

## Resumen

La vid es un cultivo de propagación vegetativa y de gran importancia económica cuyo cultivo se distribuye mundialmente por zonas templadas. Su producción va destinada principalmente a la elaboración de vino, seguido de la producción de uva de mesa. Aunque existen miles de variedades, una decena de ellas son las que se utilizan mayoritariamente a nivel mundial lo que conlleva a una pérdida de variabilidad. Desde la llegada de la filoxera, el cultivo de la vid se realiza mediante injerto en pies resistentes a este áfido. Según la Comisión Directiva 2005/43/EC por la que se modifican los anexos del Consejo Directivo 68/193/EEC, el material de propagación de vid debe estar libre de los siguientes virus: virus del entrenudo corto (GFLV), virus del enrollado 1 (GLRaV-1), virus del enrollado 3 (GLRaV-3), virus del jaspeado (GFkV) y virus del mosaico del arabis (ArMV). En este trabajo se han evaluado y desarrollado distintas metodologías relacionadas con el cultivo *in vitro* de plantas encaminadas al saneamiento, multiplicación y conservación de germoplasma de vid. La conservación de variedades de vid *in vitro* es muy importante para complementar la conservación de germoplasma de las colecciones de campo. Para ello es importante seleccionar el material a conservar, determinar su estado sanitario, sanear si es el caso y establecer las condiciones adecuadas para su conservación. En un primer capítulo de esta tesis (Capítulo 1) se describen los ensayos realizados para inducir la embriogénesis somática en 16 variedades de vid que incluyen seis variedades infectadas con los virus GFLV, GLRaV-3 y GFkV. La embriogénesis somática ha sido descrita en vid como una metodología útil para el saneamiento de plantas infectadas con virus y es la vía común de regeneración adventicia. Protocolos eficientes de regeneración son necesarios para abordar su mejora mediante transformación genética. En este trabajo se utiliza como material de partida semillas cortadas y se han obtenido plantas libres de virus y porcentajes de regeneración elevados en todas las variedades evaluadas. La utilización de marcadores microsatélites nos ha servido para seleccionar entre las plantas regeneradas aquellas que muestran el mismo genotipo que las plantas de partida. Por otra parte, en este trabajo se ha desarrollado un protocolo de micropropagación a partir de planta sana de la variedad 'Monastrell' cultivada *in vitro* obteniéndose tasas de multiplicación elevadas y plantas que se han aclimatado a condiciones de campo (Capítulo 2). El medio de cultivo MW, utilizado para el desarrollo de las plantas, se ha evaluado en otras 16 variedades y también se ha comparado el crecimiento en este medio y en variaciones de éste, como son la disminución de la

concentración de azúcar a la mitad y la eliminación del ácido indolbutírico. La finalidad de estos ensayos ha sido determinar para cada variedad qué condiciones son las más adecuadas para mantener el germoplasma vegetal en cultivo *in vitro* activo, pero alargando el tiempo entre subcultivos optimizando costes (Capítulo 3). En el Capítulo 4 se incluye un trabajo de divulgación en el que se resumen los pasos que se están siguiendo en el marco del proyecto MINECO CGL2015-70843-R para localizar, identificar, descartar o detectar la presencia de los virus anteriormente comentados, sanear si es el caso, y conservar *in vitro* las variedades de interés en las que se lleva a cabo una identificación utilizando marcadores SSR y un análisis de variabilidad genética cuando se dispone de varias accesiones. A modo de ejemplo, en este trabajo se publica el perfil de marcadores microsatélites para dos de las variedades colectadas y/o conservadas, la variedad ‘Esclafacherre’ (‘Esclafagerres’) de la que se han localizado únicamente dos cepas en dos zonas distintas de la Comunidad Valenciana, y accesiones de ‘Valenci Blanc’ en las que se ha detectado diferencias para el marcador VVMD32 que agrupa las accesiones de Alicante por una parte, y al resto de accesiones por otra. También se ha validado un protocolo de crioconservación en la variedad ‘Esclafacherre’. Por último, el Capítulo 5 hace referencia a un estudio llevado a cabo para determinar el estado actual de la aplicación de la transformación genética en vid, centrándonos en los factores limitantes de las metodologías empleadas. La transformación genética es una herramienta de gran potencial para la mejora de los cultivos, principalmente en plantas de propagación vegetativa.

Esta tesis doctoral se ha realizado en el marco de la Unidad Asociada que mantienen los directores de la tesis, especialistas en virología y cultivo *in vitro*, en el marco del proyecto RTA-2011-00067 coordinado por el Dr. Olmos y el proyecto MINECO CGL2015-70843-R que dirige la Dra. Gisbert, ambos cofinanciados con fondos FEDER.