



**Universitat de les
Illes Balears**

Escola Politècnica Superior

Memòria del Treball de Fi de Grau

**RECUPERACIÓN DE VARIEDADES
LOCALES DE VIÑA POR SANEAMIENTO
MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO***

José Luis Jiménez Rodríguez

Grau d'enginyeria Agroalimentària i del Medi Rural

Any acadèmic 2017-18

DNI de l'alumne: 78218131F

Treball tutelat per: Josefina Bota Salort

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
	si	si

Paraules clau del treball:

Vid,Cultivo *in vitro*, reguladores de crecimiento, virus,

Índice:

1.	Índice de figuras	4
2.	Índice de tablas	6
3.	Acrónimos	7
4.	Resumen	8
5.	Introducción.....	9
5.1.	Estado actual de los cultivares locales de viñedos, recuperación y conservación en las Islas Baleares.....	9
5.2.	Variedades seleccionadas	10
5.3.	Estreses bióticos.....	11
5.4.	Descripción de los virus y sus efectos en las plantas de vid.....	12
5.4.1.	Virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV “Grapevine Fanleaf Virus”).....	12
5.4.2.	Virus del Enrollado (GLRaV “Grapevine Leafroll associated Virus”).....	12
5.4.3.	Virus del jaspeado (GFkV “Grapevine Fleck Virus”)	13
5.5.	Obtención de plantas libres de virus	13
6.	Objetivos.....	16
7.	Materiales y métodos	17
7.1.	Proceso para seleccionar el medio de cultivo más eficiente para la multiplicación <i>in vitro</i> de vid	19
7.2.	Recolección de material de las variedades Batista y Valent blanc ...	21
7.3.	Estado sanitario del material vegetal	23
7.3.1.	Test ELISA	23
7.4.	Preparación del medio de cultivo.....	23
7.5.	Cultivo <i>in vitro</i>	23

7.5.1. Desinfección material	24
7.5.2. Procedimiento del cultivo de ápices caulinares	24
7.5.3. Aclimatación	27
7.6. Tratamiento estadístico	29
8. Resultados.....	30
8.1. Supervivencia de Prensal blanc en diferentes medios de cultivo	30
8.2. Estado sanitario inicial de las variedades Batista y Valent blanc	32
8.3. Supervivencia de ápices caulinares cultivados in-vitro de las variedades Batista y Valent blanc.....	36
8.4. Recuperación sanitaria	39
9. Discusión	40
10. Conclusiones.....	42
11. Bibliografía.....	43
12. Agradecimientos.....	48

1. Índice de figuras

Figura 1: Foto aérea extraída de SIGPAC de la parcela donde se recogió el material vegetal de la variedad Prensal blanc.	17
Figura 2. Foto aérea extraída de Google Maps de la parcela de la parcela experimental de sa Granja.....	18
Figura 3. Detalle de los ápices caulinares en el medio MS-0.	19
Figura 4. Detalle de los ápices caulinares en el medio MS-MIN.	20
Figura 5. Detalle de los ápices caulinares en el medio MS-MED.	20
Figura 6. Detalle de los ápices caulinares en el medio MS-MAX.	20
Figura 7. Detalle del ápice caulinar con el tallo inferior.	21
Figura 8. Plano parcela con la posición de las cepas de vid.	22
Figura 9. Imagen de las placas al final del test ELISA.	23
Figura 10. Campana con el material para proceder al enjuague de los ápices caulinares.	24
Figura 11. Detalle de la placa Petri con los ápices caulinares.	25
Figura 12. Probeta con el ápice caulinar en el medio de cultivo.	26
Figura 13. Detalle del crecimiento del ápice caulinar en el medio de cultivo.	27
Figura 14. Detalle de respuesta de la planta al medio de enraizamiento.	27
Figura 15. Imagen de la planta recién trasplantada a la maceta con la mezcla de turba, vermiculita y nutrientes.	28
Figura 16. Planta de Valent blanc en Fitotrón.	28
Figura 17. Resultados de la reacción del cultivo al medio MS-0.	30
Figura 18. Resultados de la reacción del cultivo al medio MS-MIN.	30
Figura 19. Resultados de la reacción del cultivo al medio MS-MED.	31
Figura 20. Resultados de la reacción del cultivo al medio MS-MAX.	31
Figura 21. Resultados de supervivencia de los ápices caulinares de la variedad Batista.	37

Figura 22. Resultados de supervivencia de los ápices caulinares de la variedad Valent blanc. ...37

Figura 23. Resultados de supervivencia de los ápices caulinares de la variedad Callet blanc (Valent blanc).38

2. Índice de tablas

Tabla 1. Valores de formación de callo de los ápices caulinares en los diferentes medios de cultivo.....	32
Tabla 2. Test ELISA para detección del GFKV (Grapevine Fleck Virus) o jaspeado.	33
Tabla 3. Test ELISA para detección del GFLV (Grapevine Fanleaf Virus) o entrenudo corto infeccioso.	34
Tabla 4. Test ELISA para detección del GLRaV-3 (Grapevine Leafroll associated Virus) o Enrollado.	35
Tabla 5. Test ELISA para detección del GLRaV-1 (Grapevine Leafroll associated Virus) o Enrollado.	36
Tabla 6. Tabla donde se muestra los resultados de supervivencia de las variedades estudiadas.....	38
Tabla 7. Resultados finales del test ELISA.	39

3. Acrónimos

- AIB: Ácido indol-butírico (auxina)
- BAP: Benzylaminopurine (citoquinina)
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
- GFKV: Grapevine Fleck Virus (jaspeado)
- GFLV: Grapevine Fanleaf Virus (entrenado corto infeccioso)
- GLRaV: Grapevine Leafroll associated Virus (enrollado)
- IRFAP: Institut de recerca i formació agrària i pesquera
- MS-0: Medio Murashige & Skoog comercial (Duchefa ref.M0221.91) sin hormonas.
- MS-MIN: Medio Murashige & Skoog comercial (Duchefa ref.M0221.91) con 0.3 mg/l de BAP.
- MS-MED: Medio Murashige & Skoog comercial (Duchefa ref.M0221.91) con 1mg/l BAP + 0,2mg/l NAA
- MS-MAX: Medio Murashige & Skoog comercial (Duchefa ref.M0221.91) con 2,25mg/l BAP + 0,9mg/l NAA
- NAA: Ácido naftilacético (auxina)

4. Resumen

En el presente trabajo se describen las actuaciones llevadas a cabo para conseguir un medio de cultivo eficiente para el cultivo *in vitro* de vid y el saneamiento de este dado el gran interés y auge de la viticultura en las Islas Baleares en la actualidad. Para ello se han estudiados cuatro medios de cultivo con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en la variedad Prensal blanc que en estudios previos (no publicados) presentó una gran dificultad para su propagación con este método. Por otra parte las variedades seleccionadas para su saneamiento han sido Batista y Valent blanc, ésta última también conocida como Callet blanc. Para la recogida del material vegetal se aprovechó los meses de verano de manera que las altas temperaturas unidas a un riego abundante propiciaran el crecimiento de la planta, realizándose de manera natural una termoterapia. En estas condiciones se ha demostrado que las posibilidades de saneamiento mediante cultivo *in vitro* son superiores. En cuanto a lo que se refiere a la selección del medio de cultivo se demuestra que el más eficiente, dado que no se forma callo en ninguna de las muestras, es el *Murashige & Skoog* sin aportación de reguladores de crecimiento. Los resultados del saneamiento no han sido los esperados ya que la variedad Valent blanc mediante el test ELISA realizado al final del estudio volvió a dar positivo en *Grapevine Leafroll associated Virus* o enrollado, por el contrario, la variedad Batista sí que dio negativo en este mismo test y por tanto ya se ha dado el primer paso para conseguir registrar esta variedad.

5. Introducción

5.1. Estado actual de los cultivares locales de viñedos, recuperación y conservación en las Islas Baleares.

La vid (*Vitis vinifera* L.) se considera uno de los cultivos más antiguos e importantes del mundo. Según lo informado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino, en 2014 la superficie cosechada total de uvas en el mundo se estimó en alrededor de 7,5 millones de hectáreas. Por otra parte, *V. vinifera* L. se considera la especie más dominante entre las diferentes especies de vid cultivadas, que se plantan para elaborar vino (70%), produciendo uvas de mesa de mercado fresco (22%) y pasas (8%) (Troggio et al., 2008).

A finales del siglo XIX, diferentes vectores de enfermedades llegados a Europa procedentes de Estados Unidos (mildiu, *Phylloxera vastatrix*) provocaron una enorme devastación y destrucción de muchos los viñedos europeos, induciendo un cambio drástico en la diversidad de vides cultivadas y silvestres. Otros factores también han llevado a una disminución sustancial de la diversidad de la vid, produciendo una importante erosión de la reserva genética (This et al., 2006). De hecho, en los últimos 50 años se produjo una segunda oleada de pérdida de diversidad genética, debido a la globalización del vino y la demarcación de calidad de una serie de cultivares y viñedos. La aparición de cultivos implantados en todo el mundo como el Chardonnay, el Cabernet Sauvignon, el Syrah y el Merlot está aumentando e induciendo al mismo tiempo la desaparición de viejos cultivares locales (Cipriani et al., 2010; García-Munõz 2011).

Por otra parte, la selección sanitaria de clones libres de enfermedades también ha inducido una reducción en la diversidad clonal de estos cultivares en todo el mundo. Además, se ha demostrado que el uso de pocos cultivares admitidos por las diferentes Denominaciones de Origen (DO) también ha contribuido a una disminución sustancial de la diversidad de la vid y la marginación de los cultivares locales en muchas zonas de cultivo, incluyendo España (Moreno-Sanz et al., 2011), obviando que estos si están perfectamente adaptados a la situación ambiental local y juegan un papel importante en la diversificación de los vinos (Cabello 2004).

En las Islas Baleares, la superficie vitivinícola se redujo de 30.000 ha en el siglo XIX a 2000 ha con el ataque de *Phylloxera*. En los años 60, la mayoría de los viñedos fueron abandonados debido al auge del turismo y la inversión en la industria hotelera y la construcción. Se ha mencionado anteriormente que la homogeneización del mercado internacional del vino también contribuyó a la erosión acentuada de los cultivares locales de vid en las Islas Baleares (García-Muñoz et al., 2012). Sin embargo, a pesar de todas estas alteraciones y de la zona geográfica reducida, la diversidad de la vid que se encuentra en las Islas Baleares se considera muy alta

(García-Muñoz 2011). Desde la época romana, los vinos baleares son bien conocidos en el mundo por su alta calidad (Hidalgo 2002). Varios estudios han demostrado la alta aptitud enológica de algunos cultivares minoritarios (Escalona et al., 2009, Bota et al., 2013) y debido a estas evidencias es de gran importancia que estos sean conservados y saneados.

Hoy en día, el consumidor de vino, busca un producto originario de la tierra, un producto con personalidad propia y que forme parte de la historia de la zona del cual procede. Debido a esto, la recuperación de cultivares autóctonos de vid cobra sentido pudiendo ser un factor fundamental para llenar ese vacío y satisfacer la nueva demanda (Santiago et al., 2008).

Curiosamente, el conocimiento de la diversidad genética existente en los viñedos se considera una prioridad a la hora de abordar su conservación y revalorización. Para superar esta situación, los bancos de germoplasma han jugado un papel importante en la conservación de la diversidad de la vid (Maghradze et al., 2010). Numerosos estudios sobre la recuperación, caracterización y el mantenimiento de cultivares en bancos de germoplasma se han llevado a cabo en todo el mundo para conseguir conservar el mayor número de variedades de vid (Heuertz et al., 2008, Zdunić et al., 2008). Incluyendo la conservación de los cultivares mayoritarios y minoritarios en diferentes regiones de España (Maghradze et al., 2010, Cretazzo et al., 2010, García-Muñoz et al. 2012, Moreno-Sanz et al., 2011, Bota et al., 2013, Balda et al., 2014) y conseguir de este modo empezar a abordar la problemática de la escasez de variabilidad genética.

5.2. Variedades seleccionadas

Prenal blanc: se trata de una variedad autóctona mayoritaria autorizada en las Islas Baleares. También se la conoce con el nombre de Moll. Al final del siglo XX se vio que no había ninguna variedad blanca representativa. Entonces, los bodegueros Armero y Alabern iniciaron los estudios de esta variedad. Su distribución parece indicar que el origen se encuentra en Consell y que desde allí se extendió al resto de la isla. (Escalona et al., 2016). Esta variedad de vid, se ha seleccionado porque según datos de estudios previos (no publicados), presenta una gran dificultad a la hora de ser propagada mediante la técnica de cultivo *in vitro*. Por este motivo ha sido la variedad escogida para seleccionar el medio de cultivo que más se adapte a las condiciones de este cultivo.

Valent blanc: variedad muy común en las zonas de Felanitx y Manacor. Algunos productores la conocen como Callet blanc (Escalona et al., 2016).

Batista mallorquina: encontrada en la zona de Montuiri a Felanitx. Antiguamente se utilizaba como uva de mesa. De posible confusión entre los mismos agricultores atendiendo que la han identificado como Fogoneu, Manto negro y Callet según la época (Escalona et al., 2016).

Valent blanc y Batista, se han seleccionado para su saneamiento ya que son dos variedades autóctonas sin registrar que presentan un gran interés para la viticultura de las islas Baleares, así mismo, todo lo que conlleve aumentar la variabilidad genética disponible para el viticultor, es positivo para seguir marcando el carácter tan personal que tienen los vinos de nuestra zona.

5.3. Estrés bióticos

Además de las presiones abióticas, las plantas tienen que enfrentarse a la amenaza de la infección dentro de su hábitat natural y deben defenderse del ataque de diferentes patógenos, incluyendo hongos, bacterias, virus y plagas herbívoras.

En el contexto del cambio climático, el rango de hábitat de plagas y patógenos también puede verse influenciado por el aumento de las temperaturas, lo que facilita la propagación del patógeno (Bale et al., 2002) y consecuentemente producir importantes daños en las plantas. En 2004, Oerke y Dehne revelaron que los patógenos (bacterias, hongos y virus) y plagas animales causan reducciones del 15% y 18% del rendimiento de los cultivos (trigo, arroz, maíz, cebada, patatas, soja, remolacha azucarera y algodón), lo que resulta en un gran impacto en la producción mundial de alimentos. Las vides son susceptibles a una amplia gama de patógenos que causan enfermedades en los períodos pre y poscosecha, afectando a la producción, procesamiento y exportación, junto con la calidad de la fruta.

Algunas de las enfermedades más importantes en la *V. vinifera* son el moho gris, el oídio, el mildiu, causado por *Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator* y *Plasmopara viticola*, respectivamente, y por una buena cantidad de virus. Hasta la fecha, se han identificado cerca de 70 especies de virus que son capaces de infectar el género *Vitis*, lo que representa al menos 25 enfermedades diferentes en la vid (Martelli 2014).

Desde el punto de vista económico, los virus de la vid más importantes son los que causan las enfermedades del enrollado (GLRaV), conocidos como virus asociados con el enrollado de la vid (GLRaV -1, -2, -3, -4 y -7) (Naidu et al., 2015). Además, GLRaV es uno de los virus que más afecta a la vida productiva de las plantas de vid, así como a la calidad del vino. Este virus también causa problemas en los cultivares de uva de mesa, así como los portainjertos (Cretazzo et al., 2010., Naidu et al. 2014, Montero et al., 2016).

La Directiva de la UE 2002/11/CE exige que el material vegetal inicial para la propagación vegetativa esté libre de los siguientes virus, el virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV), el virus del mosaico Arabis (ArMV), el virus de la jaspeado (GFkV) y el virus del enrollado de la hoja de vid (GLRaV-3) (GLRaV-1) (Peiró et al., 2015).

El estado sanitario de muchas variedades locales ha permanecido descuidado e inexplorado hasta la fecha, provocando el deterioro y la pérdida de ciertas variedades perdiendo de manera

irreversible la variabilidad genética que podían aportar (Cretazzo et al., 2010, Salami et al., 2009, Mahfoudhi et al., 2014). Se ha demostrado que las variedades de vid locales suelen presentar grandes niveles de infecciones víricas (Materazzi et al., 2006, Zdunic et al., 2007, Cretazzo 2010). En la viticultura de Mallorca, se ha demostrado que la incidencia de infecciones virales múltiples y únicas era muy frecuente y que GLRaV-3 era el virus predominante en la mayoría de las variedades locales (Cretazzo et al., 2010), debido a su mayor eficacia de replicación comparada a otros virus de la hoja de la vid de la vid (Velasco et al., 2014).

5.4. Descripción de los virus y sus efectos en las plantas de vid

5.4.1. Virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV “Grapevine Fanleaf Virus”)

Los síntomas de las hojas se manifiestan en que el seno peciolar, el cual, se abre más de lo normal, la dentición es más acusada y se pueden observar presencia de mosaicos de tipo nerviacional y amarillo. También produce un descenso del número de raíces si lo comparamos con las plantas sanas. En los sarmientos podemos encontrar nudos dobles, bifurcaciones, entrenudos cortos (que es el que ha dado nombre a la definición española. Se trata de un entrenudo que tiene una longitud menor que le anterior y el posterior), proliferación de “nietos” con entrenudos más cortos de lo habitual y madera aplastada. En racimos puede producir corrimiento completo o parcial de los racimos, pero este síntoma también se puede producir por otras muchas causas de tipo fisiológico o genético tales como: mala polinización por causas climáticas, suelo muy fértil, exceso de vigor del patrón (Ibáñez, 2004).

Los daños más destacables son la disminución de la producción llegando incluso hasta unas pérdidas de un 80% de la cosecha, menor longevidad de las cepas ya que a los 6 o 8 años de producirse la infección un decaimiento muy acusado. Por último también afecta al material para la multiplicación ya que la madera que procede de plantas infectadas posee menor capacidad de enraizamiento (Ibáñez, 2004).

Este virus tiene diferentes formas se transmitirse siendo la más común mediante la multiplicación vegetativa de plantas infectadas, ya que, cuando se realiza un injerto de una variedad infectada sobre un patrón sano o viceversa, la planta entera resulta infectada en poco tiempo. Los nematodos del genero *Xiphinema* también son un vector importante a tener en cuenta ya que la infección la pueden llevar a cabo tanto individuos jóvenes como adultos. (Padilla, 1988).

5.4.2. Virus del Enrollado (GLRaV “Grapevine Leafroll associated Virus”)

Como su propio nombre indica, este virus provoca que las hojas de la vid se enrollen según tres ejes (Belli, 1996). El síntoma, se produce indistintamente en variedades blancas y tintas. Otro síntoma característico de este virus es la coloración rojiza que adquieren las hojas de las

variedades tintas dejando una banda en los nervios de 2 a 3 milímetros de color verde. Por el contrario en las variedades blancas se observa una ligera clorosis foliar, dejando el seno peciolar con un tono plateado (Hewitt, 1968).

En racimos los síntomas se manifiestan produciéndose un retraso de la maduración, y a consecuencia, el fruto presenta un aumento del índice de acidez y una disminución del grado de azúcar (Goheen y Cook, 1959), el color de las bayas se ve seriamente afectado. Además, se producen un menor número de racimos por cepa y como en el caso del virus del entrenudo corto, la planta produce un menor número de raíces. (Ibáñez, 2004). Referente a los daños, este virus ataca sobre todo a los tejidos conductores, creando degeneración del xilema, desarrollo anormal del cambium, acumulaciones anormales de almidón y floema desorganizado (Hoeffert y Gifford, 1967). Debido a estos efectos se produce una disminución del flujo de nutrientes limitándose el número de racimos y, con el tiempo, se produce un menor crecimiento de las cepas (Cabaleiro y Segura, 1996).

5.4.3. Virus del jaspeado (GFkV “Grapevine Fleck Virus”)

Podemos encontrar este tipo de virus en casi todas las variedades de vid cultivadas. En *V. vinífera* es asintomático aunque se ha demostrado que puede causar algunos efectos fisiológicos como la reducción de la conductancia estomática y una menor tasa de respiración (Bota et al., 2014).

5.5. Obtención de plantas libres de virus

En la actualidad, a nivel global, las exigencias cada vez más relevantes en relación con la calidad de la producción está provocando que se lleven a cabo búsquedas de nuevos patrones para la vid. Estos patrones, deben ser capaces de tolerar estreses tanto bióticos como abióticos y conferir a las variedades, una alta calidad comercial y elevada producción de manera que se satisfagan las exigencias del mercado, ya que estas junto a la mejora genética constituyen los principales objetivos esenciales de los viñedos (Agustí, 2003).

Para conseguir cumplir con la legislación Europea de plantas libres de virus y poder autorizar variedades y registrar clones, ha sido necesario encontrar una forma de sanear las plantas de vid. Uno de los métodos utilizados ha sido el cultivo *in vitro* de meristemos apicales o de ápices caulinares, gracias a este sistemas somos capaces de regenerar plantas de forma rápida y libres de patógenos consiguiendo la conservación de genotipos de alto interés agronómico (Blaich, 1985; Liuni et al, 1998).

Si lo comparamos con los métodos clásicos, el cultivo *in vitro* nos otorga las siguientes ventajas (Torregrosa y Bouquet, 1993):

- Control del medio ambiente

- Reducción del espacio utilizado
- Tiempo de respuesta
- Disponibilidad de material vegetal durante todo el año

Gracias al rápido crecimiento de las zonas meristemáticas, podemos conseguir tejido que, con una alta probabilidad, estará ausente de virus. Con la técnica del cultivo *in vitro* de meristemas o de ápices meristemáticos se han conseguido resultados positivos en la eliminación de muchos de estos patógenos y de esta manera puede ser una solución efectiva para la erradicación de ciertos virus y viroides. (Duran- Vila et al, 1988).

La técnica del cultivo *in vitro* de fragmentos de ápices de vid, fue puesta a punto por Barlass et al 1982, quienes consiguieron regenerar plantas libres de los virus del Entrenudo corto infeccioso, Enrollado y Jaspeado, al combinar dicha técnica con la terapia de calor (35 °C). La termoterapia se consigue proporcionando calor a la planta aprovechando que está aguanta más temperatura que el virus, de esta manera se consigue disminuir la capacidad de replicación del gen vírico dejando los nuevos tejidos formados con una alta probabilidad de no estar infectados por el virus, por tanto esta técnica da mejores resultados en plantas es un estado de crecimiento activo (Martinez y Cañameras, 1988). Este efecto también se puede conseguir aprovechando la recolección del material en los meses de verano cuando la planta está en crecimiento activo i las temperaturas superan los 30⁰C (Valero et al., 2003; Bota et al., 2014).

Por contraposición, el cultivo *in vitro* presenta una serie de limitaciones que se citan en el trabajo de (Ibáñez, 2004) las cuales son:

1. En algunos sistemas de propagación *in vitro*, la estabilidad genética es débil.
2. Las plantas producidas *in vitro*, pueden mostrar características poco convencionales *in vivo*: excesiva producción de ramas laterales y regresión a la fase juvenil.
3. En el caso de las plantas leñosas, la inducción de raíces, es con frecuencia difícil. En otras ocasiones, las raíces formadas *in vitro* pueden resultar no funcionales y necesitan ser reemplazadas *in vivo* por nuevas raíces adaptadas al suelo.
4. En algunas especies, la transferencia de las plantas al tubo de ensayo al suelo es difícil de conseguir.
5. En algunos casos, el aislamiento estéril es extremadamente difícil de realizar debido a la aparición de contaminaciones de origen endógeno. Algunas plantas sanas en apariencia, pueden tener contaminantes internos (endógenos) como bacterias u hongos, que no se manifiestan hasta un determinado momento del proceso de micropropagación.

6. El clonado in vitro exige una aportación de mano de obra importante, coste de las instalaciones y sofisticación de las técnicas, lo que redundará en precios relativamente elevados para las plantas que se producen de este modo.
7. Oscurecimiento de los medios de cultivo. Determinados materiales vegetales in vitro exudan sustancias fenólicas, las cuales se polimerizan y se oxidan en el medio y en la misma planta. Estos polifenoles oxidados, son de alta toxicidad y pueden provocar la muerte del material vegetal.
8. Vitricación o alteración fisiológica que se presenta con relativa frecuencia en la micropropagación in vitro; los tallos y las hojas presentan hipertrofia y la lignificación de los vasos es deficiente. Este fenómeno comporta la inviabilidad del material vegetal y puede ser el responsable de unas pérdidas en la producción del 20 al 50% en la micropropagación de leñosas.

6. Objetivos

El objetivo principal de este estudio, es hallar un medio de cultivo eficiente para propagar *in vitro* las variedades de viña que presentan dificultades con este método como es la variedad Prensal blanc y la recuperación sanitaria de las variedades autóctonas Batista y Valent blanc. El objetivo principal se desglosa en los siguientes objetivos secundarios:

1. Hallar el medio de cultivo más eficiente para la propagación *in vitro* de viña.
2. Evaluación del estado sanitario de las variedades Batista y Valent blanc.
3. Evaluación de la capacidad de propagación *in vitro* de las variedades seleccionadas
4. Recuperación sanitaria de las variedades seleccionadas.

7. Materiales y métodos

El material seleccionado de la variedad Prensal blanc proviene de la parcela 71 poligono 12 del municipio de Binisalem.

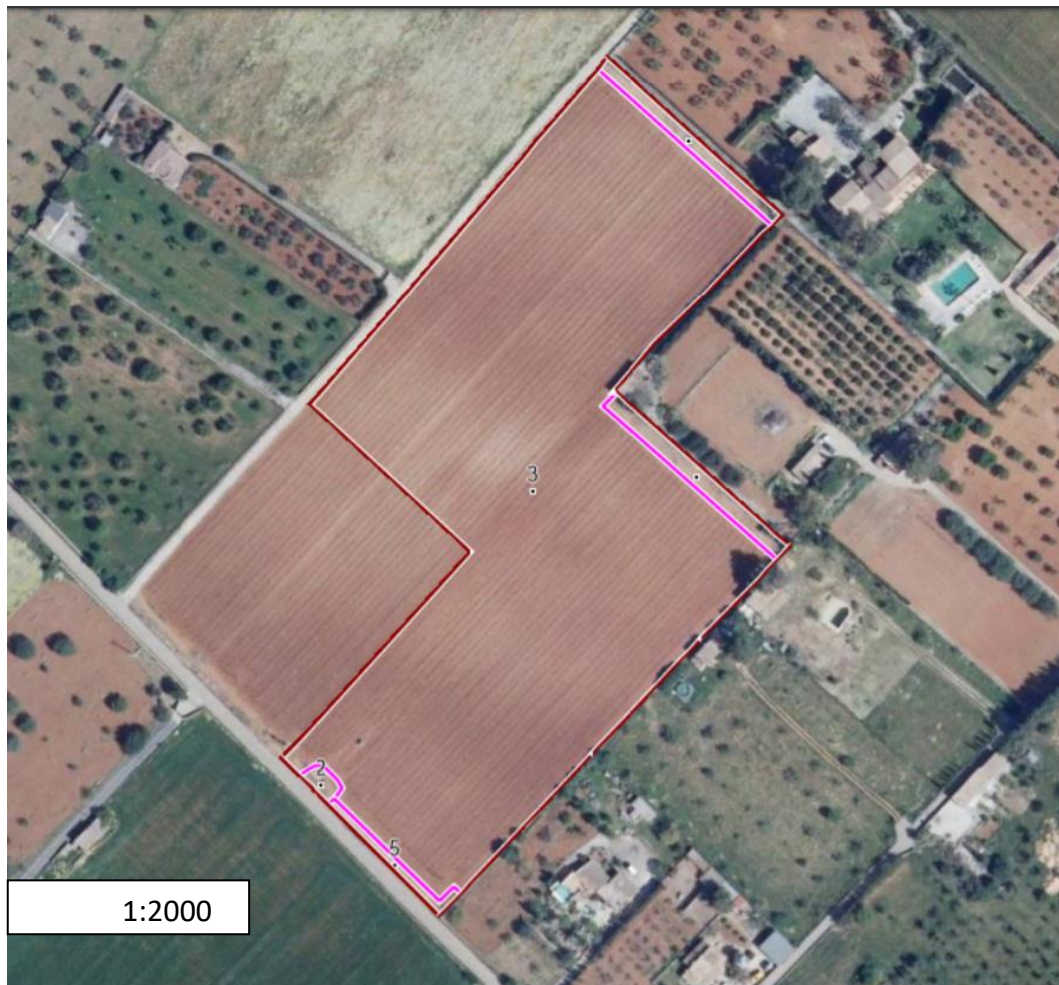


Figura 1: Foto aérea extraída de SIGPAC de la parcela donde se recogió el material vegetal de la variedad Prensal blanc.

El material seleccionado de las variedades Batista y Valent blanc para proceder a su saneamiento ha sido recogido en la parcela experimental de Sa Granja (IRFAP, Govern de les Illes Balears), situada en Palma (39°35'22,917' N Y 2°39'58,404' E).

Las condiciones meteorológicas de la parcela son las típicas del clima mediterráneo, en los que, en verano, las precipitaciones son casi inexistentes y las temperaturas son elevadas sin llegar a supera en ningún caso los 40°C las horas de insolación en las épocas estivales son elevadas llegando a las 10 horas de sol diarias con una radiación media de 15,1MJ/m². La precipitación media anual es de 550mm aproximadamente. (Escalona et al., 2016)



Figura 2. Foto aérea extraída de Google Maps de la parcela de la parcela experimental de Sa Granja.

Las variedades seleccionadas para su saneamiento mediante termoterapia natural y cultivo in vitro de ápices caulinares han sido Batista y Valent blanc también conocida como Callet blanc. Previamente se realizó un estudio para verificar que medio de cultivo era más viable para la propagación de ápices caulinares con la variedad Prensal blanc también conocida como Moll.

7.1. Proceso para seleccionar el medio de cultivo más eficiente para la multiplicación *in vitro* de vid

Para realizar este proceso se utilizaron 192 muestras de ápices caulinares de Prenal blanc y se separaron en 4 grupos. Cada grupo de 48 ápices se puso en un medio de cultivo diferente para observar la su respuesta. A tres de los citados medios de cultivo, se les añadió reguladores de crecimiento en diferentes cantidades y combinaciones. Por una parte se añadió Benzylaminopurine la cual se conoce con las siglas BAP, este regulador del crecimiento pertenece a la familia de las citoquininas y promueven el crecimiento de la parte aérea de la planta. El otro regulador de crecimiento añadido pertenece a la familia de las auxinas, se denomina ácido naftilacético (NAA) y es la encargada de promover el crecimiento radicular.

A continuación se describen los diferentes medios de cultivo utilizados:

- MS-0: Medio Murashige & Skoog comercial (Duchefa ref.M0221.91) sin reguladores de crecimiento.
- MS-MIN: Medio Murashige & Skoog comercial (Duchefa ref.M0221.91) con 0.3 mg/l de BAP.
- MS-MED: Medio Murashige & Skoog comercial (Duchefa ref.M0221.91) con 1mg/l BAP + 0,2mg/l NAA
- MS-MAX: Medio Murashige & Skoog comercial (Duchefa ref.M0221.91) con 2,25mg/l BAP + 0,9mg/l NAA



Figura 3. Detalle de los ápices caulinares en el medio MS-0.

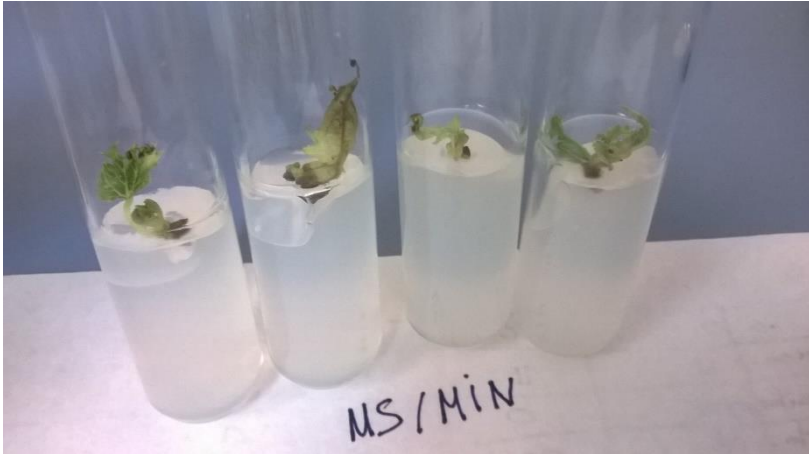


Figura 4. Detalle de los ápices caulinares en el medio MS-MIN.



Figura 5. Detalle de los ápices caulinares en el medio MS-MED.



Figura 6. Detalle de los ápices caulinares en el medio MS-MAX.

7.2. Recolección de material de las variedades Batista y Valent blanc

El material se recogió aprovechando las horas de más calor del día, las cuales rondaron entre los 33 a los 38 grados centígrados. El riego medio proporcionado fue de 4.6 litros/hora y planta con un total de 4 horas por semana repartidas en dos días no consecutivos.

Los citados ápices caulinares se conservaron una vez extraídos de la planta en un recipiente con agua y hielo para evitar su deshidratación, con el fin de evitar este efecto los ápices se cortaron siempre dejando entre 8 y 10 centímetros del tallo inferior.



Figura 7. Detalle del ápice caulinar con el tallo inferior.

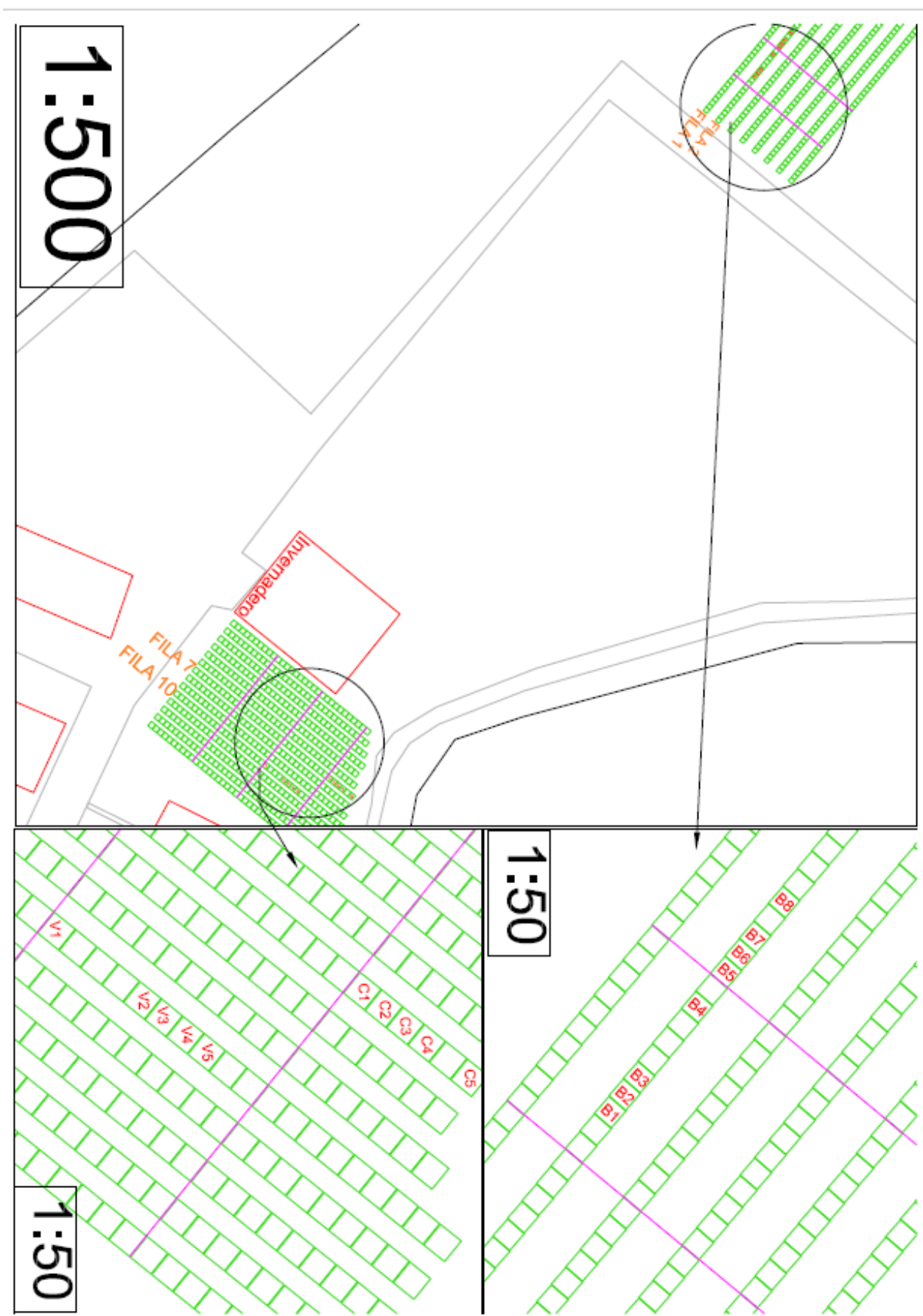


Figura 8. Plano parcela con la posición de las cepas de vid.

Para evitar confusiones a la hora de la recolección de los ápices caulinares de las variedades seleccionadas, se acordó nombrar las plantas de Batista como B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7 y por último B8. Las plantas de Valent blanc al estar colocadas en dos filas separadas se acordó nombrar las de plantas más cercanas al invernadero (fila 7) como C1, C2, C3, C4, C5 haciendo referencia a que esta variedad también es conocida como Callet blanc y por último las plantas de la fila más alejada del invernadero (fila 10) se enumeraron como V1, V2, V3, V4, V5.

7.3. Estado sanitario del material vegetal

7.3.1. Test ELISA

La comprobación del estado sanitario de las cepas se llevó a cabo mediante el test ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) (Clark y Adams, 1977) de la casa comercial BIOREBA y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Trascurridos entre 30-120 minutos se observó la reacción mediante lecturas de longitud de onda de 405 nm, estas lecturas se realizaron tres veces a intervalos de 30 min.

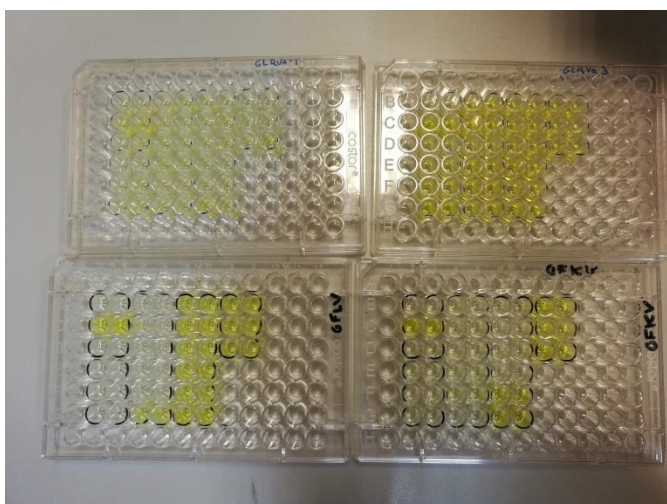


Figura 9. Imagen de las placas al final del test ELISA.

7.4. Preparación del medio de cultivo

El medio seleccionado fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) comercial Duchefa ref.M0221.91. se preparó siguiendo las instrucciones de fabricante y añadiendo 7 g/l de agar, 1 ml/l de vitaminas y 30 g/l de sacarosa.

7.5. Cultivo *in vitro*

A continuación se describen los procesos llevados a cabo para el cultivo *in vitro* de las dos variedades seleccionadas.

7.5.1. Desinfección material

Una vez se dispuso del material recolectado en el laboratorio, se llevó a cabo una limpieza del brote apical dejando solo unos 2 cm de este y se fue depositando en una placa de Petri con agua para evitar la deshidratación. Una vez se eliminaron las partes indeseadas se introdujeron todos los meristemas en un vaso de precipitados de 1 l que previamente se había preparado con 500 ml de agua autoclavada con un 2,5% de hipoclorito sódico y los se mantuvieron durante 7,5min removiéndolos periódicamente.

Una vez transcurrido el tiempo indicado, se prepararon tres vasos de precipitados con 500ml de agua previamente autoclavada y se procedió a enjuagar tres veces (una vez en cada vaso) los ápices a fin de eliminar todos los restos de hipoclorito sódico que hubieran podido quedar (esta operación se realizó dentro de la campana de cultivo *in vitro*).



Figura 10. Campana con el material para proceder al enjuague de los ápices caulinares.

7.5.2. Procedimiento del cultivo de ápices caulinares

Una vez finalizado el proceso anterior, se dejó en la campana de cultivo *in vitro* únicamente el vaso de precipitados que contiene los ápices caulinares a fin de no entorpecer en los siguientes procesos.

El primer paso consistió en preparar la placa de Petri donde se cortaron los ápices caulinares, en esta placa debemos tener un círculo de papel de los que previamente se han cortado y autoclavado, lo mojaremos con unas gotas de agua autoclavada de esta manera evitaremos la deshidratación del ápice en el proceso de corte.



Figura 11. Detalle de la placa Petri con los ápices caulinares.

Para realizar el corte del ápice se utilizaron dos bisturís y de dos pinzas largas (las pinzas largas nos facilitarían en gran medida el trabajo de introducir el ápice en el tubo con el medio de cultivo). El ápice caulinar debe cortarse lo más ajustado posible a su base ya que la parte que nos interesa reproducir es la que aún no ha podido ser infectada por el gen vírico, en caso de ser necesario podemos ayudarnos de una lupa para conseguir un corte más preciso.

Una vez cortado el ápice, rápidamente con la ayuda de las pinzas se depositó en el tubo con el medio de cultivo. Debe respetarse el sentido de crecimiento del ápice a la hora de colocarlo, por tanto, colocaremos su parte basal hacia el inferior del tubo y la parte apical hacia la superior intentando no introducirlo dentro del medio de cultivo más de un 25% de su longitud total.

En esta figura se representan las medidas de los tubos de cultivo que se utilizaron en el experimento, mediante una línea azul se representa el medio de cultivo por último la figura circular de color verde representa el ápice caulinar. Los porcentajes hacen referencia a la parte que del ápice que tiene que ser introducida en el medio de cultivo.

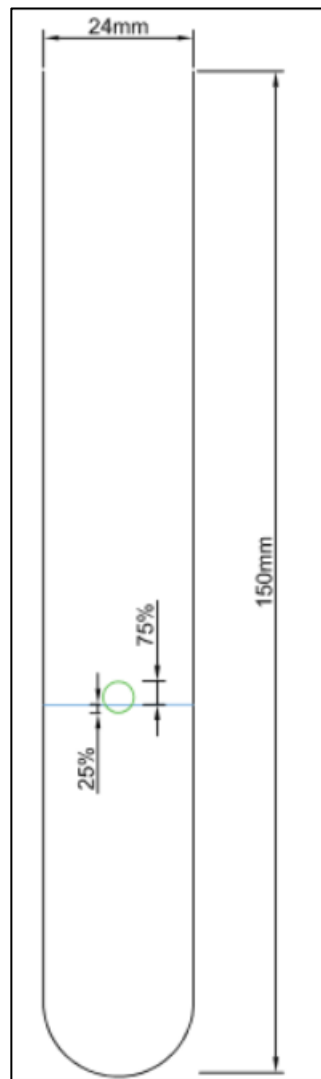


Figura 12. Tubo de cultivo con el ápice caulinar en el medio de cultivo.

Una vez se insertó cada ápice en el medio de cultivo, se introdujo la bandeja en la cámara de cultivo. Posteriormente se incubaron durante 2 o 3 meses a una temperatura de 25⁰C de temperatura diurna y 22⁰C de temperatura nocturna con un fotoperiodo de 16 horas. Durante el tiempo de incubación se fueron retirando los ápices que sufrieron contaminación o desecación.



Figura 13. Detalle del crecimiento del ápice caulinar en el medio de cultivo.

Una vez que los ápices presentaron un crecimiento de 1 o 2 centímetros, se procedió a trasplantar dichas plántulas a un medio de cultivo el cual estaba compuesto por ½ de MS con regulador de crecimiento que promueve el enraizamiento (AIB ácido indol-butírico con una concentración de 2 mg/l).



Figura 14. Detalle de respuesta de la planta al medio de enraizamiento.

7.5.3. Aclimatación

El siguiente paso una vez se constató que la planta tenía las suficientes raíces y había iniciado el crecimiento de la parte aérea, fue el de trasplantar la planta a una maceta con tierra. Para llevar a cabo este proceso se preparó una mezcla de turba con vermiculita y nutrientes y lo autoclavamos para eliminar cualquier tipo de patógeno. El trasplante se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación durante el proceso, se procedió a extraer la planta del tubo de cultivo con sumo cuidado ya que toda ella es muy frágil, seguidamente se introdujo en la maceta con tierra apretando los bordes para asegurarnos que las raíces tuvieran

un buen contacto con el nuevo medio de cultivo. Acto seguido se regaron con agua destilada y se cubrió la parte superior de la maceta con una bolsa estanca para evitar la desecación de la planta.



Figura 15. Imagen de la planta recién trasplantada a la maceta con la mezcla de turba, vermiculita y nutrientes.

Por último, una vez se observó que las plantas se habían desarrollado lo suficiente, se procedió a trasplantar las plantas a macetas pequeñas y colocarlas en el Fitotrón, en esta cámara de crecimiento se controla la temperatura a unos 25⁰C, la humedad oscila entre el 40 y el 50% con un fotoperiodo de 12 h (figura 16).

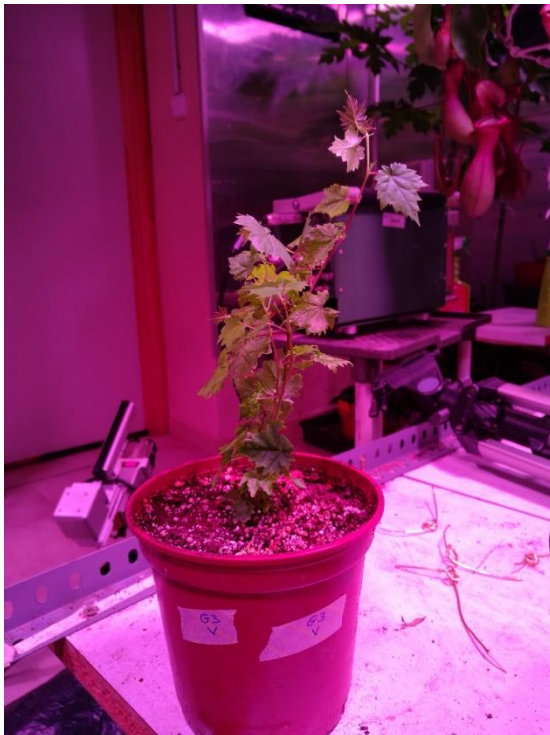


Figura 16. Planta de Valent blanc en Fitotrón.

7.6. Tratamiento estadístico

Los resultados de supervivencia de Prensal blanc en diferentes medios de cultivo se expresan con los números totales de muestras que se realizaron. Los resultados del estado sanitario inicial de las variedades Batista y Valent blanc se expresan como el valor promedio obtenido de la absorbancia más menos su error estándar en tres mediciones con un intervalo de 30 min. cada una. Por otra parte, los resultados de supervivencia de ápices caulinares cultivados *in-vitro* de las variedades Batista y Valent blanc también se expresan en números totales de muestras. La influencia de los medios de cultivo en la variedad Prensal Blanc y la influencia de la variedad de vid respecto a su supervivencia al cultivo *in-vitro* se analizó mediante el test Chi-Cuadrado, utilizando el programa XLSTAT 2018.ink.

8. Resultados

8.1. Supervivencia de Prensacultivo en diferentes medios de cultivo

Como se puede observar en las figuras 17, 18, 19 y 20 la respuesta del ápice caulinar varía en función de la composición del medio de cultivo. En el medio de cultivo MS-0 (Figura 17) se observa que 12 de las 48 muestras presentaron crecimiento de la parte aérea, 34 no presentaron crecimiento alguno mientras que 4 se contaminaron. En la figura 18 se puede apreciar los resultados del medio de cultivo MS-MIN, en este caso los ápices que presentaron crecimiento de la parte aérea fueron 11, los que no presentaron crecimiento fueron 35 y 2 contaminados.

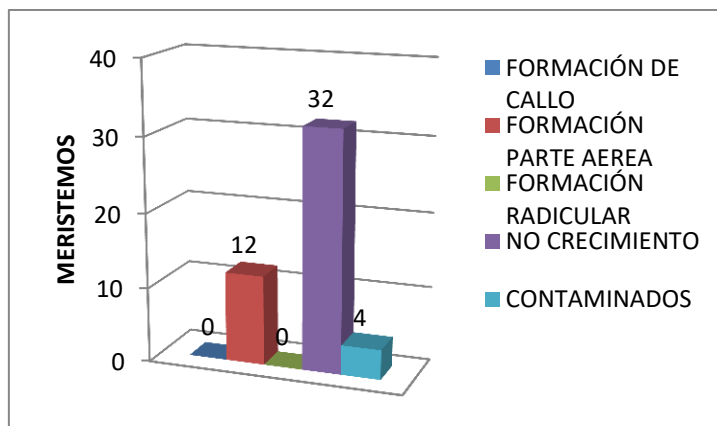


Figura 17. Resultados de la reacción del cultivo al medio MS-0.

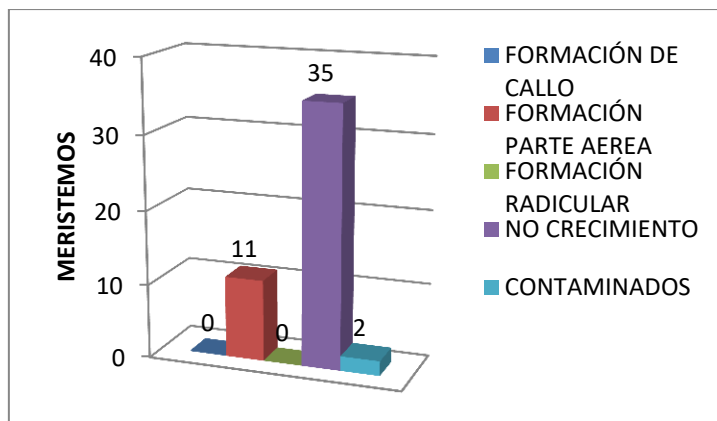


Figura 18. Resultados de la reacción del cultivo al medio MS-MIN.

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos en el medio de cultivo MS-MED, en este caso en 38 de las muestras el crecimiento del ápice caulinar fue en forma de callo celular, 8 de las muestras formaron parte aérea y 2 del total de las muestras se contaminaron. Por último en la figura 20 se representan los datos obtenidos del medio de cultivo MS-MAX, respecto a este medio, 42 de las muestras presentaron crecimiento en forma de callo, 3 formaron parte aérea y 3 del total de muestras se contaminaron.

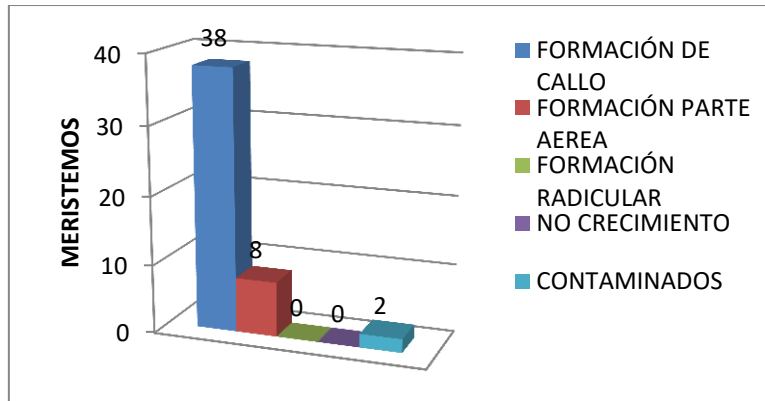


Figura 19. Resultados de la reacción del cultivo al medio MS-MED.

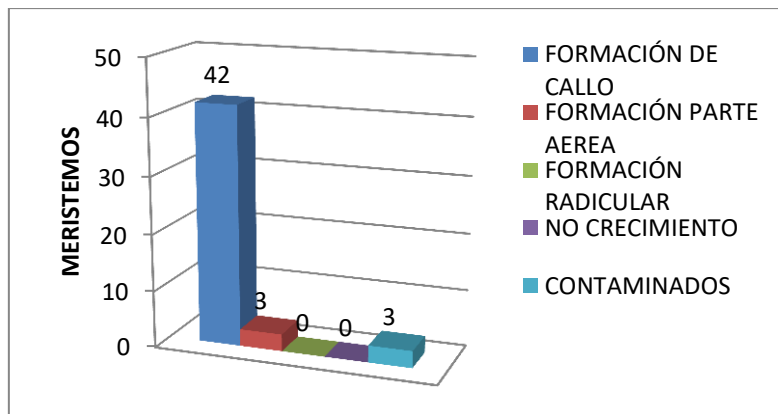


Figura 20. Resultados de la reacción del cultivo al medio MS-MAX.

El análisis estadístico reveló que si existe un efecto significativo del medio de cultivo entre la formación de callo y un crecimiento vegetativo normal.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la variedad Prensal blanc en los diferentes medios de cultivo estudiados haciendo referencia al crecimiento vegetativo y a la formación de callo.

Tabla 1: Valores de formación de callo de los ápices caulinares en los diferentes medios de cultivo.

	MS/0	MS/MIN	MS/MED	MS/MAX
FORMACION DE CALLO	0/48	0/48	38/48 (79,2%)	42/48 (87,5%)

Valor-p<0.0001

8.2. Estado sanitario inicial de las variedades Batista y Valent blanc

En las siguientes tablas se muestran los resultados de los test ELISA realizados a los cultivares de Batista y Valent blanc. En las tablas se indica la media de las lecturas realizadas de absorbancia más menos su desviación. Se realizaron tres medidas cada media hora de los 4 virus analizados, en las citadas tablas también se muestran los controles positivos y negativos que se toman como referencia para valorar los resultados obtenidos de cada cultivar. Los números de color negro muestran los resultados negativos y los de color rojo los positivos (para que el resultado se considere positivo, la medida de la absorbancia tiene que ser igual o superior al doble de la medida negativa).

Como se puede observar en la tabla 2, el test ELISA realizado para la detección del GFKV da negativo en las muestras recogidas del cultivar Batista y Callet blanc. Por el contrario las muestras de Valent blanc dan positivo.

Tabla 2. Test ELISA para detección del GFKV (grapevine Fleck Virus) o jaspeado.

GFKV	valor absorbancia a la 1/2 hora	valor absorbancia a la hora	valor absorbancia a 1,5 horas
	VALOR PROMEDIO	VALOR PROMEDIO	VALOR PROMEDIO
CONTROL NEGATIVO	0,0865±0,0035	0,0895 ±0,0064	0,0915 ±0,0021
CONTROL POSITIVO	0,847±0,0184	1,199 ±0,0283	2,2415 ±0,0361
CONTROL NEGATIVO	0,0805±0,0021	0,0875 ±0,0049	0,0905 ±0,0035
BATISTA 1	0,086±0,0014	0,094 ±0,0085	0,105 ±0,0028
BATISTA 2	0,0835±0,0007	0,089 ±0,0042	0,0985 ±0,0007
BATISTA 3	0,088±0,0028	0,0975 ±0,0078	0,116 ±0,0071
BATISTA 4	0,092±0,0014	0,097 ±0,0014	0,1145 ±0,0035
BATISTA 5	0,0925±0,0007	0,096 ±0,0028	0,1175 ±0,0007
BATISTA 6	0,089±0,0014	0,093 ±0,0014	0,1065 ±0,0007
BATISTA 7	0,0925±0,0078	0,0975 ±0,0035	0,1165 ±0,0007
BATISTA 8	0,0985±0,0007	0,1055 ±0,0035	0,1385 ±0,0007
CALLET BLANC 1	0,082±0,0057	0,084 ±0,0014	0,0915 ±0,0007
CALLET BLANC 2	0,0855±0,0021	0,089 ±0,0014	0,0955 ±0,0007
CALLET BLANC 3	0,0855±0,0021	0,0875 ±0,0021	0,0935 ±0,0021
CALLET BLANC 4	0,085±0,0014	0,0885 ±0,0007	0,0945 ±0,0007
CALLET BLANC 5	0,0825±0,0021	0,0865 ±0,0021	0,092 ±0,0014
VALENT BLANC 1	0,2455±0,0064	0,3325 ±0,0078	0,591 ±0,0042
VALENT BLANC 2	0,4815±0,0233	0,6595 ±0,0276	1,254 ±0,0608
VALENT BLANC 3	0,36±0,0057	0,513 ±0,0085	0,939 ±0,0014
VALENT BLANC 4	0,253±0,0127	0,326 ±0,0042	0,571 ±0,0269
VALENT BLANC 5	0,396±0,0255	0,553 ±0,0297	1,0425 ±0,0573

Con respecto a la tabla 3, en la que se analiza la posible infección de los cultivares por el virus GFLV, los resultados son los siguientes: el cultivar Batista da resultados negativos a esta infección, por el contrario, Callet blanc y Valent blanc dan positivo en el test desde la primera medida de absorbancia.

Tabla 3.test ELISA para detección del GFLV (Grapevine Fanleaf Virus) o entrenudo corto infeccioso.

	valor absorbancia a la 1/2 hora	valor absorbancia a la hora	valor absorbancia a 1,5 horas
GFLV	VALOR PROMEDIO	VALOR PROMEDIO	VALOR PROMEDIO
CONTROL NEGATIVO	0,08±0,0014	0,097±0,0057	0,0845 ±0,0007
CONTROL POSITIVO	0,7495±0,0544	3,2025±0,0530	2,232 ±0,0750
CONTROL NEGATIVO	0,081±0,0014	0,1035±0,0035	0,086 ±0,0014
BATISTA 1	0,0805±0,0007	0,0855±0,0007	0,086 ±0,0014
BATISTA 2	0,079±0,0014	0,086±0,0014	0,0835 ±0,0021
BATISTA 3	0,079±0,0014	0,083±0,0014	0,0845 ±0,0007
BATISTA 4	0,083±0,0021	0,0845±0,0007	0,0875 ±0,0007
BATISTA 5	0,0805±0,0021	0,082±0,0042	0,0855 ±0,0021
BATISTA 6	0,083±0,0014	0,0875±0,0021	0,089 ±0,0014
BATISTA7	0,083±0,0042	0,0885±0,0007	0,0865 ±0,0021
BATISTA 8	0,081±0,0014	0,083±0,00355	0,0855 ±0,0021
CALLET BLANC 1	0,157±0,0057	0,283±0,0014	0,3475 ±0,0035
CALLET BLANC 2	0,2095±0,0007	0,471±0,0057	0,5295 ±0,0177
CALLET BLANC 3	0,317±0,0085	0,694±0,0085	0,871 ±0,0014
CALLET BLANC 4	0,1635±0,0021	0,3985±0,0177	0,364 ±0,0113
CALLET BLANC 5	0,20265±0,0019	0,6885±0,0035	0,5165 ±0,0219
VALENT BLANC 1	0,1775±0,0007	0,3855±0,0049	0,4175 ±0,0120
VALENT BLANC 2	0,575±0,0057	0,644±0,0198	1,6935 ±0,0049
VALENT BLANC 3	0,287±0,0057	0,585±0,0042	0,798 ±0,0014
VALENT BLANC 4	0,2395±0,0021	0,2255±0,0078	0,617 ±0,0042
VALENT BLANC 5	0,2065±0,0205	0,6185±0,0177	0,5105 ±0,0658

En relación a la tabla 4, los resultados obtenidos en el test ELISA para el virus GLRaV-3 son positivos en todas las muestras analizadas, por el contrario, el test realizado para la detección del virus GLRaV-1 cuyos resultados se muestran en la tabla 5, dan resultados negativos en todas las muestras analizadas.

Tabla 4. Test ELISA para detección del GLRaV-3 (Grapevine Leafroll associated Virus) o Enrollado.

	valor absorbancia a la 1/2 hora	valor absorbancia a la hora	valor absorbancia a 1,5 horas
R3	VALOR PROMEDIO	VALOR PROMEDIO	VALOR PROMEDIO
CONTROL NEGATIVO	0,0915±0,0021	0,102±0,0064	0,1125±0,0106
CONTROL POSITIVO	3,267±0,1131	3,2073±0,0548	3,1475±0,0035
CONTROL NEGATIVO	0,093±0,0014	0,1088±0,0039	0,1245±0,0064
BATISTA 1	0,126±0,0099	0,1795±0,0219	0,233±0,0339
BATISTA 2	0,1725±0,0035	0,302±0,0028	0,4315±0,0092
BATISTA 3	0,4005±0,0233	0,8068±0,0357	1,213±0,0481
BATISTA 4	0,474±0,0057	0,9158±0,0152	1,3575±0,0247
BATISTA 5	0,703±0,0368	1,4175±0,0686	2,132±0,1004
BATISTA 6	0,1275±0,0368	0,1848±0,0152	0,242±0,0240
BATISTA7	0,3065±0,0021	0,5938±0,0074	0,881±0,0170
BATISTA 8	0,303±0,0127	0,5855±0,0240	0,868±0,0354
CALLET BLANC 1	0,1975±0,0021	0,3513±0,0053	0,505±0,0127
CALLET BLANC 2	0,306±0,0057	0,597±0,0057	0,888±0,0057
CALLET BLANC 3	0,439±0,0071	0,8223±0,0463	1,2055±0,0997
CALLET BLANC 4	0,2655±0,0148	0,4935±0,0219	0,7215±0,0290
CALLET BLANC 5	0,436±0,0014	0,8798±0,0053	1,3235±0,0120
VALENT BLANC 1	0,2575±0,0078	0,4878±0,0088	0,718±0,0099
VALENT BLANC2	0,408±0,0141	0,815±0,0156	1,222±0,0170
VALENT BLANC 3	0,3555±0,0021	0,7205±0,0049	1,0855±0,0120
VALENT BLANC 4	0,1635±0,0049	0,2608±0,0039	0,358±0,0028
VALENT BLANC 5	0,3715±0,0021	0,7525±0,0212	1,1335±0,0403

Tabla 5. Test ELISA para detección del GLRaV-1 (Grapevine Leafroll associated Virus) o Enrollado.

	valor absorbancia a la 1/2 hora	valor absorbancia a la hora	valor absorbancia a 1,5 horas
R1	VALOR PROMEDIO	VALOR PROMEDIO	VALOR PROMEDIO
CONTROL NEGATIVO	0,1 ±0,0042	0,1095 ±0,0049	0,139 ±0,0057
CONTROL POSITIVO	0,1605 ±0,0134	0,216 ±0,0283	0,3655 ±0,0573
CONTROL NEGATIVO	0,1065 ±0,0134	0,1155 ±0,0177	0,148 ±0,0311
BATISTA 1	0,0865 ±0,0007	0,0915 ±0,0021	0,108 ±0,0042
BATISTA 2	0,0945 ±0,0021	0,103 ±0,0028	0,1335 ±0,0064
BATISTA 3	0,098 ±0,0071	0,11 ±0,0099	0,1475 ±0,0191
BATISTA 4	0,121 ±0,0170	0,125 ±0,0071	0,169 ±0,0198
BATISTA 5	0,101 ±0,0071	0,1065 ±0,0078	0,137 ±0,0141
BATISTA 6	0,0995 ±0,0021	0,105 ±0,0014	0,1345 ±0,0021
BATISTA7	0,103 ±0,0071	0,119 ±0,0113	0,1605 ±0,0163
BATISTA 8	0,0995 ±0,0021	0,107 ±0,0014	0,1395 ±0,0021
CALLET BLANC 1	0,0975 ±0,0007	0,1065 ±0,0021	0,139 ±0,0099
CALLET BLANC 2	0,1045 ±0,0049	0,12 ±0,0085	0,1545 ±0,0134
CALLET BLANC 3	0,106 ±0,0085	0,116 ±0,0141	0,1535 ±0,0290
CALLET BLANC 4	0,107 ±0,0071	0,1185 ±0,0106	0,1525 ±0,0163
CALLET BLANC 5	0,09 ±0,0028	0,11 ±0,0113	0,118 ±0,0042
VALENT BLANC 1	0,0965 ±0,0007	0,106 ±0,0014	0,1335 ±0,0007
VALENT BLANC 2	0,106 ±0,0085	0,1255 ±0,0106	0,1775 ±0,0233
VALENT BLANC 3	0,0995 ±0,0007	0,105 ±0,0057	0,127 ±0,0057
VALENT BLANC 4	0,1045 ±0,0035	0,1075 ±0,0007	0,1325 ±0,0035
VALENT BLANC 5	0,1145 ±0,0134	0,1205 ±0,0163	0,163 ±0,0311

8.3. Supervivencia de ápices caulinares cultivados in-vitro de las variedades Batista y Valent blanc

En las figuras 21, 22 y 23 se muestran los resultados de supervivencia de las dos variedades estudiadas. Batista presenta 4.34% del total de ápices caulinares que han superado la fase de cultivo *in vitro*, por el contrario la variedad Valent blanc aun teniendo un mayor número de muestras, solo ha presentado un 0.42% del total de ápices caulinares que ha conseguido superar esta fase. Por último de las cinco plantas seleccionadas de Callet blanc (Valent blanc) no se pudo obtener un alto número de ápices caulinares y de las 36 muestras que se seleccionaron no obtuvimos ninguna planta viable ya que todas acabaron secándose salvo 5 que se contaminaron.

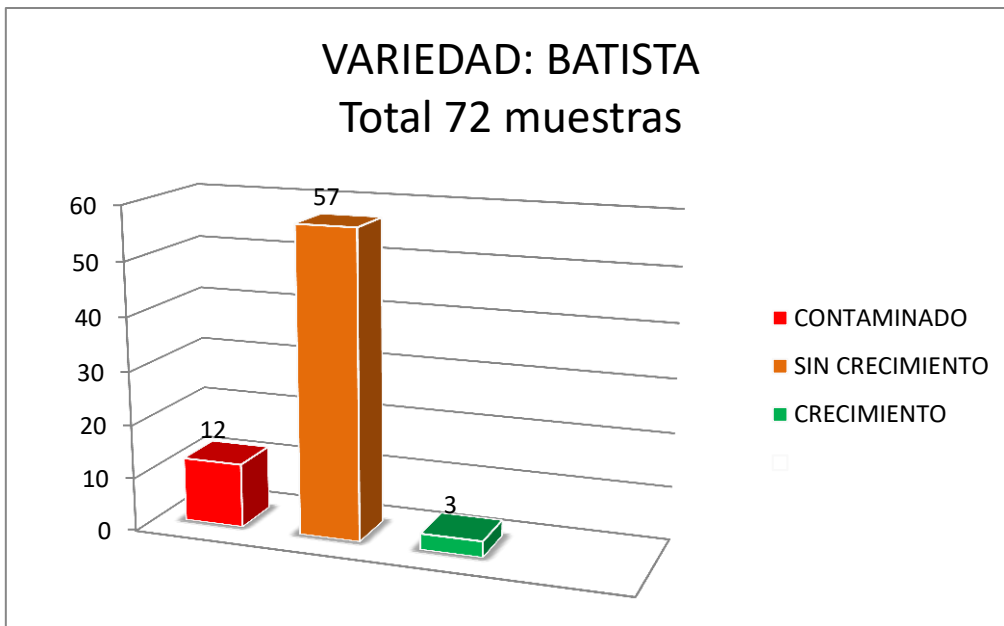


Figura 21. Resultados de supervivencia de los ápices caulinares de la variedad Batista

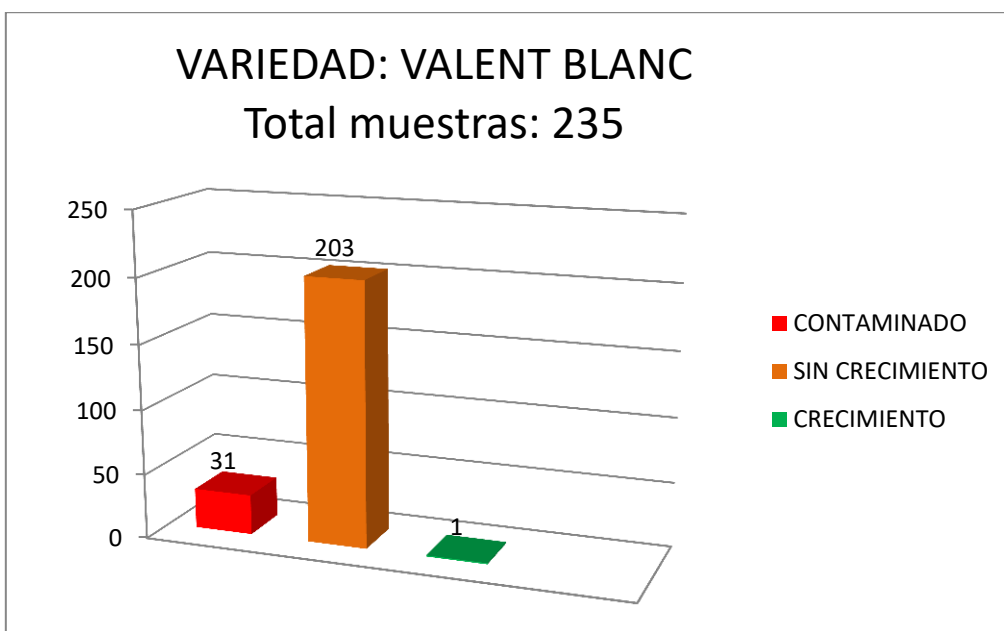


Figura 22. Resultados de supervivencia de los ápices caulinares de la variedad Valent blanc.

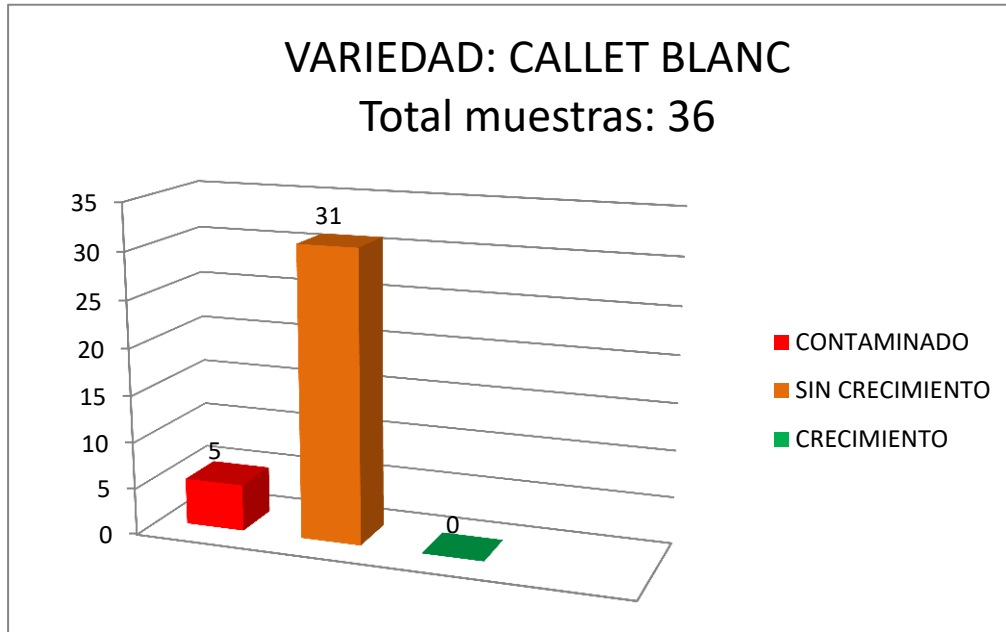


Figura 23. Resultados de supervivencia de los ápices caulinares de la variedad Callet blanc (Valent blanc).

Los resultados estadísticos mostraron que existe un efecto de la variedad sobre la supervivencia. En la tabla 6 se muestran los resultados de las variedades estudiadas haciendo referencia al número de plantas total de cada variedad que han sobrevivido a todo el proceso de saneamiento.

Tabla 6. Tabla donde se muestra los datos de supervivencia de las variedades estudiadas.

	BATISTA	VALENT BLANC	CALLET BLANC
supervivencia	3/69 (4.34%)	1/235 (0.42%)	0/36 (0%)

Valor-p=0.027

8.4. Recuperación sanitaria

En la tabla 7 se observan los resultados del test ELISA realizado en la Conselleria de Agricultura y Pesca. Las plantas de la variedad Batista dieron negativo en los cuatro virus analizados. Por el contrario, la planta de Valent blanc volvió a dar positivo en el virus del entrenudo corto.

Tabla 7. Resultados finales del test ELISA

CÓDIGO PLANTA/VIRUS	GFLV	GFKV	GLRVa R1	GLRVa R3
BATISTA 1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
BATISTA 2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
BATISTA 3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
VALENT BLANC	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

9. Discusión

Los resultados obtenidos demuestran la gran dificultad que tiene este método de propagación ya que son muchos los factores que influyen. Como podemos observar en los datos obtenidos en el estudio realizado con la variedad Prensall blanc, el porcentaje de contaminación es relativamente bajo, lo que nos hace pensar que los protocolos de esterilización son más que suficientes y efectivos. El medio de cultivo seleccionado después del estudio previo fue MS-0 ya que los explantes no respondían a este medio formando callo sino que respondían a él haciendo crecer su parte aérea. Con el medio MS-MIN en el que su composición se le añadió el regulador de crecimiento BAP, las plantas respondían igual que con el MS-0, este efecto no concuerda con las expectativas ya que diversos autores relacionan un mejor crecimiento de la parte aérea del explante con la concentración de esta hormona (Mhatre et al., 2000). Los medios MS-MED y MS-MAX que en su composición contienen los reguladores de crecimiento BAP y NAA en diferentes concentraciones, indujeron en los ápices caulinares un crecimiento en forma de callo, algunos autores ya se habían encontrado con este efecto cuando se utiliza el ácido naftalenacético como hormona de enraizamiento (Puente y Marín, 1994). Por otro lado para otros autores la utilización de dicha hormona ha dado resultados favorables (ferro, 1989).

La interpretación de la prueba Chi-cuadrado nos indica que el valor-p computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, por lo tanto, se debe rechazar la hipótesis nula donde se postula que el medio de cultivo no influye en la manera de desarrollarse del ápice caulinar, y aceptar la hipótesis alternativa comprobándose que el medio de cultivo sí influye en el desarrollo del ápice ya sea formando un crecimiento vegetativo normal o formando callo. Por tanto, en función de nuestros resultados, el cultivo *in vitro* de Prensall blanc requeriría un medio de cultivo al cual no se le añada ningún regulador del crecimiento ya que la respuesta a estos no es la deseada.

Los resultados del test ELISA inicial, ponen de manifiesto las infecciones víricas a las cuales nos enfrentamos, en el caso de la variedad Batista, el único virus que la afecta es el GLRaV-3, algo semejante ocurre con las plantas denominadas Callet blanc (como se comenta al principio del trabajo, Callet blanc es otra denominación que adquiere el cultivar Valent blanc) pero en este caso también dan positivo en el virus GFLV, por el contrario las plantas más afectadas por mayor número de virus son las de Valent blanc dado que en este caso dan positivo en tres de los cuatro virus analizados. Dicho lo anterior podemos afirmar que uno de los virus que más afecciones causa es el GLRaV-3, ya que, se encuentra en todas las muestras que se han analizado. En cambio GLRaV-1 no da positivo en ninguna de las muestras aunque se le considere el segundo enrollado más importante después de GLRaV-3 (Cretazzo et al., 2010)

El hecho de haber escogido la estación estival para recoger las muestras ha sido para aprovechar las altas temperaturas y de forma natural realizar una termoterapia a la planta antes de su recolección, pero como se demuestra en el trabajo de final de grado de (Llabrés, 2014) la supervivencia de las plantas una vez puestas en cultivo *in vitro* decrece mucho. Aunque, en muchos de los casos las plantas consiguen hacer crecer la parte aérea entre uno y dos centímetros, estas se acaban secando y el porcentaje de supervivencia es muy bajo. En 1961, Gifford y Hewitt fueron los primeros en realizar esta técnica obteniendo 2% de supervivencia en sus muestras. Comparándolo con los resultados obtenidos, con Batista se ha logrado un 4.34% de supervivencia. Por el contrario Valent blanc solo se ha conseguido un 0.42% de supervivencia quedando muy por debajo de los resultados obtenidos con el cultivar Batista.

La interpretación de la prueba Chi-cuadrado nos indica que el valor-p computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, por lo tanto, se debe rechazar la hipótesis nula donde se postula que la variedad de vid no influye en el supervivencia de su ápice caulinar al cultivo *in vitro*, y aceptar la hipótesis alternativa donde si afirmamos que la variedad de vid si influye en la supervivencia. Dados estos resultados, los podemos relacionar con los resultados observados en estudios no publicados realizados con la variedad Prensal blanc donde esta, presentó al igual que Valent blanc en este estudio, mucha dificultad a la hora de ser propagada mediante cultivo *in vitro*.

Para finalizar, los resultados referentes al saneamiento mediante la técnica de cultivo *in vitro* de ápices caulinares recogidos en época de temperaturas elevadas, muestra los resultados siguientes, las tres plantas de Batista dan negativo en GLRaV-3 y por lo tanto se ha eliminado de este cultivar el virus al cual dio positivo al principio del estudio. El cultivar Valent blanc también dio negativo en GLRaV-3 y en GFKV pero al contrario que el cultivar Batista, Valent blanc en el test inicial dio positivo en GLRaV-3, GFKV y GFLV y de este último no se ha conseguido sanear. Obviando este último dato, podemos decir que los resultados son positivos ya que para próximos estudios de saneamiento se puede tomar de material de partida esta planta, ya que solo ha dado positivo en uno de los tres virus de los que estaba infectada inicialmente. Por otro lado podría existir una relación entre el estado sanitario inicial de la planta (número de virus de los cuales está infectada la planta) y la supervivencia de esta dado que el cultivar que más virus dio positivo en el test inicial ha sido el que más dificultades ha tenido para ser propagado mediante este método, de igual modo que también presenta mayor dificultad para su saneamiento dado que se tiene un porcentaje menor de planta viva y un mayor número de virus a eliminar.

10. Conclusiones

1. En el caso de Prensal blanc el medio MS0 ha mostrado los mejores resultados para la propagación *in vitro* de este cultivar respecto a los otros tres medios probados.
2. Los medios de cultivo estudiados presentan diferencias significativas que influyen en el crecimiento del ápice caulinar, mostrando que el contenido en reguladores de crecimiento puede favorecer la creación de callo y comprometer la supervivencia.
3. Las variedades minoritarias Batista y Valent blanc, presentan un estado sanitario muy deficiente. En concreto las plantas madre del cultivar Valent blanc están altamente infectadas por GFLV, GFKV y GLRaV-3.
4. El material madre del cultivar Batista sólo se encuentra infectado por GLRaV-3
5. El cultivar Batista tiene un porcentaje de supervivencia mayor que el cultivar Valent blanc, hecho que puede estar relacionado con el estado sanitario inicial de los dos cultivares.
6. Existen diferencias significativas entre variedades a la hora de ser reproducidas mediante cultivo *in-vitro* ya que no todas responden igual a esta técnica encontrándonos con variedades como Valent blanc que presentan una gran dificultad.
7. La combinación de las técnicas de termoterapia natural y cultivo *in vitro* de ápices caulinares son técnicas eficientes para la eliminación de virus en los cultivares Batista y Valent blanc.
8. Las plantas supervivientes del cultivar Batista, constituyen el material de partida para la autorización de la variedad.

11. Bibliografía

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

Bale J.S., Masters G.J., Hodkinson I.D., Awmack C., Bezemer T.M., Brown V.K. 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology* 8: 1–16.

Barlass, M.; Skene, K.G.M.; Woodham, R.C.; Krake, L.R. 1982. Regeneration of virus free grapevine using “in vitro” apical culture. *Ann. Appl. Biol.* 101, 291-295.

Belli, G. 1996. Accartocciamento fogliare della Vite. Virus floematici e malattie della vite, di Martelli, G.; Savino, V.; Digiario, M. 1993: 27-40.

Bota, J., Montero, R., Luna, J.M., Martorell, A., Escalona, J.M., 2013. Variedades de vid minoritarias en las islas Baleares. *Viticultura*. N° 3395, 326-333.

Bota, J., Cretazzo, E., Montero, R., Rosselló, J., 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*.

Blaich, R.1985. Recherches sur les cultures de méristèmes et d’organes de vigne “in vitro” en vue de la selection et de la conservation de génotypes. *Bull. O.IV.*, 650-651: 391-395

Cabaleiro, C.; Segura, A. 1996. Efecto del Enrollado de la vid (GLRaV-3), en un viñedo en plena producción del cv. “Albariño”. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* Vol 11 (3): 451-463.

Cabello, FSSM (2004) Recuperación y estudio de variedades españolas minoritarias de vid de previsible interés comercial. In: Interés de las variedades locales y minoritarias de vid : jornada técnica organizada por la Asociación Riojana para el Progreso de la Viticultura (Arprovi), Logroño, 28 de noviembre de 2003, ISBN 84-8125-235-2, págs. 25-50

Cipriani G., Spadotto A., Jurman I., DI Gaspero D., Crespan M., Meneghetti S., Frare E., Vignani R., Cresti M., Morgante M., Pezzotti M., PE E., Policriti A. & Testolin R. (2010) The SSRbased molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theor. Appl. Genet*, 121, 1569-1585.

Clark, M. F., 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, 475-483.

Cretazzo, E., Tomás, M., Padilla, C., Rosselló, J., Medrano, H., Padilla, V., 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. 8(2), 409-418.

Duran- Vila, N.; Juárez, J.; Arregui, J.M. 1988 Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture. Am. J. Enol. Vitic. Vol. 39, nº3: 217-220

Escalona, J.M., Luna, J.M., Rubi, L., Martorell, A., 2009. Nuevas variedades locales de Baleares. Giró Ros y Gorgollasa. Vida Rural, 290, 74-80.

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.

Ferro, E. 1989. Aplicaciones de las técnicas de cultivo *in vitro* de ápices caulinares en el saneamiento de clones seleccionados de vid, variedad Albariño. Tesis doctoral. Universidad de Santiago, 194pp.

García Muñoz, S., Muñoz Organero, G., Fernández Fernández, E., Cabello, F., 2014. Sensory characterization and factors influencing quality of wines made from 18 minor varieties (*Vitis vinifera* L.). Food. Qual. Prefer. 32, 241-252

García-Muñoz, S., 2011. Study of minor grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). description, agronomic and oenological characterization of varieties from the Balearic Islands. PhD. Thesis, University of Valladolid, Spain. 183pp.

García Muñoz, S., Lacombe, T., De Andrés, M.T., Gaforio, L., Muñoz Organero, G., Lacuou, V., This, P., Cabello, F., 2012. Grape varieties (*Vitis vinifera* L.) from the Balearic Islands. genetic characterization and relationship with Iberian Peninsula and Mediterranean Basin. Genet. Resour. Crop. Ev. 59, 589-605.

Gifford, E.M.; Hewitt, W.B. 1961. The use of heat therapy and “in vitro” shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine. Am. J. Enol. Vitic. 12: 129-130.

Goheen, A.C.; COOK, J.A. 1959. Leafroll (read-leaf or rougeau) and its effects on vine growth fruit quality and yields. Am. J. Enol. Vitic. 10:173-181.

Heuertz, M., Goryslavets, S., Hausman, J., Risovanna, V., 2008. Characterization of Grapevine Accessions from Ukraine Using Microsatellite Markers 59: **169-178**.

Hewitt, W.B. 1968. Viruses and virus diseases of the grapevine. Rev. Appl. Mycol. 47 (9): 433-455.

Hidalgo, L. H. (2002). Tratado de viticultura general. Mundi-Prensa.,Santiago, J.L., Boso, S., Gago, P., Alonso-Villaverde, V., María-Carmen, M., 2008. A contribution to the maintenance of grapevine diversity. The rescue of Tinta Castañal (*Vitis vinifera* L.), a variety on the edge of extinction. *Sci. Hortic*, 116, 199-204.

Hoeffert, L.L.; Gifford, E.M. JR. 1967. Trabeculae in the grapevine infected with leafroll virus. *Am. J. Bot.* 54: 257-261.

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. 38p.

Komínek, P., Holleínová, V., 2003. Evaluation of sanitary status of grapevines in the Czech Republic. *Plant.Soil.Environ.*

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

Maghradze, D., Failla, O., Bacilieri, R., Imazio, S., Vashakidze, L., Chipashvili, R., Mdinardze, I., Chkhartishvili, N., This, P., Scienza, A., 2010. Georgian vitis germplasm. usage, conservation and investigation. *Le Bulletin de L'OIV.*

Mahfoudhi, N., BenSlimane, M., Elair, M., Selmi, I., Ben-Hamda, H., 2014. Prevalence of Viruses Infecting Autochthonous Grapevines in Tunisia. *Tunis. J. Plant. Prot.* 9, 111-118.

Martelli, G. P., 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents.

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

Materazzi, M., Triolo, E., Scalabrelli, G., D'onofrio, C., Luvisi, A., Ferroni, G., 2006. Clonal selection of cv. Aleatico (*Vitis vinifera* L.) along Tuscan coastal area. *Proc I Intl Symposium on Environment Identities and Mediterranean Area. Corte-Ajaccio, France, Jul 9-12.* pp. 531-535.

Mhatre, M., Sanlukhe, C. K., Rao, P. S. 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. *Scientia Horticultirae*, 84, 357-363.

Montero, R., Mundy, D., Albright, A., Grose, C., Trought, M.C.T., Cohen, D., Chooi K.M., MacDiarmid, R., Flexas, J., Bota, J., 2016. Effects of Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) and duration of infection on fruit composition and wine chemical profile of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Food.Chem.* 197, 1117-1183.

Moreno-Sanz, P., Loureiro, M. D., & Suárez, B. (2011). Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain). *Scientia horticultrae*, 129, 433- 440.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised médium for the rapid growth and bioassy with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-79.

Naidu, R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D., Martelli, G.P., 2014. Grapevine leafroll. a complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant.Dis.* 98, 1172-1185.

Oerkeh, E., Dehne, W., 2004. Safeguarding production losses in major crops and the role of crop protection. institute for Plant Diseases, University of Bonn, Bonn 53115, Germany.

Padilla, V.1988. Los parásitos de la vid. Estrategia de lucha. Ed. MundiPrensa, Madrid, 276 p.

Peiró R., Gammoudi N., Yuste A., Olmos A. Gisbert C. 2015. Mature seeds for in vitro sanitation of the Grapevine leafroll associated virus (GLRaV-1 and GLRaV-3) from grape (*Vitis vinifera* L.). *Spanish Journal of Agricultural Research*.

Puente, J.; Marin, J.A. 1994. Enraizamiento *in vitro* de chirimoyo. II Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas. Abril, 1993. Zaragoza: 917-922.

Salami,S.A., Ebadi, A., Zamani, Z., Habibi, M.K.,2009. Incidence of Grapevine Fanleaf Virus in Iran. A Survey Study and Production of Virus-Free Material Using Meristem Culture and Thermoherapy. *Europ. J. Hort. Sci.* 74, 42–46.

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

Santiago, J.L., Boso, S., Gago, P., Alonso-Villaverde, V., María-Carmen, M., 2008. A contribution to the maintenance of grapevine diversity. The rescue of Tinta Castañal (*Vitis vinifera* L.), a variety on the edge of extinction. *Sci. Hortic.* 116, 199-204.

Torregrosa, L.; 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: 127-134.

Troggio, M., Vezzulli, S., Pindo, M., Malacarne, G., Fontana, P., Moreira, F. M., ... & Velasco, R. (2008). Beyond the genome, opportunities for a modern viticulture: a research overview. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 117-127. Tsai CW, Rowhani A, Golino DA, Daane KM, Almeida RPP, 2010. Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus-vector specificity. *Phytopathology* 100, 830–4.

This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics*, 22, 511-519.

Zdunić, G., Maletić, E., Vokurka, A., Karoglan-Kontić, J., Pezo, I., Pejić, I., 2007. Phenotypical, Sanitary and Ampelometric Variability within the Population of cv. Plavac Mali (*Vitis vinifera* L.). *Agric. Conspec. Sci.* 72, 117-128.

Zdunić, G., Hančević, K., Sladonja, B., Poljuha, D., Hartl-Musinov, D., Budić-Leto, I., Bućan, L., Pezo, I., 2008. Ampelographic Characterization and Sanitary Status of Grapevine Cultivar 'Prč bijeli' (*Vitis vinifera* L.). *Agric. Conspec. Sci.* 73, 85-88.

12. Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mi familia todo el apoyo que me han dado durante toda mi vida, gracias a ellos me he convertido en la persona que soy y he conseguido muchos de los logros que hace unos años solo eran sueños.

Gracias a mi pareja por estar a mi lado y conseguir sacarme una sonrisa cuando la vida nos ha dado momentos difíciles y sobre todo gracias por la nueva etapa que estamos viviendo.

También quiero agradecer a la universidad y a todos los profesores que he tenido la suerte de conocer, todos los conocimientos adquiridos durante estos años, que me han hecho crecer como profesional y como persona.

No puedo dejar de lado en este agradecimiento a mi gran amigo Pep Mulet, ya que, solo teníamos 12 añitos cuando nos conocimos y desde entonces no nos hemos separado, gracias también porque juntos empezamos este viaje y juntos lo hemos acabado. Tampoco me quiero olvidar de todas las amistades que he hecho durante estos años y agradecerles todos los momentos vividos y los que nos quedan por vivir.

Agradecer a Pedro y a Juan Miquel toda la ayuda que me han dado para llevar a cabo este proyecto y recordarles que cada vez que esté en medio de un campo en agosto a 35⁰C me acordaré de ellos. También quiero agradecer a Hanan toda la ayuda prestada en el laboratorio y la paciencia que ha tenido conmigo.

Por último pero no por ello menos importante, agradecer a mi tutora Josefina Bota todos los consejos y la ayuda prestada para realizar este proyecto que sin ella no habría sido posible.