total de 4 hores setmanals, pels tècnics encarregats de Sa Granja quan se'ls hi va demanar, va propiciar el desenvolupament vegetatiu dels ceps utilitzats.

També, s'ha de tenir present que cada vegada que s'agafaren mostres es prenia la majoria d'àpexs de la vinya fet que comportava que la pròxima vegada fos tot material tendre en ple creixement.

Amb l'ús d'aquesta tècnica no es pretenia inactivar els virus com cerquen amb altres processos de termoteràpia sinó que es perseguia el propòsit que la multiplicació i el creixement de l'àpex caulinar fos més accelerat que la velocitat de replicació dels virus i d'aquesta manera poder aconseguir els meristemes lliures d'infeccions.

3.4.2. Cultiu d'àpex caulinars

- **Recollida:** Un cop es trobaven les tiges tendres i ben desenvolupades i el nostre medi de cultiu preparat, s'agafaren els brots apicals d'uns 10 cm i es conservaren en un recipient amb aigua i gel per afavorir que es mantinguessin turgents i en les millors condicions hídriques mentre s'arribava i es preparava el laboratori.

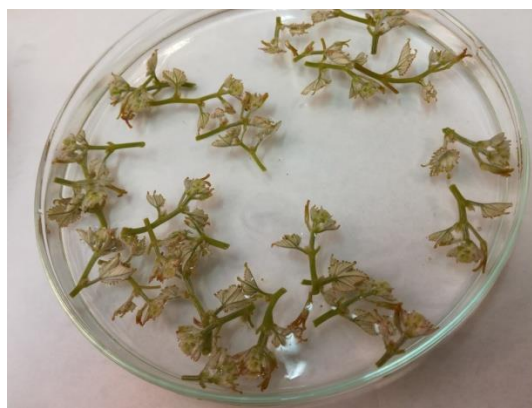
Les mostres es recolliren de la fila 3 de les plantes n° 21-30 i fila 4 de 32-34 en el cas de Vinater Blanc, mentre que l'Esperó de Gall es localitzava a la fila 8 entre les plantes n° 21-30.

- **Esterilització i preparació d'explants:** Una vegada al laboratori, es procedí a l'eliminació de les fulles i els circells i es van tallar els àpexs de 2-3 cm deixant-los en aigua per evitar la seva deshidratació. Un pic que tots els explants estigueren preparats va començar el procés de desinfecció mitjançant aigua destil·lada autoclavada a la que se li havia afegit un 2.5% d'hipoclorit sòdic unes gotes del detergent Tween 20 què afavoreix el contacte de les partícules eliminant la tensió superficial de l'aigua. Es van mantenir submergits 7,5 minuts removent-los perquè quedassen uniformement ben desinfectats.



Il·lustració 16. Eliminació de les fulles i els circells

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols

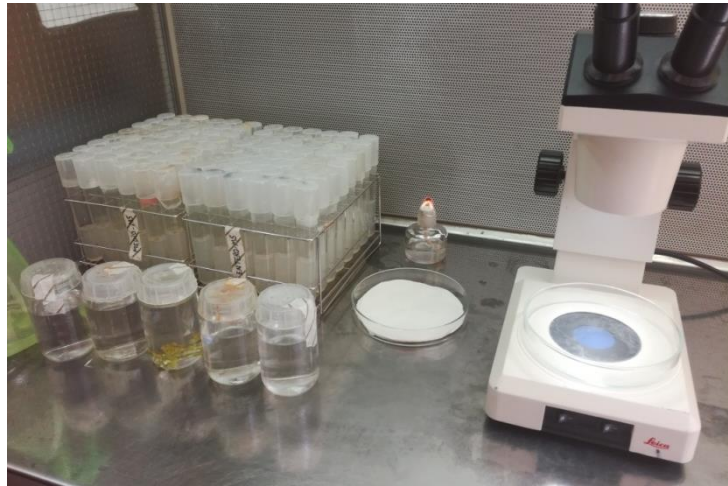


Il·lustració 17. Àpexs en aigua

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols

Un cop transcorregut el temps d'espera, es rentaren tres cops amb aigua destil·lada i autoclavada. Això es feia amb la finalitat d'eliminar totes les restes que podien quedar de l'hipoclorit sòdic. A partir d'aquest punt tot es va dur a terme dins la campana de flux laminar. La cabina o campana de flux laminar és un dels instruments fonamentals en el cultiu *in vitro*, ja que aquestes estan dissenyades per proporcionar, mitjançant una sèrie de filtres, un aire net i constant cap a l'usuari de forma que queda la zona de feina lliure de possibles contaminacions externes.

Quan s'anava a cercar les mostres al camp ja es deixava la làmpada de rajos ultraviolats encesa. Aquesta té una acció germicida per esterilitzar la campana abans de ser utilitzada.



Il·lustració 18. Instruments preparats per la sembra dins la cabina de flux laminar

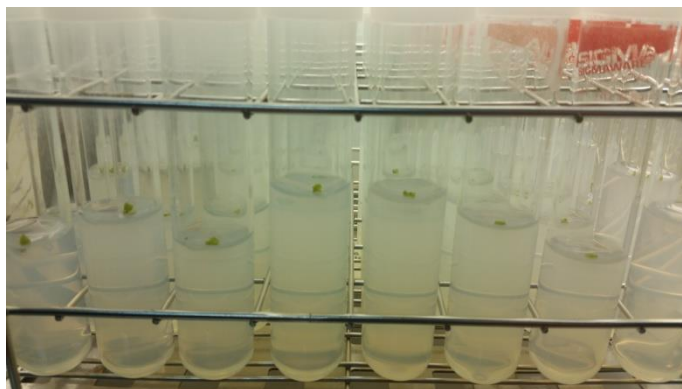
Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols

- **Sembra:** Una vegada es van tenir els explants desinfectats dins el vas amb aigua, es prepararen les plaques de Petri amb el paper de filtre. Tot el material utilitzat havia estat autoclavat. A continuació, de cada explant es va treure una porció meristemàtica molt petita que es tallà sobre el paper de la placa mínimament banyat amb aigua destil·lada per evitar la seva deshidratació durant el procés de tall.

La realització del tall es duia a terme amb l'ajuda del bisturí i les pinces curtes. El tall cal que sigui net eliminant tot el que no interressi conservar. Per tal de facilitar la feina a l'hora de determinar on aplicar la secció es va fer servir una lupa.

Quan ja es van tenir els explants apunt, amb l'ajuda de les pinces llargues, es dipositaren sobre el medi de cultiu anteriorment preparat dins cada tub d'assaig. A l'hora d'inserir-lo es va tenir en compte el tropisme natural de l'explant de manera que quedava mínimament sembrat dins el medi intentant introduint-lo manco d'un 25% del total.

Una vegada sembrada tota la gradeta sencera, cada una formada per 48 tubs, s'entrava a dins la càmera de cultiu on van ser incubats 3-4 mesos a unes condicions de 25 °C de temperatura diürna, 22 °C de temperatura nocturna i un fotoperíode de 16 hores.



II·lustració 19. Sembra acabada de realitzar de Vinater Blanc

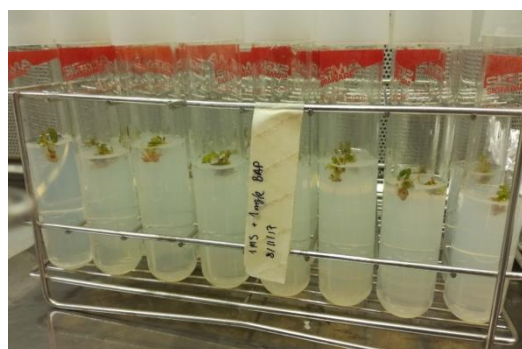
Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols

Durant aquest temps d'incubació s'anaren retirant tots els tubs on s'havia contaminat o havia mort l'explant. Aquest també era el moment de repicar les plantes supervivents. Quan tengueren uns pocs centímetres, es va procedir a canviar al medi per afavorir la caulogènesi amb l'addició d'1 mg/l de BAP. Posteriorment, quan s'observà un bon desenvolupament vegetatiu es repicaren al medi d'arrelament amb una concentració d'AIB de 2 mg/l.



II·lustració 20. Gradeta on no han reaccionat bé i han mort

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols



II·lustració 21. Gradeta on s'aprecia un bon color verd amb el medi MS-0 + BAP

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols

3.4.3. Trasplantament i aclimatació

El darrer pas del procés era el de retornar la funcionalitat i que a poc a poc les plantes recuperassin el metabolisme de la nutrició autòtrofa que s'havia perdut en les primeres etapes del cultiu *in vitro*. L'acimatació és, encara que no ho sembli, un punt clau i delicat en la recuperació de les plantes. S'ha de tenir molt present l'estat hídric, la nutrició i la temperatura, així com també procurar no donar cap passa que no correspongui ja que les plantes durant el procés són molt sensibles a qualsevol canvi.

Aquesta va ser iniciada quan es va apreciar una grandària (8-10 cm) de la zona radicular i aèria. Per realitzar el canvi fou necessari un tassó de plàstic que feia de cossioll ple d'una mescla de turba amb vermiculeta, tot autoclavat per evitar qualsevol tipus de contaminació. Durant el transplant es va treballar dins la cambra de flux afavorint les condicions d'asèpsia.

El procés va començar extraient la planta del tub amb el medi de cultiu anant molt amb compte que no es rompés a causa de la tendresa dels seus teixits. Una vegada treia del tub es va procedir a la retirada de totes les restes de medi que quedaven per les arrels ja que no interessava que hi restassin hormones o medi de cultiu que ens podria ser contraproductiu.

Una vegada la planta estava preparada, s'incorporava en el substrat intentant que les arrels tenguessin un bon contacte amb el nou medi i es regava amb MS. Finalment, quedava cobert amb una bossa de plàstic hermètica on s'anava pulveritzant aigua destil·lada per mantenir uns nivells d'humitat i així evitar la dessecació de la nova planta.



Il·lustració 22. Plantes aclimatant-se dins la cambra

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols

A partir d'aquest moment, les plantes van anar creixent fins que es van haver de canviar les bosses perquè la part vegetativa ja no hi cabia. També va ser important l'obertura gradual de la bossa que s'anava foradant cada cop més per afavorir una aclimatació exitosa.

Com a darrera etapa, una vegada ja es mantenien amb la bossa ben oberta dins la cabina, era el moment de trasplantar les plantes a cossiols més grans i dur-les al Fitotró sense bossa. El Fitotró és una cambra de creixement on es manté la temperatura a uns 25 °C,

la humitat en el 40-50 % i té un fotoperíode de 12 hores. Un cop aclimatats a la càmera i ja apreciand-se un notable creixement s'agafaren les mostres per a la realització del test ELISA final de les plantes.



Il·lustració 23. Creixent dins la cambra

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols



Il·lustració 24. Darrer estadi dins la cambra per passar al Fitotró

Imatge realitzada per Joan Miquel Truyols

3.5. CARACTERITZACIÓ AGRONÒMICA

Per aquest apartat es van utilitzar ceps de vinyes de Vinater Blanc provinents de la bodega Can Axartell. Concretament, es van determinar les següents dades agronòmiques:

- Producció per cep
- N° de raïms per cep
- N° de sarments per cep
- N° de polzes per cep
- Pes del raïm

Aquests paràmetres productius i vegetatius es mesuraren durant l'estiu de l'any 2017. El nombre de pàmpols, de raïms, de polzes i de producció per cep es determinaren sobre quatre ceps representatius de la varietat, mitjançant pesat i recompte durant la verema. El pes mitjà de raïm es va determinar a partir de 5 raïms seleccionats atzarosament. A la primavera es determinaren el nombre de sarments dels quatre ceps estudiats.

3.6. CARACTERITZACIÓ DEL POTENCIAL ENOLÒGIC: QUALITAT DEL MOST

La verema per a l'obtenció de les dades utilitzades es va dur a terme els anys 2016 i 2017. Aquesta dada va ser presa després de diversos controls de maduració que van consistir en un mostreig on es recolliren vàries baies per cep alternant raïms exposats i no exposats a la radiació solar amb altres de la part inferior, mitjana i superior del raïm. El raïm va ser transportat a les instal·lacions de la Universitat de les Illes Balears dins caixes de 15 kg per mantenir-lo en les millors condicions possibles. Un cop allà, s'agafà una mostra de 20-25 baies del conjunt de raïms i es va mantenir dins les cambres de refrigeració fins al moment de l'anàlisi.

Es realitzaren dues microfermentacions a partir dels raïms seleccionats a l'atzar. Van ser determinats el nivell de polifenols totals i antocians segons el mètode d'Iland, també els aminoàcids i els precursors aromàtics. El raïm restant va ser mantingut dins la càmera frigorífica a 2 °C fins l'endemà quan es va dur a terme la vinificació.

Les baies es van rebregar manualment i es va determinar el nivell de maduresa seguint les instruccions descrites per l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV).

| Paràmetre estudiat | Mètode analític emprat |
|--------------------------------|--|
| Sucres (°Brix) | Refractometria |
| Acidesa total (g/l àcid màlic) | Volumetria àcid-base |
| pH | Potenciometria |
| Àcid màlic | Mètode enzimàtic + espectrofotometria UV - VIS |

El pH es va medir mitjançant el pH-metre (CRISON bàsic 20) mentre que la determinació dels sòlids solubles es va dur a terme amb un refractòmetre de mà (Zuzi 50305150, ZUZI). Finalment, la quantificació de l'àcid màlic i tartàric es va realitzar amb l'ajuda d'un analitzador multiparamètric.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Estat inicial de les varietats objecte d'estudi en la col·lecció actual de Sa Granja respecte a virosis

Per començar, cal tenir present que al inici del projecte les dues varietats es consideraven absents de garantia sanitària i per això es trobaven fora de les llistes de varietats comercials. D'Esperó de Gall es disposava d'una sola planta lliure de virus i ja s'havia iniciat el procés d'inscripció d'aquesta varietat. Afortunadament ha estat recentment inscrita a la llista (10/05/2018). Aquest fet li dóna molta més facilitat per ser conservada i utilitzada en l'àmbit comercial i fugir del perill de la desaparició i erosió genètica. Els nostres resultats podran ser utilitzats per conèixer un poc més sobre la varietat davant la resposta al cultiu *in vitro* i obtenir nou material per a la seva multiplicació. Pel que fa al Vinater Blanc es troba en el punt de partida davant el procés de sanejament per poder realitzar les posteriors sol·licituds davant el ministeri per la seva inclusió dins la llista de varietats comercials. Per tots aquests motius gran part d'aquest projecte va destinat al Vinater, ja que era on es necessitava dedicar més esforços.

Un punt important per iniciar el procés de sanejament era conèixer l'estat inicial de les plantes "mare" de les quals s'agafarien les mostres per cultivar *in vitro*. Els resultats són força diferents per ambdues varietats.

En referència a l'estat sanitari dels ceps de Vinater Blanc, les plantes presentaven infeccions dobles i triples (Taula 1). Podem observar com el virus de l'entrenús curt infecció (GFLV) fou el que mostrà manco incidència (18 %) a diferència de GFKV, GLRaV-1 i GLRaV-3 on trobarem un nivell d'infecció del 91, 82 i 82 % a les plantes, respectivament (Figura 1). Per tant, la majoria de ceps estan força infectats per diversos virus al mateix moment.

| Varietat | GFLV | GFKV | GLRaV-1 | GLRaV-3 |
|--------------|------|------|---------|---------|
| VINATER 4-33 | + | + | - | + |
| VINATER 4-32 | + | - | + | + |
| VINATER 3-21 | - | + | + | + |
| VINATER 3-22 | - | + | + | + |
| VINATER 3-23 | - | + | + | - |
| VINATER 3-24 | - | + | + | + |
| VINATER 3-25 | - | + | - | + |

| | | | | |
|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| VINATER 3-26 | - | + | + | - |
| VINATER 3-28 | - | + | + | + |
| VINATER 3-29 | - | + | + | + |
| VINATER 3-30 | - | + | + | + |
| TOTAL | 2/11 | 10/11 | 9/11 | 9/11 |

Taula 1. Resultats del test ELISA de les 11 plantes inicials de la varietat Vinater Blanc

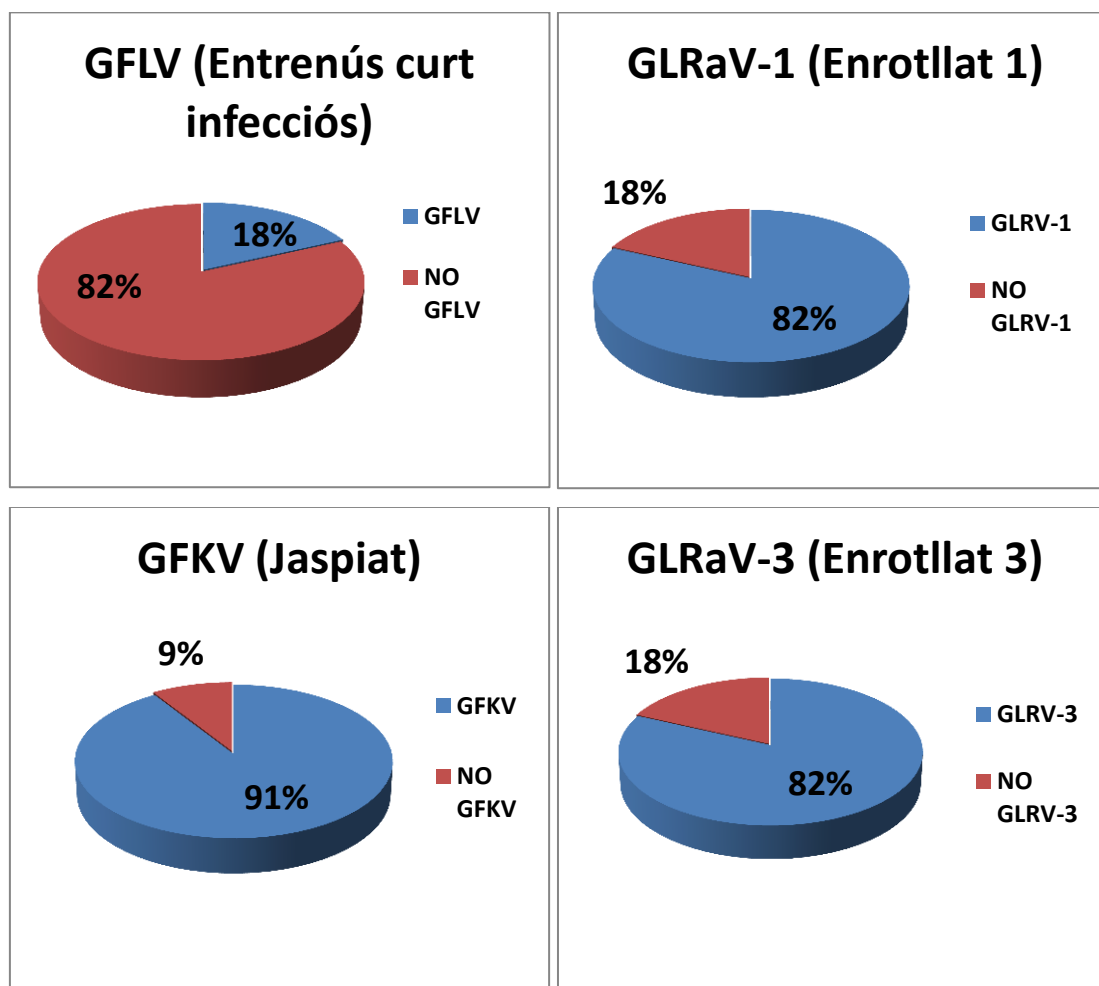


Figura 1. % inicial d'infecció de les diferents virosis al total de les 11 plantes mare de Vinater Blanc

Referent a Esperó de Gall (EG) les plantes també presentaven infeccions dobles i triples exceptuant tres plantes infectades únicament amb entrenús curt (GFLV) (Taula 2). A diferència al Vinater Blanc, a l'Esperó de Gall va tenir un nivell bastant més elevat d'incidència l'entrenús curt (75 %) mentre que l'enrotllat 1 fou absent a les plantes mostrejades. El jaspiat i l'enrotllat 3 es trobaren ambdós al 81 % de les analítiques realitzades (Figura 2). Cal esmentar que, GFKV i GLRaV-3, es trobaven sempre juntes a les mateixes plantes i l'únic canvi que es podia apreciar era si l'entrenús curt hi era o no present.

| Varietat | GFLV | GFKV | GLRaV-1 | GLRaV-3 |
|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| EG-56 | - | + | - | + |
| EG-52 | + | + | - | + |
| EG-58 | + | + | - | + |
| EG-66 | - | + | - | + |
| EG-45 | - | + | - | + |
| EG-41 | + | + | - | + |
| EG-59 | + | - | - | - |
| EG-54 | + | - | - | - |
| EG-46 | + | + | - | + |
| EG-55 | + | + | - | + |
| EG-47 | + | + | - | + |
| EG-71 | + | + | - | + |
| EG-64 | + | + | - | + |
| EG-60 | + | + | - | + |
| EG-63 | + | - | - | - |
| EG-72 | - | + | - | + |
| TOTAL | 12/16 | 13/16 | 0/16 | 13/16 |

Taula 2. Resultats test ELISA de les 16 plantes inicials de la varietat Esperó de Gall

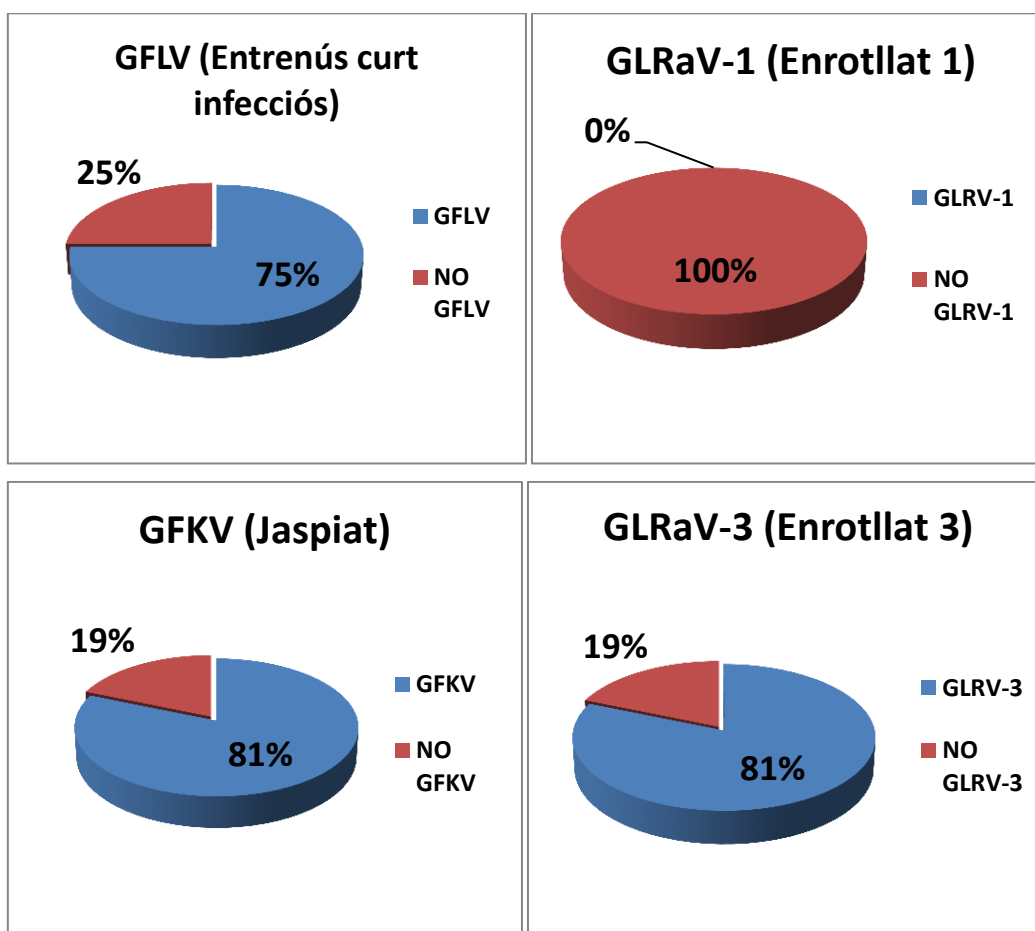


Figura 2. % inicial d'infecció de les diferents virosis sobre el total de 16 plantes mare d'Esperó de Gall

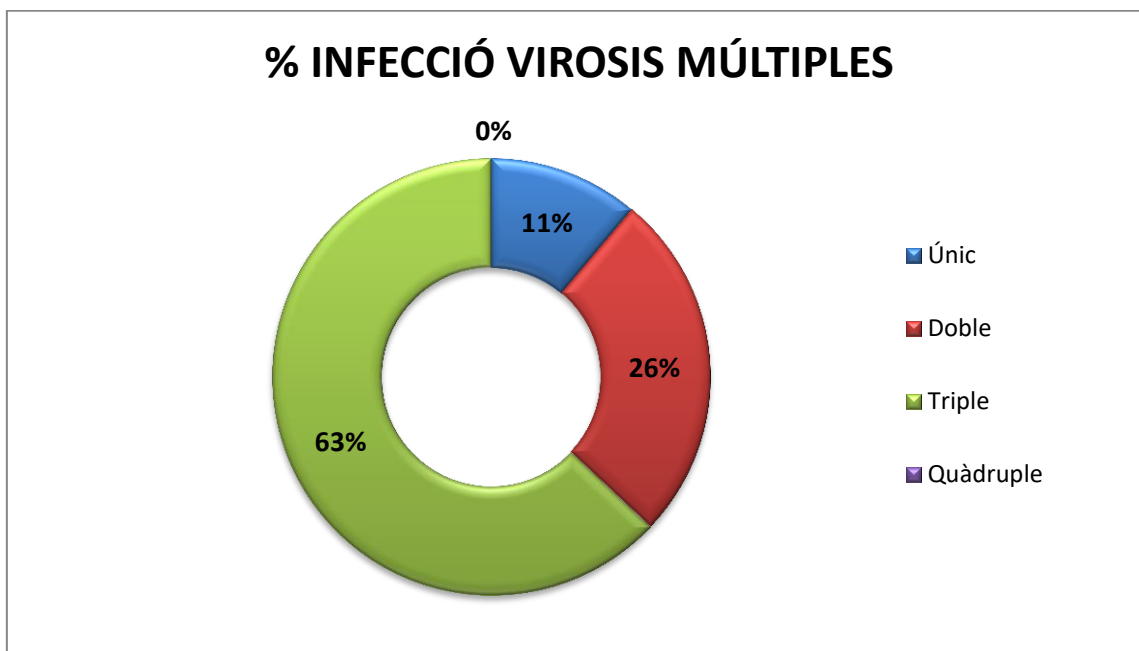


Figura 3. Percentatge d'infecció simple i múltiple dels virus presents a les 11 plantes de Vinater Blanc i les 16 plantes inicials d'Esperó de Gall.

En conjunt, a molts de casos, el nivell d'infecció no només era simple d'un sol virus sinó que en abundància es trobava infecció múltiple. Les plantes analitzades en conjunt mostraren un 26 % d'incidència de doble virosis i la gran majoria, amb un 63 %, tenia triple infecció. No es van trobar casos amb més de 3 virus junts als ceps estudiats (Figura 3).

A trets generals trobam que, el virus del GLRaV-3 va ser detectat a les dues varietats amb gran incidència fet que concorda amb els resultats dels estudis previs que demostren un grau alt d'infecció a les Balears sobre les varietats minoritàries (Cifre et al., 2003, Cretazzo et al., 2010). Aquest virus té una elevada incidència arreu del món fet que se li atorga a la seva ràpida velocitat de replicació per sobre la resta (Velasco et al., 2012). La forta presència de GFKV és un resultat esperat ja que a estudis previs es va detectar un elevat grau d'infecció d'aquest normalment combinat amb altres (Elaououad et al., enviat). No a totes les varietats mallorquines s'ha mostrat aquest alt nivell d'infecció fet que fa pensar que les varietats estudiades són més susceptibles (Cretazzo et al., 2010). Referent a l'estat de GLRaV-1, cal destacar l'absència de plantes infectades trobades en Esperó de Gall fet que podria indicar una major resistència de la varietat. S'ha de tenir en compte que l'enrotllat 1 és el segon més important a les varietats majoritàries de Balears per darrere de l'enrotllat 3 (Cretazzo et al., 2010) però aquest fet canvia quan ens referim a les varietats minoritàries ja que la

seva presència resulta molt inferior (Elaououad et al., enviat). Finalment, cal destacar que la poca incidència del GFLV sobre el Vinater Blanc no és un fet molt comú ja que aquest virus es troba entre els més comuns en les nostres condicions (Cretazzo et al., 2010) a més de ser un dels que provoquen les malalties més importants arreu de tot el món (Krizan et al., 2009).

Resumint, les plantes mare utilitzades provinents del banc de germoplasma de Sa Granja de les dues varietats locals es troben àmpliament infectades per virosis. També, s'aprecia una falta de personal i manteniment per part de la Conselleria d'Agricultura i Pesca per dur ben supervisat el cultiu de BGPM enfront de plagues, estressos i altres adversitats que es puguin donar. Malgrat això, esper que la nova plantació jove de Sa Granja de varietats minoritàries realitzada l'any 2017 es mantengui en condicions òptimes per tenir una bona reserva genètica per quan sigui necessària.

4.2. Resposta front el cultiu *in vitro* de les varietats objecte d'estudi

| Sembra 11-12 de juliol de 2017 | | Esperó de Gall | | | | |
|--------------------------------|--------------|----------------|----------|----------------|----------|----------|
| | 48 tubs MS-0 | | | 48 tubs ½ MS-0 | | |
| Dates de control | 18-08-17 | 03-11-17 | 15-01-18 | 18-08-17 | 03-11-17 | 15-01-18 |
| Creixement | 10 | 3 | 0 | 14 | 7 | 1 |
| Sense creixement | 18 | 23 | 26 | 30 | 35 | 37 |
| Contaminat | 20 | 22 | 22 | 4 | 6 | 9 |

Taula 3. Evolució de les sèmres en les diferents dates de control en l'Esperó de Gall al medi MS-0 i ½ MS-0

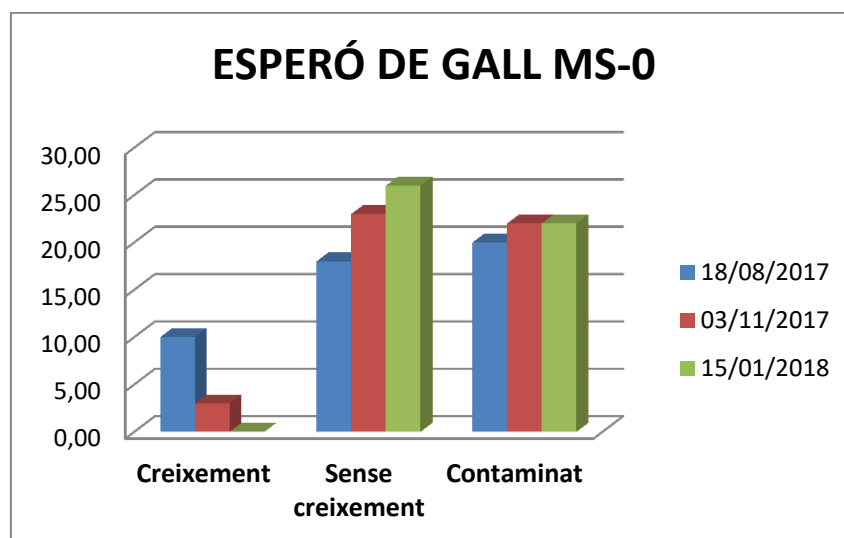


Figura 4. Evolució de les sèmres, n=48, en les diferents dates de control en l'Esperó de Gall al medi MS-0

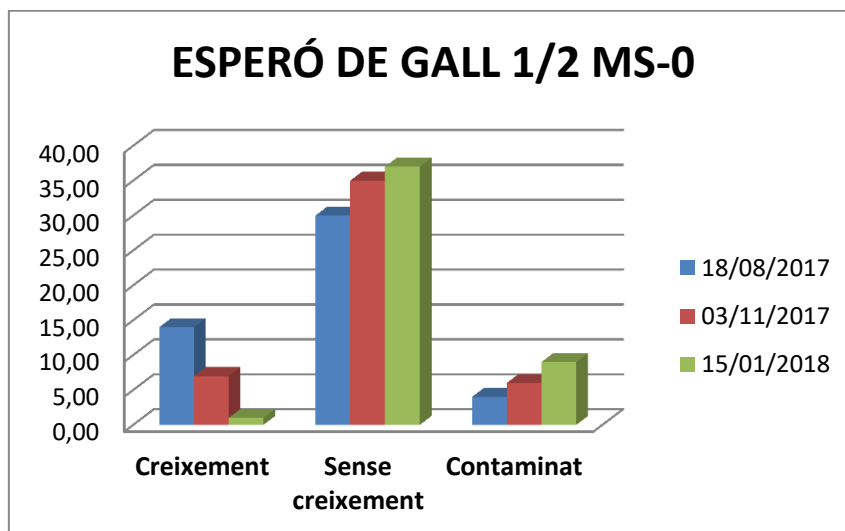


Figura 5. Evolució de les sèmres, n=48, en les diferents dates de control en l'Esperó de Gall al medi ½ MS-0

Com es pot apreciar, hi ha un esquema bàsic que es repeteix a ambdós medis de cultiu. Els primers dies després de la sembra hi trobam el màxim de creixement que tendrem, són l'etapa més delicada i on es perceben els majors canvis (Taula 3). Com a creixement hi entenem la suma dels explants que es mantenen verds i els que s'aprecia un notable creixement, tant sigui un creixement vegetatiu normal com la multiplicació de call.

En la mateixa línia hi trobam els tubs contaminats, ja que en uns pocs dies sorgiran la majoria de pèrdues que tendrem per aquest fet i que seran importants en comparació al temps transcorregut en el procés. Hi trobam contaminació per fongs i per bacteris. Transcorregudes les primeres 2 setmanes, el percentatge de contaminació baixa molt i moltes de les baixes que hi ha són causades per altres motius com l'obscuriment del medi. L'obscuriment del medi pot ser causat per l'exsudació de substàncies fenòliques de determinats materials vegetals, que s'oxiden en el medi i són d'elevada toxicitat pels explants *in vitro*.

Cal destacar que l'índex de contaminació a l'Esperó de Gall sembla més evident al medi de cultiu ½ MS-0 amb més del doble d'incidència per sobre de MS-0, per tant consideram MS-0 més adient per l'establiment *in vitro* d'aquesta varietat (Taula 4).

| Esperó de Gall | | |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| | MS-0 | ½ MS-0 |
| Contaminades | 22/48 (45,8%) a | 39/48 (81,3%) b |

Taula 4. Percentatge de contaminació segons el medi en Esperó de Gall. n= 48; p<0.001.

Moltes de les plantes en creixement, a mesura que avançava el procés, anaven perdent color, vigorositat i en pocs dies s'assecaven. Aquest fet pot ser degut a diferents causes, com l'esgotament del medi, la falta d'adaptabilitat a les hormones per part de la varietat, entre d'altres. Tot això va provocar que el percentatge final de plantes vives que poguessin passar al procés d'acimatació fos especialment baix (Taula 5).

| Sembra 18-22 de juliol de 2017 | | Vinater Blanc | | | | |
|--------------------------------|---------------|---------------|----------|-----------------|----------|----------|
| | 144 tubs MS-0 | | | 144 tubs ½ MS-0 | | |
| Dates de control | 18-08-17 | 03-11-17 | 15-01-18 | 18-08-17 | 03-11-17 | 15-01-18 |
| Creixement | 20 | 7 | 2 | 35 | 15 | 4 |
| Sense creixement | 93 | 102 | 106 | 81 | 96 | 101 |
| Contaminat | 31 | 35 | 36 | 28 | 33 | 39 |

Taula 5. Evolució de les sèmres en les diferents dates de control en Vinater Blanc al medi MS-0 i ½ MS-0

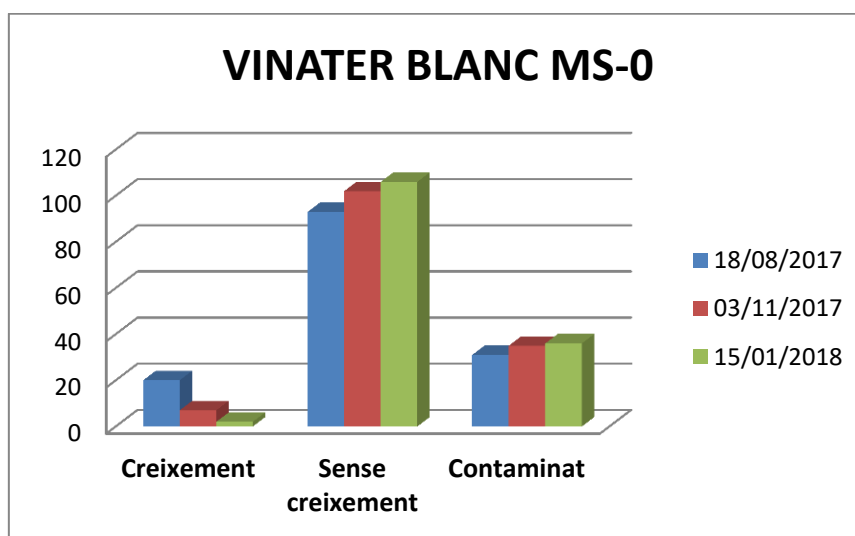


Figura 6. Evolució de les sèmres, n=144, en les diferents dates de control en Vinater Blanc al medi MS-0

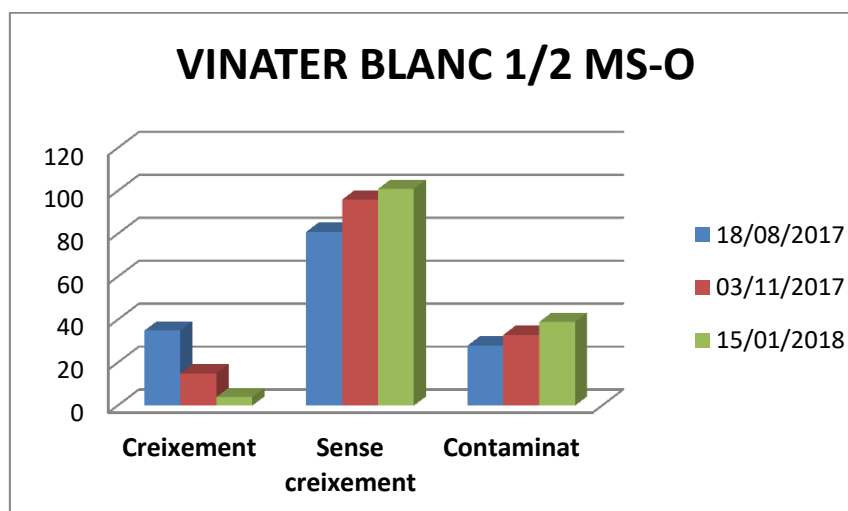


Figura 7. Evolució de les sèmres, n=144, en les diferents dates de control en Vinater Blanc al medi ½ MS-0

En el cas del Vinater Blanc realitzarem un nombre més elevat de sèmres amb els dos medis de cultiu, MS-0 i ½ MS-0.

L'esquema bàsic es repeteix com en el cas de l'Esperó de Gall, durant les primeres jornades afloren la majoria de tubs contaminats per espores de fongs o bacteris que seran eliminats del procés per mantenir les cambres el més net possible. El fet de tenir aquests graus de contaminació, fa pensar que els protocols d'esterilització s'haurien d'acabar d'adaptar a l'espècie i en concret a la varietat per ser encara més efectius.

A aquesta varietat és cert que s'aprecia un nivell de no-creixement bastant més elevat que a l'Esperó així com van passant les setmanes arribant a ser del 73,6% al final.

L'índex de contaminació al Vinater Blanc sembla més igualat que en el cas de l'Esperó, per tant consideram que no hi hauria diferències significatives entre els dos medis per l'establiment *in vitro* d'aquesta varietat (Taula 6). El grau de creixement al Vinater, en principi, és lleugerament superior al de l'Esperó fet que podria representar una major adaptabilitat front aquest procés de sanejament. Així i tot, el nombre de plantes resultants és molt escàs. L'índex de major creixement i les similars taxes de contaminació, fan pensar que el medi ½ MS-0 és més apte per dur a terme aquest procediment.

| Vinater Blanc | | |
|----------------------|-------------------|-------------------|
| | MS-0 | ½ MS-0 |
| Contaminades | 36/144 (23,61%) a | 39/144 (27,08%) a |

Taula 6. Percentatge de contaminació segons el medi a Vinater Blanc. n= 144; p>0.001.

Tan Vinater Blanc com l'Esperó de Gall han presentat uns baixos rendiments en cultiu *in vitro*. Aquest fet, què és extrapolable a molts altres resultats semblants o pitjors d'altres treballs i estudis (Jiménez, 2018; Llabrés, 2014; entre d'altres) el que ens demostra que aquesta tècnica és útil per sanejar les varietats però al mateix temps és força complicada i falta molta investigació en aquest aspecte per aconseguir un protocol més adequat a les diferents condicions i varietats.

Cal tenir present que agafarem les mostres a camp dins l'estiu per aprofitar la termoteràpia natural fet que ens ajuda per una banda a disminuir la incidència de virosis present, però per altra banda, va en contra, ja que a aquesta època les plantes ja no tenen un creixement vegetatiu tan esplendorós i els costa més créixer *in vitro*.

És sabut que no totes les varietats es comporten igual davant aquesta tècnica i pel que podem extreure sembla que l'Esperó de Gall té majors dificultats durant el seu establiment *in vitro* amb un 1.02%. Pel que fa al Vinater Blanc, hem pogut treure 6 plantes resultants d'aquest procés, el que correspondria a un 2.08% del total sembrat fet que ens porta a pensar que és més apte i s'adapta millor a la tècnica (Taula 7). Tot i així, les anàlisis estadístiques, amb un valor de $p=0,573$, ens revela que en principi no es pot confirmar que existeixi una correlació directe entre aquests dos factors. La influència dels medis de cultiu en la contaminació i en les varietats i la influència de la varietat de vinya respecte a la seva supervivència al cultiu *in vitro* es va analitzar mitjançant el test Chi-Quadrat, utilitzant el programa XLSTAT 2018.ink.

| | Esperó de Gall | Vinater Blanc |
|---------------|-----------------------|----------------------|
| Vives | 1 | 6 |
| Mortes | 65 | 213 |

Taula 7. Quantitat de plantes vives i mortes durant el procés de sanejament a ambdues varietats. Les plantes vives són les supervivents de cada varietat mentre que les mortes només sumen les plantes sense creixement, exclouent les contaminades per no interferir en els resultats.

Aquest baix índex de supervivència fa pensar que hi podria haver una correlació entre el grau d'infecció dels virus i les plantes supervivents mitjançant aquesta tècnica de cultiu *in vitro*, com també menciona Jiménez, 2018 al seu treball.

En referència a la supervivència de les dues varietats als dos medis de cultiu, l'estadística amb $p=0,288$ revela que no hi ha una diferència significativa entre els resultats obtinguts en el medi MS-0 i $\frac{1}{2}$ MS-0 (Taula 8). D'aquesta forma es podria utilitzar menys quantitat de productes i així optimitzar els protocols.

| | MS-0 | $\frac{1}{2}$ MS-0 |
|---------------|------|--------------------|
| Vives | 2 | 5 |
| Mortes | 132 | 138 |

Taula 8. Quantitat de plantes vives i mortes durant el procés de sanejament comparant els dos medis de cultiu. Les plantes vives són les supervivents de cada varietat mentre que les mortes només sumen les plantes sense creixement, exclouent les contaminades per no interferir en els resultats.

4.3. Èxit en el sanejament de les dues varietats objecte d'estudi

Com a resultat del procés de cultiu *in vitro* es van aconseguir un total de 7 plantes entre les quals hi havia una d'Esperó de Gall i les sis restants de Vinater Blanc. Totes aquestes, manco una planta de Vinater que no acabava de reaccionar bé, passaren exitosament el procés d'aclimatació i un cop estaren desenvolupades es va procedir a l'anàlisi mitjançant la tècnica ELISA per conèixer l'estat sanitari d'aquestes.

La taula 8 mostra els resultats de la Elisa de les plantes provinents del cultiu *in vitro*.

| RESULTATS ELISA | | | | |
|-----------------|------|------|---------|---------|
| Codi | GFLV | GFKV | GLRaV-1 | GLRaV-3 |
| EG1 | - | - | - | + |
| VB1 | - | - | - | + |
| VB2 | - | - | - | + |
| VB3 | - | - | - | + |
| VB4 | - | + | - | + |
| VB5 | - | + | - | + |

Taula 9. Resultats de la tècnica Elisa de les plantes obtingudes en el procés

Es resultats mostren que dels tres virus presents a les plantes inicials d'Esperó de Gall, com són el GFLV, el GFKV i el GLRaV-3 només persisteix aquest darrer (Taula 2).

En referència a l'estat de les noves plantes de Vinater Blanc, es pot veure com s'ha passat d'un gran nivell de contaminació on les plantes inicials presentaven altes incidències dels virus de GFLV, GFKV, GLRaV-1 i GLRaV-3 obtenint com a resultat 2 plantes amb infecció doble de GFKV+GLRaV-3 i altres 3 amb una infecció simple de GLRaV-3 (Taula 8).

El GLRaV-3 és un dels virus més complicats d'eliminar per culpa de la seva velocitat de replicació i mètode de transport per dins les plantes fet que fa molt difícil el seu sanejament.

Si bé és cert que no s'ha obtingut cap planta sana, totes les plantes resultants tenen un nombre molt inferior d'infecció comparat amb les inicials, servint així com a material de partida per als propers treballs de sanejament.

4.4. Estudi de les característiques agronòmiques i de paràmetres de qualitat de fruit

En referència a les característiques agronòmiques, el nombre de polzes, taula 10, normalment és habitual que en tinguin 3 o 4 per braç, és a dir, de 6 a 8. Per tant, ens movem dins aquests marges, encara que 4 és considerat un valor un poc baix. De cada polze han de sortir 2 sarments (12-16 normalment) i les fulles que surten de cada un s'anomenen pàmpols. Cada sarment sol tenir d'1 a 2 raïms. Resumint, el nombre de raïms és correcte, ja que encara que molts cops interessa producció de litres, s'ha de tenir en compte que a major nombre de raïms, pitjor maduració i augmenta considerablement el risc d'agafar malalties.

| Vinater Blanc | | | | |
|----------------------|--------------------|-----------------|------------------|---|
| Nº Cep | Nº sarments | Nº raïms | Nº polzes | Observacions |
| 1 | 13 | 10 | 7 | |
| 2 | 11 | 15 | 4 | Raïms molt compactes i amb botrytis àcida |
| 3 | 11 | 14 | 7 | |
| 4 | 10 | 11 | 5 | |

Taula 10. Paràmetres agronòmics del Vinater Blanc

Pel que fa a la taula 11, la data de verema de la varietat de Vinater Blanc és del 9 de setembre el que coincideix amb la maduració d'una varietat mallorquina com és el Prensal, que estaria en la mateixa línia. Quant a ° Brix està relacionat amb el grau alcohòlic que s'ha anomenat anteriorment. Cal esmentar els valors elevats de pH, haurien d'estar, en un vi blanc, entre els 3,3 - 3,4 fet que el fan més àcid i més refrescant. El valor 3,87 de l'any 2017, referent a l'acidesa total, és massa baix ja que hauria d'estar per sobre dels 4,5 g/l TH₂. Per tant, hauria de ser corregit mesclant amb altres varietats d'acidesa més alta, o bé, afegint àcid tartàric en el most.

L'Esperó de Gall, per la seva part, ve mitjanament prest, comparable amb el Merlot. Quant a ° Brix està relacionat amb el grau alcohòlic que s'ha comentat anteriorment. En el cas dels valors del pH, estan bé però són lleugerament alts. En el vi negre els valors recomanables es troben entre el 3,4 – 3,5 encara que no té tanta importància com en el cas dels blancs.

| Varietat | Data de la verema | | ° Brix | | Grau alcohòlic probable (%) | | pH | | Acidesa total (g tart/l) | |
|----------------|-------------------|-------|--------|------|-----------------------------|------|------|------|--------------------------|------|
| | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 |
| Vinater Blanc | 09/09 | 29/09 | 21,2 | 19,1 | 12,5 | 11,2 | 3,55 | 3,93 | 4,575 | 3,87 |
| Esperó de Gall | 09/09 | 12/09 | 21,0 | 21,1 | 12,3 | 12,4 | 3,63 | 3,63 | 4,725 | 4,9 |

Taula 11. Paràmetres raïm i most del Vinater Blanc i Esperó de Gall els anys 2016 i 2017.

Com a discussió, comparant i analitzant amb els resultats obtinguts per Escalona 2016, com podem extreure de la taula 12, l'Esperó de Gall es caracteritza per tenir un grau alcohòlic baix però suficient, ja que entra dins els paràmetres establerts, així com percebem que serà el nostre grau alcohòlic probable. Pel que fa a l'acidesa total té uns valors corrents, una mica altets, fet que seria apte per a l'elaboració de vins joves. Cal vigilar però que l'acidesa total no caigui per sota de 4,5 g/l d'àcid tartàric. L'acidesa volàtil, per altra banda, és correcte, no arriba als màxims autoritzats però podria tenir-ne manco. Quant als sucres reductors, per davall de 2 g/l són valors correctes encara que s'elaboraria un vi sec. En el cas de l'àcid màlic és destacable el valor tan baix de l'any 2008 (0,2 g/l), ja que sent el segon àcid més important després del tartàric és difícil d'entendre. D'aquesta manera, aquests valors indicarien que hi ha hagut una fermentació

malolàctica (àcid màlic → àcid làctic) pròpia de les varietats negres on se cerca que el vi perdi l'acidesa verda i adquireixi una acidesa més suau, cosa que ho explicaria.

Pel que fa a la varietat Vinater Blanc, la taula ens mostra que aquesta supera el mínim normatiu de graus alcohòlics referent a varietats blanques, el que la fa apte per a la vinificació. En el cas de l'acidesa total, té uns valors habituals pels valors blancs, ja que se cerca la sensació de frescor. Quant a l'acidesa volàtil, és correcta, ja que no arriba al 0,6, encara que podria tenir-ne manco. Per altra banda, és percepció que la fermentació s'ha portat a terme de forma correcta, ja que el nivell de sucres reductors és normal encara que sobrepassi un poc els 2 g/l. En el cas de l'àcid màlic, en el Vinater no s'ha duit a terme la fermentació malolàctica, ja que se cerca l'acidesa verda tipus "poma" per donar-li frescor al vi.

| Varietat | Grau alcohòlic (%) | | Acidesa total (g tart/l) | | Acidesa volàtil (g/l) | | Sucres reductors (g/l) | | Àcid màlic (g/l) | |
|----------------|--------------------|------|--------------------------|------|-----------------------|------|------------------------|------|------------------|------|
| | 2007 | 2008 | 2007 | 2008 | 2007 | 2008 | 2007 | 2008 | 2007 | 2008 |
| Esperó de Gall | 11.8 | 13.2 | 5.3 | 4.7 | 0.43 | 0.49 | 1.3 | 1.6 | 1.4 | 0.2 |
| Vinater Blanc | 12.9 | 11.8 | 6.2 | 6.2 | 0.42 | 0.53 | 2.3 | 1.6 | 1.7 | 2.1 |

Taula 12. Paràmetres raïm i most del Vinater Blanc i Esperó de Gall els anys 2006 i 2007.

(Escalona et al., 2016)

Respecte als valors de la taula 11 del llibre de *Varietats de vinya a les Illes Balears*, Escalona 2016, l'Esperó de Gall es quedaria amb una mitjana de 5,47 mentre que el Vinater Blanc de 5,94. No són notes excel·lents, però amb cupatge amb altres varietats poden sortir vins de qualitat, amb característiques diferenciadores i exòtiques.

| | Valoració obtinguda en el tast | |
|----------------|--------------------------------|-------------|
| | 2007 | 2008 |
| Esperó de Gall | 4.38 ± 0.23 | 6.55 ± 0.37 |
| Vinater Blanc | 6.00 ± 0.40 | 5.87 ± 0.28 |

Taula 13. Valoració obtinguda en el tast anys 2007 i 2008

(Escalona et al., 2016)

5. CONCLUSIONS

En el present treball, que s'ha duit a terme per tal de recopilar informació sobre les varietats locals de vinya, com l'Esperó de Gall i el Vinater Blanc, i després de realitzar les diferents proves científic-tècniques per tal d'observar com s'adaptaven les dues varietats al cultiu *in vitro*, s'han pogut extreure les següents conclusions:

- Les plantes mare utilitzades provinents del banc de germoplasma de Sa Granja de les dues varietats locals estudiades es troben àmpliament infectades per les virosis més importants a les nostres condicions com són: GFLV, GFKV, GLRaV-1 i GLRaV-3. Especialment per GFKV i GLRaV-3.
- No s'ha apreciat una diferència significativa pel que fa al percentatge de supervivència obtingut amb la utilització dels dos medis de cultiu usats (MS-0 i ½ MS-0).
- Les sèmres realitzades més a la primavera o a principi d'estiu tenen majors taxes de supervivència i aquesta disminueix a mesura que l'estiu va en detriment i les plantes van deturant el seu creixement vegetatiu. Com s'ha vist a altres ocasions, la supervivència d'aquestes plantes un cop *in vitro* decreix molt i encara que aconseguixin créixer uns pocs centímetres, acaben dessecant, com ens ha passat a gran part del nostre cultiu.
- Els baixos nivells de supervivència, d'un 1% en l'Esperó de Gall i del 2% en el cas del Vinater Blanc, independentment del medi utilitzat, fan pensar que aquestes varietats tenen un genotip amb dificultats per adaptar-se al cultiu *in vitro*.
- El virus que presenta major dificultat a l'hora de ser eliminat és l'enrotllat tipus 3 (GLRaV-3). També s'ha de destacar que dues de les set plantes supervivents mantenen el GFKV a més del GLRaV-3. En canvi el percentatge de plantes sanejades de GLRaV-1 i GFLV ha estat molt superior, fet que manifesta una major facilitat de ser eliminats durant el cultiu d'àpexs caulinars.
- Pel que fa a l'èxit en el sanejament, s'ha passat d'un estat on les plantes de les quals es van recollir les mostres tenien un nivell força alt d'infecció vírica de GFLV, GFKV, GLRaV-1 i GLRaV-3, obtenint com a resultat 2 plantes amb infecció doble

de GFKV+GLRaV-3 i altres 4 amb una infecció simple de GLRaV-3. No s'ha obtingut cap planta lliure de virus. Així i tot, les plantes obtingudes poden ser el punt de partida per a propers treballs i estar més a prop en el procés d'autorització.

- Tot i que la combinació de cultiu *in vitro* amb la termoteràpia natural han mostrat ser tècniques eficients per a l'eliminació d'alguns virus a les varietats Vinater Blanc i Esperó de Gall, es necessiten més estudis per millorar l'eficiència del protocol de sanejament per aquestes varietats.
- Pel que fa als paràmetres de qualitat, les dues varietats han mostrat qualitats suficients per a poder ser considerades per a la seva vinificació. No farien uns vins excel·lents totes soles, però amb cupatge amb altres varietats poden sortir vins de qualitat, amb característiques diferenciadores i exòtiques.

6. BIBLIOGRAFIA

Aramburu-Zabala Higuera, J. (2007). *Enigmas de la arqueología balear*. Palma: Documenta Balear.

Archiduque Lluís Salvador d'Àustria, (1891). *Die Balearen: im wort und bild gelchildert*.

Arxiu Municipal de Palma.

Bota J. (1999). *Caracterització morfològica i fisiològica de varietats de vinya (Vitis vinífera L.) autòctones de les Illes Balears*. Tesis de llicenciatura. UIB

Bota, J., Elaououad, H., Pou, A., Tomàs, M., Montero, R., Ribas-Carbó, M. i Medrano, H. (2017). *Combined effect of virus infection and water stress on water flow and water economy in grapevine*. *Physiologia Plantarum* 160: p.171–184.

Bota, J., Cretazzo, E., Montero, R., Rosselló, J. i Cifre, J. (2014). *Grapevine fleck virus (GFkV) elimination in a selected clone of Manto Negro cv. and its effects on photosynthesis*. *Journal International des Science de la Vigne et du Vin. A premsa*.

Branas, J. (1948). *Recherches sur la dégénérescence infectieuse de la Vigne*. *Bull. O.I.V.* 205, p. 7-12.

Cabaleiro C., Segura A., García-Berrios J.J. (1999). *Effects of grapevine leafroll-associated virus 3 on the physiology and must of Vitis vinifera L.cv. Albariño following contamination in the field*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, p.40-44.

Chomé, P., M., Sotés, V., Benayas, F., Cayuela, M., Hernández, M., Cabello, F., Ortiz, J., Rodríguez, I. i Chaves, J. (2003). *Variedades de vid. Registro de variedades comerciales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA)*. Madrid, España, p. 284-303.

Cifre, J., Sampol, B., Escalona, J. M., Riera, D., Raya, S., i Medrano, H. (2003). *Selección clonal de variedades de vid autóctonas de Baleares: influencia de la zona de producción y del grado de infección vírica*. XV Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal & VIII Congreso Hispano-Luso. Palma de Mallorca

Clark, M. F. i Adams, A. N. (1977). *Characteristics of the Microplate Method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses*. *Journal of General Virology*, 34, p.452-496.

Cretazzo, E., Tomás, M., Padilla, C., Rosselló, J., Medrano, H., Padilla, V. i Cifre, J. (2010). *Incidence of virus infection in old vineyards of local grapevine varieties from Mallorca: implications for clonal selection strategies*. Spanish Journal of Agricultural Research.

Elaououad, H., Montero, R. i Medrano, H. i Bota, J. (2016). *Interactive effects of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) and water stress on the physiology of Vitis vinifera L. cv. Malvasia de Banyalbufar and Giro-Ros*. Universitat de les Illes Balears.

Escalona, J.M., Luna, J.M., Bota, J., Garau, C., Martorell, A., (2016). *Varietats de vinya de les Illes Balears*. Conselleria Medi Ambient, Agricultura i Pesca. Palma de Mallorca.

Fernández Sierra, R. (2013). *Virosis en la vid*. Servicio ATRIA, Vino de Calidad de Canga, p.1-4.

García-Muñoz, S. (2011). *Estudio de variedades minoritarias de vid (Vitis vinifera L.): descripción, caracterización agronómica y enológica de material procedente de las Islas Baleares*, p. 183.

Goheen, AC i Luhn, C. (1973). *Heat inactivation of viruses in grapevines*. Riv Patol Vég Ser IV 9, p. 260-289.

Hewitt, W. B., Goheen, A. C., Raski, J. D., Gooding, G. V. (1962). *Studies of virus diseases of the grape California*. Vitis, 3 (1), p. 15-32.

Hu, C. i Wang, P. (1983). *Meristem, shoot tip and bud cultura*. Handbook of Plant Cell Culture vol.1 edited by Shark. New York, USA, p. 166-203.

Ibañez, A. (2004). *Obtención de material vegetal libre de virus en uva de mesa de la región de Murcia y posterior micropropagación*. Ed.: Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, Murcia.

Jiménez, J. (2018). *Recuperación de variedades locales de viña por saneamiento mediante cultivo in vitro*. Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca.

Krizan, B., Ondrusiková, E., Holleinová, V., Moravcová, K. i Bláhová, L. (2009). *Elimination of Grapevine fanleaf virus in grapevine by in vivo and in vitro thermotherapy*. Horticultural Science, 36 (3), p.102-109.

Llabrés, B. (2014). *Recuperació de la varietat minoritària de vinya Argamussa*. Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca.

Llacer, G. (1974). *Tècniques terapèutiques per al control de malalties virals en fruiters. La termoterapia*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid (Spain), p. 16-37.

Manera, C. (1995). *Desarrollo económico y actitudes empresariales en la Mallorca contemporánea, 1730-1930*.

Mannini F., Agramante N., Cuzzo D., Credi R. (2007). *Effetto del risanamento da accartocciamento fogliare (GLRaV-3) sul comportamento produttivo e sulla qualità delle uve di un clone di Moscato Bianco (Vitis vinifera L.)*. Italus Hortus, 14, p. 204–207.

Martelli GP. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology* 96 (S1): p.1–136.

Martinez, X., Cañameras, N. (1988). *El cultiu in vitro i l'agricultura*. 1a. Edició. Ed. Fundació Caixa de Pensions. Barcelona, p.62.

Martorell, A. (2011). *Història i evolució de les varietats de raïm de les Illes Balears*, p. 255. Projecte de fi de màster. UIB.

Meshi, T. i Okada, Y. (1986). *Systemic movement of viruses*. *Plant Microbe Interact.* 4, p. 295-307.

Montero, R., Bota, J., Elaououad, H., Marzachi, C., Castell, N., García, E., Flexas, J. i Florez-Sarasa, I. (2017). *Effects of Grapevine leafroll-associated virus 3 on the physiology in asymptomatic plants of Vitis vinifera*. *Association of Applied Biologists*. p.1-16.

Murashige T., Skoog F. (1962). *A revised médium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. *Physiologia Plantarum*, 15, p.73-79.

Nyland, G. (1962). *Heat therapy of virus diseases of perennial plants*. Departament de patologia vegetal, Universitat de Califòrnia, p.42-76.

Padilla, V. (1998). *Los parásitos de la vid. Estrategia de lucha*. Ed. MundiPrensa, Madrid, p. 276.

Prota, U. (1996). *Il legno riccio della vite (Rugose wood complex of the grapevine)*. In Martelli, G.P., Savino, V., Digiario, M. (Ed.). *Virus floematici e malattie della vite*, p. 41-62.

Refatti, E. Carraro, L. Osler, R. i Soligo, S. (1999). *Alcuni dati sul risanamento mediante calore di materiale di moltiplicazione per pomacee affetto da agenti virali*. Revista de Fruticultura i Hortofruticultura 61: p. 91-95

Salazar, D. M. i López, I. (2005). Viticultura. *Enfermedades transmisibles por injerto, fúngicas y bacterianas*. Primera edición. Ed.: Universidad Politécnica de Valencia, p. 324.

Torregrosa, L. i Bouquet, A. (1993). Culture *in vitro*, apports actuels et perspectives pour la multiplication et l'amélioration de la vigne. Progrès Agricole et Viticole, 110 n°6: p.125-139.

Valero, M., Ibañez, A. i Morte, A. (2003). *Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from Vitis vinifera L. cv. Napoleon tissue cultures*. Scientia Horticulturae, 97 (3-4), p. 245-286.

Velasco, L., Padilla, C. V., Padilla, V., García, B., Hita, I., Bota, J. M. i Montero, R. (2012). *La multiplicación diferencial de ampelovirus en plantas de vid podría explicar las diferencias de incidencia en los viñedos*. XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, p. 15-20.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Balda, P., Ibañez, J., Sancha J. C. i Martínez de Toda, F. (2014). *Characterization and identification of minority red grape varieties recovered in Rioja, Spain*, Am.J.Enol. Vitic., 65, p. 148-152.

Barlass, M., Skene, K. i Woodham, R. (1982). *Regeneració de vinyes sense virus utilitzant cultiu apical in vitro*.

Carretero E., Estelrich P., Ferrà B., Gralla, Monlau J., Oliver G., Santandreu P., Taronj J., Verniere P. (1876). *Anuario agrícola mallorquín para 1876*. Palma de Mallorca. Imprenta de Bartolomé Rotger. AñoI.

Carretero E., Estelrich P., Ferrà B., Gralla, Monlau J., Oliver G., Santandreu P., Taronj J., Verniere P. (1877). *Anuario agrícola mallorquín para 1876*. Palma de Mallorca. Imprenta de Bartolomé Rotger. AñoII.

Escalona, J. M., March, J., Luna, J. M., Martorell, A. 2006. *Recuperación de variedades minoritarias de vid de Baleares*. Ponència en el 5è Fòrum Mundial del Vi, Logronyo (Espanya).

Escalona; J. M., March; J., Luna; J. M., Martorell, A. 2006. *Recuperación caracterización y aptitud enológica de variedades minoritarias de vid de Baleares*. Ponència en el XXIX Congrés Mundial de la Vinya i del Vi, Logronyo (Espanya).

Juan Vidal, Josep (1993). *L'evolució de la producció vitícola a Mallorca entre els segles XIV i XVIII. Vinyes i vins: Mil anys d'història.*

Marimon Ribas, P, (2009-2010). *El vi: cultura l'antiguitat balear.* Historica.cat, núm 1.

Martínez X., Cañameras N. (1988). *El Cultiu "in vitro" i l'agricultura.* Tecnologia i Economia Agrària. Monografies de l'Obra Agrícola de la Caixa Pensions.

Mestre Artigas, A. (1933). *Apuntaciones de viticultura y enologia.* Palma de Mallorca, Imprenta de Soler Prats.

Mhatre M., Salunkhe C.K. Rao P.S. (1999). *Micropropagation of Vitis vinifera L: towards an improved protocol.* Scientia Horticulture 84 (2000).

Sahar A. J., Al-Dhaher i A.A. Shalaby (2009). *Elimination of Grapevine leafroll virus (GFLV) and Grapevine leafroll-associated virus-1 (GLRaV-1). From Infected Grapevine Plants Using Meristem Tip Culture.* International Journal of Virology, 5: p.86-102.

PÀGINES WEB CONSULTADES

<http://eportal.magrama.gob.es/websiar/Inicio.aspx> [Consulta: 22 de juliol de 2018]

<http://es.wikipedia.org> [Consulta: en diverses ocasions, maig-agost 2018]

<https://www.softcatala.org> [Consulta: en diverses ocasions, maig-agost 2018]

<http://boib.caib.es> [Consulta: 30 de juliol de 2018]

http://www.academia.edu/250048/El_vi_cultura_a_lantiguitat_balear [Consulta: 12 d'agost de 2018]

<http://www.uib.cat/> [Consulta: 5 d'agost de 2018]

<http://bibliotecadigital.rah.es> [Consulta: 22 d'agost de 2018]

<http://www.oiv.int> [Consulta: 22 d'agost de 2018]

ANNEX

L'empelt mallorquí

Durant una de les diverses prospeccions realitzades a camp, ens va sorprendre la realització d'una pràctica de multiplicació vegetativa força antiga. Aquesta explotació és situada al municipi de Felanitx on ens explicaren el procés i la pèrdua d'aquestes formes tradicionals d'empelt a la majoria d'explotacions actuals. Ells l'anomenaren "Empelt mallorquí" i era realitzat per un home de 75 anys què brodava la tècnica a la perfecció. Aquesta, té una eficàcia bastant gran pel que fa a nivells de supervivència, propagació de clons de les varietats minoritàries, etc, però com a desavantatge té la persistència de les virosis durant el procés de propagació. D'aquesta manera els nous ceps tenen, bàsicament, l'estat fitosanitari de la planta mare d'on procedeixen les mudes. Per aquests motius, el nostre treball es complementa perfectament amb aquestes formes de multiplicació de manera que el cultiu in vitro és la fase inicial per poder treure uns ceps sans d'on aconseguir el material vegetal sa per empeltar de les varietats desitjades.

El primer pas del procés consistia en desenterrar els ceps dels porta-empelts amb un clotet d'uns 15 cm per poder manipular bé i realitzar l'empelt davall terra. És important que es trobin amb fase de creixement actiu.

A continuació, es feia un petit tall en el patró en forma d'escutet ^(Imatge 1) i amb la mateixa forma es realitzava el tall de la muda què ha de contenir una gemma ^(Imatge 2). S'ha de mantenir una capa de càmbium que serà el que unirà les dues parts i farà que l'empelt tingui èxit.

Un cop es va tenir tot preparat es procedí a inserir la muda dins el tall del patró ^(Imatge 3) on li quedava encaixat amb una precisió mil·limètrica. ^(Imatge 4)

Tot d'una, es fermava amb ràfia ^(Imatge 5) per augmentar la seva adhesió i major contacte entre patró-muda. La ràfia, al ser un material natural biodegradable, facilita que no s'hagi d'anar posteriorment a retirar el fermall.

Finalment, es tapava fent un muntet de terra triga per protegir l'empelt de la pluja. En unes setmanes quan s'aprecia l'èxit d'aquest es procedeix a retirar la resta de branques del peu. ^(Imatge 6)



Imatge 1. Es realitza el tall en el patró



Imatge 2. Es realitza el tall a la muda continent una gemma



Imatge 3. Inserció de la muda al tall del peu



Imatge 4. Inserció de forma que quedi encaixada la muda a la perfecció



Imatge 5. Es ferma amb ràfia per fomentar el contacte entre patró-muda



Imatge 6. Per acabar, es tapen els empelts amb muntets de terra

