

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE LAS  
VARIEDADES DE VID MONASTRELL,  
ESCLAFACHERRE Y BOBAL**

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y  
DEL MEDIO RURAL

Alumna: Nora Martínez Pérez  
Tutora: Carmina Gisbert Doménech

Curso Académico: 2014-2015  
Valencia, Septiembre de 2015

# RESUMEN

La vid (*Vitis vinifera* L.) representa uno de los cultivos con más importancia tanto a nivel nacional como mundial. De este cultivo se obtienen multitud de productos entre los que destacan la uva de mesa para consumo en fresco y el vino obtenido de la uva de vinificación. Preservar la variabilidad de la vid mediante la conservación de germoplasma es de gran interés para poder afrontar nuevas necesidades. La preservación de los recursos genéticos incluye la recuperación, identificación y caracterización de las variedades con especial interés de aquellas minoritarias en peligro de desaparición. Una de las herramientas de escaso uso pero de gran interés en vid, cuya propagación es vegetativa, es la conservación *in vitro* de material vegetal. Esta técnica permite conservar el material en condiciones controladas que reducen el riesgo de pérdidas causadas por distintos factores ambientales y meteorológicos y es ideal para mantener duplicados de las colecciones que se mantienen en campo. Es importante para una conservación *in vitro* eficiente reducir el número de subcultivos, para optimizar los recursos y reducir el riesgo de contaminaciones. Este tipo de metodología requiere del ajuste de medios y condiciones de cultivo específicos para cada variedad, que permitan minimizar el crecimiento sin detrimento de la viabilidad.

En este estudio se ha evaluado el desarrollo *in vitro* de tres variedades de uva, Monastrell, Esclafacherre y Bobal, en medio de cultivo estándar (MW) y en este medio con distintas modificaciones: reduciendo el azúcar a la mitad (MW S/2), no adicionando la auxina IBA (MW IBA 0) y la combinación de reducir el azúcar y eliminar la auxina (MW S/2 IBA 0). También se ha estudiado la influencia del genotipo y de los factores modificados. Las tres variedades han mostrado variabilidad en cuanto a su crecimiento, siendo la variedad Esclafacherre la que presenta menor desarrollo radicular y vegetativo respecto a las otras dos variedades. La reducción de azúcar ha supuesto mayor desarrollo vegetativo y mayor desarrollo radicular. Como era esperable, un menor desarrollo de la raíz se ha manifestado en los medios sin auxina. El medio con la concentración de azúcar reducida ha sido el que más ha favorecido el crecimiento en las tres variedades, superando el obtenido en el medio estándar MW. Este medio sería más adecuado para la micropropagación de estas variedades. El medio con la concentración de azúcar reducida y sin IBA ha resultado el más adecuado para la conservación *in vitro* de las variedades Monastrell y Esclafacherre ya que en él se ha obtenido el menor crecimiento. En el caso de la variedad Bobal el crecimiento ha sido similar en medio MW, MWS/2 y medio MWS/2 IBA 0, con un menor desarrollo radicular en este último y también podría utilizarse éste para su conservación *in vitro*.

Palabras clave

**Vid, conservación de germoplasma, conservación *in vitro*, medio de cultivo, sacarosa, auxina IBA, genotipo**

# ABSTRACT

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) represents one of the most important crops worldwide with great importance in Spain. Table grape for fresh consumption and the wine obtained from the wine grapes are the most important products. Variability preservation of the grapevine cultivars, especially those with risk of extinction is of great interest in order to face with future needs. Preservation of the genetics resources includes identification and characterization of grape varieties. In grape, that is vegetatively propagated, *in vitro* culture is an effective tool for plant material preservation. It is interesting, in order to reduce the number of subcultures and optimize resources, the adjustment of specific media and culture conditions for each variety that minimize growth without loss of viability.

In this study the development of three grapevine varieties, Monastrell, Esclafacherre and Bobal, have been evaluated in standard culture medium (MW) and in this medium with half sucrose concentration (MW S/2), without IBA (MW IBA 0) or both (MW S/2 IBA 0). The influence of genotype and the modified factors have also been studied. The three varieties have shown variability in their growth. Esclafacherre was the variety with the lowest root and vegetative development. In medium with reduced sucrose concentration higher growth respect in the standard medium MW was observed. Thus, this medium would be the most appropriate for micropropagation. Lack of IBA in the medium reduced root and vegetative growth. The medium with reduced sucrose and without IBA has been the most adequate for Esclafacherre and Monastrell *in vitro* conservation because in this medium the lowest growth was observed. In the Bobal case, growth was similar among MW, MW S/2 and MW S/2 IBA0 with lower root development in the latter. Therefore, it could be also used for *in vitro* preservation.

Key words

**Grapevine, germplasm conservation, *in vitro* conservation, culture medium, sucrose, auxin IBA, genotyp**

# AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Carmina por enseñarme y guiarme en el mundo de la investigación.

A Tania y Aurora por su paciencia y ayuda.

A mis padres e Inés por su apoyo incondicional.

A Iñigo por cada día.

Muchas gracias a todos ellos.

“Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido del experimento, madre de toda certidumbre.” -Leonardo Da Vinci

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La vid.....	1
1.1.1. Clasificación botánica y generalidades.....	1
1.1.2. Importancia económica.....	2
1.1.2.1. DOP.....	3
1.1.3. Erosión genética.....	4
1.2. Conservación de germoplasma.....	4
1.2.1. Conservación de germoplasma <i>in vitro</i> .....	5
1.3. Colecciones de germoplasma de vid.....	7
1.4. Características de las variedades utilizadas en este proyecto. . .	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1. Características del experimento.....	11
3.2. Material vegetal de partida.....	11
3.3. Medios de cultivo.....	11
3.4. Condiciones de cultivo.....	12
3.5. Evaluación del desarrollo de las plantas en los diferentes medios.....	12
3.6. Análisis estadístico.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15

4.1. Evaluación del desarrollo de las plantas de las variedades Monastrell, Esclafacherre y Bobal en el medio de cultivo estándar MW y este medio modificado: 1) Reduciendo el azúcar a la mitad (MW S/2); 2) No adicionando la auxina IBA (MW IBA 0) y 3) Reduciendo el azúcar y eliminando la auxina (MW S/2 IBA 0).....	15
4.1.1. Variedad Monastrell.....	15
4.1.2. Variedad Esclafacherre.....	16
4.1.3. Variedad Bobal.....	17
4.2. Estudio de la influencia de los distintos factores (variedad, concentración de azúcar y presencia de IBA) en la altura, número de hojas y desarrollo radicular.....	19
5. CONCLUSIONES.....	25
6. BIBLIOGRAFÍA.....	26
7. ANEXOS.....	29

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La vid

### 1.1.1. Clasificación botánica y generalidades

La vid forma parte de la familia *Vitaceae* que cuenta con 14 géneros, entre ellos el género *Vitis*, al que pertenece. Dentro de este género se han clasificado más de 60 especies con distinta distribución en el mundo. A su vez, en este género se distinguen dos subgéneros (Figura 1): *Muscadinia* y *Euvitis*. Del primero solo existe una especie cultivada, *Vitis rotundifolia M.* con  $2n=40$  y distribución americana en zonas subtropicales, para uva de mesa y para algún elaborado. El segundo consta de 3 grupos: el grupo asiático, el grupo americano, que constituye la base para la obtención de todos los portainjertos utilizados en viticultura, y el grupo europeo, que presenta una única especie que, actualmente, se cultiva en todo el mundo, *Vitis vinifera L.* con  $2n=38$ , con más de 10.000 variedades, distribuida en todos los continentes, para el consumo humano y elaboración de vino (Salazar & Melgarejo, 2005).

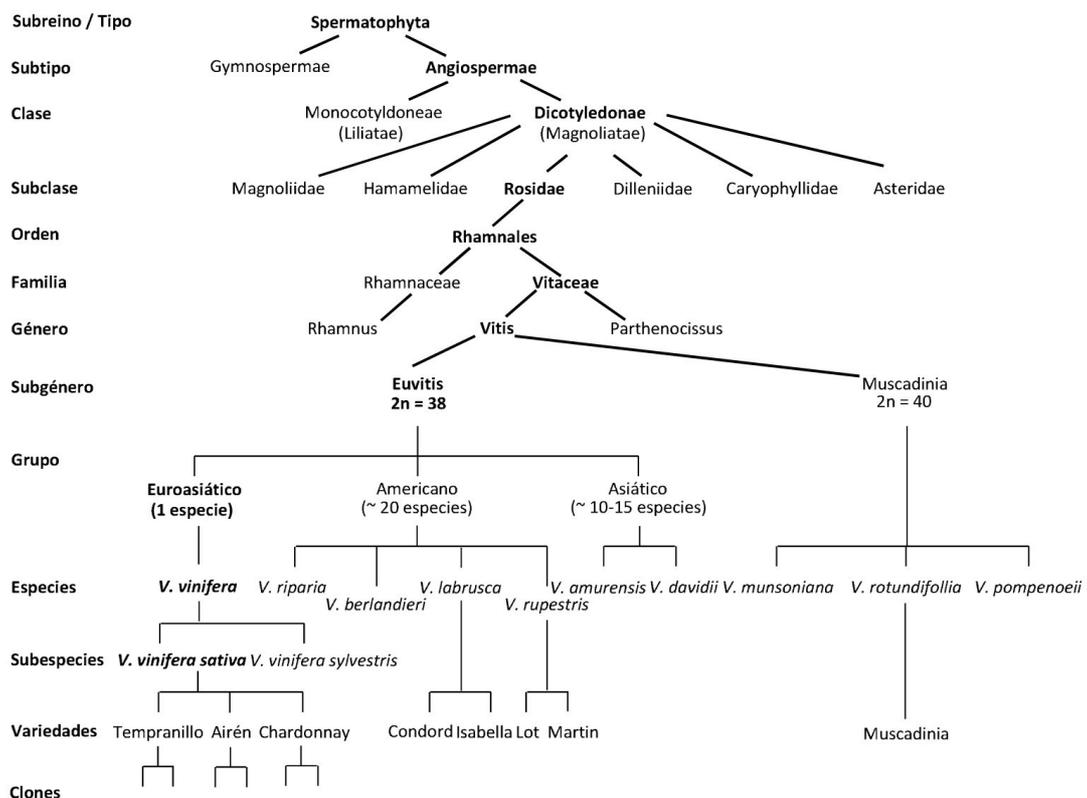


Figura 1. Taxonomía de la vid

Las primeras formas de vid aparecieron hace, aproximadamente, 6000 años (Enjalbert, 1975; Martínez de Toda y Sancha, 1997). En particular, los primeros datos sobre *Vitis vinifera*

proceden de Georgia y posteriormente de Egipto y Azerbaiyán (Salazar & Melgarejo, 2005). Los materiales actualmente cultivados proceden en su mayor parte de hibridaciones naturales entre los cultivares existentes o que han existido en distintas zonas geográficas o, de hibridaciones dirigidas intra o interespecíficas (López & Salazar, 2006).

La vid es una planta semileñosa y trepadora. Las ramas jóvenes, llamadas sarmientos constan de hojas y zarcillos. Las hojas son alternas y palmatinervias, variando su forma y tamaño con las distintas variedades. Las flores son pentámeras y se encuentran dispuestas en inflorescencias de racimos. El fruto es una baya globosa.

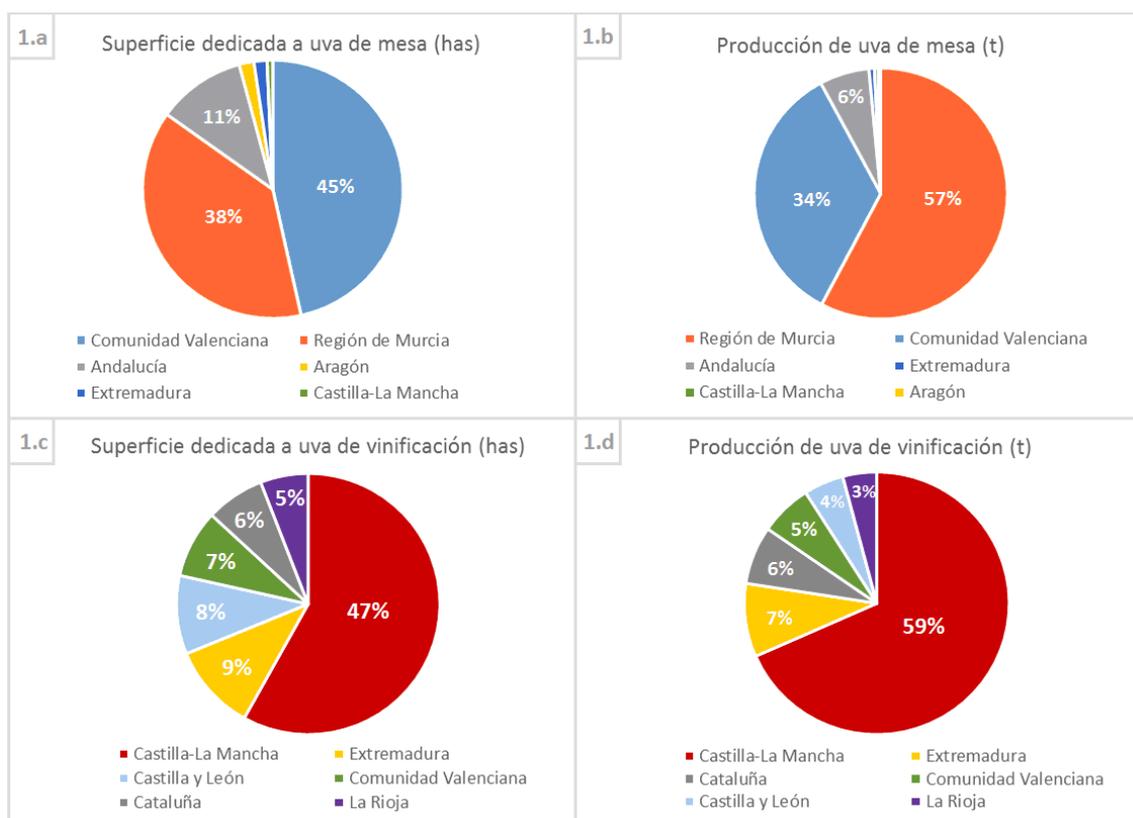
### 1.1.2. Importancia económica

*Vitis vinifera* es uno de los cultivos frutales más importantes en el mundo (Mukherjee *et al.* 2010). En cuanto a la producción mundial de uva, Europa es el principal productor con el 37,7% del total, seguido de Asia con el 32,4%, luego de América con el 21,4% y por último África (5,8%) y Oceanía (2,8%). En cuanto a países productores, China, con 11.650.024,00t es el principal productor y España se encuentra en cuarto lugar con una producción de 7.480.000,00t (FAOStat, 2013).

En nuestro país la producción de uva puede clasificarse según el destino final de la uva y encontramos tres grupos, uva de mesa, uva de vinificación y uva de pasificación.

La superficie total dedicada al cultivo de la uva de mesa en el año 2014 fue de 13.742 has con una producción de 254.258 t siendo la Región de Murcia la comunidad autónoma más productora seguida de la Comunidad Valenciana y Andalucía como principales productoras. Como se observa en la Figura 1.a, en cuanto a la superficie dedicada a uva de mesa, es la Comunidad Valenciana la que más superficie tiene. Respecto a la uva de vinificación nos encontramos con una superficie total de 930.820 has y una producción de 7.226.532 t. En este caso la comunidad autónoma más productora es Castilla-La Mancha seguida de Extremadura, Cataluña, la Comunidad Valenciana, y La Rioja. Las demás comunidades autónomas del país también producen uva de vinificación, su producción representa el 16% del total. Y por último, en cuanto a la uva de pasificación, Andalucía es la única productora con un total de 1690 has y una producción de 1749 t (MAGRAMA, 2014).

Como se observa, el cultivo de la vid tiene un papel importante en la economía española, así, tanto para la uva de vinificación como para la de mesa, existen numerosas Denominaciones de Origen Protegidas.



**Figura 1. Superficie dedicada a uva de mesa (has) (1.a); Producción de uva de mesa (t) (1.b), Superficie dedicada a uva de vinificación (has) (1.c), Producción de uva de vinificación (1.d).**

### 1.1.2.1. DOP

Las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) constituyen el sistema utilizado en nuestro país para el reconocimiento de una calidad diferenciada, consecuencia de características propias y diferenciales, debidas al medio geográfico en el que se producen las materias primas, se elaboran los productos, y a la influencia del factor humano que participa en las mismas. Para cumplir con la normativa de las DOP hay que cumplir que el producto sea originario de un lugar determinado, una región o, excepcionalmente, un país; que la calidad o características se deban fundamentalmente o exclusivamente a un medio geográfico particular y que las fases de producción tengan lugar en su totalidad en la zona geográfica definida (MAGRAMA).

En cuanto a la uva, ya sea para vino o para uva de mesa, hay variedades autorizadas por los diferentes consejos reguladores de cada denominación de origen y a su vez se encuentran también denominaciones de origen específicas de los vinos así como de uva de mesa. En España hay 70 denominaciones de origen protegidas de vinos. Además de una estricta normativa de calidad, si una zona de producción quiere acceder a una D.O. deberá haber sido reconocida al menos cinco años antes como región de producción de Vinos de Calidad. De todas las DO que hay en España, sólo dos son Denominaciones de Origen Calificadas: Rioja y Priorat. Estas D.O.Ca. deben cumplir una normativa más estricta y un control más exhaustivo que las anteriores y su nivel de protección es mayor. Además, para acceder a la D.O.Ca., una región de producción debe haber sido reconocida como D.O. al menos diez años antes.

### 1.1.3. Erosión genética

La erosión genética es el proceso que provoca la pérdida de potencial genético. Con cada material que desaparece, se pierden genes que pueden servir para afrontar distintos tipos de estrés y poder adaptarse a nuevas situaciones.

En el cultivo de la vid se produjo una gran pérdida de variabilidad como consecuencia de la terrible plaga de la filoxera que asoló los viñedos europeos en el siglo XIX. Desde entonces las variedades que se utilizan en Europa pasaron a injertarse en pies americanos resistentes a la filoxera. Además se han creado viveros de selección y multiplicación de material vegetal. Así la mayoría de las variedades cultivadas hoy en día no tienen más de 200 años (Viala & Vermorel, 1905). La erosión genética sigue produciéndose debido a múltiples factores, entre ellos se puede destacar la evolución de las plantas con el paso del tiempo. Frente a distintas adversidades solo quedan las formas más resistentes, perdiéndose aquellas que no han evolucionado del mismo modo. También la mano del hombre en su proceso de selección vegetal, de puesta en cultivo de nuestras tierras, de urbanización de zonas agrestes, etc., ha provocado una disminución de las áreas naturales de supervivencia de las formas espontáneas. Hoy, en muchas regiones, resulta sumamente difícil encontrar este tipo de viñas (Martínez de Toda, 1991) y actualmente como consecuencia de la sustitución de variedades tradicionales por otras comerciales aceptadas en las distintas D.O. Igualmente, el gran impulso que han adquirido los trabajos de selección clonal y sanitaria, indudablemente necesarios, también reduce la variabilidad dentro de cada variedad, eligiendo solo los clones superiores que son los que, posteriormente, se ponen en cultivo. (Martínez de Toda, 1991).

La posibilidad de recurrir a germoplasma con el que hacer frente a futuras adversidades pasa por mantener este germoplasma en buenas condiciones para poder hacer uso de él cuando se requiera. En este sentido el desarrollo de metodologías de conservación es de gran interés.

## 1.2. Conservación de germoplasma

Los recursos fitogenéticos son la base biológica de la seguridad alimentaria y, directa o indirectamente, sostienen los medios de subsistencia de todos los habitantes de la Tierra. Los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA) consisten en una diversidad de semillas y materiales para la siembra de variedades tradicionales y de cultivares modernos, de variedades silvestres afines a los cultivos y de otras especies de plantas silvestres (FAO). Según Cubero (1999), estos recursos fitogenéticos pueden ser conservados mediante las siguientes técnicas:

1) Conservación *in situ*, es decir, en el propio lugar donde se cultiva lo que se pretende conservar. Consiste en la creación, en ciertos lugares, de reservas de cultivos, en las que las razas locales podrían conservarse *in situ*, permitiendo sin embargo cambios en el ambiente aceptando las técnicas agrícolas pero sin utilización de variedades modernas.

2) Conservación *ex situ*, esto es, en bancos de germoplasma, de colecciones de semillas, de plantas vivas, de polen, de ADN y de plantas o tejidos vegetales cultivados *in vitro*.

Las colecciones de semillas tienen la particularidad de que sólo pueden llevarse a cabo si se trata de semillas ortodoxas, es decir, aquellas que pueden conservarse en condiciones de baja humedad y baja temperatura. Pero muchas especies no admiten la conservación de sus semillas, como es el caso de las semillas recalcitrantes o aquellas afectadas por la latencia, por lo que deben ser conservadas a través de las técnicas mencionadas anteriormente. Las colecciones vivas suponen una alternativa a la conservación de semillas y es un método muy extendido, pero tiene inconvenientes tales como la dificultad de los métodos de propagación asexual así como del espacio que requiere. En cuanto a la conservación de polen en un principio pareció ser útil a la hora de realizar cruzamientos y la posterior multiplicación vegetativa del material obtenido, pero el polen es muy sensible a la desecación por lo que es un método que ya prácticamente no se usa (Cubero, 1999).

Por último, la conservación de plantas o tejidos vegetales cultivados *in vitro* sólo puede llevarse a cabo cuando se dispone de protocolos adecuados pero es una metodología de gran interés en plantas que no pueden mantenerse en bancos de semillas como son las de reproducción vegetativa.

En el mundo hay más de 1750 bancos de germoplasma que poseen colecciones muy diversas de recursos fitogenéticos y su objetivo general es la conservación a largo plazo y la accesibilidad del germoplasma vegetal para los fitomejoradores, investigadores y otros usuarios. La conservación sostenible de estos recursos fitogenéticos depende de una gestión eficaz y eficiente de los bancos de germoplasma mediante la aplicación de normas y procedimientos que aseguren la continua supervivencia y disponibilidad de los recursos fitogenéticos (FAO).

### **1.2.1. Conservación de germoplasma *in vitro***

La conservación *in vitro* es una metodología que complementa la conservación en campo o jardines y consiste en el cultivo de plantas o explantes, obtenidos mediante micropropagación, en condiciones de asepsia que se mantienen en condiciones controladas en cámaras de cultivo. Es importante regenerar frecuentemente la colección mantenida *in vitro* para evitar el envejecimiento fisiológico que ocurre en algunos materiales (Cubero, 1999). Para ello hay que buscar las condiciones óptimas para el crecimiento lento del explante, mediante el manejo de variables como el régimen de iluminación, la temperatura y composición del medio, individualmente o en combinación (Engelmann, 1991). Por otra parte, reducir el crecimiento supone reducir el número de subcultivos y por lo tanto la mano de obra, optimizando recursos y evitando posibles pérdidas de material por contaminación o errores de etiquetado.

Entre las estrategias más utilizadas para disminuir el crecimiento de las plantas está la utilización de distintas fuentes de carbono y/o la variación de la concentración de la fuente de carbono utilizada. La presencia de azúcar en el medio es fundamental para el desarrollo de una

planta *in vitro* (Pierik, 1990) ya que la fotosíntesis, en estas condiciones de cultivo, suele ser insuficiente para satisfacer la necesidad de carbono de la planta. Esto, se relaciona con que los tejidos verdes *in vitro* no son suficientemente autotróficos, además la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera del tubo de cultivo no es siempre la más adecuada (Gibson, 1967) y la iluminación es insuficiente. En consecuencia, la planta *in vitro* necesita tomar carbono del medio de cultivo para satisfacer sus necesidades. La mayoría de plantas superiores utilizan la sacarosa como la principal fuente de carbono, usándose en el metabolismo y el crecimiento o para almacenarse como reserva (Azcon-Bieto y Talón, 2003; Lemoine 2013). Es por esto que la sacarosa (del 2% al 5%) es el azúcar que más se utiliza en los medios de cultivo *in vitro* y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa (Mroginski y Roca, 1991). En general, el incremento de los niveles de sacarosa favorece el crecimiento y la formación de productos, pero valores superiores al 10 % (p/v) pueden producir represión por catabolitos (Ertola *et al.*, 1994) y también provocar un estrés osmótico que ralentice el crecimiento ya que la sacarosa actuará como agente osmótico. Haciendo lo contrario, es decir con la reducción de la concentración de sacarosa por debajo del óptimo de cada especie, ésta será un factor limitante que reduzca el crecimiento pero sin que la planta se vea afectada fisiológicamente. Si no se dispone de bibliografía es importante ensayar primero con diferentes concentraciones de sacarosa para saber cuáles son las más adecuadas para conseguir el objetivo sin causar daños a la planta (Akdemir *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2003).

Otra alternativa en la modificación del medio de cultivo es la reducción o el cambio de sales. Los protocolos de micropropagación son dependientes del genotipo y de las condiciones del cultivo (Monette, 1988). Hasta ahora no existe un diseño que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción (Krikorian, 1991).

Estudios llevados a cabo sobre la fisiología de las auxinas revelaron que ésta intervenía en procesos como el desarrollo y crecimiento del tallo, la rizogénesis, la inhibición de yemas, la activación de células del cambium así como en la embriogénesis de los cultivos en suspensión (Hartman y Kester, 1997; Pierik, 1990). Las auxinas más utilizadas para el establecimiento de cultivos son el ácido 3-indolbutírico (IBA), el ácido 3-indolacético (AIA), el ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA), y el ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Mroginski y Roca, 1991).

El desarrollo de protocolos de crioconservación que utilizan explantes de plantas en cultivo *in vitro* (i.e. meristemos) es también una metodología relacionada con el cultivo *in vitro* que permite el almacenamiento a muy largo plazo. Tras la puesta a punto de los protocolos pertinentes el material se conserva en nitrógeno líquido y puede ser recuperado cuando se requiera.

### 1.3. Colecciones de germoplasma de vid

Según la OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin), a nivel mundial se han descrito hasta 2013 un número total de 4020 variedades y en España, 150 que son cultivadas en las 70 denominaciones de origen que existen.

El interés por identificar y recuperar variedades tradicionales va en aumento y actualmente se están realizando trabajos de localización e identificación de variedades minoritarias y locales en todas las zonas con tradición vitícola. Los proyectos encaminados a la preservación de los recursos genéticos de la vid pretenden la recuperación, identificación y caracterización de las variedades minoritarias. Todo ello está encaminado a su conservación en bancos de germoplasma, con el fin de salvaguardar la biodiversidad genética.

En España existen distintos centros de recursos fitogenéticos de vid que mantienen las variedades en parcelas. Los más representativos son:

- El Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV). Fue el primero en fundarse y es el que más variedades y entradas posee. Fue creado por el Gobierno de La Rioja, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Universidad de La Rioja. Su objetivo es el de crear nuevos conocimientos y nuevas tecnologías en Viticultura y Enología que sirvan como base para el desarrollo tecnológico y la innovación en el sector vitivinícola, muy importante en nuestra cultura y economía.
- El Banco de Germoplasma de Vid de Castilla-La Mancha (BGVCM). Consta de una colección en la que, junto a variedades de distribución peninsular, europea y mundial, aparecen otras minoritarias de distribución comarcal o local. En la actualidad hay 121 variedades representadas. De ellas, unas 30 se pueden considerar tradicionales de esta Región, o de algunas de sus grandes comarcas, y 35 son de distribución más local, no estando aún reconocidas como nuevas variedades. El resto lo integran variedades distribuidas por diferentes regiones peninsulares, algunas de ellas de mesa, y otras que podemos considerar importadas, en su mayoría francesas.
- La Colección de Variedades de Vid de "El Encín". La Colección ocupa en la actualidad 15 ha en las que se realizan las labores habituales de cultivo de la vid. El coste total de mantenimiento se cofinancia gracias al esfuerzo conjunto del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (I.N.I.A.) y del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (I.M.I.D.R.A). En la actualidad la colección está formada por 3.532 accesiones. Por grupos hay 852 portainjertos, 69 híbridos productores directos (H.P.D.), 111 *Vitis* spp., 1.852 variedades de *Vitis vinifera*, de las cuales 1.178 son de vinificación y 674 de mesa; y 648 de *Vitis vinifera sylvestris*.
- La Estación de Enología y Viticultura de Galicia (EVEGA). Ha ido reuniendo desde su apertura en 1988, un total de 67 variedades de diferentes orígenes. Están en marcha una serie de proyectos autonómicos para la documentación, caracterización, y

racionalización del germoplasma de vid prospectado y conservado en España y la creación de una colección nuclear.

- El Centro de Investigación y Formación Agraria, Cantabria (CIFA) que dispone de parcelas para conservar en campo variedades autóctonas de vid en la finca de Muriedas (Cantabria).
- El Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Asturias (SERIDA).
- El Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Cataluña (IRTA).

Todas estas variedades se conservan en parcelas experimentales. Sería de gran interés disponer de duplicados de estas colecciones en cultivo *in vitro* con el fin de disponer de este material a la salvaguarda de posibles pérdidas por desastres climatológicos, infecciones en campo, etc.

### 1.4. Características de las variedades utilizadas en este proyecto

- Monastrell: es una variedad tinta de origen español, conocida desde el siglo XV y extendida por casi todas las zonas del litoral mediterráneo español. En España es la segunda variedad más importante de uva tinta después de Tempranillo y consta de 48.393 has de producción (MAGRAMA). La variedad Monastrell se conoce también por los siguientes nombres o sinonimias: Morrastell, Garrut, Alcayata, Ros, Reina, Veremeta, Gallata, Churret, Mataró, Negrelejo, Verema, Veremeta, en Francia se denomina Mourvedre.  
Según la Orden AAA/580/2014, de 7 de abril por la que se modifica el anexo XXI del Real Decreto 1244/2008, de 18 de julio, por el que se regula el potencial de producción vitícola, Monastrell es variedad recomendada en Aragón, Castilla -La Mancha, Cataluña, Región de Murcia y en la Comunidad Valenciana y está autorizada en Andalucía, Baleares, Extremadura, Comunidad de Madrid, Comunidad Foral de Navarra, País Vasco y La Rioja.
- Esclafacherre o Esclafachar: variedad minoritaria presente en la provincia de Alicante. Actualmente, únicamente se tiene constancia de su localización y cultivo en el Parc Natural de las Lagunas de la Mata y Torrevieja. Por lo tanto es una variedad en riesgo de desaparición. Según Blanco (1997), el botánico español director del Real Jardín Botánico de Madrid Mariano Lagasca (1776-1839), recorrió en 1811 las zonas vitícolas de Alicante y Murcia recogiendo material vegetal e información sobre los viñedos de la zona. Lagasca nombra la variedad Esclafachar como la más usada para hacer vino junto a la variedad Morrastrell.

## 1. Introducción

- **Bobal**: es una variedad tinta autóctona de la Comunidad Valenciana. La extensión de su producción es de 65.186 has (MAGRAMA). Esta variedad puede conocerse también por las siguientes sinonimias: Provehón, Requena, Canonao, Boal, Boral, Bogal, Requeno, Bovatí. Según la Orden AAA/580/2014, de 7 de abril por la que se modifica el anexo XXI del Real Decreto 1244/2008, de 18 de julio, por el que se regula el potencial de producción vitícola, Bobal es variedad recomendada en Aragón, Castilla-La Mancha y Comunidad Valenciana. Su cultivo también está autorizado en la Comunidad Foral de Navarra, Andalucía y Cataluña y Extremadura.

## 2. OBJETIVOS

En el marco del proyecto RTA2011-00067-C04-04, se han saneado distintas variedades de vid que incluyen variedades de importancia económica y variedades minoritarias. En este proyecto se pretende establecer las condiciones de cultivo *in vitro* adecuadas para el mantenimiento de tres variedades de vid libres de los virus que exige la normativa europea actual, dos de gran importancia en las DO de la Comunidad Valenciana y otra también presente en la comunidad y que se encuentra en peligro de desaparición:

El objetivo de este estudio es determinar qué medio de cultivo es el más adecuado para asegurar un crecimiento lento (sin detrimento de la viabilidad) que permita la conservación *in vitro* de las variedades Monastrell, Esclafacherre y Bobal. Para ello se pretende:

Evaluación del desarrollo de las variedades en el medio de cultivo estándar MW y este medio modificado:

- Reduciendo el azúcar a la mitad (MW S/2)
- No adicionando la auxina IBA (MW IBA 0)
- Reduciendo el azúcar y eliminando la auxina (MW S/2 IBA 0)

Estudio de la influencia del genotipo y de los factores modificados (azúcar, auxina)

Los resultados que se obtengan nos permitirán seleccionar el medio más adecuado en cada caso con el fin de reducir el número de subcultivos que requiere el mantenimiento *in vitro*. De esta manera, se conseguirá la conservación de los genotipos saneados, la optimización de los recursos y la disminución del riesgo de contaminaciones o errores de etiquetado que pueden ocurrir en los subcultivos.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Características del experimento

Todos los ensayos se han llevado a cabo en las instalaciones del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad (COMAV-UPV) de la Universidad Politécnica de Valencia en el laboratorio dirigido por la Dra. Gisbert.

### 3.2. Material vegetal de partida

Se han utilizado tres variedades de vid, todas ellas de uva tinta (Verema, 2015)

- Monastrell: siendo DO en Andalucía, Aragón, Castilla-La Mancha, Cataluña, Comunidad Foral de Navarra, Comunidad Valenciana, Extremadura, Islas Baleares y Región de Murcia. Su cultivo está autorizado también en Madrid, País Vasco y La Rioja.
- Bobal: siendo DO en Aragón, Castilla-La Mancha, Comunidad Valenciana y Extremadura. Su cultivo también está autorizado en la Comunidad Foral de Navarra, Andalucía y Cataluña.
- Esclafacherre: variedad minoritaria presente en la provincia de Alicante.

Plantas de los genotipos Monastrell, Bobal y Esclafacherre obtenidas en el grupo de investigación a partir de embriones somáticos y en las que se ha verificado, también previamente a este trabajo, que estaban libres de los virus que exige la normativa europea para material de propagación (GLRaV-1, GLRaV-3, GFLV, ArMV y GFkV). A partir de cada planta se han obtenido en este trabajo explantes nodales (de un cm aproximadamente con una yema axilar sin hoja) que han sido cultivados individualmente en medio estándar MW. Tras la obtención de un número suficiente de plantas de cada genotipo, estas se han utilizado para llevar a cabo los distintos ensayos.

### 3.3. Medios de cultivo

Como medio estándar se ha utilizado el medio MW seleccionado por Vilanova (2013) para la micropropagación de la variedad Monastrell.

Se prepararon medios de cultivo distintos que difieren únicamente en la concentración de azúcar o la presencia de la auxina ácido indolbutírico. Todos los medios fueron ajustados a un pH=5,8 (Peiró *et al.* 2015).

A continuación se detalla su composición.

1) Medio Woody (MW)

- 2,46g/L Sales Woody Plant (Lloyd & McCown, 1980) (En la Tabla 7 del anexo se muestra la composición detallada)
- 20g/L Sacarosa
- 0,1g/L PVP10
- 7,0g/L Agar
- 0,2mg/L ácido indol-3-butírico (IBA)

2) Medio W ½ Sacarosa (MW S/2)

- 2,46g/L Sales Woody Plant
- 10g/L Sacarosa
- 0,1g/L PVP10
- 7,0g/L Agar
- 0,2mg/L ácido indol-3-butírico (IBA)

3) Medio W ½ Sacarosa y sin IBA (MW S/2 IBA 0)

- 2,46g/L Sales Woody Plant
- 10g/L Sacarosa
- 0,1g/L PVP10
- 7,0g/L Agar

4) Medio W sin IBA (MW IBA 0)

- 2,46g/L Sales Woody Plant
- 20g/L Sacarosa
- 0,1g/L PVP10
- 7,0g/L Agar

Se prepararon 144 tubos por medio y todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (20 minutos a 121°C y 1 atmósfera de presión). Los reguladores de crecimiento se añadieron por filtración en el medio estéril antes de su distribución en los tubos.

#### 3.4. Condiciones de cultivo

Los explantes cultivados en tubos con los correspondientes medios de cultivo se colocaron en cámaras de cultivo *in vitro*, al 70% de humedad, a una temperatura media de 25°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz (mediante tubos Sylvania Agro-Lux F36W/CRO-tb) y 8 horas de oscuridad.

#### 3.5. Evaluación del desarrollo de las plantas en los diferentes medios

### 3. Material y métodos

Por micropropagación se obtuvieron 48 explantes nodales de aproximadamente 1cm con una yema axilar sin hoja por variedad y medio (salvo en el medio MW IBA0 para la variedad Bobal en la que se obtuvieron 44 explantes) que se distribuyeron en los tubos con los medios de cultivo a razón de un explante por tubo. En total se utilizaron 572 explantes.

A los 20, 30, 40 y 84 días de cultivo se anotó:

1. el porcentaje de brotación =  $\left(\frac{n^{\circ} \text{ explantes brotados}}{n^{\circ} \text{ tubos}} * 100\right)$
2. la altura (cm)
3. el porcentaje de plantas con hojas verdes =  $\left(\frac{n^{\circ} \text{ plantas con hojas verdes}}{n^{\circ} \text{ explantes brotados}} * 100\right)$
4. el número de hojas por planta
5. el estadio de desarrollo de la raíz. Se ha categorizado el desarrollo de la raíz en cuatro niveles donde 0 indica que la raíz no ha crecido, 1 indica que el crecimiento ha sido pequeño, 2 indica que el crecimiento ha sido intermedio y 3 indica que el crecimiento ha sido elevado (Figura 2).

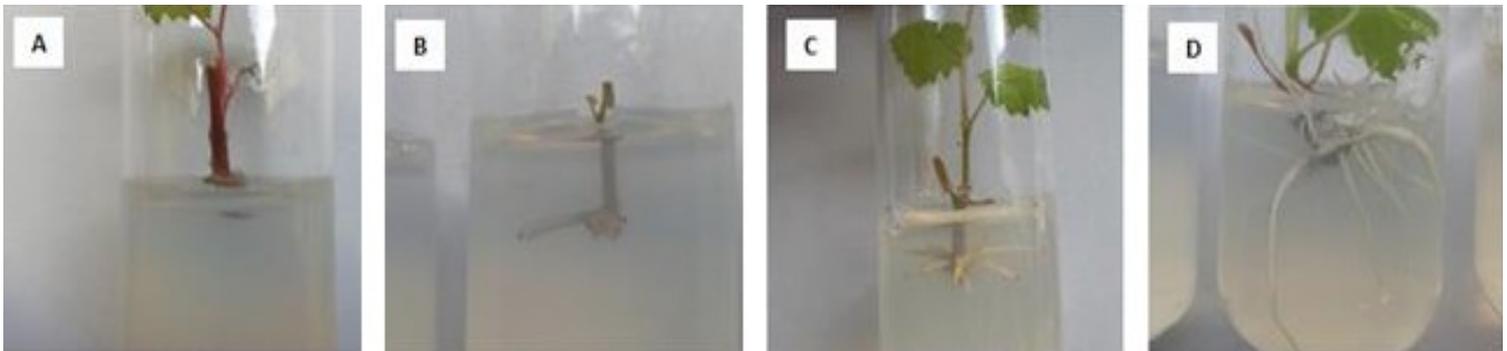


Figura 2. Estadios de desarrollo de la raíz. Raíz tipo 0 (a), raíz tipo 1 (b), raíz tipo 2 (c) y raíz tipo 3 (d).

### 3.6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se han llevado a cabo con los explantes sanos que han brotado. Se ha realizado un análisis de la varianza (ANOVA) mediante el programa *Statgraphics Centurion XVI.I*, para evaluar el crecimiento mediante el efecto de la variedad sobre la altura de los explantes, el número de hojas y el desarrollo de la raíz tras 40 y 84 días de crecimiento. Previamente se comprobó que los datos seguían una distribución normal y se utilizó la transformación logarítmica en aquellos casos en los que se desviaban de esta distribución. Para evaluar el efecto de la sacarosa en el medio se ha realizado el mismo análisis incluyendo

### 3. Material y métodos

el efecto del medio de cultivo (con dos niveles; 10 y 20 g/L), el efecto de la variedad (con tres niveles; Monastrell, Esclafacherre y Bobal), así como la interacción doble sobre la altura de la planta, el estadio de desarrollo de la raíz y el número de hojas a los 84 días de crecimiento. El mismo análisis se ha realizado para evaluar el efecto de la auxina IBA en el medio, incluyendo el efecto del medio de cultivo (con dos niveles; 0 y 0,1 mg/L), el efecto de la variedad (con tres niveles; Monastrell, Esclafacherre y Bobal) así como la interacción doble sobre la altura de la planta, el estadio de desarrollo de la raíz y el número de hojas a los 84 días de crecimiento. Para todos los casos se ha realizado el contraste mediante la prueba LSD (Least Significant Difference), asumiendo un riesgo tipo I de 0,05.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Evaluación del desarrollo de las plantas de las variedades Monastrell, Esclafacherre y Bobal en el medio de cultivo estándar MW y este medio modificado: 1) Reduciendo el azúcar a la mitad (MW S/2); 2) No adicionando la auxina IBA (MW IBA 0) y 3) Reduciendo el azúcar y eliminando la auxina (MW S/2 IBA 0)

Los resultados obtenidos en cuanto a crecimiento y desarrollo radicular para cada una de las variedades en el medio MW y en los distintos medios de cultivo resultantes de la modificación de la concentración de azúcar y /o la eliminación de auxina en este medio se muestran a continuación.

#### 4.1.1. Variedad Monastrell

En la Tabla 1 se muestran los valores promedios de los parámetros relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas obtenidos para la variedad Monastrell en los distintos medios ensayados tras 40 días de cultivo.

**Tabla 1: % de brotación, medias mínimo cuadráticas ( $\pm$  error estándar (ee)) para la altura (cm), el número de hojas por planta y el estadio de desarrollo de la raíz de los 173 explantes en los cuatro medios de la variedad Monastrell a los 40 días de crecimiento**

Medio	% de brotación	Altura (cm) (media $\pm$ ee)	Nº hojas/planta (media $\pm$ ee)	Estadio desarrollo raíz (media $\pm$ ee)
MW	91,67	3,63 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	4,95 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	1,43 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
MW S/2	95,83	4,59 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	5,15 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	1,83 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>
MW IBA 0	97,92	3,95 $\pm$ 0,29 <sup>ab</sup>	4,74 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	1,28 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>
MW S/2 IBA 0	75	3,39 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	3,78 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	1 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p$ -valor $<$ 0,05).

**Tabla 2: % de brotación, medias mínimo cuadráticas ( $\pm$  error estándar (ee)) para la altura (cm), el número de hojas por planta y el estadio de desarrollo de la raíz de los 173 explantes en los cuatro medios de la variedad Monastrell a los 84 días de crecimiento**

Medio	% de brotación	Altura (cm) (media $\pm$ ee)	Nº hojas/planta (media $\pm$ ee)	Estadio desarrollo raíz (media $\pm$ ee)
<b>MW</b>	91,67	11,02 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	9,77 $\pm$ 0,22 <sup>ab</sup>	2,73 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>
<b>MW S/2</b>	95,83	12,97 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	10,57 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	2,5 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>
<b>MW IBA 0</b>	97,92	11,01 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	9,13 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	2,17 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>
<b>MW S/2 IBA 0</b>	75	10,70 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	9,17 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>	1,78 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p$ -valor $<$ 0,05).

Como se observa en la tabla 1, en el medio MW S/2 las plantas han mostrado mayor altura y desarrollo radicular. El menor desarrollo de las plantas se ha obtenido en el medio MW S/2 IBA 0, en el que se ha obtenido una altura similar a la obtenida en los medios MW y MWIBA0 pero inferior número de hojas y desarrollo radicular.

El comportamiento ha sido similar a los 84 días de cultivo (tabla 2). Si bien, a estos días de cultivo, el número de hojas y el desarrollo radicular también se ve claramente disminuido en el medio sin IBA respecto a los medios que contienen este regulador de crecimiento.

Se constata que para la variedad Monastrell el medio de cultivo MW S/2 IBA0 es adecuado para su cultivo *in vitro* ya que tanto a los 40 como a los 84 días de crecimiento se han obtenido los valores más bajos para los tres parámetros de crecimiento estudiados observándose un buen aspecto de las plantas. Si bien habrá que tener en cuenta para próximos ensayos que en el medio MW S/2 IBA 0 se da el menor número de explantes brotados. En el medio utilizado como estándar (MW) las plantas presentan menor altura que en medio con el azúcar reducido a la mitad, el número de hojas no difiere y el porcentaje de brotación es ligeramente inferior. En el caso de querer micropropagar estas plantas el medio MW S/2 sería el más adecuado.

#### 4.1.2. Variedad Esclafacherre

Para esta variedad se ha observado a los 40 (tabla 3) y 84 días (tabla 4) de crecimiento una altura y número de hojas similar en el medio MW, MW IBA 0 y MW S/2 IBA 0 y una mayor altura en el medio MW S/2. En cuanto al desarrollo radicular, a los 84 días de crecimiento, se observa un menor desarrollo en los medios sin auxina, siendo este menor en el medio que contiene la menor concentración de sacarosa. Es por tanto el medio MW S/2 IBA 0 el que utilizaríamos para mantener las plantas de esta variedad *in vitro* con el fin de reducir el número de subcultivos y el medio MW S/2 el que se utilizaría en caso de micropropagación. En este caso el porcentaje de brotación es claramente inferior en los dos medios sin auxina.

## 4. Resultados y discusión

**Tabla 3: % de brotación, medias mínimo cuadráticas ( $\pm$  error estándar (ee)) para la altura (cm), el número de hojas por planta y el estadio de desarrollo de la raíz de los 157 explantes en los cuatro medios de la variedad Esclafacherre a los 40 días de crecimiento**

Medio	% de brotación	Altura (cm) (media $\pm$ ee)	Nº hojas/planta (media $\pm$ ee)	Estadio desarrollo raíz (media $\pm$ ee)
<b>MW</b>	97,92	2,83 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	3,13 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	1,91 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>
<b>MW S/2</b>	95,83	4,24 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	4,39 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	1,52 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>
<b>MW IBA 0</b>	62,5	2,97 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	3,23 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>
<b>MW S/2 IBA 0</b>	70,83	3,07 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	3,56 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>	1,05 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p$ -valor $<$ 0,05).

**Tabla 4: % de brotación, medias mínimo cuadráticas ( $\pm$  error estándar (ee)) para la altura (cm), el número de hojas por planta y el estadio de desarrollo de la raíz de los 157 explantes en los cuatro medios de la variedad Esclafacherre a los 84 días de crecimiento**

Medio	% de brotación	Altura (cm) (media $\pm$ ee)	Nº hojas/planta (media $\pm$ ee)	Estadio desarrollo raíz (media $\pm$ ee)
<b>MW</b>	97,92	8,18 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	8,15 $\pm$ 0,29 <sup>ab</sup>	2,51 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>
<b>MW S/2</b>	95,83	11,06 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>	9,07 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>	1,98 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>
<b>MW IBA 0</b>	62,5	7,71 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	6,8 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	1,67 $\pm$ 0,21 <sup>ab</sup>
<b>MW S/2 IBA 0</b>	70,83	7,95 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	7,21 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	1,26 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $p$ -valor $<$ 0,05).

### 4.1.3. Variedad Bobal

En la variedad Bobal se han cultivado un total de 133 yemas axilares observándose un comportamiento similar en cuanto a altura y número de hojas a los 40 días en los cuatro medios y un menor desarrollo radicular en los medios sin auxina (Tabla 5).

#### 4. Resultados y discusión

**Tabla 5: % de brotación, medias mínimo cuadráticas ( $\pm$  error estándar (ee)) para la altura (cm), el número de hojas por planta y el estadio de desarrollo de la raíz de los 133 explantes en los cuatro medios de la variedad Bobal a los 40 días de crecimiento**

Medio	% de brotación	Altura (cm) (media $\pm$ ee)	Nº hojas/planta (media $\pm$ ee)	Estadio desarrollo raíz (media $\pm$ ee)
<b>MW</b>	58,83	3,67 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	3,61 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	2,29 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>
<b>MW S/2</b>	100	3,78 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	3,69 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	2,13 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>
<b>MW IBA 0</b>	81,82	3,49 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	3,85 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	1,26 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
<b>MW S/2 IBA 0</b>	47,92	3,20 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	3,52 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	1,05 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Valores con diferente superíndice indican diferencias significativas (p-valor<0,05).

A los 84 días las plantas mostraron un crecimiento más reducido (altura y número de hojas) en el medio MW respecto al medio MW S/2 a pesar de mostrar un desarrollo radicular similar (tabla 6).

**Tabla 6: % de brotación, medias mínimo cuadráticas ( $\pm$  error estándar (ee)) para la altura (cm), el número de hojas por planta y el estadio de desarrollo de la raíz de los 133 explantes en los cuatro medios de la variedad Bobal a los 84 días de crecimiento**

Medio	% de brotación	Altura (cm) (media $\pm$ ee)	Nº hojas/planta (media $\pm$ ee)	Estadio desarrollo raíz (media $\pm$ ee)
<b>MW</b>	58,83	9,40 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	7,36 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	2,64 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>
<b>MW S/2</b>	100	11,83 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>	8,5 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	2,54 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
<b>MW IBA 0</b>	81,82	10,71 $\pm$ 0,56 <sup>ab</sup>	8,59 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	2,09 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
<b>MW S/2 IBA 0</b>	47,92	10,62 $\pm$ 0,90 <sup>ab</sup>	8,38 $\pm$ 0,59 <sup>ab</sup>	1,81 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Valores con diferente superíndice indican diferencias significativas (p-valor<0,05).

Para la conservación de la variedad Bobal podríamos utilizar el medio MW, MW S/2 o MW S/2 IBA 0 aunque el menor desarrollo radicular en este último podría ralentizar más el crecimiento en un periodo de cultivo más extendido por lo que sería el medio de elección. En el caso de la micropropagación el medio seleccionado sería el MW S/2. Como para las variedades anteriores, es en este medio donde se obtiene un menor porcentaje de brotación que para esta variedad es solo del 50%.

Podemos destacar que las sales Woody Plant y el resto de componentes del medio MW, comúnmente utilizadas en nuestro laboratorio para el cultivo *in vitro* de la vid, han resultado adecuadas para las variedades ensayadas, lo que coincide con los trabajos de Barreto *et al.*

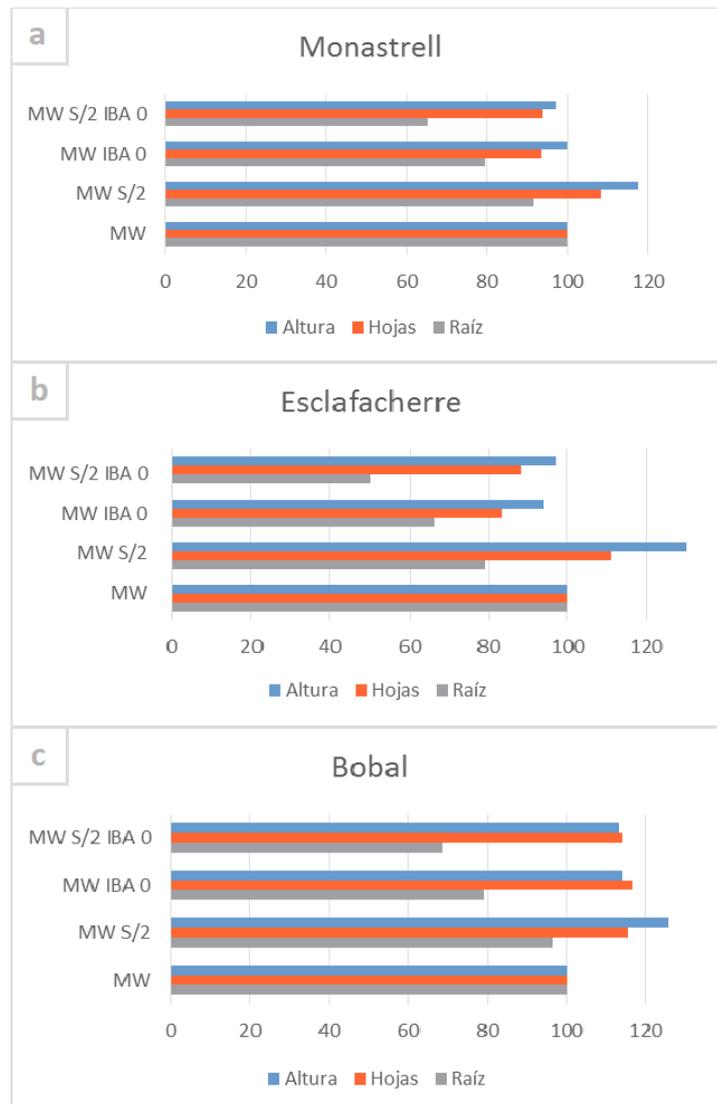
(2008), Lu (2005) y Vilanova (2013). Esto no concuerda con lo obtenido por Diab *et al.* (2011) donde expone que el Woody Plant medium no es adecuado para la micropropagación ya que muchos explantes producidos acaban vitrificados. Esto muestra que probablemente la adecuación a cada medio sea dependiente de la variedad, como hemos podido comprobar en el laboratorio en el trabajo de Muñoz (2015).

Al modificar el medio estándar, las tres variedades de vid utilizadas en este trabajo han mostrado un buen desarrollo en los medios estudiados siendo el medio MW S/2 IBA 0 el más adecuado para la conservación *in vitro* de las variedades, aun que cabe destacar que es en este mismo medio donde se han dado los porcentajes de brotación más bajos para las tres variedades. Aún así todas muestran una brotación adecuada. El medio MW S/2 es el más favorable para la micropropagación. En las Figuras 7, 8 y 9 del anexo se muestra el desarrollo a lo largo del tiempo de los tres parámetros estudiados.

En líneas generales, estos resultados no parecen coincidir con lo expuesto por Barreto (2006) sobre la dependencia del genotipo en cuanto a la respuesta de la vid al cultivo *in vitro*, pero comparando nuestros resultados con otros obtenidos en nuestro laboratorio (Muñoz, 2015), puede que la coincidencia entre estas variedades en cuanto a la respuesta al mismo medio se haya debido a la casualidad.

### **4.2. Estudio de la influencia de los distintos factores (variedad, concentración de azúcar y presencia de IBA) en la altura, número de hojas y desarrollo radicular**

Si tomamos el crecimiento en el medio estándar MW como el 100% podemos comparar la reducción o el incremento de crecimiento que ese produce con las modificaciones realizadas en este medio (Figura 3.a-c). En las tres variedades se ha producido un incremento en altura y número de hojas al reducir la concentración de sacarosa. Así se ha producido en MW S/2 un incremento en altura del 17,69% en Monastrell, del 35,21% en Esclafacherere y del 25,85% en Bobal. En cuanto al número de hojas el incremento ha sido del 8,18% en Monastrell, 11,29% en Esclafacherre y 15,48% en Bobal. Estos incrementos se han provocado a pesar de mostrar las plantas un menor desarrollo radicular en comparación con MW.



**Figura 3. Comparación de la altura, número de hojas y estado de desarrollo de la raíz entre los diferentes medios para las diferentes variedades. Monastrell (a), Esclafacherre (b) y Bobal (c) a los 84 días de cultivo.**

En los medios sin IBA se ha producido una reducción en un rango de 0,09% a 5,25% para la altura, y de 6,14% a 11,53% para el número de hojas en Monastrell y Esclafacherre, en cambio no se ha observado reducción sino incremento en Bobal. El desarrollo radicular se ha reducido en todas las variedades y parámetros estudiados al realizar cualquiera de las modificaciones que se han realizado en el medio estándar MW. La mayor reducción se ha producido en todos los casos en el medio MW S/2 IBA 0.

Como se puede observar en los siguientes gráficos no todas las variedades muestran la misma velocidad de crecimiento y desarrollo. Así, la variedad Esclafacherre crece más lentamente para un mismo periodo de tiempo que las variedades Bobal y Monastrell (figura 4.a), siendo su menor altura significativamente estadística.

En cuanto al número de hojas es menor en Bobal y Esclafacherre con un promedio de 7 y 8, respecto a 9, en Monastrell (figura 4.b).

## 4. Resultados y discusión

El desarrollo radicular es superior en Bobal y Monastrell respecto a Esclafacherre (figura 4.c). Esta podría ser una de las causas de su menor altura respecto al resto de variedades.

Es destacable que la diferencia de crecimiento, número de hojas y raíz no sigue una misma pauta, es decir, no siempre es la misma variedad la que presenta los valores más bajos para cada parámetro, si no que cada vez es una variedad distinta la que destaca. Esto confirma lo expuesto anteriormente en cuanto a la influencia del genotipo/variedad, y además indica que cada parámetro podría tener cierta independencia respecto de los demás.

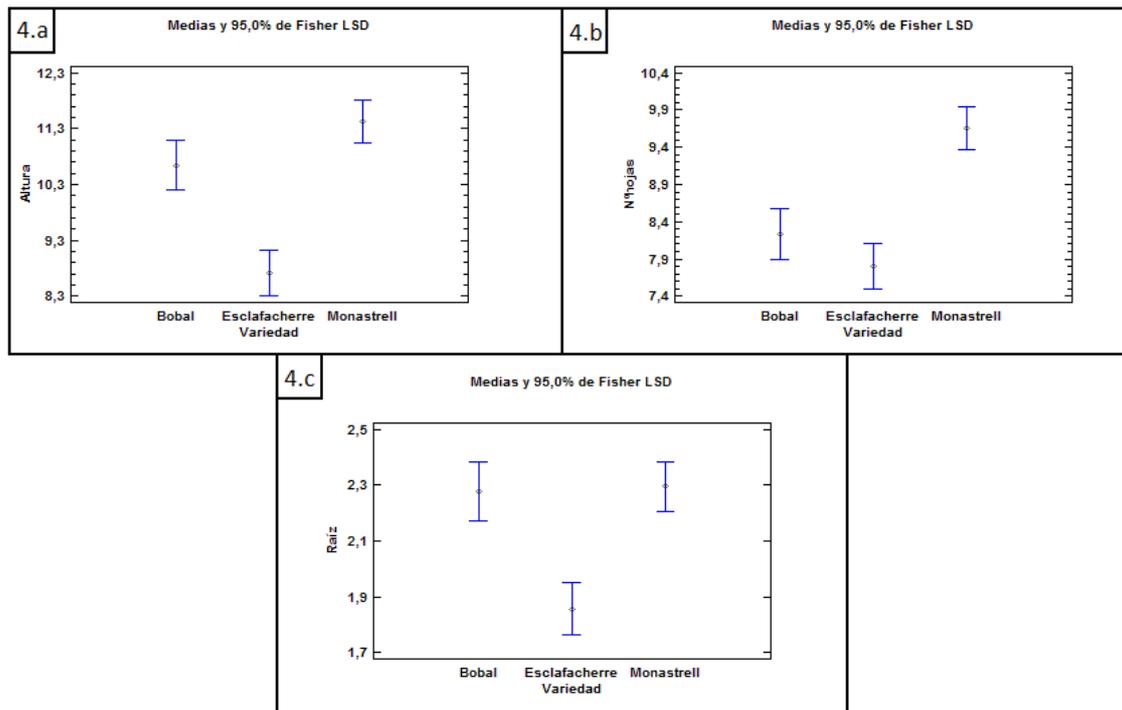


Figura 4: Altura (4.a), número de hojas (4.b) y desarrollo radicular (4.c) en cada variedad.

La reducción del azúcar en el medio ha supuesto en promedio un mayor crecimiento (figura 5.a).

En los medios con menor concentración de azúcar el número de hojas es mayor (figura 5.b).

La reducción de la sacarosa a la mitad afecta a la raíz traduciéndose en un menor desarrollo (figura 5.c).

## 4. Resultados y discusión

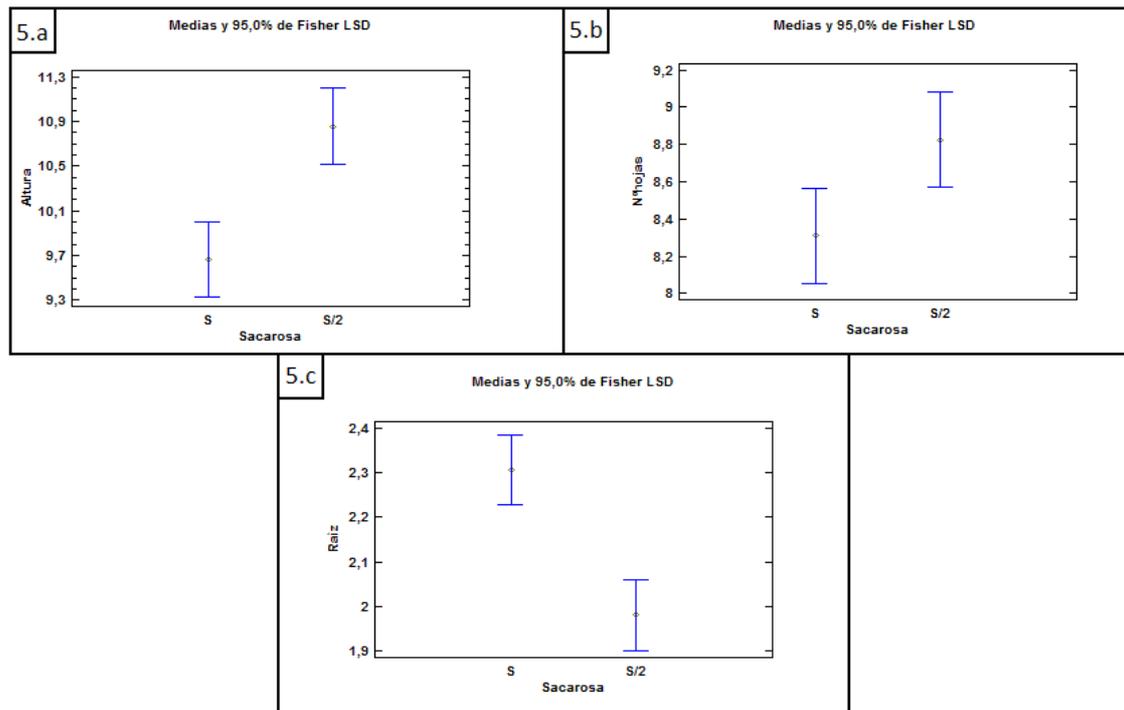


Figura 5: Altura (5.a), número de hojas (5.b) y desarrollo radicular (5.c) para cada concentración de sacarosa.

La eliminación del IBA en el medio ha provocado una reducción del desarrollo radicular que se ha traducido en una menor altura de las plantas (figura 6.c). Por lo tanto la no adición de este regulador de crecimiento sirve para ralentizar el crecimiento de las plantas.

La no adición de IBA supone también un menor número de hojas.

En medio con la mitad de sacarosa el desarrollo radicular se ve disminuido (Figura 6.c) al igual que ocurre cuando se elimina el IBA (Figura 6.c). Este resultado indica interacciones entre concentración de azúcar e IBA.

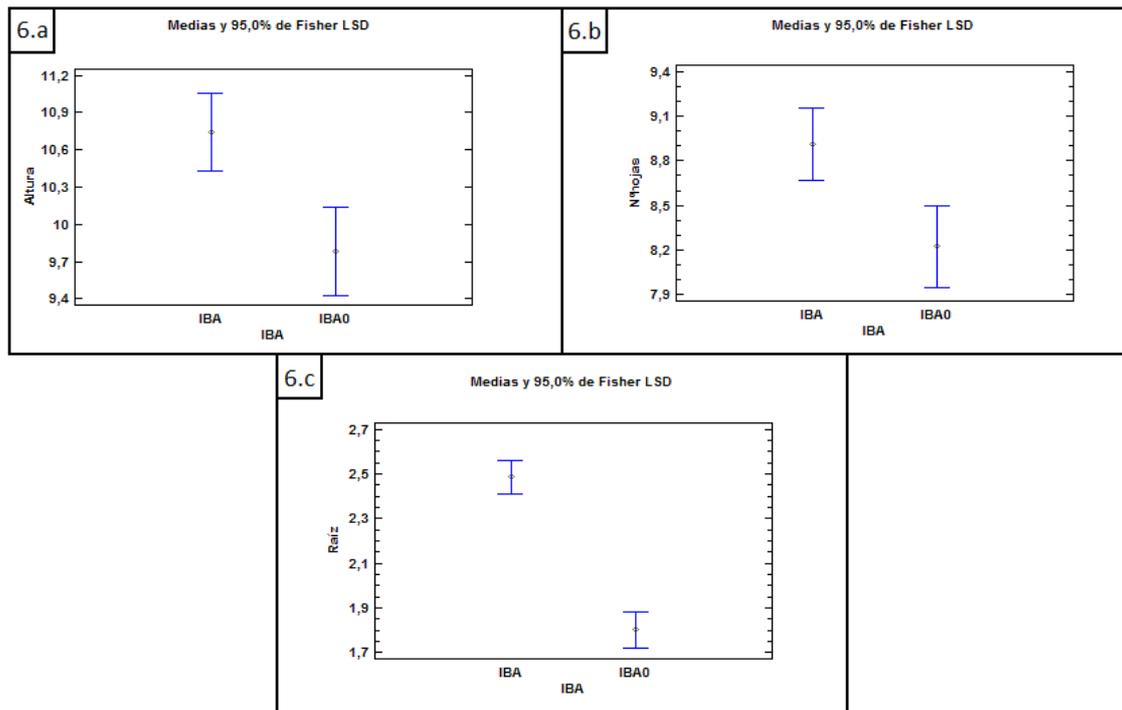


Figura 6: Altura (6.a), número de hojas (6.b) y desarrollo radicular (6.c).para la presencia o ausencia de IBA.

En los tres casos la reducción de sacarosa a la mitad ha supuesto un incremento en la altura de los explantes en crecimiento. Estos resultados coinciden con los de Troncoso *et al.* (1997) donde la concentración de azúcar más baja en el medio de cultivo favoreció claramente el crecimiento y desarrollo de la parte aérea del portainjerto de vid 41B. Esto puede deberse a que, al reducir la sacarosa en el medio, se haya incrementado la capacidad fotosintética de los brotes ya que, al ser los hidratos de carbono sintetizados productos finales de almacenamiento, en la fase oscura de la fotosíntesis, su falta induce una mayor actividad fotosintética obligando a la planta a desarrollar más la parte aérea para disponer de mayor cantidad de clorofila. Esto, además, explica también el mayor número de hojas producido al reducir la sacarosa en el medio. Estos resultados no coinciden con los de Han *et al.* (2003) donde obtuvieron una reducción en el crecimiento a una concentración de sacarosa de 10g/L en medio MS (Murashige & Skoog), aumentando este con el aumento de sacarosa hasta 40g/L, donde empieza a decrecer por el efecto osmótico. Estas diferencias pueden deberse al genotipo de cada variedad. En trabajos relacionados con el cultivo *in vitro* y la micropropagación de vid se ha comprobado que es importante ajustar el medio de cultivo para cada genotipo. (Ayub *et al.*, 2010; Barreto *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2010; Skiada *et al.*, 2010).

Para las tres variedades se observa que el desarrollo de la raíz disminuye al eliminar la auxina. Esta reducción, además, es más marcada con la reducción de la sacarosa a la mitad (Figura 3.a-c). Pese a que el desarrollo es menor, éste es adecuado para un buen cultivo *in vitro*, por lo que se puede interpretar que la producción de hormonas propias de la planta puede ser suficiente para el desarrollo de la raíz (Muñoz, 2015). Pero según Lewandowski (1991), la rizogénesis es dependiente del genotipo por lo que puede que estos resultados puedan diferir con otras variedades. Asimismo, esto cuadra con lo estudiado por Silva (2012) que muestra

#### 4. Resultados y discusión

que la presencia de auxina en el medio de cultivo es esencial para un buen enraizamiento. En nuestro trabajo el nivel de desarrollo radicular alcanzado en medio con sacarosa reducida y sin IBA ha sido suficiente para una correcta absorción de nutrientes en el medio. La adición de auxina externa puede incrementar el desarrollo radicular pero no necesariamente la eficiencia de las raíces inducidas. Según los resultados obtenidos por Jaskani *et al.* (2008) puede ser que el efecto de la auxina varíe con la composición del medio de cultivo utilizado, ya que en su ensayo con el medio MS la ausencia de IBA resultó en un completo fracaso en la formación de raíces.

## 5. CONCLUSIONES

La comparación del crecimiento y desarrollo radicular de las variedades de vid Monastrell, Esclafacherre y Bobal en el medio estándar MW y este medio con la mitad de sacarosa y en presencia o ausencia de IBA nos ha llevado a concluir que:

- El crecimiento experimentado en las tres variedades al reducir la concentración de azúcar ha sido mayor que en las plantas cultivadas en medio MW, produciéndose en promedio, un incremento en altura del 26,25% y de un 11,65% en el número de hojas. Este medio sería más adecuado para la micropropagación de estas variedades que el medio control.
- El menor crecimiento de las variedades Monastrell y Esclafacherre se ha producido en medio con la concentración de azúcar reducido y sin IBA, siendo este medio adecuado para la conservación *in vitro* de ambas variedades. En el caso de la variedad Bobal el crecimiento ha sido similar en medio MW, MW S/2 y medio MW S/2 IBA 0, con un menor desarrollo radicular en este último y también podría utilizarse éste para su conservación *in vitro*.
- Existe variabilidad entre variedades en cuanto a su crecimiento, siendo la variedad Esclafacherre la que presenta menor desarrollo radicular y vegetativo respecto a las otras dos variedades. Las plantas de la variedad Bobal presenta menor número de hojas que Monastrell.
- En general se puede decir que la variabilidad entre los resultados obtenidos puede deberse a la influencia del genotipo de cada variedad.
- En conjunto, una reducción de azúcar en el medio ha supuesto un mayor crecimiento vegetativo y un menor desarrollo radicular de las plantas en comparación con el medio estándar MW. Es por ello que, en medio de cultivo sin IBA el crecimiento se reduce más en el medio con la concentración de azúcar reducido.
- Como era esperable, la no adición de IBA al medio reduce el crecimiento radicular y vegetativo en las tres variedades.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Akdemir, H., Kaya, E., Ozden, Y. 2010. *in vitro* proliferation and minimum growth storage of fraser photinia: Influences of different medium, sugar combinations and culture vessels. *Scientia Horticulturae*. 126: 268-275.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. 2003. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw Hill Interamericana. 3ra edición. España. 522 pp.
- M.S. Barreto, A. Nookaraju, A.M. Joglekar, G.S. Karibasappa and D.C. Agrawal. 2006. Variability among *Vitis vinifera* cultivars to *in vitro* propagation. In: International symposium on Grape production and Processing, Baramati, India, February 6-11, 2006. pp. 83.
- BOE, 2014. Orden AAA/580/2014 de 7 de abril por la que se modifica el anexo XXI del Real Decreto 1244/2008, de 18 de julio, por el que se regula el potencial de producción vitícola. BOE nº 91, 4064, 14 pp.
- Cubero, J.I. 1999. *Introducción a la mejora genética vegetal*. Ed. Mundi-Prensa. 365 pp.
- Diab, A. A., Khalil, S. M., & Ismail, R. M. (2011). Regeneration and micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through shoot tips and axillary buds. *IJABR*, 2(4), 484-491.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm -review. *Euphytica* 57:227-243
- Enjalbert, H. 1975. *Historie de la Vigne et du Vin. L'avènement de la Qualité*. Ed. Bordás, París.
- Ertola, R., Mignone, C., Yantorno, P. 1994. *Microbiología Industrial*. Washington: OEA.
- FAOStat, 2013. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. Acceso el 2 de Julio de 2015
- Gidson. 1967 *Austr. J Biol. Sci.* 20: 189-191.
- Han, D.S., Niimi, Y., Wu, J.Y. 2003. Micropropagation of *Vitis amurensis* Rupr.: An improved protocol. *Vitis*. 43 (3): 163-164.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E. 1997. *Plant propagation: Principles and Practices*. Prentice Hall. 770 págs.

- Jaskani, M. J., Abbas, H. A. I. D. E. R., Khan, M. M., Qasim, M., & Khan, I. A. (2008). Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette. *Pakistan Journal of Botany*, 40(1), 105.
- Krikorian, A.D., 1991. Propagación clonal *in vitro*, En Roca, W.M. y L.A. Mroginski eds.) Cultivo de tejidos en la Agricultura. CIAT, Colombia 95-125
- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J., Durand, M. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*. 4: 272.
- Lewandowski, V.T. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* "Delaware". *HortScience*, v.26, p.586-589.
- Lloyd, G. & McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings of International Plant Propagator's Society*. 30: 421-427.
- López-Cortés, I., Salazar, D.M. 2006. Ampelografía básica de cultivares enológicos blancos. Tomo III. Ed. UPV. 170 págs.
- Lu, M. 2005. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. *Source: Scientia Horticulturae*. Volume: 107. Issue: 1. Pages: 64-69.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, alimentación y medioambiente), 2014. Potencial de producción vitícola a 31 de julio de 2013, último inventario disponible. En [www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es).
- Martínez de Toda, F. 1991. *Biología de la Vid. Fundamentos biológicos de la viticultura*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 346 págs.
- Monette, P.L. 1988. Grapevine (*Vitis vinifera* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Crops III*, vol. 6. Springer. Berlin. Págs 1-37.
- Mukherjee, P., Husain, N., Misra, S.C., Rao, V.S. 2010. *In vitro* propagation of a grape rootstock, deGrasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of medium composition and plant growth regulators. *Scientia Horticulturae*. 126: 13-19.
- Muñoz, P. Trabajo Final de Máster. 2015. Evaluación de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de variedades de vid

## 6. Bibliografía

- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). <http://www.oiv.int/oiv/info/fr/liste/page?lang=fr> Acceso el 19 de Junio de 2015.
- 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. 13 (2): e1005, 7 pags.
- Pierik, R.L.M., 1990. Cultivo "*in vitro*" de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Roca, W.M., Arias, D.I., Chávez R. 1991. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. Capítulo 31. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Roca, W.M., Mroginski. (eds.) CIAT. pp. 697-713
- Salazar, D.M., Melgarejo, P. 2005. Viticultura. Técnicas de Cultivo de la Vid, Calidad de la Uva y Atributos de los Vinos. AMV Ed. Mundi-Prensa S.A., Madrid, España. 325 pp.
- Silva, R.C., Gomes Luis, Z., Scherwinski-Pereira, J.E. 2012. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 47: 344-350.
- Troncoso de Arce, A., Matte, C., Venegas, M. J., & Cantos, M. (1997). Influencia de la concentración de sacarosa en el medio, sobre la respuesta de material de vid "*in vitro*".
- Verema, 2015. <http://www.verema.com/blog/verema/1256772-variedades-uva-segun-denominaciones-origenFAOStat> Acceso el 1 de Julio de 2015.
- Viala, P., Vermorel, P. 1905. *Traité général de viticulture, Ampélographie*. Paris, Masson et Cie éditeurs. 6 tomes.
- Vilanova, J. Trabajo Final de Máster. 2013. Micropropagación y conservación *in vitro* de *Vitis vinifera* L. variedad Monastrell.

## 7. ANEXOS

Tabla 7. Composición del medio de cultivo Lloyd & McCown Woody Plant Basal Medium.

Lloyd & McCown Woody Plant Basal Medium w/ Vitamins	
Contains the macro and micronutrients and vitamins as described by Lloyd & McCown (1981).	
Store at 2° to 6°C	
Soluble in Water	
Use at 2,41 grams per liter	
Plant Tissue Culture Tested	
Components (mg/L)	
Ammonium Nitrate	400
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	72.5
Calcium Nitrate	386
Cupric sulfate • 5H <sub>2</sub> O	0.25
Na <sub>2</sub> EDTA • 2H <sub>2</sub> O	37.3
Ferrous Sulfate • 7H <sub>2</sub> O	27.85
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate • H <sub>2</sub> O	22.3
Molybdic Acid, Disodium Salt • 2H <sub>2</sub> O	0.25
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous	170
Potassium Sulfate, Anhydrous	990
Zinc Sulfate • 7H <sub>2</sub> O	8.6
Glycine	2.0
myo -Inositol	100
Nicotinic Acid	0.5
Pyridoxine • HCl	0.5
Thiamine • HCl	1.0
pH at Room Temperature	4.0 ± 0.5

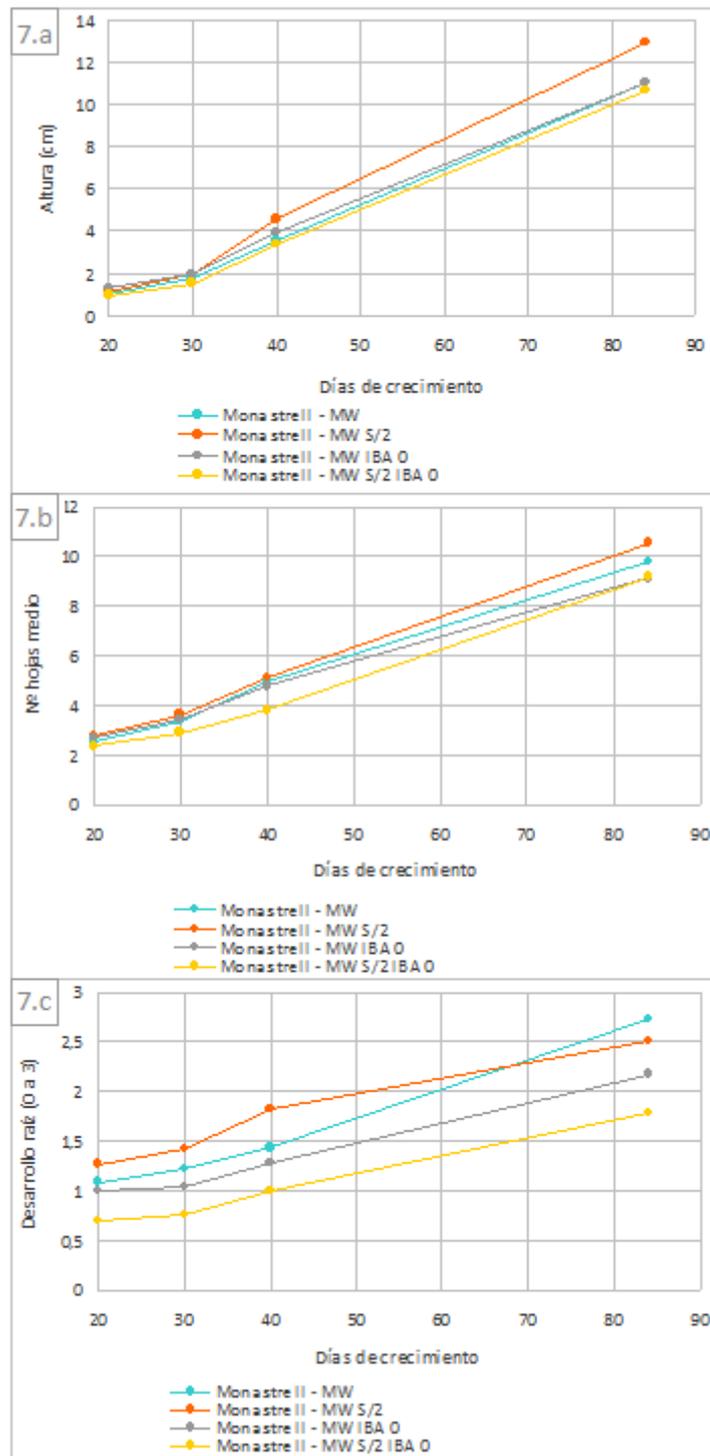


Figura 7. Evolución de la altura (7.a), del número de hojas (7.b) y del desarrollo de la raíz (7.c) para la variedad Monastrell.

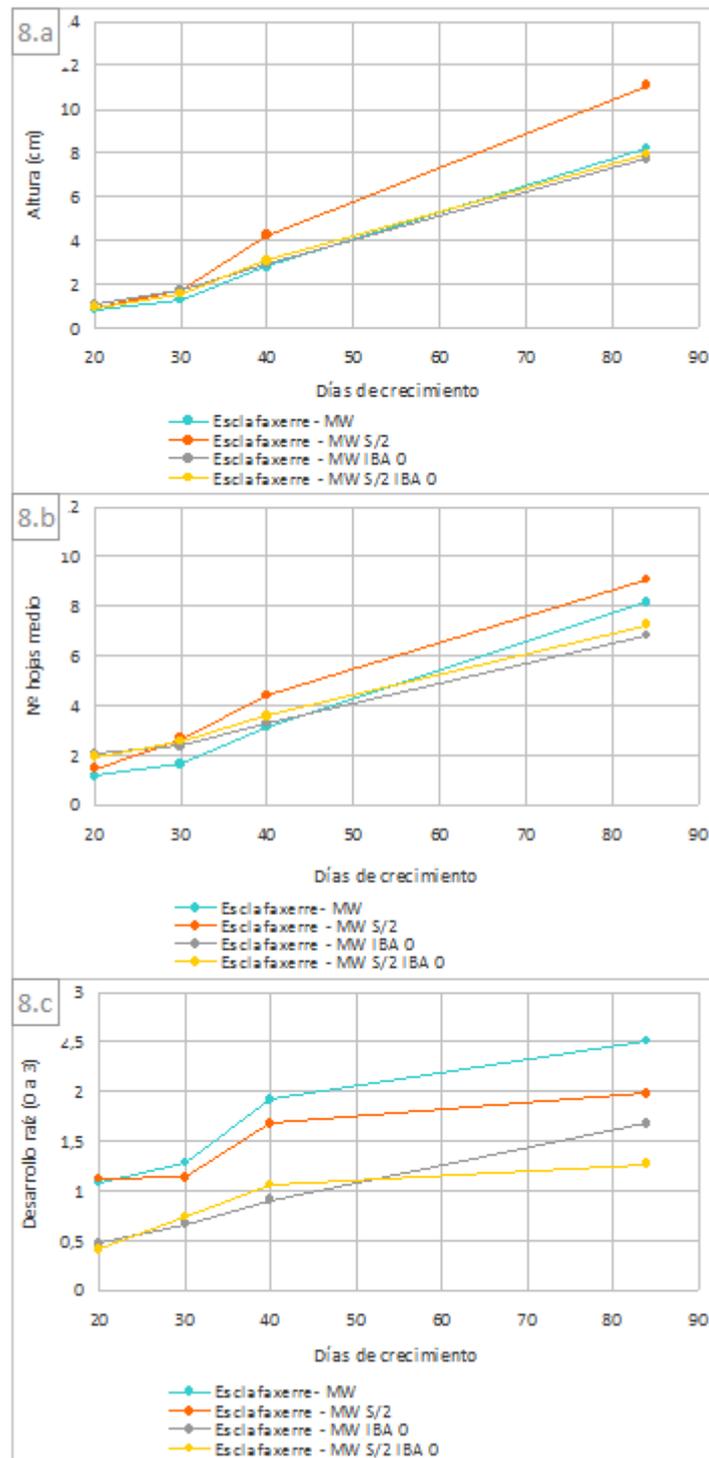


Figura 8. Evolución de la altura (8.a), del número de hojas (8.b) y del desarrollo de la raíz (8.c) para la variedad Esclafacherre.

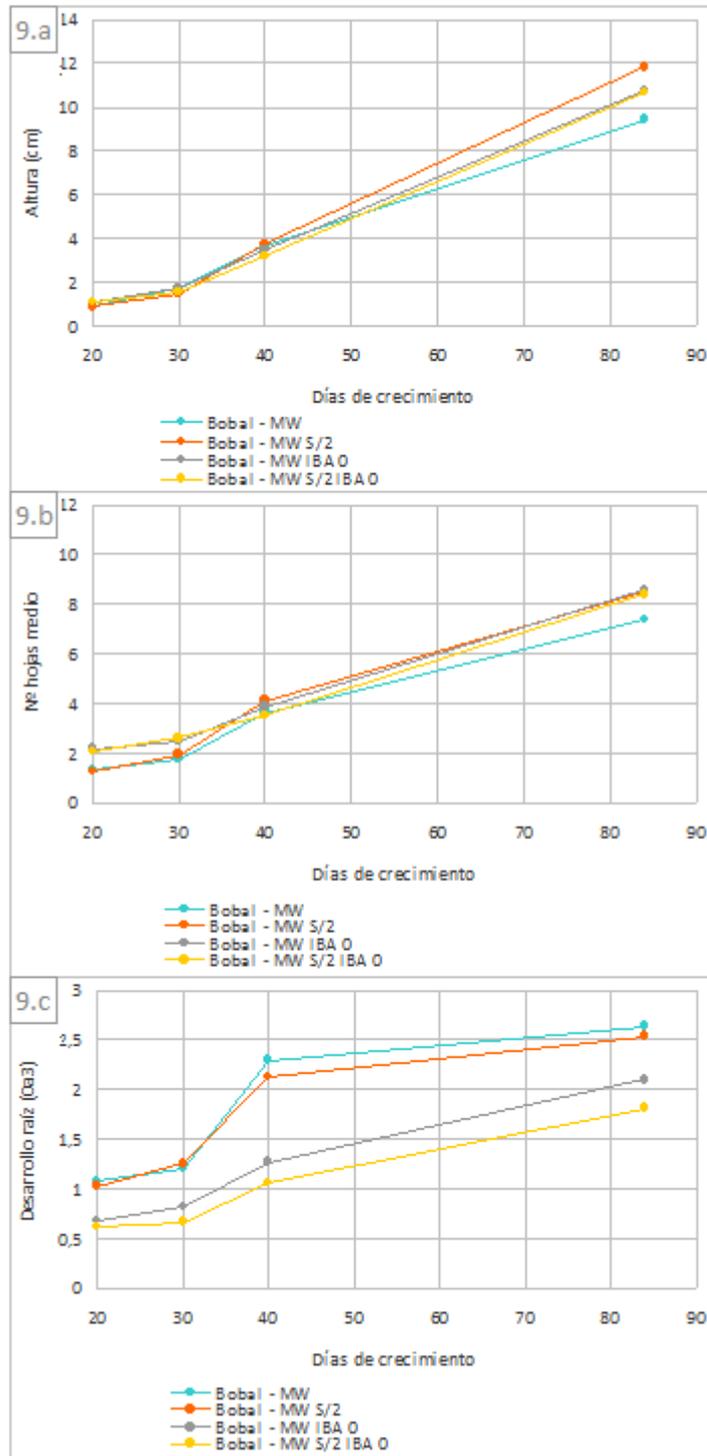


Figura 9. Evolución de la altura (9.a), del número de hojas (9.b) y del desarrollo de la raíz (9.c) para la variedad Bobal.