

OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL LIBRE DE VIRUS EN UVA DE MESA DE LA REGIÓN DE MURCIA Y POSTERIOR MICROPROPAGACIÓN

Ascensión Ibáñez Torres



**OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL
LIBRE DE VIRUS EN UVA DE MESA
DE LA REGIÓN DE MURCIA
Y POSTERIOR MICROPROPAGACIÓN**

**OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL
LIBRE DE VIRUS EN UVA DE MESA
DE LA REGIÓN DE MURCIA
Y POSTERIOR MICROPROPAGACIÓN**

Ascensión Ibáñez Torres

Dra. en Biología

Dirección y coordinación:

Instituto Murciano de Investigación
y Desarrollo Agrario y Alimentario



Región de Murcia

Consejería de Agricultura,
Agua y Medio Ambiente

© Comunidad Autónoma de la Región de Murcia
Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente
Depósito Legal: MU-1315-2004
I.S.B.N.: 84-688-7080-3
Preimpresión: CompoRapid, S.L.
Impresión: Imprenta Regional de Murcia

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a una beca concedida por la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente bajo la dirección de los Doctores D. Ventura Padilla Villalba y D. Manuel Valero Roche, a quienes manifiesto mi más sincero agradecimiento por su disponibilidad y asesoramiento efectuados a lo largo del presente estudio.

La parte experimental se ha efectuado en los laboratorios e instalaciones de dicha Consejería, situados en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) de La Alberca (Murcia).

También mi agradecimiento a la Dirección General de Modernización de Explotaciones y Capacitación Agraria de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia, en la persona de su Director General, D. Ángel García Lidón, que ha potenciado y facilitado la ejecución material del libro.

PRESENTACIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia en España; sólo superado por los cereales y el olivar. Los últimos datos del M.A.P.A. (2001) indican una superficie de 1.202.267 millones de Has, de las cuales unas 23.645 Has se dedican a plantaciones regulares de uva de mesa, situadas fundamentalmente en la zona costera levantina, y en menor superficie, en algunas zonas del interior de la Meseta y en Badajoz. Aunque los rendimientos unitarios son bajos, la gran superficie cultivada hace que se logren unas producciones importantes, situándose la producción media en torno a las 398.542 Tm. De estas se exportan unas 93.000 Tm, siendo Francia el principal receptor con el 27%, seguida de Alemania con un 26%, Portugal con un 15% y Reino Unido con un 14%.

Sin embargo cuando comparamos la superficie, producción y rendimiento de España con respecto a los demás países vitícolas observamos que en cuanto a rendimiento y producción nos vemos sobrepasados por otros países. Entre las distintas causas que originan dichas pérdidas, son de destacar las condiciones ecológicas y el estado sanitario. En el aspecto sanitario hemos de considerar que un alto porcentaje de pérdidas se debe a la presencia de virosis, entre las que fundamentalmente destacan: **Entrenudo Corto Infeccioso, Enrollado, Jaspeado y Madera Rizada.**

En cuanto a variedades de uva de mesa, el ranking de producción en España lo encabeza el cultivar **Napoleón** (autóctono de la Región de Murcia), seguido de **Ohanes, Italia,** y **Dominga**, también autóctona de Murcia. En exportación también es el cultivar **Napoleón** el más demandado con un 45%, seguido de **Aledo** (que se produce en Alicante) con un 16%; **Italia** con un 10% y **Dominga** también con un 10%. De estos datos se deduce la importancia del cultivar **Napoleón** en esta Región.

En 1978 se llevó a cabo la preselección clonal en el área de cultivo del cv. **Napoleón** comprobándose que el estado sanitario del material vegetal

sometido a “indexaje” era bastante deficiente. De los 32 clones elegidos al final del período de preselección clonal, 28 estaban afectados por el virus del **Enrollado**, 2 por los virus del **Enrollado** y del **Entrenudo Corto Infeccioso**, simultáneamente y solamente dos clones se encontraban libres de virus. Se sabe que la presencia de virus afecta negativamente a la producción y a la calidad de la uva, sobre todo en lo que respecta a su coloración y sabor. La longevidad de las parras también se ve afectada habiéndose observado parrales de 8 a 10 años, en un estado depresivo tal, que los hace totalmente improductivos, a la vez que se ve alterado el ciclo vegetativo.

Dada la gravedad de la situación se vio la necesidad de disponer de un material que reuniera unas buenas condiciones de autenticidad varietal y calidad sanitaria. Con la finalidad de regenerar el cv. **Napoleón** de las principales virosis que le afectan y poner a punto un protocolo de micropropagación, se llevaron a cabo los trabajos que constituyen la presente memoria.

La elección del cultivar de uva de mesa **Napoleón** para la realización del presente trabajo, dimana del hecho de ser autóctona de la Región de Murcia, estar incluida en la lista de variedades de uva de mesa recogida en el Real Decreto de 5 de Junio de 1985, sobre calificación de variedades de vid, y poseer una importancia considerable en el contexto de dicho sector en la Región. Desde que empezó a desarrollarse hace unos 30 años el aumento de superficie ha sido espectacular. En este incremento ha influido su mayor producción unitaria y su buena cotización, debido a la buena acogida en los mercados nacionales y en aquellos países a los que se ha exportado. Su producción supone el 50% de la uva de mesa que se produce en la Región de Murcia.

SUMARIO

OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL LIBRE DE VIRUS EN UVA DE MESA DE LA REGIÓN DE MURCIA

1. EL CULTIVO DE LA UVA DE MESA EN LA REGIÓN DE MURCIA	15
1.1. Principales zonas productoras	15
1.2. Condiciones climatológicas	16
1.3. Suelo	17
1.4. Técnicas de cultivo	19
1.5. El cultivar de uva de mesa Napoleón	21
1.5.1. Origen	21
1.5.2. Ciclo vegetativo	22
1.5.3. Características varietales	22
1.5.4. Aspectos agronómicos y comerciales	23
1.6. Otras variedades de uva de mesa	23
1.6.1. Italia	24
1.6.2. Dominga	24
1.6.3. Ohanes	24
1.6.4. Variedades apirenas	26
2. PROBLEMÁTICA DE LOS VIRUS DE LA VID	27
2.1. Incidencia económica	29
2.2. Descripción de las principales virosis de la vid	31
2.2.1. Virus del Entrenado Corto Infeccioso (GFLV)	31
2.2.2. Virus del Enrollado (GLRaV)	36
2.3. Selección de plantas sanas procedentes del campo	39
2.4. Saneamiento del material vegetal infectado	40
2.4.1. Termoterapia convencional	40
2.4.1.1. Termoterapia por agua caliente	41

2.4.1.2. Termoterapia por aire caliente	41
2.4.2. Técnicas de cultivo “in vitro” de tejidos vegetales	43
2.4.2.1. Microinjerto	45
2.4.2.2. Cultivo de meristemos y ápices caulinares	46
2.4.3. Técnicas combinadas de cultivo “in vitro” y termoterapia	48
2.4.3.1. Cultivo de ápices caulinares y termoterapia “in vitro”	48
2.4.3.2. Termoterapia “in vivo” y cultivo de ápices caulinares	50
3. MULTIPLICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL LIBRE DE VIRUS EN CONDICIONES QUE IMPIDAN SU REINFECCIÓN..	52
3.1. Medidas preventivas y de control del estado sanitario del material vegetal	52
3.2. Técnicas de multiplicación vegetativa	53
3.2.1. Injerto sobre patrón en condiciones sanitarias idóneas..	53
3.2.2. Estaquillado herbáceo en camas calientes bajo nebulización	54
3.2.3. Propagación clonal “in vitro”	54

MICROPROPAGACIÓN DE LA VID

1. EL CULTIVO “IN VITRO” DE MATERIAL VEGETAL	59
1.1. Fundamentos	59
1.2. Historia	62
1.3. Aplicaciones relacionadas con la Agricultura	66
1.3.1. Obtención de plantas libres de patógenos. Programas de saneamiento vegetal	67
1.3.2. Programas de selección y mejora genética de los cultivos	69
1.3.3. Conservación de material vegetal de interés. Programas de mantenimiento de la diversidad genética	75
1.3.4. Multiplicación vegetativa de especies y variedades de interés agrícola. Programas de micropropagación.....	77
1.4. Ventajas, limitaciones y viabilidad de la micropropagación	80
1.4.1. Ventajas	80

1.4.2. Limitaciones	81
1.4.3. Viabilidad comercial	83
2. PROPAGACIÓN “IN VITRO” DE LA VID	83
2.1. Etapas del proceso	85
2.1.1. Selección y preparación de la planta madre (Fase-0)....	85
2.1.2. Establecimiento de cultivos iniciales en condiciones asépticas (Fase-I)	86
2.1.3. Mantenimiento y multiplicación de los cultivos (Fase-II)	90
2.1.4. Enraizamiento y elongación de los brotes (Fase-III)	94
2.1.5. Aclimatación en condiciones “extra vitrum” (Fase-IV) ..	102
2.1.5.1. Acondicionamiento previo	104
2.1.5.2. Aclimatación	107
2.1.6. Endurecimiento y trasplante definitivo a campo (Fase-V)	108
 BIBLIOGRAFÍA	 111

ÍNDICE DE CUADROS Y LÁMINAS

CUADROS

Cuádro 1	32
----------------	----

LÁMINAS

Lámina 1	16
Lámina 2	25
Lámina 3.	28
Lámina 4	33
Lámina 5	68
Lámina 6	82
Lámina 7	110

**OBTENCIÓN DE MATERIAL
VEGETAL LIBRE DE VIRUS EN UVA
DE MESA DE LA REGIÓN DE MURCIA**

1. EL CULTIVO DE UVA DE MESA EN LA REGIÓN DE MURCIA

La problemática de la vid en nuestra región viene definida fundamentalmente por tres parámetros; agua, clima y suelo, a los cuales hay que añadir la deficiente calidad del material vegetal cultivado, y en otro orden de importancia las estructuras de las explotaciones. Siendo el material vegetal el aspecto sobre el que más y mejor podemos incidir, puesto que para conseguir buenas producciones y de calidad, es necesario disponer de patrones y variedades selectas y sanas (García de Luján, 1996).

De la superficie y producción nacional corresponden a la Región de Murcia 5.132 Has y 55.324 Tm, lo que la sitúa en el segundo lugar, precedida únicamente por la Comunidad Valenciana (Estadística Agraria de Murcia, 96-97).

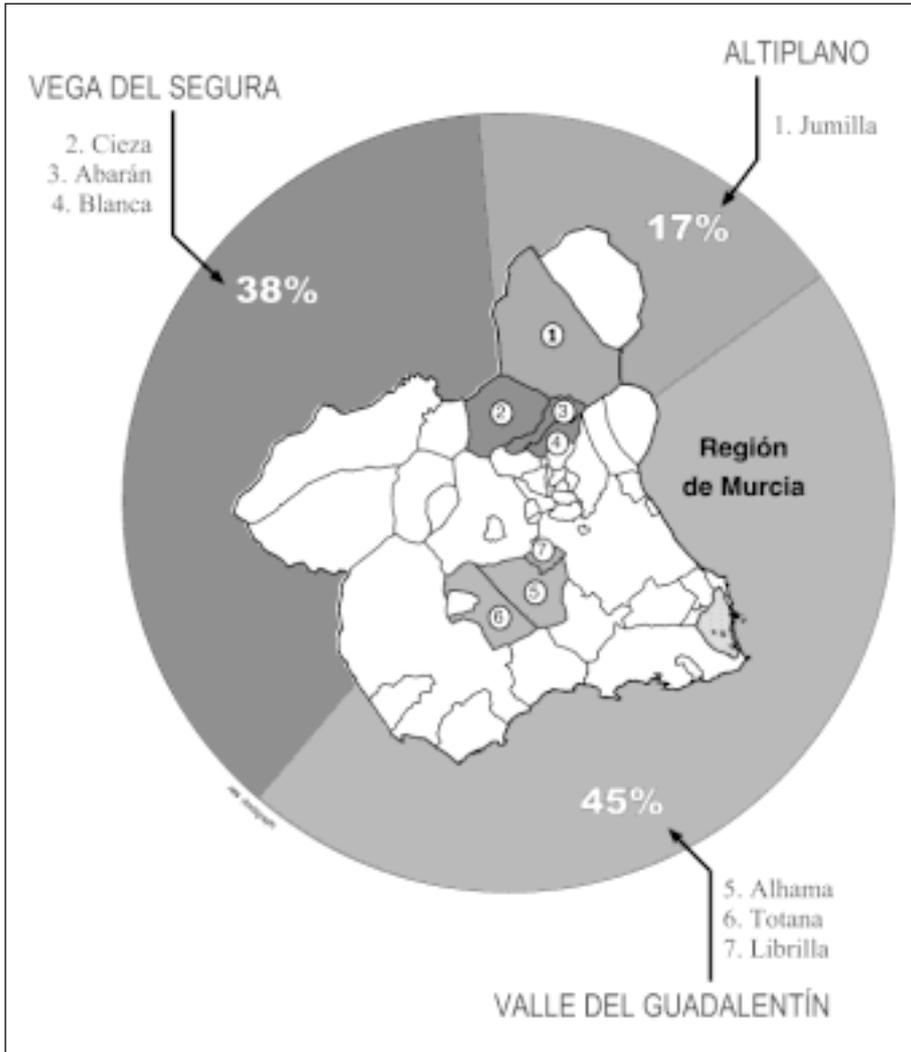
Desde la Región de Murcia, se exporta cerca del 90% de la uva de mesa que se produce en España, al comercializarse además de la uva que se produce en la Región, la mayoría de la producida en las provincias limítrofes: Alicante y Almería. La variedad almeriense **Ohanes**, en años anteriores la más exportada, ha dado paso paulatinamente a la murciana **Napoleón**. Las razones de este éxito son fundamentalmente:

- es tardía, pudiendo conservarse directamente en el parral hasta prácticamente fin de año;
- la forma y tamaño del racimo, así como la tonalidad de las bayas y sabor agradable, favorecen su consumo.

1.1. Principales zonas productoras de uva de mesa

El cultivo en la Región de Murcia se encuentra localizado principalmente en las comarcas de: el Valle del Guadalentín, (45%) la Vega Media del Segura (38%) y el Altiplano (17%), siendo muchos los agricultores de estas zonas que se dedican casi exclusivamente a su cultivo.

LÁMINA 1



1.2. Condiciones climatológicas

El clima es mediterráneo continental, con escasa lluvias, 300 mm anuales de media y temperatura máxima anual de 38-40 °C en los meses de Julio-Agosto y mínima de 4 °C, en Enero. El período libre de heladas es de unos 7 meses, de Abril a Octubre. La evapotranspiración es alta entre Marzo y Octubre, presentando un fuerte déficit hídrico en los meses de

Junio, Julio y Agosto. El número anual de horas de sol (insolación) es de 2.964. Existe riesgo de pedrisco en los núcleos productores de Abarán-Cieza y Alhama de Murcia.

Las especiales condiciones climatológicas de las áreas vitícolas murcianas, dedicadas al cultivo de la uva de mesa con otoños cálidos y secos, bajo índice de heladas en los meses de Octubre, Noviembre y aún en Diciembre, y ausencia de nieblas matinales hace de estas zonas lugares muy aptos para el cultivo de variedades tardías.

La uva de mesa parece preferir los climas templados, luminosos, de nubosidad media, ligeramente ventilados, con poca humedad ambiental, veranos largos e inviernos suaves. Los otoños han de ser secos y cálidos. Teme los rocíos, nieblas y vientos fuertes y secos. Las lluvias en la época de fecundación son perniciosas para el cuajado.

1.3. Suelo

La influencia del suelo no se puede separar totalmente del clima, puesto que el conjunto suelo-clima forma una unidad ecológica. El suelo más adecuado es el profundo, con buena aireación y drenaje. A la hora de hacer un análisis del terreno, hay una serie de parámetros básicos (Padilla, 1997) que es necesario conocer, a saber: tipo de suelo, contenido en caliza activa, materia orgánica, fósforo, potasio, pH, salinidad del terreno, etc. Entre ellos y referido a la zona de Levante, hemos de considerar ante todo el contenido en caliza activa y la salinidad del suelo, junto con la conductividad del agua que se vaya a utilizar para el riego. La combinación de estos factores, junto con la resistencia a la sequía y el vigor requerido nos permitirá poder elegir el patrón adecuado.

Los terrenos más adecuados para el cultivo de la vid son los sueltos; silíceo-calizos o calizosilíceos, profundos, fértiles, permeables y sueltos, y con un pH neutro, siendo importante la proporción de guijarros y gravas al favorecer el drenaje y la aireación (Chauvet y Reynier, 1984).

En líneas generales los suelos de las zonas murcianas donde se localiza el cultivo de uva de mesa, presentan las siguientes características:

Vega alta del Segura

La Vega Alta se encuentra flanqueada bien por los litosuelos calizos que forman las Sierras del Molino, Ascoy, del Oro y Ricote; o por serosen margoso, en los lugares en que el río discurre por terrenos menos accidentados. Los suelos son de textura media y pedregosa con gran capacidad de campo.

Los contenidos de materia orgánica en estos suelos son bajos. También son pobres en nitrógeno y potasio. En la zona de la Estación de Blanca, destaca la existencia de una zona de suelos salino-calizos, siendo suelos de textura fina y estructura débil.

Valle del Guadalentín

Está formado casi exclusivamente por suelos de vega pardo-caliza, destacando áreas de suelos salinos. Estas zonas salinas presentan un problema de difícil solución: la conjunción de un clima de naturaleza árida que presenta un desequilibrio intenso en la evaporación y las precipitaciones y la escasez o falta casi absoluta de aguas de riego de calidad aceptable, toda vez que el río Guadalentín permanece seco durante la mayor parte del año. En consecuencia, prácticamente todo el valle del Guadalentín, algo salino “per se”, se riega con aguas de calidad generalmente deficientes, incrementándose de manera rápida su contenido en sales solubles. Los suelos de esta zona se pueden clasificar como notablemente calizos y con poder clorosante de medio a elevado.

La capacidad de cambio es media y los contenidos de materia orgánica de bajos a muy bajos. Lo mismo se puede decir de los contenidos de nitrógeno y potasio.

Altiplano

En general, existe en la comarca un predominio de rocas calizas que han formado unas variedades de suelo a partir de la roca madre, y que van desde una película edáfica bastante tenue en las partes montañosas con relieve abrupto, hasta suelos muy potentes formados en el fondo de los valles corredores y cubetas. A pesar de la variedad pueden haberse constituido todos a partir de la misma roca madre.

Según Morales (1972) los suelos que existen en mayor extensión, por orden de importancia son:

- 1° Suelos pardo calizos,
- 2° Litosuelos calcáreos,
- 3° Suelos de vega pardo-caliza,
- 4° Serosen margoso en complejo con suelo pardo calizo,
- 5° Suelos margoso-yesosos sobre sedimentos del Keuper, y
- 6° Tierra parda superficial mesotrófica sobre esquistos de silicatos.

Los suelos pardo calizos son los de mayor importancia. Se originaron a partir de sedimentos del Plioceno y Pleistoceno en las cubetas endorreicas y valles corredores. Son suelos en general bastante profundos, con textura limoso-arenosa, de color pardo, con alto contenido de carbonato cálcico, que varía del 35% al 63%, con un pH próximo a 8. La materia orgánica presenta valores del 1% al 2% y va decreciendo con la profundidad, los contenidos de cloruros, sodio y yeso son muy bajos, elevándose en los horizontes inferiores.

1.4. Técnicas de cultivo

Las operaciones de cultivo tienen una gran importancia en el cultivo de la vid, ya que además de intervenir en gran medida en los costes de producción por el gran empleo de mano de obra que precisan, de su óptima realización dependen tanto las producciones obtenidas como la calidad de los racimos.

Prácticamente toda la superficie se cultiva en regadío, estando el 48% con riego localizado (Estadística Agraria de Murcia, 1996-97). El sistema de formación utilizado mayoritariamente es el parral, con el que se obtienen altas producciones unitarias de buena calidad. Este sistema tiene como objetivos el de asegurar la penetración de la luz y la aireación, tanto de la masa de vegetación como de los racimos, ya que así se dificultará la aparición de enfermedades y se favorecerá la maduración y coloración de las bayas. Por el momento las plantaciones en espaldera constituyen un capítulo muy pequeño.

En la Región de Murcia los marcos de plantación más utilizados son los de 3,5 a 4 m entre líneas y de 3,5 a 4,5 m entre parras. Para la plantación lo mejor es emplear barbados o planta injertada, procedente de viveros autorizados, siendo recomendable partir de clones seleccionados y saneados, que nos aseguren la precisa garantía varietal y sanitaria. A la hora de realizar la plantación es conveniente tener en cuenta una serie de medidas o cuidados culturales tales como:

- Mantener las plantas en sitio húmedo y fresco;
- Observar si existen anomalías: raquitismo, presencia de nudos, y escasez de raíces, etc.;
- Supresión de raíces que nacen por encima del nudo inferior;
- Evitar dejar huecos o espacios libres de tierra alrededor de las raíces;
- Dejar únicamente el sarmiento más vigoroso, evitando dejar yemas ciegas;
- Realizar la plantación lo antes posible; y
- Dar un riego de apoyo al arraigo y brotación de las plantas, de 2 a 6 L por planta.

Estas operaciones se deben realizar preferentemente a finales de invierno o principios de primavera. En la actualidad, en el parral existe una tendencia a plantar planta injertada en vez de plantar primero el portainjerto y después injertar en campo.

Dadas las condiciones edafológicas de las zonas de cultivo, con un elevado contenido en caliza activa, los portainjertos que se han venido utilizando con mayor frecuencia son: 161- 49 Couderc (*V. riparia* x *V. berlandieri*), 110 Richter (*V. berlandieri* Resseguier nº 2 x *V. rupestris* Martín), 41-B Millardet y Grasset (*V. vinifera* cv. Chasselas x *V. berlandieri*) y 1103 de Paulsen (*V. berlandieri* Resseguier nº 2 x *V. rupestris* de Lot).

El injerto puede hacerse en taller (modalidades Júpiter y Omega) o bien en campo, siendo la época principal en primavera (15 Marzo - 15 Abril). En este caso las modalidades más corrientes son las de púa, hendidura simple o a la inglesa y lengüeta, yema o en T. El injerto en campo también puede realizarse en otoño (modalidades Cadillac o hendidura de costado y escudete). Normalmente el injerto se realiza al segundo año; si bien con portainjertos vigorosos puede hacerse en el primer año. También existen agricultores que adquieren la planta ya injertada, práctica que es cada vez más empleada.

Transcurrido el primer año de instauración del cultivo se despuntará el injerto a una altura entre 1 y 1,5 m del suelo. Durante el segundo año, de los sarmientos que hayan brotado y alcanzado los alambres dispuestos a modo de techo se dejarán únicamente los cuatro que se encuentran situados más arriba, formando los brazos que se despuntarán con 5 a 7 yemas, según el vigor de la parra. En años sucesivos de cada una de las yemas dejadas brotará un sarmiento y cuando llegue la época de poda dejaremos los dos sarmientos traseros de cada brazo con 4-5 yemas cada uno, manteniendo la madera suficiente para poder obtener una buena producción.

Durante el período activo de vegetación, con el fin de obtener una mejor exposición de los racimos a la luz, el aire y el calor, se realizan otras labores de cultivo tales como despampanado, despunte de ramas, deshojado, descolgado de racimos, aclareo, incisión anular o anillado.

Este cultivo precisa de unas dotaciones medias de agua entre 4.000 y 5.500 m³/Ha y año que deben distribuirse a lo largo de todo el desarrollo del cultivo. En las variedades muy vigorosas conviene suprimir el riego en los períodos de floración para evitar el corrimiento de las flores.

La uva de mesa es un cultivo que precisa de fuertes fertilizaciones, requiriendo en plantaciones adultas durante su ciclo de cultivo de unas 240-150-150 NPK unidades fertilizantes por Ha.. Este cultivo no es muy exigente en

cuanto a las aportaciones de materia orgánica pero se estima conveniente la aportación de unas necesidades mínimas, sobre todo, si tenemos en cuenta que las características de nuestros tipos de suelo son la carencia de estos compuestos y la alcalinidad de los mismos. Las aportaciones se realizan a razón de 15.000 a 20.000 Kg/Ha.

Entre los principales tratamientos fitosanitarios cabe destacar la desinfección del suelo antes de plantar y el control de malas hierbas con herbicidas en invierno o principios de primavera. De modo general se suelen hacer 3 ó 4 tratamientos anticriptogámicos para prevenir los ataques de mildiu, oídio y botritis, siendo conveniente adicionar un insecticida para prevenir distintos ataques, principalmente de polillas del racimo. Los azufrados del viñedo, tan arraigados entre nuestros agricultores, son eficaces para el control de ácaros, aunque en ocasiones son necesarios tratamientos con acaricidas orgánicos para erradicar ataques severos de araña roja.

1.5. El cultivar de uva de mesa Napoleón

Esta variedad tinta es autóctona de la Región de Murcia, siendo la provincia donde su cultivo ocupa mayor superficie 2.766 Has, con una producción de unas 27.515 Tm (lo que supone el 50% del total de la uva de mesa de esta Región (Estadística Agraria de Murcia, 1996-97).

También se conoce con otras denominaciones: **Ohanes negra, D. Mariano, Regina negra, Almería negra, Alicante negra, Aledo negro, Ovan negro.**

Es la variedad más tardía entre las uvas tintas, de racimos con forma piramidal y sueltos, granos grandes y bien adheridos al pedicelo, lo que facilita su transporte, con tonos prácticamente negros, piel resistente y pulpa crujiente, de sabor simple muy agradable. La fecha de recolección abarca desde Septiembre hasta Diciembre. Esta variedad es muy apreciada en Alemania.

1.5.1. Origen

En cuanto al origen de dicho cultivar nos encontramos ante un caso más, de los muchos existentes, en que se desconoce. Por sus características parece responder a una mutación natural de tipo cariotípico. De ello se deduce que el material vegetal disponible no proviene de ningún programa de certificación, y por tanto se asume “a priori” la presencia de virus en dicho cultivar (Padilla, 1989).

1.5.2. Ciclo vegetativo

La vid es un arbusto cuyos órganos principales de larga duración son las raíces, troncos y brazos. Los órganos de duración anual sólo en el período no frío son los pámpanos que se transforman en sarmientos después del agostado y las hojas. El fruto dura tres o cuatro meses dependiendo de las variedades y de las zonas climáticas. Las flores sólo pueden observarse unos pocos días al año (Pulgar, 1994).

En la Región de Murcia y en las zonas de cultivo de esta variedad, el movimiento de reservas se inicia a mediados de Marzo, cuando la temperatura del suelo es de 9-10 °C, teniendo lugar la brotación a mediados de Abril.

La floración o "cierna" de la parra se produce a finales de Mayo. Es el momento más delicado en la vida de la parra, pues ha de verificarse la fecundación para que sobrevenga la cosecha. Un excesivo vigor de la parra, lluvias, enfermedades, etc., hacen que se corra la flor con la consiguiente anulación o al menos disminución de la cosecha. A los diez o quince días después de la floración se produce el "cuaje". Culminado este, comienza el crecimiento del grano produciéndose una parada en la vegetación a mediados de Julio. Llega un momento en que los granos toman color, es el momento del "envero", que ocurre de primeros a mediados de Agosto.

La recolección de esta variedad abarca un período de casi tres meses, desde mediados de Septiembre hasta principios de Diciembre. A finales de Noviembre o primeros de Diciembre, se produce la caída de la hoja.

1.5.3. Características varietales

- Sarmientos de superficie estriada y sección aplastada.
- Hoja pentalobulada, de tamaño mediano, tanto el haz como el envés es glabro, de superficie plana, color verde sin brillo, borde dentado, de dientes convexos, el ángulo del vértice del lóbulo terminal es agudo; seno peciolar en lira cerrada.
- Los racimos son grandes, alargados, con bayas sueltas y raspón grueso.
- Los granos o bayas son de tamaño mediano a grande, de forma elíptica, color granate oscuro a negro en plena madurez, con pruina, de piel resistente y buena adherencia al pedicelo, lo que facilita su transporte.
- La pulpa es crujiente, jugosa, dulce con sabor simple muy agradable. El mosto es incoloro, contiene tres o cuatro pepitas.

1.5.4. Aspectos agronómicos y comerciales

La recolección tiene lugar entre Octubre y Noviembre, permaneciendo en ocasiones hasta el mes de Diciembre en la parra, es decir, se trata de un cultivar incluido en el grupo de uva de mesa tardía. Posee gran vigor, por lo que el marco de plantación es amplio, entre 4 x 5 y 5 x 5 m, con una densidad situada entre 400 a 625 cepas/Ha. La poda es de tipo medio, dejando 4-6 yemas por vara.

Producción media

Varía de un año a otro y dentro del mismo año de una parcela a la vecina, así hay plantaciones de **Napoleón** que llegan a producir 35.000 Kg/Ha e incluso más, aunque por término medio se puede considerar un rendimiento de 22.000 Kg/Ha.

Calidad de la producción

Desde hace unos años, se viene observando, un descenso de calidad caracterizado por una deficiente coloración y aptitud para la conservación y transporte. Entre las causas que podrían originarlo se pueden encontrar ciertos desequilibrios en la fertilización, cargas excesivas en las podas, problemas de carácter fitosanitario y edafoclimatológico, etc. La falta de color constituye el mayor problema, ya que en ciertas zonas productoras la uva no toma color, y si lo hace es de manera muy leve.

Si pensamos que en el año 1997 se pagó el kilo de esta variedad a 85 ptas de media y que en la Región de Murcia, se obtienen unas 27.500 Tm anuales, es fácil llegar a considerar la repercusión económica que tiene en el sector agrícola de esta Región. De ahí, el interés que supone realizar estudios varietales y sanitarios sobre este cultivar, con la finalidad de mejorarlo todo lo posible.

1.6. Otras variedades de uva de mesa

Hidalgo (1981) define las variedades de uva de mesa propiamente dichas como aquellas que se aprecian más por las condiciones físicas y estructurales de sus frutos, que por las características de sus mostos.

De este modo general se buscan variedades con racimos grandes y bien conformados, de aspecto hermoso, con bayas sueltas de buen tamaño, pulpa crujiente, piel resistente, difícil desgrane, sabor fresco, sin necesidad de ser excesivamente azucarado, con aromas agradables, tanto si el sabor es simple como si es "amoscatelado".

Entre las variedades blancas de mayor difusión destacan **Italia** y **Dominga**, seguidas de lejos por **Ohanes**, **Aledo**, **Moscatel** y **Rosetti**. Dentro de las variedades tintas sobresale **Napoleón** y, con menor importancia, **Cardinal**.

El 90% de la producción corresponde a las variedades **Italia**, **Napoleón**, **Dominga** y **Ohanes**, aunque esta última ha entrado claramente en retroceso en los últimos años (Estadística Agraria de Murcia, 1996-97).

1.6.1. Italia

A esta variedad blanca se le conoce también como **Ideal**. La producción actual es de unas 16.187 Tm, lo que supone el 29% de la uva de mesa en la Región. El racimo es grande, con granos sueltos, color amarillo crema dorado, pulpa crujiente y sabor dulce muy agradable. La fecha de recolección abarca desde Agosto hasta Octubre.

1.6.2. Dominga

Al igual que el cultivar **Napoleón**, esta variedad blanca también es autóctona de la Región de Murcia. Su producción se cifra en unas 6.230 Tm, lo que supone el 11% de la producción total de uva de mesa en la Región de Murcia.

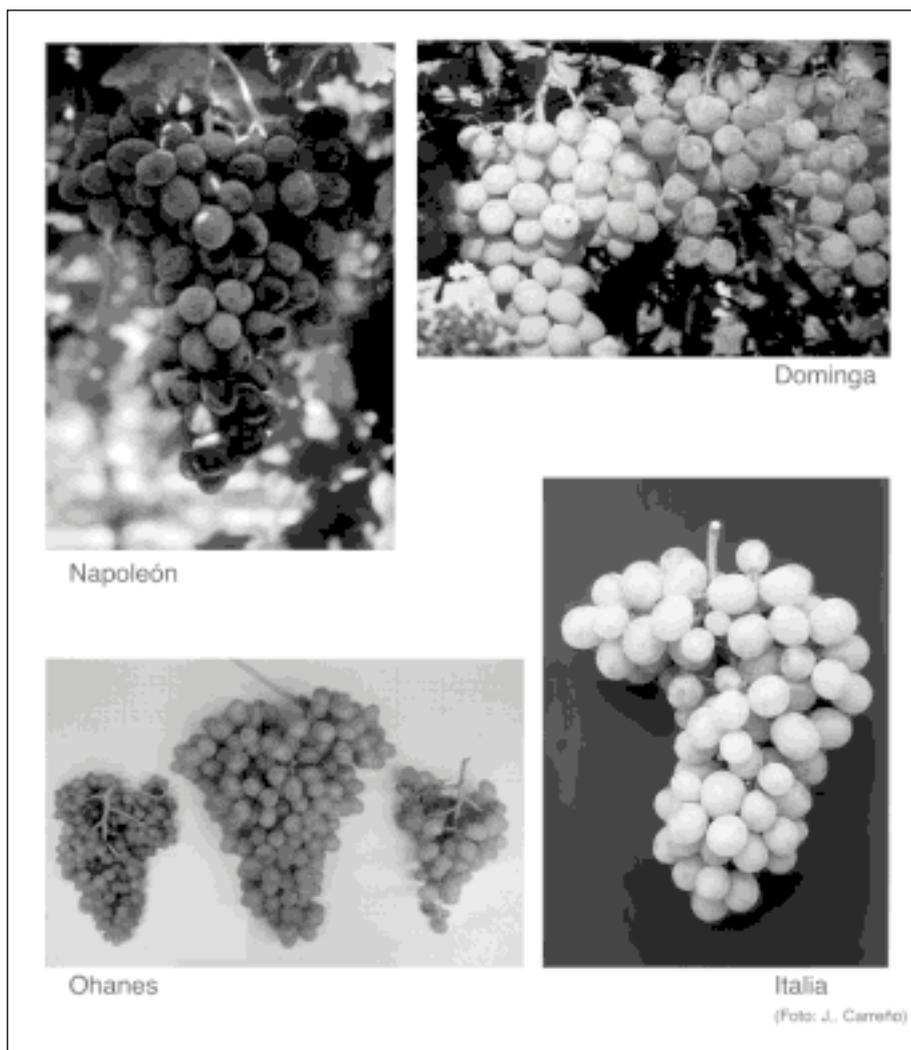
El racimo es grande con bayas de gran tamaño, de color crema y muy apretado, lo que supone una mayor sensibilidad a podredumbre y botritis. Pulpa carnosa azucarada y de sabor agradable. En racimos muy expuestos al sol, pueden haber tonalidades rosas. La fecha de recolección es de Noviembre a Diciembre.

1.6.3. Ohanes

La superficie ha disminuido mucho en los últimos años; la producción es de unas 182 Tm, lo que supone el 0,3% regional. Como sinónimos: **uva de Almería**, **uva de embarque**, **uva de barco**. Muy exportada a Suecia, Noruega y Dinamarca.

Se trata de una variedad blanca que en Murcia se encuentra en regresión debido a problemas sanitarios, a la pérdida de las características genéticas propias de este cultivar y a sus características organolépticas que no la hacen muy apetecible, no es muy dulce.

El racimo es grande, con hombros anchos y de compacidad media. Las bayas son gruesas, de forma cilíndrica muy característica, piel espesa y pruina poco abundante, el color varía entre amarillo claro y el verde más o menos dorado, pulpa carnosa y crujiente, poco azucarada, y con sabor neu-

LÁMINA 2.**PRINCIPALES VARIEDADES DE UVA DE MESA EN LA REGIÓN DE MURCIA**

tro. Por las características del hollejo, fuerte y basto, el transporte y la conservación son bastante fáciles.

Uno de los aspectos negativos lo constituye el hecho de que la flor es morfológica y fisiológicamente femenina, de donde emana la necesidad de realizar la polinización artificial, operación denominada "macheo" o "engarpe". La fecha de recolección va desde Agosto hasta Diciembre.

1.6.4. Variedades apirenas

Son aquellas en las que después de una fecundación normal el embrión y el albumen abortan, originando bayas con semillas rudimentarias y herbáceas no perceptibles al masticarlas.

El cultivo de estas variedades en la región va aumentando (Estadística Agraria de Murcia, 1996-97). El calendario de producción se sitúa fundamentalmente entre los meses de Julio y Septiembre (variedades precoces), con lo cual vienen a completar el período actual de producción de nuestras variedades, que se centra fundamentalmente en los meses de Octubre a Diciembre (Pallares, 1987). Estas variedades apirenas, resultan de interés tanto para el mercado en fresco como para la producción de pasas, fabricación de macedonias y compotas de frutos.

Las variedades más importantes de las ensayadas hasta ahora son (Martínez Cutillas et al, 1991):

Red Globe

Variedad de color rojo con racimos y bayas muy grandes, de sabor neutro y consistencia ligeramente crujiente. Madura en la segunda quincena de Agosto.

Thompson Seedless

Conocida también como **Sultanina**, es la variedad apirena más extendida y cultivada en el mundo, tanto para consumo en fresco como para la obtención de pasas. Produce unos racimos amarillos de tamaño mediano a grande, excesivamente compactos por lo que necesita aclareo. Las bayas son de tamaño pequeño exigiendo tratamientos con ácido giberélico, incisión anular y poda de racimos. Tiene un sabor neutro y consistencia media. Madura en la segunda quincena de Agosto.

Dawn Seedless

Variedad apirena de color amarillo, tiene racimos de tamaño medio que precisan de tratamientos con ácido giberélico e incisión anular, bayas pequeñas, sabor neutro aromático y consistencia crujiente. Tiene una buena productividad, madurando en la primera decena de Agosto.

Centenial

Apirena de color amarillo, con un tamaño de racimo mediano, tiene un tamaño de baya aceptable. Sin tratamientos responde bien a la incisión anu-

lar. Tiene un sabor neutro y consistencia algo crujiente. Necesita poda larga puesto que las dos primeras yemas son muy poco fértiles. Madura en la primera decena de Agosto.

Flame Seedless

Apirena de color rojo con racimos de tamaño medio, bayas de tamaño pequeño, necesita aclareo de racimos, incisión anular y aplicaciones de ácido giberélico. Tiene un sabor neutro aromático y consistencia crujiente. En conjunto tiene unas características organolépticas extraordinarias, siendo muy apetecida en algunos mercados europeos. Presenta una buena productividad. Madura en la tercera decena de Julio.

Superior Seedless

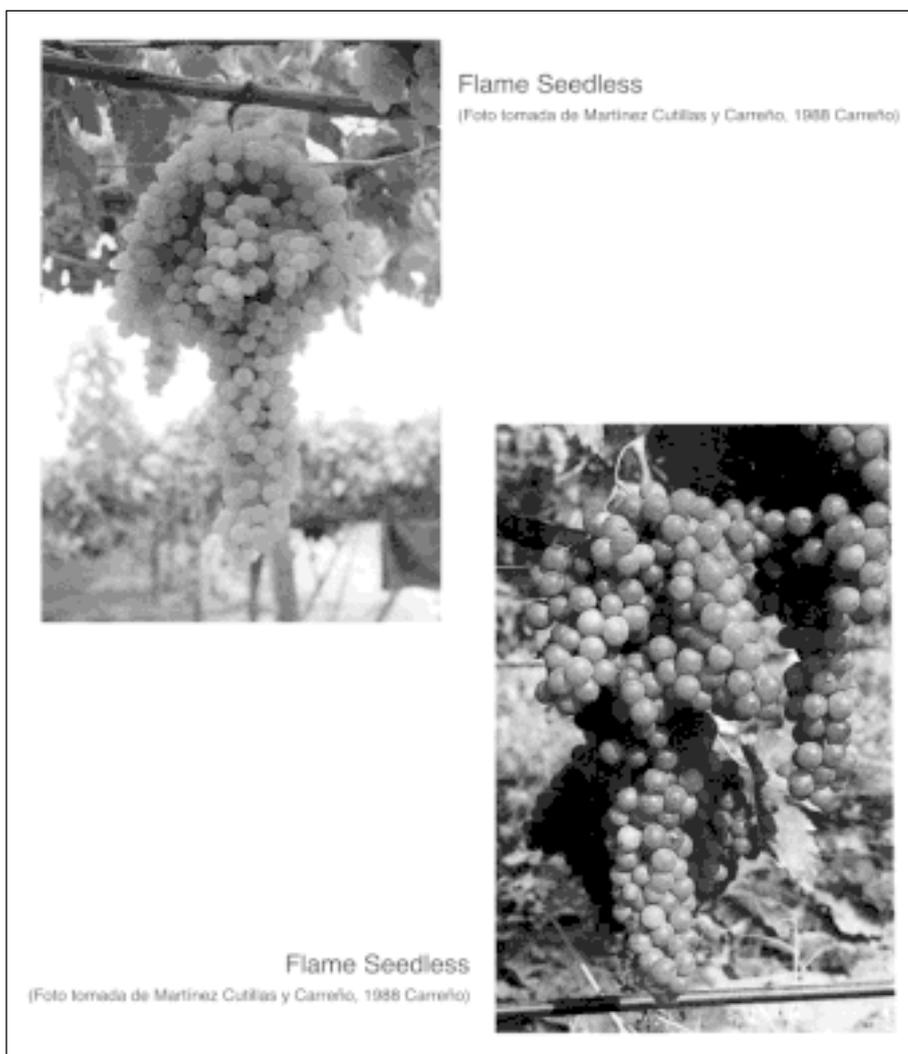
Por las características del racimo y época de maduración es, posiblemente, la mejor variedad apirena, no necesitando aplicaciones de ácido giberélico ni poda de racimos. Tiene racimos de tamaño medio, de color amarillo, bayas de tamaño medio, sabor neutro y consistencia crujiente. Madura en la segunda decena de Julio. Es muy vigorosa pero tiene una baja fertilidad, algunos años presenta problemas de mal cuajado. Necesita podas muy largas. Es poco productiva pero alcanza muy buenos precios en la exportación.

2. PROBLEMÁTICA DE LOS VIRUS DE LA VID

Antes de 1950 se estimaba que un único virus era el responsable de todos los síntomas observados en la vid, no atribuibles a patógenos conocidos (Branas, 1948). Como consecuencia de la intensificación de las investigaciones en el campo de la virología vegetal, concretamente en la vid, esta idea fue abandonada, y en 1960 se atribuían las enfermedades de tipo viral en la vid a siete virus diferentes (Hewitt, 1978).

En la actualidad el número de virosis que afectan a la vid es de 44 (Walter y Martelli, 1997), pero siguen existiendo enfermedades de supuesta etiología vírica, cuyos agentes patógenos no han sido aislados.

Entre los autores españoles, que trataron en primer lugar el tema, podemos citar a Marcilla (1942) y Fernández de Bobadilla (1948) al referirse a la degeneración infecciosa de la vid, como una enfermedad de posible etiología vírica. También se pueden señalar entre los primeros trabajos realizados en España los de Ruiz de Castro (1966), quien se refirió a las virosis en Andalucía, y los de García de Luján y Gil Bernabé (1976), confirmando la

LÁMINA 3.**PRINCIPALES VARIEDADES DE UVA DE MESA EN LA REGIÓN DE MURCIA**

presencia del virus del **Entrenado Corto Infeccioso** en cepas de la zona de Jerez. A partir de entonces se inicia un estudio amplio sobre virosis de la vid y selección sanitaria de la gran mayoría de las viníferas españolas (Alfaro, 1971; Hidalgo 1973, García de Luján, 1996).

En diversos estudios (González et al, 1997; Mannini et al., 1999) se ha intentado relacionar los efectos perniciosos de los distintos virus a nivel de

producción con alteraciones en diversas reacciones fisiológicas como son: fotosíntesis, procesos enzimáticos, transporte de la savia, nutrición mineral, respiración o equilibrios de fitoreguladores (Hale y Woodhan, 1979; Caló, 1988; Walter, 1988, Berres, 1990; Cabaleiro et al, 1999).

También se han realizado diversos estudios para evaluar los daños en diferentes variedades, tipos de virus y combinaciones patrón-injerto, en diversas zonas de cultivo de la vid y con diferentes sistemas de cultivo, pero resulta difícil extrapolar los resultados de esos estudios a otros sistemas productivos no estudiados (Cabaleiro y Segura, 1996).

Aunque no existan estudios exhaustivos sobre la importancia que las enfermedades producidas por virus tienen en nuestro país, si podemos decir que en todas aquellas regiones vitícolas en las que se ha estudiado, se ha observado la gran incidencia económica que supone su presencia (Padilla, 1990, García de Luján, 1996; Walter y Martelli, 1997).

La gravedad de las virosis radica en que no pueden ser combatidas con tratamientos a base de productos fitosanitarios, siendo la única forma la eliminación de las cepas afectadas y la destrucción de los posibles vectores de transmisión. La lucha contra los virus (y otros agentes fitopatógenos relacionados) de la vid, debe hacerse basada en una serie de intervenciones preventivas (Savino, 1996), principalmente:

- Producción de material de propagación exento de virus, es decir, material certificado;
- Multiplicación del material certificado en condiciones sanitarias óptimas, en todas las fases que preceden a la cesión al viticultor; y
- Lucha contra los vectores que transmiten las virosis.

También es muy importante el tener a punto una buena técnica de diagnóstico, a saber: ensayos biológicos, serológicos, moleculares, etc. (Albouy, 1998).

2.1. Incidencia económica

Los datos existentes, aunque cada vez más abundantes, son en su mayoría de orden teórico, por lo que los porcentajes de pérdida de cosecha, así como los efectos en la calidad del fruto y del vino, no son totalmente conocidos (Padilla, 1986). Provedo y Fernández-Sevilla (1973), Díaz-Yubero y Esteban (1973), García de Luján (1976), Martínez y Padilla (1981) cifran las pérdidas producidas por virosis entre el 5 y el 40% del valor de la cosecha. Las virosis disminuyen la productividad del parral afectando al rendimiento, calidad de la uva y longevidad de los parrales, por lo que su importancia económica

crece sin cesar a causa de la rápida propagación de estas enfermedades (Martínez-Zaráte, 1979).

Sin embargo, la incidencia de estas enfermedades sobre la economía es muy variable según el tipo de virosis y la estirpe de virus de que se trate, al producirse en la planta perturbaciones de mayor o menor gravedad (Walter y Martelli, 1998). Las dos enfermedades que tienen mayor importancia económica por las pérdidas que producen son el **Entrenudo Corto Infeccioso** y el **Enrollado**. Dado que no existen datos en España a cerca de la incidencia de estas virosis en la economía vitivinícola, haremos a continuación unas consideraciones generales.

En primer lugar, en cuanto a mayores pérdidas económicas, se encuentra el virus del **Entrenudo Corto Infeccioso**, cuya presencia ocasiona fundamentalmente una baja producción, debido al corrimiento y/o "granilla" de los racimos, reduciendo así su valor comercial (Martelli, 1993). Las parras afectadas por las estirpes más virulentas presentan un enanismo muy marcado en la mayoría de sus órganos, las bayas son muy pequeñas y el número de racimos por sarmiento disminuye.

Bajo condiciones severas, el virus puede llegar a matar las plantas, aunque en general, las vides afectadas sobreviven produciendo cada vez menos. En Europa se han estimado reducciones de un 50% de la producción para las variedades más susceptibles (Bovey, 1970).

El segundo lugar le corresponde al virus del **Enrollado**, tanto en pérdidas como en extensión geográfica afectada; el rendimiento se reduce entre un 10 y un 70% (Martelli, 1993). La calidad del fruto, y del vino se ve afectada debido al menor contenido de azúcares en el momento de la cosecha y al incremento del índice de acidez (Padilla, 1998); asimismo se observa una falta de coloración de la uva en las cepas afectadas. Al igual que ocurría en el caso del **Entrenudo Corto Infeccioso**, también reduce la capacidad de enraizamiento de las estacas y de prendimiento de los injertos. Además ocasiona una disminución del desarrollo de las parras infectadas, así como del número de raíces por parra. Este virus produce daños menos graves ya que no afecta tanto al vigor de la planta y no produce corrimiento. No obstante, hay que tener presente la frecuencia elevada de esta enfermedad.

Otros virus que ocasionan pérdidas económicas son los englobados en el denominado **Complejo vírico de la Madera Rizada**; la importancia económica es grande pero difícil de evaluar, pues como indicábamos en párrafos anteriores, los daños parecen depender de:

1) la combinación patrón-injerto,

- 2) la susceptibilidad de las variedades y
- 3) el grado de virulencia del agente causal, que en las variedades más sensibles a la enfermedad, puede llegar a ocasionar la muerte de la planta (Padilla, 1998).

En cuanto al virus del **Jaspeado**, señalar que la importancia de esta virosis desde el punto de vista económico está todavía por determinar de manera clara. Los daños económicos que hasta el momento se pueden considerar provienen del mal prendimiento de los injertos, pudiendo ser elevados debido a efectos de sinergismo con otras virosis (Padilla, 1998).

De acuerdo con el grado de incidencia económica que ocasionan, podemos clasificar a las virosis con mayor grado de presencia, en dos grandes grupos:

- a) Mayor incidencia: Entrenudo Corto Infeccioso, Enrollado, Madera Rizada y Jaspeado.
- b) Menor incidencia: Enaciones y Necrosis de los Nervios.

2.2. Descripción de las principales virosis de la vid

2.2.1. Virus del Entrenudo Corto Infeccioso (GFLV)

Se trata de un Nepovirus (virus poliédrico transmitido por nematodos). Su distribución es a nivel mundial, y su presencia puede llegar a hacer inviable la plantación o al menos disminuir de manera considerable la producción y la calidad de la uva (Prota, 1996; Lorrain, 1997; Erny et al, 1997).

1) SÍNTOMAS

No todas las virosis que afectan a la vid presentan una amplia gama de síntomas externos e internos como el **Entrenudo Corto Infeccioso**. Estos síntomas en ocasiones, y considerados individualmente, pueden confundirse con otros debidos a alteraciones diversas, o a características propias de la variedad, por lo que para poder aseverar con un bajo índice de error la sanidad de un viñedo, es preciso considerar todos y cada uno de los síntomas que a continuación se describen (Martelli, 1993; Walter, 1997; Padilla, 1998).

En hojas

- El seno peciolar se abre más de lo normal.
- La dentición es más acusada.
- Presencia de mosaicos de tipo nerviacional y amarillo.

CUADRO 1.
VIROSIS DE LA VID DETECTADAS EN ESPAÑA
Y SU DENOMINACIÓN EN OTROS IDIOMAS (PADILLA, 1998).

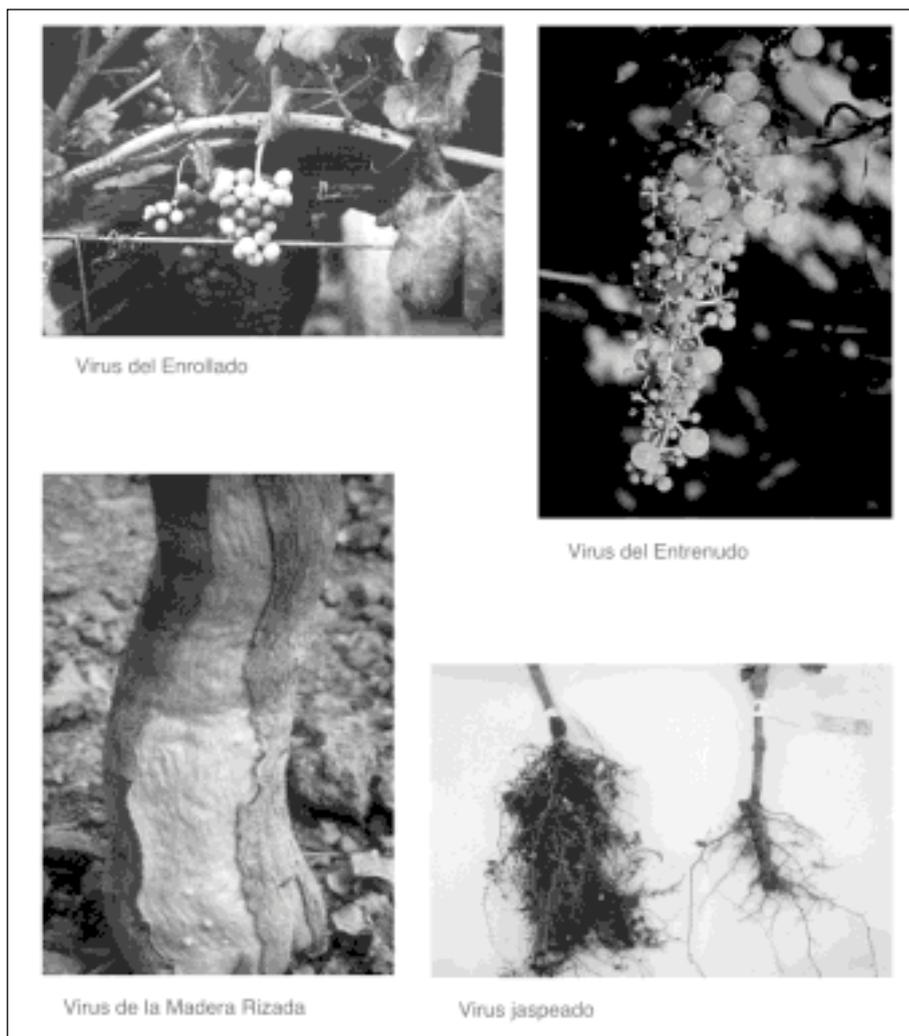
Español	Francés	Italiano	Inglés	Siglas internacionales
Entrenudo Corto Infecioso	Virus Court-noué de la Vigne	Arricciamento	Grapevine Fanleaf Virus	GFLV
Enrollado	Enroulement de la Vigne	Accartocciamento	Grapevine Leafroll associated Virus	GLRaV
Jaspeado	Marbrure de la Vigne	Maculatura de la Vite	Grapevine Fleck Virus	GFkV
Madera Rizada	Bois strié	Legno riccio	Rugose Wood Disease Rupestris stem pitting Kober stem grooving Corky bark LN 33 stem grooving	RWD RSP KSG CB LNSG
Enaciones	Maladie des énaions de la Vigne	Malattia delle Enazioni	Grapevine Enations Disease	GED
Necrosis de los Nervios	Necrose des nervures de la Vigne	Necrosi delle Nervature	Grapevine Vein Necrosis Disease	GVND

En sarmientos

- Dobles nudos.
- Fasciaciones y bifurcaciones.
- Entrenudo corto, que es el que ha dado lugar a la denominación española. Se trata de un entrenudo que tiene una longitud menor que el anterior y posterior; estadísticamente dicho entrenudo se sitúa entre los nudos 6º y 9º.
- Proliferación de "nietos" con entrenudos más cortos de lo normal, lo que da un aspecto arbustivo a la planta.
- Madera aplastada.

En racimos

La presencia de este virus produce casos de corrimiento completo y de corrimiento parcial de los racimos (granilla). Es de destacar que muchas veces también se producen corrimientos de tipo fisiológico o genético; de-

LÁMINA 4.**EFFECTOS DE DIFERENTES TIPOS DE VIRUS SOBRE VITIS VINIFERA**

bidos a una mala polinización por causas climáticas; al excesivo vigor procedente de un patrón no apropiado; suelo muy fértil; abonado nitrogenado excesivo, etc.

En el sistema radicular

- El número de raíces es menor que en las plantas sanas, con mayor grosor y menor longitud.

- Presencia de cordones endocelulares en los vasos conductores, aunque estudios posteriores han demostrado que dichos cordones son más abundantes en unas especies del género *Vitis* que en otras, por lo que este diagnóstico no es concluyente.

2) DAÑOS

Son variables de acuerdo con el grado y extensión de la infección, variedad y condiciones del medio. De ellos son de destacar los siguientes:

- Disminución del rendimiento. Las pérdidas pueden llegar hasta un 80% de la cosecha. Es importante en todas las variedades de uva de mesa debido al corrimiento del racimo, que implica una fuerte desvalorización comercial. En la uva para transformación no tiene repercusión ni en el índice de acidez ni en el grado de azúcar.
- Menor longevidad de las cepas. A los 6-8 años de producirse la infección se observa que la planta afectada presenta un marcado estado depresivo.
- Incidencia sobre el material vegetal de multiplicación. La madera procedente de planta infectada posee una menor capacidad de enraizamiento, el número de estaquillas obtenidas es más bajo, y el porcentaje de prendimientos de los injertos se ve también muy afectado.

3) FORMAS DE TRANSMISIÓN

La forma típica de transmisión es la multiplicación vegetativa de plantas infectadas. Cuando se injerta un patrón sano con una variedad infectada o una variedad sana sobre un patrón enfermo, la planta entera resulta infectada al cabo de poco tiempo.

Otra forma importante de transmisión la realizan los nematodos del género *Xiphinema*. La infección la pueden realizar tanto los individuos adultos, como los estados juveniles.

La transmisión por medio de la semilla es posible, aunque no es un grave problema ya que la multiplicación por semilla se utiliza únicamente en procesos de hibridación.

La transmisión por herramientas utilizadas en la poda no es de temer como ocurre con otras enfermedades debidas a hongos o bacterias (Padilla, 1988).

4) DIAGNÓSTICO

El conocimiento de los síntomas descritos es fundamental en cualquier trabajo, sea de simple control de la plantación o de un proceso de selección

clonal-sanitario. Sin embargo, la presencia de dichos síntomas no es suficiente para diagnosticar con toda certeza la presencia del virus, lo que obliga a recurrir a las siguientes técnicas especializadas:

Indicadores leñosos o herbáceos

Son plantas que ante la presencia del virus reaccionan presentando una serie de síntomas muy típicos y fácilmente reconocibles. El indicador leñoso más utilizado en este caso es *Vitis rupestris* de Lot cv. **St. George** y la transmisión del virus se hace mediante injerto de la planta a diagnosticar en el indicador. Entre los indicadores más utilizados figuran algunos "cenizos" (*Chenopodium quinoa* Willd) y la transmisión se realiza por inoculación mecánica del jugo de la planta a estudiar sobre el indicador (Martelli et al, 1993).

Serología

Actualmente y merced al avance de las técnicas serológicas, se ha logrado poner a punto el método conocido como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), que permite establecer un diagnóstico rápido y fiable en el caso del **Entrenudo Corto Infeccioso**.

Microscopía electrónica

La utilización del microscopio electrónico es un apoyo más en el proceso de diagnóstico de este virus, ya que se conoce perfectamente su conformación. Mediante una observación del jugo de la planta se puede establecer si en él hay o no partículas víricas; aunque para diagnósticos rutinarios no es útil, debido a lo lento del proceso en comparación con otras técnicas.

5) ESTRATEGIA Y MEDIOS DE PROTECCIÓN

Protección directa

Pese a los esfuerzos que se están realizando en investigación, no existe actualmente ningún tratamiento o técnica de lucha que permita combatir a los virus en las plantaciones ya establecidas. En una plantación afectada por el virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** no existe otra solución que proceder al arranque total de las cepas, cuando la producción deje de ser rentable.

Desinfección de suelos

Como ya hemos indicado anteriormente, una de las principales vías de transmisión del virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** es mediante nemato-

dos, principalmente *Xiphinema index*. Para establecer una lucha contra dicho vector hay que seguir uno de los siguientes métodos:

Protección biológica

Este método consiste en dejar en reposo el terreno sobre el que se va a ubicar el viñedo o el parral, bien en barbecho, bien cultivando plantas no "apetecibles" por los nematodos para su alimentación y supervivencia tales como alfalfa, altramuces, cereales, aromático-medicinales, etc., durante 7-10 años, dependiendo del grado de contaminación (población de nematodos) y tipo de terreno (arenoso, franco-arenoso, arcilloso, etc.).

Protección química

Dado que el umbral de seguridad una vez arrancado el parral se cifra en 5 años para terrenos ligeros y 8-10 años para los pesados, y que el viticultor o parralero no puede cambiar fácilmente de cultivo ni permitirse estos plazos de tiempo, se pueden realizar tratamientos nematicidas, utilizando distintos productos como: bromuro de metilo (brometano), disulfuro de carbono, 1,3-dicloropropeno (DD).

Utilización de planta exenta de virus

Constituye hoy por hoy la mejor y casi única estrategia que se puede adoptar para evitar la presencia posterior de estas enfermedades en los viñedos (García de Luján, 1996). Los procesos por los que se logra obtener material vegetal exento de virus, a partir de plantas afectadas, son la "termoterapia", el "cultivo de tejidos" o combinaciones de ambos (Walter, 1997).

2.2.2. Virus del Enrollado (GLRaV)

El agente causante de esta virosis pertenece al grupo de los Closterovirus (Savino, 1996), distinguiéndose actualmente siete serotipos (Boscia et al, 1995). Se trata de una virosis ya estudiada desde hace mucho tiempo (Pistre, 1891, citado por Padilla, 1990) aunque, por supuesto, sin llegar a considerar el problema como de índole virótico.

La naturaleza viral fue establecida en 1936 por Sheu (citado por Padilla, 1990) al lograr transmitir la enfermedad mediante injerto. Posteriormente otros autores han tratado de conocer mejor esta virosis (Bovey, 1958; Goheen y Hewitt, 1964; Hoeffert, 1965; Milikan et al, 1965; Boubals y Pistre, 1966; Hoeffert y Gifford, 1967), siendo a partir de 1970 cuando más se profundizó en el tema.

Junto con el virus del **Entrenado Corto Infeccioso**, se trata de la virosis más grave que afecta a la vid (Goheen, 1970), encontrándose en todos los países vitícolas del mundo (Bovey et al, 1980; Fortusini et al, 1996; Walter, 1997). Afecta tanto a variedades como a portainjertos, aunque estos últimos suelen ser tolerantes, lo cual complica la situación aún más al pasar desapercibidos los síntomas.

1) SÍNTOMAS

Las manifestaciones más llamativas corresponden a las que presentan hojas y racimos, pero como ocurre con la mayoría de las virosis, la mayor o menor exteriorización depende de la variedad, portainjerto, condiciones edafoclimáticas y métodos de cultivo (Borgo, 1991).

En hojas

La denominación de **Enrollado** deriva de la conformación que adquieren las hojas, enrollándose según tres ejes (Belli, 1996). Este síntoma, se produce tanto en variedades blancas como tintas. Sin embargo, el otro síntoma típico consistente en la coloración rojiza de las hojas, dejando los nervios verdes en una banda de 2-3 mm, sólo se da en las variedades tintas; en los cultivares de uva blanca, únicamente se observa una ligera clorosis foliar, con un tono plateado del seno peciolar (Hewitt, 1968).

La consistencia de las hojas es quebradiza, con el tacto un tanto rugoso (Hewitt, 1968). En 1933, Ravaz et al encontraron en las hojas menor cantidad de potasio que en las hojas de cepas sanas, por lo que llegaron a considerar la enfermedad, como algunos otros autores (Lafon et al, 1955), causada por una deficiencia en potasio (Milikan et al, 1963; Chapman, 1966; Walter, 1988). Además de los problemas de desequilibrios de potasio y calcio, aparece una acumulación atípica de almidón en las hojas de cepas infectadas. El floema se ve afectado en sarmientos, peciolo, etc., con obturación de los vasos liberianos (Hoeffert y Gifford, 1967; Goheen, 1970; Castellano et al, 1983).

En Racimos

- Se produce un retraso en la maduración, por lo que el color de las bayas se ve gravemente afectado.
- Hay menor número de racimos por cepa.

En el sistema radicular

Se produce un menor número de raíces, y de menor longitud, que las formadas en plantas sanas.

2) DAÑOS

Algunos daños atribuidos al **Enrollado** conciernen sobre todo a los tejidos conductores, con degeneración del xilema, desarrollo anormal del cambium, desorganización del floema y acumulación anormal de almidón (Hoeffert y Gifford, 1967; Castellano et al, 1983; Borgo, 1991). Todo ello conlleva una disminución del flujo de nutrientes que limita el número de racimos que pueden desarrollarse y que, a lo largo de los años, se traduce en un menor crecimiento de las cepas (Cabaleiro y Segura, 1996). El prendimiento del injerto se ve también muy afectado (Bovey, 1970; Credi y Babini, 1984). La comercialización se ve asimismo muy comprometida (Gugerli et al, 1997).

Los descendos de la producción pueden alcanzar hasta un 68% en variedades muy sensibles (Cabaleiro y Segura, 1996). La gravedad del daño depende en gran medida de las condiciones ambientales, los sistemas de cultivo y las variedades objeto de estudio (Woodham et al, 1984; Walter y Martelli, 1997). Los principales efectos son:

- Merma del desarrollo de las cepas y menor número de racimos (Goheen et al 1958; Goheen y Cook, 1959).
- En las variedades tintas el color de la uva es menos intenso, llegando incluso a desaparecer por completo (Goheen et al., 1958; Goheen, 1970; Woodham et al, 1983).
- Las cepas enfermas soportan peor el frío (Sheu, 1936).
- La maduración se retrasa (Borgo, 1991; Magalhaes et al, 1997).
- Como consecuencia del retraso en la maduración, el fruto presenta una disminución en el grado de azúcar, junto con un aumento del índice de acidez (Goheen y Cook, 1959; Dimitrijevic, 1970; Over de Linden y Chamberlain, 1970; Woodham et al, 1983; Credi y Babini, 1984), persistiendo dicho problema aún si se dejan los racimos más tiempo en la cepa, en un intento de mejorar el proceso de maduración (Thomas, 1983).

3) FORMAS DE TRANSMISIÓN

La forma fundamental de transmisión es mediante multiplicación vegetativa y, sobre todo, por el injerto, lo que ha conducido a la posibilidad de utilizar indicadores leñosos que exteriorizan claramente los síntomas típicos.

También se puede transmitir por la picadura de insectos como *Pseudococcus citri* (Cabaleiro y Segura, 1997), *P. longispinus* y *P. calceolariae* (Petersen y Charles, 1997).

4) DIAGNÓSTICO

Indicadores leñosos

Dentro del género *Vitis* se utilizan, con resultados satisfactorios en general, diversos indicadores entre los cuales se puede citar: **Cabernet sauvignon, Pinot noir, Mission, LN33, Cabernet franc y Baco 22A.**

Serología

En los últimos años se ha venido utilizando el ensayo serológico, conocido con las siglas ELISA, con resultados bastante satisfactorios en la mayoría de los casos (Habibi et al, 1996; Prota, 1996).

5) ESTRATEGIA Y MEDIOS DE PROTECCIÓN

En las plantaciones afectadas, no existe actualmente otra solución que proceder al arranque total de las cepas, cuando la producción deje de ser rentable, utilizando para la nueva plantación material vegetal certificado, es decir, exento de virosis.

Los aportes de fertilizantes nitrogenados, abonos foliares, quelatos de hierro, etc., pueden atenuar a corto plazo los síntomas depresivos debidos a la virosis, pero de ningún modo eliminar el problema.

2.3. Selección de plantas sanas procedentes del campo

La repetida propagación vegetativa y el intercambio de material vegetativo a nivel mundial, ha favorecido la infección, multiplicación y diseminación de patógenos de naturaleza diversa: bacterias, hongos, virus y viroides (Rezaian, 1992).

El proceso de selección sanitaria de la vid pretende descubrir o identificar las plantas sanas ya existentes en campo. Para ello se realiza una primera fase de selección visual que tiene como resultado la eliminación de las plantas que muestran síntomas de virosis claramente identificables. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las vides infectadas que no muestran síntomas distintivos escapan del proceso de selección, permaneciendo como reservorios de virus en la población de vid. Por tanto, en una segunda fase

aquellas plantas preseleccionadas, que no muestran síntomas de virosis, deben ser sometidas a determinadas pruebas para detección de virus y sólo si estas resultan negativas se procederá a la multiplicación del material vegetal seleccionado.

A grandes rasgos el desarrollo de dicho proceso de selección sanitaria se podría resumir en los siguientes pasos:

1. Seguimiento visual de las plantaciones y preselección de las plantas que aparentemente manifiesten características genéticas, morfológicas y sanitarias idóneas.
2. Análisis vírico de las plantas preseleccionadas.
3. Multiplicación vegetativa de aquellas cuyo resultado sea negativo para las virosis de mayor repercusión económica (**Entrenudo Corto Infeccioso, Enrollado, Jaspeado y Madera Rizada**).
4. Evaluación agronómica y enológica.

La limitación más destacable es la larga duración del proceso; han de transcurrir al menos unos 10-12 años para poder entregar a los viveristas plantas madres con total garantía varietal y sanitaria.

2.4. Saneamiento del material vegetal infectado

En el caso de no haber logrado en el proceso de selección sanitaria material vegetal sano, se puede proceder a su regeneración o saneamiento, lo cual se puede conseguir aplicando diferentes técnicas de "termoterapia", "cultivo de tejidos" o combinaciones de ambas (Mannini y Gribaudo, 1999).

2.4.1. Termoterapia convencional

La técnica conocida como termoterapia se inició a finales del siglo pasado, al descubrir Kobus (citado por Llacer, 1974) que la caña de azúcar sumergida durante media hora en agua a 50 °C, daba lugar a plantas con mejor aspecto sanitario. Entonces todavía se desconocía el agente causal de la enfermedad que acarreaba enormes pérdidas al cultivo de la caña; más tarde se supo que era un virus (**Ratoon Stunt Virus, RSV**). En la actualidad en muchas partes del mundo varios miles de toneladas de esquejes se tratan anualmente en grandes depósitos antes de plantar.

En árboles frutales fue aplicada por primera vez en 1936 por Kunkel (citado por Gella, 1990), quién empleó agua caliente para eliminar el **Mosaico Amarillo** de los melocotoneros. Además, dicho autor encontró que la aplicación de calor daba mejor resultado si se mantenían los árboles durante 2-4 semanas, en cámara de aire caliente a 34-35 °C.

En 1957, Nyland (citado por Llacer, 1974) fue el primero en aplicar termoterapia a frutales de hueso infectados por virus, obteniendo buenos resultados en el saneamiento del cerezo y del ciruelo.

La termoterapia en vid, fue aplicada por primera vez en 1960 por Bovey (citado por Vuitenez et al, 1962), siendo posteriormente perfeccionada por Hewitt et al (1962), Goheen et al (1965, 1973) y otros investigadores.

Hay dos formas de aplicar la termoterapia, según la intensidad del calor y la duración de la aplicación (Llacer, 1974):

- *Termoterapia por agua caliente*: Alta intensidad/corta duración de aplicación
- *Termoterapia por aire caliente*: Baja intensidad/larga duración de aplicación.

2.4.1.1. Termoterapia por agua caliente

Se sumergen los órganos en estado de latencia, durante un tiempo que puede variar entre unos pocos minutos y algunas horas. Las temperaturas empleadas son del orden de los 50-60 °C. Este método no es aplicable durante la fase de vegetación activa, ya que dichas temperaturas dañarían las plantas. Este tipo de termoterapia tiene su máxima aplicación en el cultivo de la caña de azúcar (Kassanis y Posnette, 1961) para eliminar el virus **RSV**, **Ratoon Stunt Virus**, mediante inmersión en agua a 50°C durante dos horas. El modo de tratamiento, la temperatura y los períodos de exposición dependen de muchos factores, principalmente del tipo de patógeno: ácaros (Szendrey et al, 1995), bacterias (Burr et al, 1996; Caudwell et al, 1990, 1997; Murai et al, 1997) o virus.

2.4.1.2. Termoterapia por aire caliente

El fundamento de la técnica radica en la acción del calor sobre la multiplicación del virus, ya que a partir de ciertas temperaturas este se multiplica a una velocidad menor que el material celular de la planta (Nyland, 1962). El “bloqueo” de la actividad vírica implica la disminución de la infiltración del virus hacia los nuevos tejidos, posibilitando así la obtención de brotes no contaminados (Goheen, 1970). Los ápices distales de dichos brotes pueden ser enraizados en invernadero, obteniéndose así plantas libres de virus.

El mejor tratamiento térmico será aquel que consiga inmovilizar al máximo el virus y permita un crecimiento satisfactorio del brote. La duración del tratamiento por calor puede ser diferente, incluso para el mismo virus, según la especie y variedad infectada (Refatti et al, 1999). La temperatura y el

tiempo de exposición están limitados por la tolerancia de la planta huésped. Entre los árboles frutales, las Pomáceas toleran mejor el calor que los frutales de hueso. Los cerezos son especialmente sensibles a las altas temperaturas. En variedades y especies termosensibles, se recomienda el tratamiento a temperaturas alternas altas/moderadas de acuerdo con el ciclo día/noche.

Entre los principales investigadores que han trabajado en termoterapia por aire caliente, cabe destacar los trabajos llevados a cabo por:

Goheen y Luhn (1973) enraizaron extremos apicales (de 1 a 5 cm de longitud) procedentes de plantas madre de vid, del cv. **Thompson seedless**, infectadas por diferentes virosis: **Enrollado**, **Jaspeado** y **Madera Rizada**, que previamente habían sufrido tratamiento de termoterapia a 38 °C, por períodos de tiempo que variaban entre 60 y 317 días. Los resultados posteriores de "indexaje" demostraron que sólo el 11% de los brotes estaba libre de virus, por lo que dichos autores manifestaron que la obtención de plantas sanas de vid a partir de plantas madres enfermas por este método, no es efectiva, y además conlleva mucho tiempo.

Ottenwaelter et al (1973) eliminaron el virus del **Jaspeado** en varios clones de *V. vinifera* y *V. rupestris* de Lot por termoterapia seguida de enraizamiento de los ápices bajo "mist. Dichos investigadores introdujeron una pequeña modificación en la técnica que consistía en realizar el tratamiento de termoterapia durante dos períodos sucesivos (100/109 días), separados por un corto descanso a temperatura normal. Un aumento de la intensidad luminosa mejoró la respuesta en crecimiento y supervivencia de las plantas durante el tratamiento.

También merecen especial mención los trabajos llevados a cabo por Stelmach (1993), quien no realizó en sentido estricto un tratamiento termotérmico, sino que logró obtener plantas libres del virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** y del **Mosaico del Arabis (ArMV)**, forzando las plantas madre a 30 °C y posteriormente propagando bajo "mist" los extremos apicales con 6 cm de longitud. Las plantas así obtenidas no mostraron síntomas de infección durante siete años, resultando negativas todas las pruebas serológicas (ELISA) practicadas. Sin embargo, no consiguió eliminar el virus del **Enrollado**.

Otra aplicación, menos utilizada de la termoterapia por aire caliente, es la posibilidad de aprovechar la diferente duración del tratamiento térmico requerido para eliminar cada uno de los componentes de un complejo viral, y poner así de manifiesto su composición (Nyland y Goheen, 1962).

Los principales inconvenientes de la termoterapia por aire caliente son: lentitud, coste relativamente alto, posibilidad de seleccionar mutantes víricos termorresistentes y aleatoriedad de los resultados.

2.4.2. Técnicas de cultivo "in vitro" de tejidos vegetales

En los últimos años, el desarrollo de la industria vitivinícola, con denominación de origen y del mercado de uva de mesa, ha traído como consecuencia la transformación del viñedo tradicional en plantaciones modernas con cultivares específicos, lo que ha originado una fuerte demanda de plantas de vid (portainjertos y variedades) con garantía varietal y sanitaria (Ferro, 1989).

El conocimiento y desarrollo de las técnicas de cultivo "in vitro", ha permitido la regeneración de plantas a partir de ápices meristemáticos de forma rápida, la obtención de plantas libres de patógenos, y la conservación de genotipos de alto valor comercial (Blaich, 1985; Liuni et al, 1998).

En relación con los métodos clásicos, ofrece las siguientes ventajas (Torregrosa y Bouquet, 1993):

- Eliminar la influencia del medio ambiente, ó al menos controlar suficientemente los factores.
- Espacio y volumen reducido.
- Tiempo de respuesta rápida.
- Posibilidad de trabajar todo el año con un material homogéneo.

La técnica de cultivo "in vitro" fue puesta a punto por White (1934) y por Gautheret en 1939. Esta técnica permite el desarrollo aséptico, sobre medio de cultivo artificial, de plantas, a partir de protoplastos, de células, tejidos y órganos diversos, por ejemplo: fragmentos de tallo, de raíz, de hojas, yemas, ápices, embriones, anteras, polen, óvulos, etc.

Estas técnicas tienen un amplio y variado campo de aplicación, a saber: facilitan el estudio de los tejidos vegetales, las relaciones entre los diversos órganos de las plantas, la acción de los distintos fitorreguladores, los mecanismos de histogénesis y diferenciación celular, fenómenos de polaridad, mejora genética y sanitaria, conservación de germoplasma, etc., tanto en plantas herbáceas como leñosas.

Actualmente se aplica esta técnica a la vid, sobre todo en los aspectos de mejora sanitaria y multiplicación clonal de variedades, con tan buenos resultados que ha sido incluida dentro de los programas de investigación y selección clonal-sanitaria, de la mayoría de los países vitícolas, siendo muy utilizada como método de multiplicación y de difusión rápida de nuevos clones de nuevas variedades, procedentes de selección clonal-sanitaria o de selección genética (Gifford y Hewitt, 1961; Galzy y Compan, 1968; Goussard, 1981; Valat et al, 1981; Harris y Stevenson, 1982; Chée et al 1984; Martin et al, 1987; Duran-Vila et al, 1988). La multiplicación vegetativa "in vitro"

(micropropagación) es una técnica moderna que permite multiplicar plantas idénticas a la original en condiciones sanitarias óptimas y a una velocidad superior a las prácticas tradicionales (Skenne y Barlass, 1980; Silvestroni, 1981; Martín et al, 1987), pero puede ocasionar modificaciones morfológicas epigenéticas y genéticas, por lo que se deben tomar ciertas precauciones antes de difundir el material vegetal así obtenido (Grenan, 1979, 1984).

En plantas producidas por cultivo "in vitro" de tejidos se ha observado mayor pigmentación por antocianos de los brotes, peciolos de las hojas y nervios, cambios en la forma de la hoja e incremento de la pubescencia en la superficie inferior (Altmayer, 1990; Hartl et al, 1990; Koruza y Jelaska, 1993; Martínez, 1996; Heloir et al, 1998). En **Corvina veronese**, Cancellier y Cossio (1988) observaron cambios en la pubescencia y forma de la hoja, coloración de brotes y menor productividad. Sin embargo, Chée y Pool (1982) no observaron modificaciones en el cultivar **Rougeou**. Liuni et al (1998) indicaron que el mantenimiento de los caracteres juveniles está muy relacionado con el sistema de poda empleado, siendo aconsejable realizar una poda larga.

También se utilizan las técnicas de cultivo "in vitro" en la realización de pruebas de sensibilidad a numerosos parásitos: mildiu, oídio, eutipiosis, botritis, necrosis bacteriana, nematodos, etc. (Bouquet, 1988; Trillas et al, 1997), permitiendo así apreciar una variabilidad preexistente o artificialmente creada (Torregrosa y Bouquet, 1993).

Otras aplicaciones del cultivo "in vitro", dentro del proceso de selección clonal-sanitaria de la vid, son:

- a) La creación de un banco de plantas libres de virus (Germoplasma), manteniendo las plantas "in vitro", en una cámara fría a 9 °C, durante un largo período de tiempo (Çelik y Batur, 1990).
- b) Monette y James (1990) utilizaron las técnicas de cultivo "in vitro" en virología de la vid para la transmisión mecánica de partículas parecidas a closterovirus (CVLPs) a huéspedes herbáceos (*Nicotiana benthamina*); también utilizó dichas técnicas en la purificación y análisis de ácidos nucleicos víricos. Savino (1993) igualmente utilizó las técnicas de cultivo de tejidos para el aislamiento y extracción de closterovirus de tejidos de vid y Martelli (1993), utilizó dichas técnicas para la extracción de virus isométricos.

Entre las técnicas de cultivo "in vitro" empleadas para eliminar los distintos virus destacan:

- a) El cultivo de segmentos nodales, procedentes de la fragmentación de la

planta madre, puesto a punto por Galzy (1961, 1962, 1964) para la realización de tratamientos por termoterapia "in vitro". Permite eliminar ciertas virosis, como el **Entrenudo Corto Infeccioso, Enrollado y Jaspeado**, aplicándolo simultáneamente a gran cantidad de plantas.

- b) Por otra parte y debido a la "casi" ausencia de virus y patógenos afines en las zonas meristemáticas, el cultivo "in vitro" de meristemos, ápices meristemáticos y el microinjerto, han dado resultados positivos en la eliminación de muchos de estos patógenos, por lo que puede constituir una solución en la lucha contra ciertos virus y viroides (Duran-Vila et al, 1988) difíciles de eliminar por termoterapia. De hecho el cultivo de ápices caulinares de pequeño tamaño, se ha descrito y empleado para la obtención de plantas libres de virus de numerosas especies y variedades incluyendo la vid (Bini, 1976; Mur, 1979; Bass y Legin, 1981; Barlass et al, 1982; Jakó, 1986; Casal, 1990).
- c) El cultivo de fragmentos de ápices de vid, es utilizado para regenerar plantas libres de virus; esta técnica fue puesta a punto por Barlass et al en 1982, quienes consiguieron eliminar los virus del **Entrenudo Corto Infeccioso, Enrollado y Jaspeado**, al combinar dicha técnica con la terapia de calor (35 °C).

2.4.2.1. Microinjerto

La técnica del microinjerto de meristemos la pusieron a punto Murashige et al (1972) con resultados positivos en la eliminación de varios virus de *Citrus*. El microinjerto resulta de gran importancia, en el caso de aquellas especies leñosas en las cuales el cultivo de meristemos sea difícil o un brote obtenido por cultivo de meristemos no sea capaz de formar raíces; entonces es posible injertar el meristemo o ápice meristemático, sobre un patrón libre de virus cultivado "in vitro".

Ayuso y Peña-Iglesias, (1978) mediante microinjerto de ápices de vid de 2-3 mm de longitud, sobre indicadores enraizados en medio de cultivo, obtuvieron síntomas de **Enrollado y Jaspeado**. En cambio, con meristemos de 0,2-0,3 mm, no se observaron síntomas de estas enfermedades, después de seis meses. Otra aplicación del microinjerto es como método de diagnóstico virológico. Tanne et al (1993), detectaron **Madera Rizada y Enrollado** por medio del microinjerto.

El método consiste en injertar de forma aséptica un ápice (de 0,5 a 1 mm de longitud) sobre plantas de semilla de 10 ó 12 días, desarrolladas "in vitro" y preferentemente en la oscuridad. Después del microinjerto las plantas se

cultivan en un medio líquido aséptico, de esta forma se obtiene un 45-70% de prendimientos. Al cabo de 3 a 5 semanas se trasplanta a suelo con una supervivencia del 60-70%. Entre los principales investigadores que han realizado el microinjerto en vid cabe destacar: Bass y Vuittenez (1976); Bass et al (1978); Engelbrecht y Schwerdtfeger (1979). Posteriormente Peña-Iglesiás y Ayuso (1980) propusieron una modificación del método realizando el injerto lateral del meristemo sobre un brote del portainjerto con función de indicador, para verificar la ausencia del virus. También D'Khili y Grenan (1995), utilizaron la técnica del microinjerto para el diagnóstico rápido de la **Necrosis de Nervios**.

El proceso de selección sanitaria de la vid, iniciado a nivel oficial en España en 1986, incluye también el desarrollo de estas técnicas, en los aspectos citados de regeneración de material enfermo y multiplicación clonal de plantas madres sanas (Borgo et al, 1998).

2.4.2.2. *Cultivo de meristemos y ápices caulinares*

En las últimas décadas el cultivo de meristemos ha sido utilizado en propagación agámica en vista de la rapidez con que se consigue la multiplicación de diversos vegetales (Bini, 1976; Aldwinckle y Buturac, 1980; Corte y Mendonça, 1985; Barlass y Skene, 1978). Además, como ya hemos indicado, la posibilidad de regenerar una planta a partir de un meristemo presenta una alta probabilidad de obtener plantas libres de virus, especialmente al asociar el cultivo "in vitro" con termoterapia (Stace-Smith, 1968; Sward y Hallam, 1976; Grenan, 1984; Valat, 1986; Lê et al, 1991).

El saneamiento de plantas infectadas mediante cultivo "in vitro" de meristemos, se basa en la distribución no uniforme de los patógenos, en el cuerpo de la planta huésped. White (1934) demostró que el virus del **Mosaico del Tabaco (TMV)** se distribuía de forma desigual por las diferentes zonas de la raíz del tabaco, encontrándose una baja concentración en su extremo y estando el meristemo libre de virus. Limasset y Cornuet (1949) propusieron la existencia de un gradiente de virus semejante en los vástagos de las plantas de tabaco. En 1952, Morel y Martín aislaron y cultivaron "in vitro" meristemos apicales de dalias infectadas con virus, obteniendo a partir de aquellos plantas libres de virus.

Se ha comprobado que los ápices caulinar y radicular, de la mayoría de las especies de plantas infectadas, frecuentemente contienen títulos virales muy bajos, no habiéndose encontrado virus en el domo meristemático (White, 1934). En algunas especies, por el contrario, se han encontrado partículas víricas en los meristemos.

Actualmente se aceptan diferentes hipótesis que intentan explicar esta distribución:

- a) Ausencia de un sistema vascular (Meshi y Okada, 1986) que dificultaría en gran medida el transporte de las partículas víricas. Cuando se extienden de una célula a otra, han de hacerlo más lentamente a través de plasmodesmos. Por ello, es relativamente difícil para ellos infectar completamente el tejido meristemático, donde el tejido vascular no se ha diferenciado.
- b) La alta actividad mitótica de las células meristemáticas (Hu y Wang, 1983) podría suponer un importante impedimento para la síntesis del RNA necesario para la replicación viral, estableciéndose de este modo una competición entre la división celular y la multiplicación vírica (Wu et al, 1960). En tejidos en división activa la síntesis de nucleoproteínas normales requeridas para la división celular predominaría sobre la síntesis de proteínas víricas que se producen más tarde cuando la actividad mitótica celular decrece (Quak, 1965). Aunque determinadas observaciones sostienen esta hipótesis (Crowley y Hanson, 1960) otras indican un claro efecto del medio o de las condiciones de cultivo en la inactivación y eliminación de virus por cultivo de ápices meristemáticos (Hollings y Stone, 1964; Walkey y Webb, 1968).
- c) Si se admite la existencia de un sistema de inactivación viral, la actividad en la región apical puede ser más elevada que en otras regiones, pudiendo así proteger las células de la región meristemática de ser infectadas. Otros autores propusieron que la baja concentración de los virus en los meristemas se debe a la presencia de inhibidores naturales; estos inhibidores explicarían por que las semillas, frecuentemente se encuentran libres de virus (Hollings y Stone, 1964).

Entre los patógenos que han sido eliminados en vid mediante cultivo de meristemas, citaremos a título de ejemplo: *Agrogacterium tumefaciens* (Altmayer, 1990; Thies et al, 1992) y los viroides **Grapevine Yellow Speckle (GYSVd, 1; GYSVd, 2)** (Duran-Vila, 1988). En el caso particular de la eliminación de virus, citar los trabajos realizados en vid por diversos autores como Gifford y Hewitt (1961), Hoeffler y Gifford (1964), Galzy y Compan (1968), Barlass y Skene (1978), Valat et al (1981), Altmayer (1989, 1990), Casal (1990), Savino (1990), Staudt (1990), Koruza y Jelaska (1993), Staudt y Kassemeyer (1994).

Como ya hemos indicado el meristemo no siempre está libre de infección viral. Sheffield (1942) y Lackey (1946) [citados por Pierik (1990)] describieron la presencia del virus del **Mosaico del Tabaco (TMV)** en meristemas

caulinares de tabaco y tomate. Appiano y Penazio, (1972) detectaron partículas del virus X en los meristemos de patata.

Teniendo en cuenta lo anterior, resulta lógico pensar que un aumento en el tamaño del explanto inicial llevará consigo una disminución de la eficacia de erradicación vírica. De hecho, Borgo (1992), cultivando “in vitro” ápices meristemáticos (de 1 a 1.5 mm de longitud) de dos variedades de vid, **Sangiovese** y **Torbato**, afectadas por el virus del **Enrollado**, sólo logró un porcentaje de saneamiento del 23% para la variedad **Torbato** y del 29% para **Sangiovese**. Arancibia (1988), cultivando “in vitro” ápices del cultivar **Black seedless**, infectados por el virus del **Enrollado (GLRaV, 2)**, concluyó que dicha técnica no era efectiva para eliminar dicho serotipo. Sin embargo, Fanizza et al (1983), efectuaron 4 subcultivos consecutivos de ápices de *Vitis vinifera* cv. **Primitivo**, afectados por el virus del **Enrollado**; el microscopio electrónico reveló la ausencia de closterovirus al final del segundo subcultivo.

También hay que considerar que, así como el cultivo de meristemos se utiliza por ejemplo de forma rutinaria en el saneamiento de la fresa, es difícil de aplicar en especies leñosas, ya que la posibilidad de que un meristemo sobreviva sin primordios foliares es muy pequeña (Stace-Smith, y Mellor, 1968; Navarro, 1983) y además no siempre es conocida la composición óptima del medio de cultivo. Por otra parte, en algunos casos a partir de los meristemos se forman callos indiferenciados de los que puede o no producirse la posterior diferenciación y regeneración de plantas, algunas de las cuales pueden ser variantes somaclonales o mutantes genéticos.

2.4.3. Técnicas combinadas de cultivo “in vitro” y termoterapia

2.4.3.1. Cultivo de ápices caulinares y termoterapia “in vitro”

Se utiliza para sanear plantas que son muy sensibles a las temperaturas elevadas, de este modo pueden recibir un tratamiento por calor más largo a temperatura alta-moderada (34-38 °C). Entre los autores que han realizado termoterapia “in vitro” en vid, cabe destacar los trabajos llevados a cabo por:

Galzy (1961, 62, 64, 66, 69a), quien puso a punto una metodología de saneamiento de plantas afectadas por el **Entrenudo Corto Infeccioso** y otros virus, consistente en aplicar termoterapia a plantas axénicas de vid. La planta es cultivada “in vitro” sobre un medio de cultivo pobre en sales minerales y sin fitoreguladores. Para efectuar este tipo de tratamiento utilizó una estufa apropiada. Simultáneamente, Galzy (1969b) profundizó en la investigación del medio de cultivo para realizar la micropropagación me-

dianate cultivo de segmentos uninodales de la vid sana, posibilitando la comparación entre el comportamiento “in vitro” de vid sana y virosada.

Monette (1986) también eliminó el virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** y del **Mosaico del Arabis**, realizando un tratamiento de termoterapia “in vitro” durante 40 días (39 °C durante 6 horas, seguido por 18 horas a 22 °C).

Mur et al (1979), aplicando la metodología de Galzy, obtuvieron la curación del virus del **Enrollado**, después de 70 días a 38°C, observando que temperaturas más elevadas pueden conllevar una mayor mortalidad de las plantas. El método de termoterapia “in vitro” fue también empleado por Valat y Mur (1976), sobre el cultivar **Cardinal rouge**, por Peña-Iglesias y Ayuso (1973) y Sasahara et al (1981), sobre cultivares españoles.

También destacar los trabajos de Ferro (1989) y Cantos et al (1993) que lograron eliminar el virus del **Entrenudo Corto Infeccioso**, realizando técnicas combinadas de cultivo de ápices caulinares y termoterapia “in vitro” a 38 °C, durante 18-40 días. Así como los trabajos llevados a cabo por Barba et al (1992) y Hatzinicolakis y Roubelakis et al (1993), quienes eliminaron el virus del **Entrenudo Corto Infeccioso**, manteniendo los cultivos a 37-38 °C, durante 30-70 días, logrando un 57% de supervivencia en los explantos.

En las plantas obtenidas por Cantos et al (1993) se observaron signos relacionados con la inducción de caracteres juveniles. De hecho ya en 1979, Mur señaló que el tratamiento de termoterapia “in vitro” provoca un rejuvenecimiento del material tratado, pero que las características de rendimiento y riqueza de los frutos no se ven desfavorablemente afectados. Otros autores que destacan variaciones inducidas durante el tratamiento de termoterapia “in vitro” son: Bovey et al (1973), Valat y Rives (1973) y Valat (1986).

Valat et al (1981) realizaron observaciones sobre las aptitudes de algunas variedades de portainjertos y de *Vitis vinifera*, tratados por termoterapia “in vitro”. Con respecto al estado sanitario encontraron que habían eliminado los virus: **Entrenudo Corto Infeccioso**, **Jaspeado** y **Enrollado** lo que demuestra la gran eficacia de este método. Respecto a las características de producción encontraron que la termoterapia produce un incremento de vigor en los portainjertos, mientras que en las variedades de *V. vinifera* las características ampelográficas estaban muy modificadas, siendo las de producción variables según las cepas. En la bibliografía consultada encontramos que ciertos autores muestran que el material tratado es más productivo y más vigoroso (Bovey et al, 1980; Schoffling, 1981; Woodham et al, 1984; McCarthy et al, 1989), siendo el aumento de vigor proporcional al número de períodos de termoterapia que la planta ha recibido (Mur y Markovih, 1978). Otros cons-

tataron, por el contrario, una menor producción en los clones tratados que sin tratar (Grenan, 1982).

2.4.3.2. Termoterapia "in vivo" y cultivo de ápices caulinares

La utilización conjunta del cultivo de ápices y el tratamiento térmico "in vivo" tiene la doble finalidad de poder incrementar, por un lado, el enraizamiento y desarrollo de los ápices distales de los brotes en condiciones de invernadero y, por otro, aumentar el tamaño del explanto utilizado para el establecimiento de los cultivos "in vitro" –de modo que en vez de trabajar a nivel de meristemo, lo hagamos a nivel de ápice–. Así la aplicación previa de termoterapia "in vivo" constituiría una modificación o mejora del cultivo de meristemos que, al permitir trabajar con ápices de 0,5 a 1 cm de longitud en lugar del simple domo meristemático, más uno o dos primordios de hoja y una longitud total entre 0,1 y 0,5 mm, aumenta notablemente la facilidad de manejo y el porcentaje de éxitos (Llacer, 1974).

Gifford y Hewitt (1961) fueron los primeros investigadores que aplicaron la termoterapia combinada con el posterior cultivo "in vitro" de ápices para la erradicación del virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** a partir de cepas infectadas de *V. rupestris* cv. **St. George** y *V. vinifera* cv. **Mission**; el problema fue el bajo porcentaje de enraizamiento de los ápices obtenido, 2%.

Credi y Babini (1997) realizaron termoterapia "in vivo" (37 °C, durante 20-60 días) seguida por el posterior cultivo de ápices "in vitro" para eliminar diversos virus, a saber: **Enrollado, Jaspeado y Acanalado del Kober 5BB (KSG)** en diferentes cultivares de *V. vinifera*, obteniéndose una eficacia de eliminación del virus del 65%.

También Guidoni et al (1997) eliminaron los virus del **Enrollado** y de la **Madera rizada** en el clon Nebbiolo, mediante termoterapia "in vivo" (37 °C, durante 140 días) seguida por la excisión de los ápices que fueron cultivados "in vitro", obteniéndose una descendencia libre de dichos virus.

Vemos así que esta combinación de técnicas resulta altamente eficaz para la limpieza y mantenimiento de la planta exenta de virus. Por los buenos resultados que proporciona es la más utilizada hoy en día para la eliminación de determinados virus. De hecho, Arancibia (1990) no logró obtener plantas libres del virus del **Enrollado**, al realizar solamente el cultivo "in vitro" de ápices meristemáticos procedentes de plantas infectadas del cv. **Black seedless** y, sin embargo, sí que lo logró al realizar un tratamiento previo de termoterapia.

Comparación de técnicas

Para comparar el tratamiento termoterápico “in vivo” frente al realizado “in vitro”, podemos comentar los trabajos llevados a cabo por Doazan et al (1979), quienes realizaron ensayos de termoterapia en maceta e “in vitro” para eliminar los virus del **Jaspeado**, **Enrollado**, **Corky bark** y **Necrosis de Nervios**, en 4 cultivares de vid. Dichos autores observaron que las plantas establecidas en maceta soportaban mayor temperatura (39 °C) que “in vitro” (37 °C), necesitando menos tiempo para su saneamiento.

La eficacia de la termoterapia tradicional "in vivo" frente a su combinación con el posterior cultivo “in vitro” de los extremos apicales es sensiblemente inferior. Ello queda demostrado en los trabajos de Goheen y Luhn (1973) que, al enraizar bajo condiciones de invernadero los extremos apicales (de 1 a 5 cm) de planta madre de vid, sólo obtuvieron un 11% de planta libre de virus (**Enrollado**, **Jaspeado** y **Madera Rizada**), mientras que al realizar el cultivo “in vitro” de ápices caulinares, obtuvieron un mayor porcentaje de planta libre de virus. También Savino (1990), al realizar el enraizamiento de extremos apicales bajo "mist", sólo logro un 20% de eliminación del virus de **Enrollado**, sin embargo al utilizar el cultivo “in vitro” de ápices dicho porcentaje se elevó hasta el 100%.

Comparación del material vegetal infectado y saneado

Diversos investigadores han comparado el material vegetal infectado y saneado después de sufrir termoterapia tradicional "in vivo" o combinada con el cultivo de ápices caulinares "in vitro". Algunos han encontrado una notable mejoría en diversos parámetros, por ejemplo, Bass y Legin (1981), al eliminar el **Enrollado** mediante termoterapia, observaron un mayor vigor y rendimiento que en las cepas infectadas por dicho virus (cuatro veces mayor). También Schoffling (1981), Conradie (1989), McCarthy (1989) y Guidoni et al (1997), después de realizar termoterapia para eliminar diversos virus: **Jaspeado**, **Enrollado**, y **Madera Rizada**, encontraron una mayor producción, vitalidad y crecimiento vegetativo, en los clones tratados.

Mannini (1993), al regenerar plantas de tres cultivares de vid infectados por los virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** y **Enrollado**, sometidos a termoterapia, observó un incremento del vigor y de la producción en las plantas regeneradas, que era mucho mayor al eliminar el virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** que con la eliminación del **Enrollado**, resultando en este caso los cambios menos evidentes.

Sin embargo, otros investigadores como Basler (1981) y Woodham (1984) no encontraron diferencias significativas de rendimiento y calidad entre los clones tratados y no tratados por calor, al menos en los parámetros analizados: producción, crecimiento anual y composición de la uva.

3. MULTIPLICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL LIBRE DE VIRUS EN CONDICIONES QUE IMPIDAN SU REINFECCIÓN

3.1. Medidas preventivas y de control del estado sanitario del material

Los resultados de las pruebas de detección de virus, nos permite certificar la no presencia de los virus analizados, pero podría haber otros. En consecuencia no existe en el mercado ningún material vegetal con certificación de sanidad total, ya que esta sólo se hace en relación a determinadas virosis (Walter y Martelli, 1996).

Ahora bien, el que una planta haya sido saneada de una determinada enfermedad no significa que esta planta no pueda reinfectarse de nuevo si se dan los requisitos epidemiológicos necesarios. En otras palabras, saneamiento es distinto a resistencia. Una planta es resistente a una enfermedad, cuando posee unas características tales que le permiten no ser susceptible de contraer aquella enfermedad (Pierik, 1990).

Como el material libre de virus, puede ser reinfestado se deben tomar medidas preventivas como son:

- 1) Las plantas se deben cultivar en invernadero libre de infecciones y de vectores. Las macetas y substratos deberán estar igualmente exentos de parásitos
- 2) Se requieren unas mínimas normas higiénicas: desinfección de manos, ropa, zapatos, así como de los instrumentos utilizados para las diversas labores culturales, impidiendo cualquier transferencia mecánica durante el cultivo.
- 3) Se deberá controlar a los vectores, sobre todo insectos y nematodos, eliminando de forma continua cualquier foco de infección, manteniendo el suelo desnudo y con tratamientos insecticidas preventivos.
- 4) Control visual y analítico de todos los árboles mediante las mejores técnicas de detección de virus disponibles en cada momento. La frecuencia de realización de análisis, dependerá de las virosis implicadas, su modo y velocidad de difusión, las medidas de aislamiento y otras precauciones tomadas para asegurar la ausencia de infección.

-
- 5) Para tener una mayor seguridad, se recomienda que el material vegetal libre de enfermedades se conserve “in vitro”

3.2. Técnicas de multiplicación vegetativa

3.2.1. Injerto sobre patrón en condiciones sanitarias idóneas

Los ápices de los brotes desarrollados durante el tratamiento térmico, constituyen un material tierno y delicado que dificulta el éxito de la multiplicación. Son varios los factores a tener en cuenta para tratar de aumentar el porcentaje de prendimientos:

- Estado de desarrollo del ápice y del portainjerto. Deben estar en el mismo estado y, puesto que el del ápice es herbáceo y turgesciente, ese deberá ser también el estado del portainjerto (Maroquin, 1970).
- Edad del portainjerto. Según lo anterior, los mejores resultados deberían obtenerse con los patrones jóvenes de semilla. Sin embargo, no es la edad del patrón lo que influye, sino la del brote sobre el que se injerta (Naumann, 1970). Así pues, los patrones no tienen que ser necesariamente jóvenes, siempre que se rebajen adecuadamente. Lo importante, según Marenaud (1970), es injertar cerca del sistema radicular para obtener el mejor crecimiento.
- Época en la que se realiza el injerto. Viene determinada por la época en que se realiza el tratamiento y como ya dijimos los mejores y mayor número de ápices injertables se obtenían en los tratamientos que se realizaban a primeros de año. Estos ápices se encuentran luego, tras el crecimiento de todo el verano, en las condiciones óptimas para pasar el invierno (Maroquin, 1970).
- Cuidados posteriores al injerto. Es imprescindible proteger los ápices recién injertados contra la desecación. Para ello hay que colocar las plantas en nebulización (Campell, 1970) o en su defecto, recubrir los ápices injertados con pequeñas bolsas de plástico transparente, que serán luego retiradas progresivamente a partir de las tres semanas (Maroquin, 1970). La atmósfera del interior de las bolsitas puede favorecer los ataques criptogámicos, por lo que antes de colocarla conviene tratar los ápices con fungicidas. Este tratamiento puede repetirse, si es necesario, retirando momentáneamente las bolsitas. Una vez retiradas definitivamente, hay que seguir protegiendo los ápices en crecimiento de una insolación excesiva (Naumann, 1970).

Aparte de estos factores controlables, hay que tener en cuenta que no

todas las especies tienen la misma facilidad para multiplicarse por injerto apical.

3.2.2. Estaquillado herbáceo en camas calientes bajo nebulización

El estaquillado de los ápices es una práctica cuya utilización se limita al caso de algunos portainjertos, ya que la mayoría de especies enraízan muy mal en estas condiciones (Campbell, 1970).

De entre los diversos factores que influyen en el éxito del estaquillado en general, algunos son favorables al material procedente de termoterapia y otros no. Así por ejemplo:

- El estado de crecimiento del pámpano utilizado; a un crecimiento más activo corresponde un mayor rendimiento de estaquillado.
- La edad de la planta madre, cuanto más joven, mayor porcentaje de estaquillas válidas.
- La posición de la estaquilla en el pámpano madre; al principio del período de crecimiento, las mejores estaquillas son las de la base del pámpano (tejidos más diferenciados).

Los dos primeros factores son favorables a un buen enraizamiento del material procedente de termoterapia, ya que este material es joven y se halla en una fase de crecimiento activo. El último factor por el contrario es desfavorable, dado el carácter indiferenciado de los ápices. Por lo tanto, incluso si los otros factores son muy favorables, no deben esperarse tampoco rendimientos muy elevados, en la multiplicación de los ápices por estaquillado herbáceo (Monin, 1970).

Los problemas de la multiplicación de los ápices no terminan una vez prendidos por injerto o enraizados. Pueden producirse todavía algunos hechos que lleven al fracaso toda la operación. Por ejemplo:

- La transformación de las yemas vegetativas en botones de flor, como resultado de una interrupción demasiado prolongada del crecimiento.
- La falta de rusticidad de las plantas de cara al invierno siguiente.

3.2.3. Propagación clonal “in vitro”

Durante los últimos años se está utilizando la técnica de cultivo “in vitro” como una medida alternativa de la propagación asexual para plantas con interés económico.

El principio de este método consiste en inducir la brotación de yemas axilares durmientes, por la inclusión de citoquininas en el medio de cultivo;

posteriormente la eliminación de dichas citoquininas permitirá el desarrollo de raíces y, con ello, la obtención de una planta entera. La propagación por cultivo “in vitro” representa la gran ventaja frente a la propagación vegetativa clásica: injerto, acodo, esquejes, etc., de poder aumentar la tasa de propagación de especies de gran valor comercial –como podría ser una planta libre de virus.

Para ello se hace necesario una serie de requisitos como son:

- a) El mantenimiento de unas condiciones de esterilidad, esenciales para evitar que puedan desarrollarse microorganismos que ocasionarían la muerte del material vegetal.
- b) La formulación de un medio nutritivo adecuado que aporte los requerimientos nutritivos necesarios para el crecimiento y desarrollo de los tejidos.

MICROPROPAGACIÓN DE LA VID

1. EL CULTIVO “IN VITRO” DE MATERIAL VEGETAL

1.1. Fundamentos

Fundamentalmente, las técnicas «in vitro» se basan en una característica esencial de las especies vegetales; la totipotencialidad de sus células (Margarita, 1988), es decir, no solamente una parte de la planta, por ejemplo un esqueje puede originar una planta entera, sino que una sola célula tiene también esta capacidad.

El cultivo de tejidos, así como sus aplicaciones prácticas, ha contribuido también de forma importante a nuestro conocimiento básico de la célula. La teoría celular de Schwann y Schleiden (1838-39), en la cual la célula se describe como la unidad biológica más pequeña -a la que se puede considerar totipotente- ha sido respaldada por el cultivo de tejidos: una célula aislada es capaz de dar lugar a una planta completa.

Los objetivos de los cultivos de tejidos varían desde estudios sobre patología, bioquímicos, fisiológicos, morfogenéticos (que intervienen en la diferenciación de partes aisladas de la planta), metabólicos y de desarrollo de las plantas. Entre ellos podríamos citar:

1. La micropropagación de determinadas especies (Soulle et al, 1993; Forneck et al, 1996; Liuni et al, 1998).
2. Obtención de plantas libres de algún patógeno determinado: bacterias, virus o nematodos (Dai et al, 1995; Rodríguez et al, 1997). Asimismo el cultivo de tejidos es de gran interés para comprender las relaciones huésped-parásito (Trillas et al, 1997) e investigación de posibles resistencias. También para el estudio de la forma u origen de la desorganización celular, como pueden ser los tumores, su bioquímica, y la acción de diversas sustancias inhibitoras sobre los mismos (Gribaudo, 1985).
3. Asimismo el cultivo de tejidos vegetales ha sido de gran utilidad en el estudio de reguladores del crecimiento vegetal, nutrición celular, meca-

nismos de histogénesis y diferenciación, fenómenos de polaridad e inducción y efectos de diferentes sustancias sobre la respuesta celular (Casanova et al, 1997; Feucht et al, 1996).

4. En los últimos años, estas técnicas se están aplicando con fines de selección y mejora genética (González-Nebauer et al., 1997; Sales et al., 1997; Benelli et al., 1999). Así, algunas técnicas como el cultivo de embriones, óvulos y ovarios, permiten mejorar el rendimiento y eficiencia de los programas de mejora tradicional, al igual que los cultivos de células aisladas, anteras y microesporas (Murashige, 1977).
5. Después del aislamiento con éxito de protoplastos viables de vid, a partir de los cuales se pueden regenerar plantas completas, se ha creado una alternativa, la hibridación somática, a las técnicas de propagación convencionales (hibridación sexual o cruzamiento). La posibilidad de poder formar individuos por fusión de protoplastos supone que, en principio, es posible salvar las barreras genéticas naturales. La hibridación somática hace posible también la creación de híbridos citoplásmicos (cíbridos) (Olivares et al, 1997).
6. Técnicas como el trasplante de núcleos (o partes de), cromosomas y orgánulos han sido investigados por genetistas, mejoradores y biólogos moleculares (Harst, 1995).
7. También se están llevando a cabo estudios de transformación genética en vid, en concreto Martinelli, (1995) regeneró plantas transgénicas de *V. rupestris* Scheele, realizando embriogénesis somática a partir de callo de peciolo: el cocultivo de embriones individuales con *Agrobacterium tumefaciens*, durante la inducción de embriogénesis secundaria, produjo los clones celulares deseados. También Gribaudo (1995) realizó investigaciones genéticas similares utilizando *Agrobacterium rhizogenes* como vector génico.

Vemos pues, que el cultivo «in vitro» ha facilitado considerablemente el progreso en varios campos, tales como: producción en horticultura, erradicación de enfermedades originadas por virus, selección y mejora genética de plantas, conservación de fuentes genéticas, etc. (Galzy, 1990; Kitto, 1997; Liuni et al, 1998). En general, el cultivo de tejidos permite al investigador utilizar una serie de técnicas controladas y fácilmente reproducibles, ya que la composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación son conocidas y reproducibles.

Actualmente se propagan “in vitro” alrededor de 1000 especies, sin embargo no todas pueden ser micropropagadas a escala comercial (Kitto,

1997); las investigaciones continúan pues es necesario lograr un aumento en la velocidad de propagación, así como una producción de calidad y un precio competitivo.

Desde 1975, el cultivo «in vitro» de las plantas superiores ha experimentado un espectacular desarrollo. En los laboratorios de investigación se han desarrollado los métodos para el cultivo de plantas, semillas, embriones, ápices, meristemos, tejidos, células y protoplastos sobre medios nutritivos estériles, con el resultado de la producción y regeneración de individuos viables de muchas especies de plantas. Desde 1980, ha habido una explosión en el desarrollo de la manipulación genética mediante técnicas “in vitro” (Pierik, 1990).

Hoy en día, se tiende a la automatización, para reducir el costo del proceso y disminuir la mano de obra. Se han realizado progresos significativos con biorreactores, varias formas de semiautomatización y robótica (Kitto, 1997; Roig et al, 1997). Sin embargo, existe escaso desarrollo en automatización para uso comercial, puesto que existen diversos problemas que requieren solución a la hora de automatizar, estos son: hiperhidricidad en medio de cultivo líquido, contaminación microbiana, repetitividad, costo efectivo, elección de materiales, sincronización de crecimiento, eliminación de tejido no deseable, estabilidad genética, rendimiento de plantas y selección de métodos (Aitken-Christie, 1995; Scordo, 1998).

En vid las finalidades de investigación están dirigidas a encontrar una respuesta adecuada en términos de calidad y cantidad a los problemas de premultiplicación del material vitícola y estudios de mejora genética y sanitaria. Asimismo, la planta producida «in vitro» puede representar un seguro y rápido método para el intercambio y la difusión de nuevas variedades, así como una técnica válida de conservación para el mantenimiento del germoplasma (Moukadiri et al, 1997; Tanne, 1997).

De acuerdo con Pierik (1990), estas técnicas se caracterizan porque:

1. Ocurren a microescala, por ejemplo, sobre una superficie relativamente pequeña. La miniaturización supone un menor tamaño del material vegetal con el que se inicia el proceso. Asimismo, las plantas cultivadas «in vitro» tienen un tamaño reducido, por lo que pueden cultivarse a gran densidad: centenares de plantas por metro cuadrado de estantería, lo que supone un ahorro de espacio, de superficie de viveros, de coste de mantenimiento y de labores.
2. Se optimizan las condiciones ambientales en lo que se refiere a los factores físicos, nutricionales y de reguladores de crecimiento.

3. Se excluye la presencia de microorganismos (bacterias y hongos, principalmente), así como también de plagas (insectos y nematodos), lo que supone un mantenimiento del cultivo en condiciones asépticas y con garantía de mantenimiento del estado sanitario de las plantas durante su cultivo «in vitro».
4. Generalmente, no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, resultando que un tejido aislado puede dar origen a un callo o puede desarrollarse de otras formas poco usuales (por ejemplo, formación de órganos, embriogénesis somática, etc.).
5. La capacidad de cultivar protoplastos, o células individuales, permite manipulaciones que antes eran imposibles.
6. El nombre de cultivo «in vitro» (que literalmente quiere decir «en vidrio») se utilizó porque, al menos inicialmente, se emplearon recipientes de vidrio para el cultivo.

1.2. Historia

La historia del cultivo de tejidos comenzó en 1838-1839, cuando Schleiden (1838) y Schwann (1839), independientemente enunciaron la teoría celular básica, postularon que la célula tiene autonomía y formularon la teoría de la totipotencialidad; la cual establece que las células son autosuficientes, y que en principio son capaces de regenerar una planta completa. Su teoría fue de hecho el núcleo del que nació el cultivo de tejidos y células. Esto es obvio en el caso de huevos y esporas que son capaces de transformarse ellos mismos en organismos completos. Fueron necesarios, alrededor de 130 años, para demostrar la totipotencialidad celular, después de una larga y tortuosa investigación.

Trécul (1853), describió un proceso de cicatrización de heridas y formación de callo que afectaba a numerosas especies vegetales. Vöchting (1878) observó algunos casos de desarrollo de callo, algunos de los cuales eran de gran tamaño. Dos años después Sachs (1880-1882), aunando los resultados obtenidos en callos y cicatrización de heridas, sugirió que las plantas contenían órganos que formaban sustancias, que eran polarmente distribuidas.

Una aproximación importante al cultivo de tejidos, la realizó Rechanger (1893), quién determinó experimentalmente el límite de la divisibilidad de las plantas, que permiten la proliferación de tejidos. Rechanger utilizó yemas, secciones de raíces, tallos, etc. Colocó los explantos sobre superficie de arena humedecida con agua, y concluyó que las piezas de mayor grosor, de 1,5 mm podían desarrollarse, pero dicho investigador no utilizó nutrientes ni

condiciones asépticas, por lo que sus cultivos apenas podían ser llamados cultivos de tejidos, sin embargo fue un verdadero pionero en los principios de los cultivos de tejidos.

El primero en realizar el cultivo «in vitro» de tejidos vegetales fue Haberlandt en 1902, quien eligió para sus investigaciones, células aisladas y como base la solución nutritiva de Knop, adicionada con sacarosa, asparagina y peptona. Desgraciadamente, sus investigaciones fracasaron al no poder mantener vivos los tejidos que estudió; pues no logró obtener división celular, las células sólo se mantuvieron vivas durante 20 a 27 días, y exhibieron en el mejor de los casos, un incremento en el volumen original, pero no en la división. Posteriormente, Simon (1908) observó el desarrollo de segmentos de tallo de álamo, que produjeron callos, raíces y yemas. La base del cultivo de callos, e incluso la micropropagación, se había establecido, pero estos cultivos no eran asépticos; de ahí que su resultado fuera ignorado.

Después de 30 años, el investigador americano White (1934) consiguió cultivar con éxito «in vitro», ápices radiculares de tomate y posteriormente, en 1938, tejidos tumorales de tabaco. White inicialmente utilizó un medio de cultivo, con extracto de levadura y sacarosa, pero más tarde reemplazó el extracto de levadura por tres vitaminas; piridoxina, tiamina y ácido nicotínico. El cultivo de tejidos vegetales había quedado un poco rezagado, con respecto al cultivo de tejidos animales y humanos, debido al tardío descubrimiento de los fitorreguladores vegetales. El primer regulador descubierto, la auxina AIA (ácido indolacético), produjo grandes oportunidades para el cultivo de tejidos vegetales. El descubrimiento en 1955 del fitoregulador, kinetina, constituyó un nuevo estímulo.

En Francia, Gautheret (1939) realizó el cultivo «in vitro» de fragmentos de cambium de diferentes especies y obtuvo proliferación de tejidos, al estimular la multiplicación celular por medio de diferentes factores de crecimiento: clorhidrato de cisteína, vitamina B₁ y AIA. De este modo, obtuvo un cultivo indefinido de tejidos vegetales (utilizando raíces de zanahoria), que supuso el primer cultivo de tejidos auténtico. Simultáneamente, Nobecourt (1939) obtuvo resultados comparables utilizando raíces de zanahorias y tubérculos de chufa, mientras que en 1944 Morell realizó con éxito el cultivo «in vitro» de tejidos de cambium de vid.

En la segunda mitad del siglo XX, las investigaciones se aceleraron considerablemente. En 1957, Skoog y Miller, pusieron en evidencia el equilibrio auxina/citoquinina, sobre la orientación de la organogénesis en los tejidos cultivados «in vitro». Las experiencias de Skoog y Miller, dieron lugar al concepto de reguladores del crecimiento; demostrando que la diferenciación

de brotes o raíces en cultivos de callo, estaban en función de la relación auxina/citoquinina y que la diferenciación de órganos se podía regular cambiando las concentraciones de dichas sustancias en el medio de cultivo. Así, altas dosis de auxina promueven el enraizamiento, mientras que altos niveles de citoquinina inducen la formación de brotes. En el caso de concentraciones iguales, se tiende a un crecimiento desorganizado. Vemos pues que las bases teóricas: científico-técnicas del cultivo «in vitro», pertenecen a dos temáticas complementarias: el descubrimiento de los fitorreguladores del crecimiento vegetal y los estudios de diferenciación celular (Martínez y Cañameras, 1989).

En 1958, Steward y sus colaboradores obtuvieron la formación de embriones somáticos en suspensiones celulares de zanahoria; logrando la diferenciación de plantas completas. Vasil y Hildebrandt demostraron, en 1965, el fenómeno de la totipotencialidad celular, a la hora de regenerar plantas enteras a partir de células aisladas de tabaco.

El cultivo «in vitro», permite realizar aproximaciones nuevas, de temas ya abordados de un modo clásico. Abre campos de investigación nuevos, que implican un aumento exponencial de nuestros conocimientos en biología vegetal como; aportar respuestas a numerosas cuestiones sobre la nutrición, el metabolismo, la diferenciación celular, los procesos de histogénesis y de organogénesis, las relaciones huesped-parásito, etc. Pero también las técnicas de cultivo «in vitro» tienen una importancia económica considerable: una de sus primeras aplicaciones agronómicas fue la curación de plantas viróticas. En 1952, Morel y Martín observaron que, las plantas de dalia obtenidas por cultivo «in vitro» a partir de meristemos primarios extraídos de brotes infectados por varios virus, estaban exentas de dichos virus. Estos trabajos, han permitido la expansión de los cultivos libres de virus de un amplio número de especies de importancia hortícola y agronómica. En 1960, Morel mostró que el cultivo «in vitro» permite no solamente eliminar los virus en ciertas orquídeas, sino también igualmente multiplicar masivamente los explantos, abriendo así la vía a la micropropagación industrial. Las primeras aplicaciones, se realizaron sobre planta herbácea ornamental, pero rápidamente se extendieron a especies leguminosas, frutales y especies forestales.

En 1962, Murashige y Skoog presentaron una nueva formulación con altos niveles de sales, que ha sido y es muy utilizada para una amplia gama de plantas, tanto monocotiledóneas, como dicotiledóneas. Murashige ha trabajado de forma extensiva para popularizar las técnicas de multiplicación clonal, desarrollando métodos estándar para la propagación de varias especies, desde helechos ornamentales a arboles frutales (Casas, 1987).

De todo lo dicho anteriormente, vemos que el cultivo “in vitro” es en efecto una herramienta puesta al servicio de productores de plantas. En la actualidad, se estima que se producen anualmente en el mundo más de 400 millones de “vitroplantas”, principalmente en lo referente a especies hortícolas. El hecho de que el número de especies de plantas herbáceas micropropagadas sea superior al de las plantas leñosas, es debido a una dominancia apical menos marcada, lo que facilita el desarrollo «in vitro» de yemas laterales de multiplicación (Damiano et al 1991).

A nivel agronómico, el cultivo «in vitro» permite la puesta a punto de técnicas de mejora genética más sofisticadas. Así, en 1964, Guha y Maheswari cultivaron «in vitro» anteras de *Datura*, obteniendo plantas haploides de origen polínico y abrieron las vías a las técnicas de haploidización, utilizadas actualmente para la selección de líneas puras en numerosas especies cultivadas (arroz, trigo, etc.).

En 1971, Takebe y sus colaboradores obtuvieron plantas de tabaco a partir de protoplastos. La fusión de protoplastos o hibridación somática, es aplicable a un número creciente de especies, y permite no solamente eliminar las barreras a la hibridación sexual entre especies genéticamente muy alejadas, sino igualmente manipular genomas de orgánulos citoplásmicos: cloroplastos y mitocondrias. La aptitud que poseen numerosas especies para poder regenerar una planta entera a partir de una célula, ha permitido la obtención de plantas transgénicas, es decir, plantas que han integrado en sus propios cromosomas genes extraños, que provienen de organismos muy diversos (virus, bacterias, vegetales, animales). Las secuencias génicas seleccionadas, son transferidas según técnicas punteras, a saber: el cocultivo de células vegetales susceptibles de infección con vectores biológicos, la transformación directa de protoplastos ya sea mediante tratamiento químico (polietilenglicol, fosfato cálcico, policationes tipo «polibrene»), electroporación, microinyección intranuclear, sonicación o la formación de liposomas (microvesículas de fosfolípidos que encapsulan el ADN a transferir) y, por último, el bombardeo de células o tejidos vegetales con «microproyectiles» metálicos. Quizá el método más utilizado consiste en la utilización de vectores bacterianos de transformación: *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*.

A partir de los años 50, el desarrollo de este campo ha sido muy rápido y se han publicado numerosos resultados, de gran importancia para la agricultura, silvicultura y horticultura (Pierik, 1990). El aumento sustancial del número de investigadores en esta área, en los últimos años, queda justificado por la utilidad que el cultivo de tejidos vegetales brinda a los agrónomos, mejoradores, botánicos, biólogos moleculares, bioquímicos, fitopatólogos, etc.

1.3. Aplicaciones relacionadas con la Agricultura

Como ya vimos en párrafos anteriores, el término de cultivo «in vitro» es muy amplio, abarca desde el cultivo de suspensiones celulares, cultivo de protoplastos, callos, embriogénesis somática, micropropagación, etc. También comentamos que los cultivos de tejidos son un arma importante en numerosos campos científicos: estudios metabólicos y fisiológicos, genética, morfogénesis y desarrollo, mejora de plantas, patología, técnicas de transformación, etc. Constituyen además una gran ayuda técnica para la conservación del material vegetal en espacio reducido, la propagación clonal de material, especialmente en especies leñosas y la obtención de material libre de virus (Dagnin y Letouzé, 1997).

En concreto en la vid, las investigaciones involucran varios campos, tales como: eliminación de virus (Galzy, 1964, 1971; Ayuso y Peña-Iglesias, 1978; Bass et al, 1976; Engelbrecht y Schwerdtfeger, 1979), mejora genética (Skene, 1974; Hirabayashi et al 1976; Krull y Worley, 1977; Rajasekaran y Mullins, 1979), preservación de germoplasma (Blaich, 1985; Galzy, 1985), propagación vegetativa (Barlass y Skenne, 1978, 1980; Jona y Webb, 1978; Bini, 1979; Aldwinckle y Buturac, 1980; 1980; Goussard, 1981; Silvestroni, 1981; Harris y Stevenson, 1982) y selección de clones resistentes a enfermedades y estrés (Hazel, 1994).

El cultivo «in vitro» es considerado como una eficaz herramienta biotecnológica y, según las orientaciones de un grupo de científicos del INRA de Versalles (Torregrosa y Bouquet, 1993), debe servir para:

- 1) modificar un genotipo,
- 2) fijar los caracteres o multiplicar un genotipo preexistente.

Además de tales aplicaciones, también se adapta para hacer posible o para mejorar los procesos reproductivos: fecundación «in vitro» y cultivo de embriones (Damiano et al 1991). Entre las diversas aplicaciones del cultivo «in vitro» de la vid destacan (Galzy, 1985):

- 1) Obtención de plantas libres de patógenos.
- 2) Programas de selección y mejora genética.
- 3) Conservación de material vegetal.
- 4) Multiplicación vegetativa de especies y variedades con interés agrícola.

1.3.1. Obtención de plantas libres de patógenos

Programas de saneamiento vegetal

Desde comienzos de los años 60, los ensayos de eliminación del virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** se realizaron aplicando tratamientos térmicos de larga duración, sobre las microplantas cultivadas «in vitro» (Galzy, 1961), o bien asociando la termoterapia sobre la planta entera y el posterior cultivo «in vitro» de sus extremos apicales (Gifford y Hewitt, 1961). Al asociar el tratamiento por calor; con la utilización del cultivo «in vitro» de órganos o tejidos las probabilidades de obtener plantas libres de virus son mucho más elevadas.

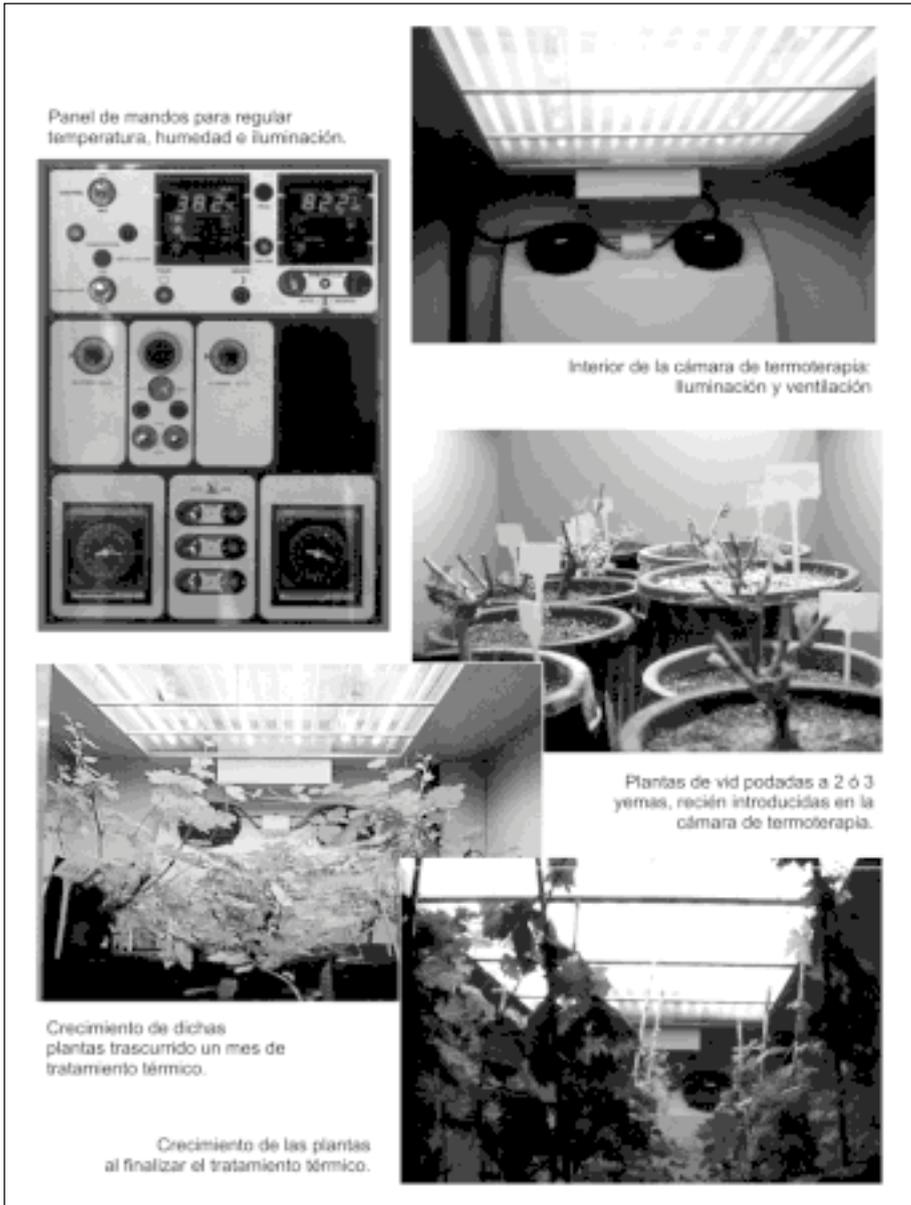
Estas técnicas demostraron ser eficaces para eliminar los virus del **Entrenudo Corto**, **Mosaico del Arabis**, **Jaspeado** y **Enrollado**. Sin embargo, ciertos virus de la vid son más resistentes que otros a los tratamientos térmicos. Este es el caso del complejo vírico de la **Madera Rizada**, del virus del **Mosaico de los Nervios** y de los viroides (moléculas circulares de ARNmc de bajo peso molecular, desprovistas de envoltura proteica), que son insensibles al calor, es más el calor parece favorecer su multiplicación.

El aislamiento de ápices caulinares (formados por células meristemáticas, presumiblemente indemnes de virus o de viroides) y su cultivo directo sobre medios nutritivos enriquecidos con auxinas y citoquininas (Galzy, 1972) da resultados aleatorios en cuanto a la tasa de supervivencia de los explantos. Sin embargo, Barlass et al (1982) lograron eliminar un cierto número de virus (**Entrenudo Corto Infeccioso**, **Enrollado**, **Jaspeado**) y un viroide (**Punteado Amarillo**), utilizando la técnica del cultivo «in vitro» de fragmentos de ápices. Asimismo, Duran-Vila et al (1988) obtuvieron tasas de respuesta muy elevadas cultivando directamente «in vitro» ápices de *V. vinifera* cv. **Cabernet sauvignon**, con vistas a eliminar los diferentes viroides que infectan la variedad.

Otra técnica utilizada para garantizar una tasa de supervivencia elevada de los ápices extraídos de plantas tratadas por calor, es el microinjerto de ápices sobre brotes de plantas exentas de virus (Ayuso y Peña-Iglesias, 1978) o sobre los hipocotilos obtenidos a partir de semillas de variedades exentas de virus (Benin y Grenan, 1984).

Hay que destacar también que Goussard et al (1991) consiguieron eliminar el **Enrollado**, pero no el **Entrenudo Corto Infeccioso** en las plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de cultivos de ovarios y de

LÁMINA 5



antras de variedades viróticas. A pesar de todo, este método tiene limitaciones (variabilidad de respuesta de genotipos) e inconvenientes (riesgo de reproducción no conforme).

1.3.2. Programas de selección y mejora genética de los cultivos

Selección «in vitro»

Todo método de mejora se apoya en la selección de los genotipos más interesantes en función de los objetivos definidos. La selección «in vitro» puede sino reemplazar a los métodos de selección clásica, al menos jugar un papel complementario, no desdeñable, pues ofrece numerosas ventajas. El investigador puede integrar el cultivo «in vitro» con el proceso de selección a diferentes niveles, lo que puede ser aplicado en la puesta a punto de ensayos de sensibilidad a parásitos, enfermedades o estrés abiótico, permitiendo así al seleccionador apreciar generalmente sobre las “vitroplantas”, una variabilidad preexistente o artificialmente creada y efectuar posteriormente una selección, según los criterios definidos. Con esta finalidad, se han realizado numerosos trabajos en el campo de la patología y fisiología, por ejemplo, podemos citar la sensibilidad a la eutipiosis (Fallot et al, 1990), al mildiu (Barlass et al 1986), al oídio (Klempka et al, 1984), a botritis (Vannel et al, 1991), al virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** (Walker y Meredith, 1990), a los nematodos (Palys y Meredith, 1984) y a la filoxera (Askani y Beiderbeck, 1991). También podemos citar la sensibilidad al cloruro de sodio (Barlass y Skenne, 1981; Troncoso et al., 1999), a la carencia de magnesio (Bouquet, et al 1990), a la clorosis férrica (Chiadmi, 1986), la resistencia al frío (Muniz et al, 1991), así como a la incompatibilidad al injerto (Hassani y Boubals, 1991).

El cultivo «in vitro», ofrece igualmente al seleccionador la posibilidad de eliminar directamente y rápidamente los genotipos sin interés, aplicando una presión de selección, de acuerdo con el estado elegido. De este modo, el seleccionador puede combinar la obtención de la característica deseada con la selección. Este es el caso, por ejemplo, cuando la investigación de una variación somaclonal o una mutagénesis se efectúa sobre un medio selectivo.

Los trabajos en este campo son todavía limitados. Se pueden citar las investigaciones de embriones somáticos resistentes al cloruro de sodio (Lebrun et al 1985), a la caliza (Netzer et al 1991), a la carencia de magnesio (Bouquet et al 1990) o a la toxina eutipina producida por el hongo *Eutypa lata* (Fallot et al 1990).

El éxito está condicionado por un factor principal, ya que el programa genético desarrollado por una vitroplanta es en muchos aspectos diferente al que desarrolla una planta adulta y, por tanto, su metabolismo celular puede ser fundamentalmente distinto. En consecuencia, una característica expresada por una planta cultivada «in vitro» puede no expresarse en la misma

planta una vez que se cultiva en condiciones naturales. Como ejemplo pueden servir los resultados engañosos obtenidos por los investigadores austrianos (Skenne y Barlass, 1988) para la tolerancia al cloruro de sodio, lo que aconseja prudencia y rigor en este campo.

Por otra parte, ciertas características (marcadores bioquímicos o fisiológicos) que se expresan sólo en planta adulta, facilitando el trabajo al seleccionador, pueden no ser identificables sobre planta cultivada «in vitro». Así, la irradiación por ultravioleta que estimula la síntesis de revastrol sobre las plantas adultas y permite discriminar las especies o variedades sensibles y resistentes a ciertos parásitos (botritis, oídio), no puede ser utilizada sobre las “vitroplantas” por su alta fitotoxicidad (Barlass et al, 1987). Los isoenzimas correspondientes a ciertas funciones fisiológicas, observados sobre plantas adultas, pueden estar modificados cualitativa y cuantitativamente en plantas cultivadas «in vitro» (Benin, 1989; Botta et al, 1990).

Es probable que la utilización en la selección de marcadores genéticos del tipo RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism) o RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), basados directamente en el análisis del DNA genómico, no estén sujetos al azar en el empleo de plantas cultivadas «in vitro».

Mejora genética de la vid

La mejora genética de una especie cultivada como la vid tiene por objetivos modificar su comportamiento en campos muy variados, como son: mejora del equilibrio rendimiento/calidad, adaptación a las nuevas condiciones climáticas, resistencia a enfermedades, etc. No siendo necesaria sí el seleccionador tiene a su disposición una variabilidad natural suficientemente amplia y explotable en función de las características deseadas.

Esta variabilidad genética, es más o menos grande, según el nivel taxonómico en el que uno se sitúa (variedad o cepa/especie/género). Teniendo en cuenta esta variabilidad, se ofrecen dos posibilidades al mejorador:

- a) una consiste en recombinar la información genética existente en los diferentes genotipos.
- b) la otra, en introducir una información genética nueva en un genotipo existente.

En el curso de estas dos aproximaciones, el cultivo «in vitro», puede ser complementario de los métodos clásicos constituyendo la base misma de los procesos de mejora genética (Bouquet, 1989a; Verdisson et al, 1999).

En todos los casos, la diversidad genética así creada constituye un cam-

po de selección en el que será necesario individualizar, por medio de métodos apropiados, el futuro prototipo de una variedad nueva; a este nivel, el cultivo «in vitro» puede jugar un papel considerable.

La recombinación genética

Los métodos de mejora practicados convencionalmente son: la hibridación o cruzamiento intraespecífico (por ejemplo: *Vitis vinifera* cv. **Cabernet sauvignon** x *V. vinifera* cv. **Grenache noir**), la hibridación interespecífica (por ejemplo: *V. riparia* x *V. berlandieri*) y la hibridación intergenérica (*V. vinifera* x *Muscadina rotundifolia*); todos ellos basados en la estrategia de recombinación de genes existentes.

La aportación del cultivo «in vitro» en este campo, la podemos referir a los programas que necesitan realizar el «rescate» de embriones abortivos, procedentes de cruzamientos interespecíficos e intraespecíficos (Spiegel- Roy y col. 1985; Liuni et al, 1998; Yamashita et al, 1998) y los trabajos de creación de variedades de uva de mesa sin pepita (Cain et al., 1983; Spiegel- Roy et al 1985; Bouquet y Davis, 1989b; Burger y Goussard, 1996).

En cuanto a la consecución de plantas haploides por cultivo de anteras (androgénesis «in vitro») son de destacar los resultados publicados por Greshof y Doy (1974), Zou y Li (1981) y Liuni et al (1998); aún cuando en la vid no ha dado los resultados esperados. Los callos obtenidos están formados principalmente por células diploides ($2n=38$) o tetraploides ($4n=76$), que provienen de la pared de la antera o del filamento del estambre, y una pequeña parte de células haploides ($n=19$), resultantes de la proliferación de los granos de polen (Pérez- Ruiz, 1990). Únicamente se ha conseguido obtener plántulas (vía embriogénesis somática) a partir de células diploides, siendo las plantas genéticamente idénticas a la planta madre (Rajasekaran y Mullins, 1981). Por lo que en la vid el estado haploide parece ser incompatible con el proceso morfogénico normal (Bouquet, 1982).

La producción de líneas homocigóticas, a partir de cultivos de anteras puede ser especialmente útil en especies como la mayoría de árboles frutales con largas generaciones, que hacen que los métodos tradicionales de mejora sean impracticables (Bueno et al, 1997). La producción de haploides se usa en los programas actuales de mejora, puesto que facilitan el rescate de mutaciones recesivas y recombinaciones únicas (Dolcet-Sanjuan, 1997). Además la duplicación cromosómica de los haploides permite la producción de líneas homocigóticas diploides que pueden utilizarse directamente para la producción de híbridos.

También hay que señalar, que recientemente se ha conseguido la regeneración de la vid, a partir de protoplastos (Reustle et al 1994; Schneider et al, 1996). La hibridación somática por fusión de protoplastos, permite traspasar las barreras genéticas que impiden la fecundación y la puesta en común del material genético entre dos especies o géneros muy alejados (Barcelo-Muñoz, 1997; Olivares et al, 1997), de modo que se podrá ampliar considerablemente el campo de investigación en relación a la mejora de la vid, mediante la creación de nuevas variedades que ofrezcan resistencia al frío, estrés hídrico o salino y enfermedades. No obstante, la obtención de protoplastos en leñosas presenta dificultades adicionales debido a la diversidad de resultados (Farré et al, 1997).

Variación somaclonal, mutagénesis y transformación genética

Si la mejora de portainjertos y de variedades de uva de mesa, por hibridación se puede tildar de exitosa, no se puede decir lo mismo para las variedades de uva de vino, quizá debido a la mentalidad y conservacionismo de los productores.

Sin embargo, existe la necesidad de disponer de técnicas, que permitan generar información genética nueva, como es la técnica de la embriogénesis somática (Compton y Gray, 1996) o la neoformación de ápices caulinares (Martinelli et al, 1996; Torregrosa y Bouquet, 1996). Parece ser, que este tipo de modificaciones se efectúa gracias a ciertas desregulaciones inducidas por el cultivo «in vitro», que conducen a variaciones que pueden ser explotables, desde una óptica de mejora genética (Mullins, 1985). Se conocen como variaciones somaclonales (Larkin y Scowcroft, 1981) y su origen todavía es controvertido, a saber: variación del nivel de ploidía de las células; mutaciones puntuales a nivel del ADN nuclear o del citoplásmico; variaciones epigenéticas.

El concepto de variación somaclonal permite considerar la creación de tipos, que presentan características nuevas o mejoradas que pueden permanecer en la variedad, caracterizadas por su tipicidad morfológica y cualitativa. Sin embargo, si la existencia de variaciones somaclonales inducidas por cultivo «in vitro» parece real (Bouquet, 1989b; Kuksova et al, 1997), y si las condiciones que permiten la aparición de este fenómeno son conocidas, sólo queda demostrar el interés de este tipo de variaciones para la mejora de la vid. No se puede ser demasiado optimista, pero ya se han obtenido, siguiendo estos métodos, algunas plantas de vid con características agronómicas deseables, como tolerancia a enfermedades o a condiciones adversas de estrés (Bouquet, 1989a). No obstante, todavía es necesario confirmar la estabilidad

de estos variantes y, además, debemos tener en cuenta que la regeneración de plántulas vía embriogénesis asexual, está en vid fuertemente condicionada al genotipo (Pérez-Ruiz, 1990).

Por lo que respecta a la mutagénesis, la aplicación de tratamientos físicos (rayos X ; ultravioleta, gamma) o químicos (Kikkert et al, 1996; Silva y Doazan, 1995) sobre cultivos «in vitro» provoca efectos que no afectan a un gen concreto. De momento, las investigaciones en este campo son muy limitadas (Kim et al, 1986). Si la mutagénesis puede conducir a la aparición de nuevas características, por modificación «ciega» de los genes existentes, la ingeniería genética lucha por introducir en una célula vegetal e insertar en su genoma una secuencia de ADN conocida, respetando en lo posible la integridad de los genes preexistentes (Le Gall et al, 1994; Krastanova et al, 1995). Existen diferentes métodos de practicar esta intervención, entre los cuales el más utilizado por el momento, al menos sobre plantas dicotiledóneas, consiste en la utilización de vectores bacterianos de transformación (Kikkert et al, 1996; Scorza et al, 1995). Sin embargo, los resultados positivos están restringidos a unos pocos genotipos que muestran un elevado potencial regenerativo (Martinelli et al, 1996).

Estos vectores biológicos son bien conocidos, se trata de *Agrobacterium rhizogenes*, que provoca la aparición de raíces en cabellera muy densa o «hairy-root» y de *Agrobacterium tumefaciens*, agente responsable de la corona de agallas o crown-gall (Scorza et al, 1995; González-Nebauer, 1997; Roig et al, 1997; Mozsár et al, 1998). Ambas enfermedades están relacionadas con la presencia en estas bacterias fitopatógenas de plásmidos **Ri** o **Ti**, inductores de raíces o tumores, respectivamente. Estos plásmidos tienen la capacidad de transferir una parte de los mismos, la conocida como **T-DNA**, al genoma de la célula vegetal infectada. Dicho fragmento de ADN bacteriano redirige las actividades metabólicas del huésped y la producción de reguladores del crecimiento vegetal (auxinas y citoquininas) y sustancias metabólicas características, las opinas. Gracias a esta manipulación genética natural, la bacteria es capaz de desviar el metabolismo de la planta hacia la búsqueda de un nicho ecológico favorable: masificación de células con espacios intercelulares numerosos y una multiplicación rápida.

Todos estos fenómenos fueron estudiados a partir de 1970, desarrollando los investigadores **T-DNAs** quiméricos y técnicas de cocultivo de bacterias y células vegetales para manipular genéticamente en su provecho las plantas (Tempe y Schell, 1987). La manipulación consiste en reemplazar sobre el plásmido bacteriano los genes inductores de enfermedad por uno o más genes funcionales extraños, que deben contener los segmentos codificadores

de información genética deseada y las apropiadas regiones reguladoras requeridas para su correcta expresión fenotípica; principio simple en teoría, pero extremadamente complejo en su realización. En 1986, se obtuvieron las primeras plantas transgénicas y después se realizaron importantes progresos, obteniéndose plantas de distintas especies resistentes a herbicidas, insectos o virus (Tepfer et al, 1988). La aptitud morfogenética y de transformación depende de la variedad utilizada y del estado fisiológico del material vegetal (Estopá et al, 1997).

En vid, las investigaciones encaminadas a poner a punto metodologías eficaces de transformación genética fueron iniciadas en numerosos laboratorios, empleándose explantos primarios de muy distinta naturaleza (“vitroplantas”, ápices fragmentados, peciolos, limbos foliares, embriones somáticos, etc.), así como los dos vectores biológicos ya citados (Mullins et al, 1990) o métodos «biolísticos» de transformación directa (Torregrosa y Bouquet, 1993; Scorza et al, 1995; Alfonso et al, 1997). En general, los trabajos mostraron que la transformación genética de la vid, no es algo sencillo. La selección de las células transformadas y la combinación transformación-regeneración son difíciles, formándose en la mayoría de los casos tejidos quiméricos constituidos por células transformadas y no transformadas. No obstante, Mullins et al (1990) lograron la obtención de una planta transformada de *V. rupestris* que expresa el gen marcador **GVS** de la B-glucuronidasa de origen bacteriano. Actualmente, las investigaciones van encaminadas a introducir en la vid la secuencia génica que codifica para la envoltura proteica del virus del **Entrenudo Corto Infeccioso (GFLV)** (Serghini et al 1990; Barbier et al, 1997; Cámara Machado et al, 1997; Torregrosa y Bouquet, 1997), con el fin de inducir en la planta una resistencia a dicho virus. Se han obtenido ya plantas transgénicas que producen la proteína capsidal del virus **Grape Chrome Mosaic (GCMV)** (Torregrosa y Bouquet, 1995), de modo que muestran cierta resistencia a la infección viral tanto para **GCMV**, como para **GFLV**. Experimentos similares han sido realizados por Ling et al (1997), obteniendo plantas transgénicas que expresan las proteínas de la cápsida del virus del **Enrollado**.

Otras vías de investigación en materia de transformación genética de la vid van encaminadas a crear resistencia contra insectos fitófagos (Walter, 1991), por la introducción de un gen que codifica la toxina específica de *Bacillus thuringiensis*, y resistencia a las enfermedades criptogámicas, por la introducción de genes que codifican enzimas con efecto antifúngico (quitinasas). Sin embargo, la vía más prometedora consiste en integrar en el genoma de la planta, la secuencia genética inversa (antisentido), del oncogén

de *Agrobacterium tumefaciens*. La expresión de esta secuencia, impedirá la expresión del gen correspondiente, y dará lugar a una vid transformada menos sensible, resistente a la enfermedad (Huss et al, 1988).

1.3.3. Conservación de material vegetal de interés. Programas de mantenimiento de la diversidad genética

El genetista o mejorador, necesita contar con una fuente de variabilidad. Esta fuente, está representada por la variabilidad genética natural existente a nivel de una especie. Por lo que respecta a la vid, los esfuerzos principales en materia de conservación de fuentes genéticas, se refieren principalmente a variedades y clones de *Vitis vinifera*.

Sin embargo, la mayor parte de otras especies también son importantes bien porque en el área geográfica en donde se encuentran juegan un papel de reserva natural de diversidad genética, o bien porque sus hábitats naturales se encuentran perturbados por el hombre (urbanización, deforestación). Las formas primitivas silvestres de vid, han ido perdiendo su diversidad a lo largo del tiempo, debido especialmente a la acción humana sobre sus áreas naturales de supervivencia. A esta pérdida, se añade otra referente a los cultivares y clones que van desapareciendo en beneficio de grupos cada vez más restringidos, pero con mejores características agronómicas para su explotación actual (Boursiquot, 1998). Para atajar esta importante erosión genética, organismos como la FAO y la OIV, han reconocido la necesidad de crear colecciones o bancos de genes de vides cultivadas y silvestres (Pérez Ruiz, 1990).

Si la conservación durante largo tiempo, en forma de semilla, puede ser utilizada para mantener la diversidad genética en muchas especies cultivadas, esto no puede aplicarse a *V. vinifera* debido a la fuerte heterocigosidad. En consecuencia, si queremos conservar clones y cepas sin ninguna modificación de sus caracteres morfológicos, culturales o de calidad, estos no pueden multiplicarse más que por vía vegetativa.

Actualmente los reservorios genéticos de la vid, se presentan bajo la forma de colecciones en las cuales cada clon o variedad está representado por numerosas cepas. La puesta en cultivo y el seguimiento de estas colecciones debe realizarse en condiciones extremadamente rigurosas, lo que representa un gran costo y responsabilidad para los centros de investigación y los organismos implicados. Además, estas colecciones «in situ» están expuestas a numerosos factores climáticos (frío, calor) o bióticos: contaminación por virus, bacterias, enfermedades criptogámicas, parásitos, animales, etc.

Para paliar estos inconvenientes y para garantizar un perfecto estado sanitario, de las variedades o los clones salidos de selección genética o sanitaria, numerosos laboratorios investigan las condiciones idóneas que permitan el establecimiento de colecciones «in vitro». Para ello pueden emplearse distintos métodos, siendo los más utilizados:

- 1) El cultivo con limitación química y/o física del crecimiento vegetal; y
- 2) La crioconservación de ápices o líneas celulares embriogénicas.

Cultivo con limitación del crecimiento

El objetivo es buscar el modo de espaciar los subcultivos, ya que la conservación «in vitro», por microestaquillado de segmentos uninodales de cientos o de miles de variedades representa un trabajo y un costo prohibitivo, cuando los ciclos de cultivo son cortos (8 a 12 semanas). Se puede realizar de diferentes modos o combinaciones de ellos, a saber: por inclusión en el medio de cultivo de agentes retardantes o inhibidores del crecimiento, utilización de medios nutricionales mínimos, incubación a bajas temperaturas e iluminación reducida, etc.

En vid, caben citar los trabajos de: Galzy (1969, 1972, 1985), quien conservó clones de *V. rupestris* a 9 °C y en oscuridad, durante 250 días, sin necesidad de subcultivar; sin embargo, varios cultivares de *V. vinifera*, no soportaron estas condiciones. Los resultados de Barlass y Skene (1983) son contrarios a los de Galzy, ya que fue precisamente *V. rupestris* la especie que peor soportó la conservación a 9,5 °C. Para Barlass y Skene (1983), las temperaturas óptimas de almacenamiento son características de cada clon.

Blaich (1985) conservó plántulas de vid a temperaturas próximas a los 7 °C. El crecimiento se redujo drásticamente, pero se recuperó al transferir el cultivo a las condiciones normales.

Pérez-Ruiz (1990) conservó plántulas de vid a 5 °C y en oscuridad, subcultivando cada año. En estas condiciones, fue posible mantener viables casi un 90% de los explantos.

Harst-Langenbucher y Alleweldt (1989) utilizaron inhibidores del crecimiento tipo CCC, cloruro de clorocolina.

Desgraciadamente, parece ser que estos métodos son difíciles de poder llevarlos a la práctica, por los resultados aleatorios a nivel de tasas de supervivencia de las plantas, que depende mucho de la variedad utilizada. Para otros investigadores, este tipo de conservación a largo tiempo puede conllevar el riesgo de multiplicar plantas que hayan sufrido variaciones morfológicas u otras no detectables «in vitro», sin hablar de los riesgos y errores de

manipulación en el curso de los sucesivos subcultivos. No obstante, Skene et al (1988) mostraron que el nivel de ploidia de las plantas no es modificado por una conservación a largo plazo, sino por los sucesivos subcultivos.

Crioconservación de ápices o líneas celulares embriogénicas

Estudios recientes realizan la conservación en frío de ápices (Plessis et al, 1991) o líneas celulares embriogénicas (Moukadiri al, 1997), capaces de volver a dar lugar a plantas enteras. En los dos casos, se trata de bajar la temperatura del material vegetal, hasta alcanzar los -196°C , después de pretratamientos adecuados. La conservación es entonces teóricamente ilimitada y sin el menor riesgo de alteraciones genéticas, por estar completamente detenidos los procesos metabólicos. Los porcentajes de respuesta, después de la crioconservación, varían entre el 20-30%, lo que permite poder utilizar estas técnicas para las colecciones genéticas. La crioconservación de ápices parece ser actualmente la técnica más prometedora y probablemente se desarrollará en los próximos años. Por el contrario, con la aplicación de la crioconservación de líneas celulares embriogénicas es más difícil de obtener una reproducción conforme y además, por el momento, sólo es aplicable a variedades que responden perfectamente a la embriogénesis somática. De hecho, su principal finalidad, es la de poder conservar las suspensiones celulares difíciles de obtener, sin perder su capacidad embriogénica.

1.3.4. Multiplicación vegetativa de especies y variedades de interés agrícola. Programas de micropropagación

Todas las técnicas de multiplicación vegetativa se basan en la división mitótica, es decir, el proceso que permite obtener dos células genéticamente idénticas a la célula madre. Este hecho posibilita que la descendencia por vía vegetativa comporte mantenimiento de las características específicas o varietales. La primera aplicación industrial del cultivo "in vitro" en micropropagación fue hecha por Morel (1965) quien multiplicó orquídeas tropicales a partir del cultivo de ápices. Tras este primer éxito se inició el desarrollo de laboratorios comerciales, principalmente en EEUU. Actualmente Europa ocupa un papel importante en la micropropagación industrial, destacando el norte de Italia, Holanda, Bélgica, España, Alemania, Francia, etc. En España los laboratorios comerciales más importantes se encuentran en Valencia, Canarias, Cataluña, Aragón, etc. (Martínez y Cañameras, 1989).

La elección de las especies a micropropagar viene condicionada por diversos factores como son: la dificultad de la propagación tradicional, la atención de una elevada demanda de nuevos cultivares, la economía del sistema, etc.

(Damiano et al, 1991). Actualmente es posible regenerar plantas de vid vía organogénesis y embriogénesis, partiendo de distintos tipos de explantos (Galzy, 1961; Barlass y Skenne, 1978; Silvestroni, 1981; Cheng y Reich, 1989). Sin embargo, pese a todos estos logros no parece posible a corto y medio plazo aplicar en la vid técnicas de micropropagación a gran escala con fines comerciales, debido a la obligación de injertar por causa de la filoxera. La micropropagación podría ser útil para producir portainjertos o multiplicar rápidamente material seleccionado para injertar (Pérez-Ruiz, 1990).

También es de destacar que algunas plantas obtenidas “in vitro” no muestran conformidad morfológica y/o fisiológica con la planta madre, retornando en ocasiones a características juveniles, aunque estas modificaciones no parecen ser definitivas (Grenan, 1984). Con todo, aquellos métodos que parten de ápices o yemas como explanto inicial para a continuación forzar el desarrollo de este muestra una gran estabilidad genética. Pero cuando existe formación intermedia de callo o la tasa de multiplicación y el número total de regenerantes obtenidos sobrepasa los límites específicos aumenta el riesgo de generar variación somaclonal. La micropropagación mediante embriogénesis asexual parece difícil que pueda ser útil a corto plazo para multiplicar la vid a gran escala (Pérez-Ruiz, 1990). Trabajos como el de Gray (1991) muestran que la proporción de embriones anormales formados “in vitro” es muy elevada.

Estado actual de la micropropagación en España y Europa

Los grupos más importantes de planta micropropagada son: ornamentales de maceta, flor cortada y árboles frutales, mientras que el resto lo forman las bulbosas ornamentales, pequeños frutos, orquídeas, especies hortícolas, etc.

– Ornamentales de maceta

El principal productor europeo es Holanda. En muchos géneros, por ejemplo *Syngonium*, *Spathyphillum*, *Philodendron*, etc., el producto final es la planta micropropagada, mientras que en otros como *Ficus*, el material procedente de laboratorio se utiliza como planta madre para abaratar el costo del producto final (Capellades et al, 1991).

– Flor cortada

También destaca Holanda como el primer productor, la mayor parte de la producción corresponde a gerbera. En otras especies, crisantemo y clavel, la planta micropropagada se utiliza como planta madre que después se enraiza mediante técnicas convencionales (Stimart, 1986).

– Árboles frutales

El principal productor es Italia, la mayoría de las cuales corresponden al híbrido melocotonero x almendro, **GF-677** (Rosati y Paoli, 1992). Las variedades autoenraizadas de melocotonero han mostrado un buen comportamiento en campo (Cobianchi et al, 1992).

En peral, las variedades autoenraizadas suelen mostrar un retraso de dos años en la entrada en producción, en relación con el material obtenido mediante técnicas convencionales, aunque después de 5 años la producción acumulada es similar.

En *Malus*, no se encontraron diferencias en producción acumulada a los 6 años entre variedades autoenraizadas e injertadas, aunque el material micropropagado era más vigoroso; en *Prunus cerasus*, por el contrario, el material micropropagado mostró un claro descenso en producción respecto a los controles injertados (Rosati y Gagioli, 1989). En España la producción de árboles frutales se sitúa alrededor de 2,5 millones correspondiendo también la mayor parte al portainjerto **GF-677**.

– Pequeños frutos

En España se producen en la actualidad 500.000 plantas, fundamentalmente de fresa. En las condiciones de cultivo de la zona de Huelva, el material micropropagado del cv. **Chandler** ha mostrado un excelente comportamiento en campo (López-Aranda et al. 1994).

– Cultivos hortícolas

En cultivos hortícolas como la patata, la micropropagación se usa para el establecimiento de stocks de plantas libres de virus y para la producción de microtubérculos “in vitro”, lo que ha supuesto considerables incrementos de producción (Seckinger, 1991). En otros casos la micropropagación se utiliza en programas de mejora para mantenimiento de genotipos libres de patógenos, multiplicación de nuevos cultivares híbridos o para clonar de forma rápida cultivares élite (Doré, 1987).

Los problemas que pueden aparecer en el proceso son de índole económica, comerciales y técnicos. En cuanto a la economía la principal desventaja de la planta micropropagada respecto a la obtenida por técnicas convencionales es su elevado precio, de aquí los esfuerzos en automatizar algunas fases del proceso. En cuanto a la comercialización, en la actualidad existe un exceso de producción en cultivos «clásicos» (Barnhill y Sluis, 1991), por lo que es necesario diversificar la oferta. Esto es difícil ya que aunque hay muchas plantas que se pueden multiplicar “in vitro”, la tecnología actual no

permite su propagación a escala comercial. Los principales problemas técnicos que conlleva el uso de la técnica de micropropagación son: las excesivas pérdidas durante la fase de aclimatación, las infecciones internas y la inestabilidad genética (Pliego y Barceló, 1995).

1.4. Ventajas, limitaciones y viabilidad de la micropropagación

1.4.1. Ventajas

- 1) Permite obtener un elevado número de plantas en poco tiempo, a partir de una planta madre, lo que facilita el lanzamiento de nuevas variedades. Asimismo permite obtener una producción durante todo el año, al tener controladas las condiciones ambientales; aunque es necesario ajustar el trasplante a vivero desde el invernadero en la época adecuada.
- 2) Algunas variedades difíciles y lentas de multiplicar (por ejemplo, orquídeas) pueden ser propagadas con relativa facilidad por cultivo «in vitro». También se mejora el enraizamiento de plantas difíciles de enraizar por los métodos tradicionales.
- 3) Se puede utilizar todo el año, en contraste con las técnicas convencionales de propagación.
- 4) Constituye una forma eficaz para el intercambio internacional de material vegetal en adecuadas condiciones sanitarias, ya que a veces las colecciones vegetales al aire libre pueden ser vulnerables a factores bióticos y abióticos, tales como agentes patógenos, estrés climático o contaminación del aire. El intercambio a través de las fronteras es facilitado por la miniaturización, y el control de las condiciones sanitarias.
- 5) Conservación de material vegetal de interés genético, creación de bancos de germoplasma. Las técnicas de cultivo de tejidos para conservación genética han sido propuestas como una alternativa a los métodos tradicionales, por ejemplo; estudios llevados a cabo por Galzy (1965), demostraron que los cultivos de vid (*V. rupestris* Scheele) podían ser almacenados durante 290 días a 9 °C.
- 6) Posibilidad de controlar adecuadamente las condiciones en las que se realiza el proceso.
- 7) Obtención de plantas de alta calidad, partiendo de planta madre bien seleccionada. Asimismo, puede utilizarse para el lanzamiento rápido de nuevas variedades.
- 8) Desarrollo de programas de genética y mejora de los cultivos, encaminados a conseguir plantas resistentes a determinadas enfermedades o bien

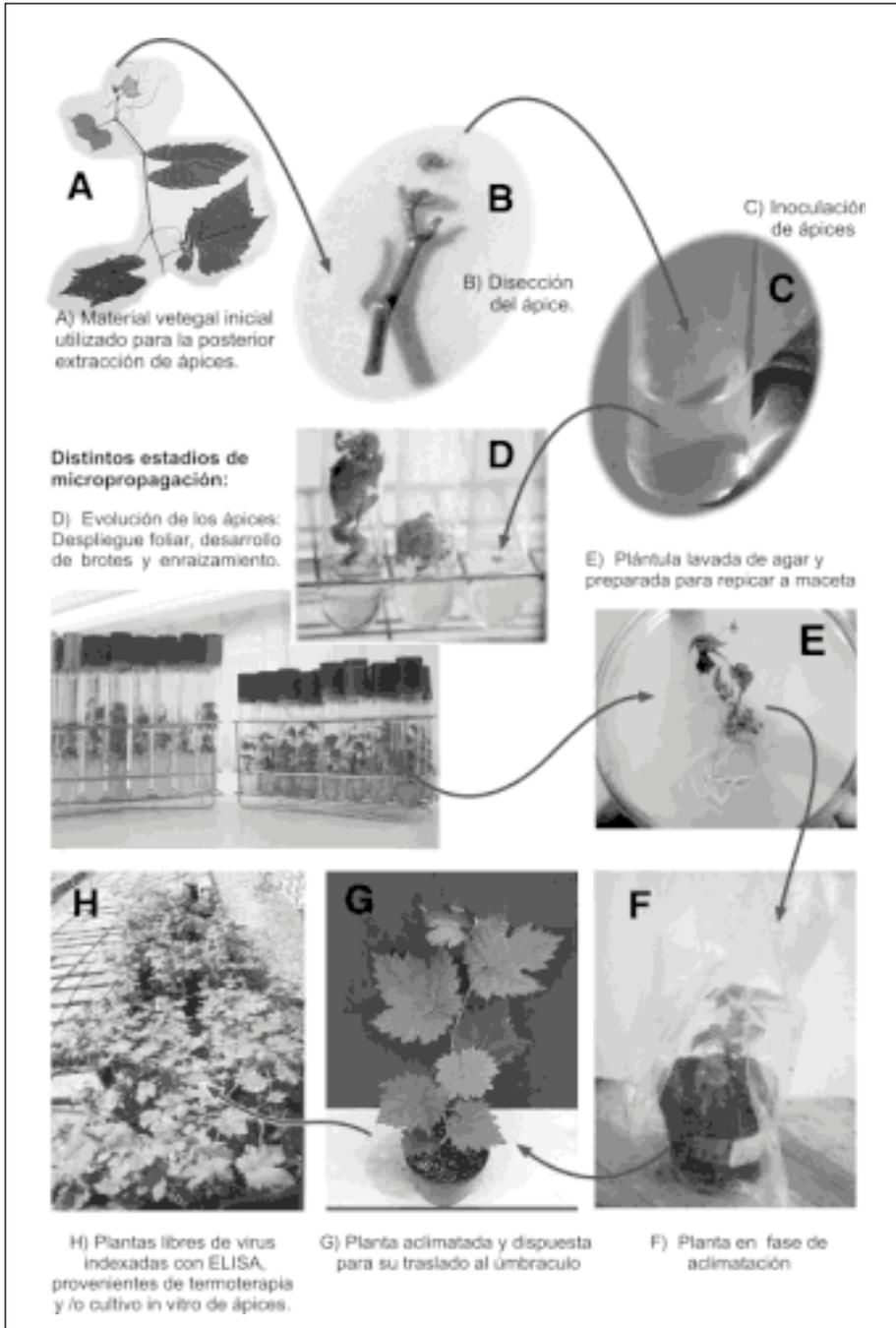
a condiciones ambientales extremas como salinidad, sequía, frío, calor, etc. Actualmente, estos programas se están aplicando con cierto éxito en la remolacha azucarera, tomate, clavel, patata y vid.

- 9) Obtención de metabolitos secundarios y productos naturales de utilidad farmacológica o industrial, tales como: aromas, esencias, pigmentos, fármacos, etc., los cuales no se pueden sintetizar químicamente, o bien el coste es muy elevado; además se aprecia una preferencia creciente de los productos naturales sobre los sintéticos. En la actualidad, el cultivo de células es de gran importancia en biotecnología; los investigadores luchan por conseguir cultivar células vegetales como si fueran microorganismos para obtener metabolitos secundarios de forma industrial.

1.4.2. Limitaciones

- 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 desde el tubo de ensayo al suelo es difícil de conseguir.
- 5) Se puede perder la capacidad de regeneración de los cultivos de callos o de células en suspensión, mantenidos mediante subcultivos sucesivos.
- 6) 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.
- 7) El clonado «in vitro» exige una aportación de mano de obra importante, coste de las instalaciones y sofisticación de las técnicas, lo que redonda en precios relativamente altos para las plantas que se producen de este modo.
- 8) 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.

LÁMINA 6.



- 9) Vitrificación 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.

1.4.3. Viabilidad comercial

Para Negueroles (1978) la viabilidad comercial de la micropropagación estará en función de los siguientes factores:

1. Valor económico del material vegetal considerado.
2. Ritmo de proliferación de los brotes cultivados «in vitro».
3. Porcentajes de enraizamiento obtenidos por los métodos tradicionales de propagación.
4. Volumen de producción esperado y capacidad de la empresa.

2. PROPAGACIÓN “IN VITRO” DE LA VID

El uso de los cultivos de tejidos, para la propagación clonal de algunas especies con interés agrícola de plantas leñosas y herbáceas, es una práctica bien establecida en la industria viverística comercial.

Se denominan técnicas de micropropagación a aquellas que bajo condiciones de laboratorio, asépticas, nutritivas y de crecimiento, permiten la multiplicación de las especies vegetales. En otras palabras, la obtención de descendencia de una planta madre a partir de cultivos en medios nutritivos sintéticos de tejidos u órganos, los cuales mediante un proceso regenerativo-morfo genético terminan constituyéndose en plantas completas, capaces de sobrevivir en un ambiente externo (Silvestroni, 1981; Skenne y Barlass, 1980). Inicialmente se desarrolló sobre planta herbácea, siendo aplicada con posterioridad a especies arbóreas (Barlass y Skene, 1980), principalmente frutales.

El buen resultado de la multiplicación «in vitro», depende de cuatro factores, que se deben controlar y afinar al máximo, a saber: estado óptimo de la planta madre, desinfección del material de partida; asepsia en las instalaciones y finalmente establecimiento de un correcto equilibrio entre los distintos componentes del medio de cultivo. El tipo de fitoregulador empleado, la concentración de este y las proporciones relativas entre estas condicionan y dirigen la evolución del explanto (Royo et al, 1991).

En algunas especies vegetales (manzano, melocotonero, cerezo, portainjertos, fresa, actinidia, orquídeas, etc.) la propagación vegetativa «in vitro» (o micropropagación) ha producido resultados de enorme importancia para la agricultura, horticultura y silvicultura, pues el ciclo de multiplicación es muy corto (algunas semanas) y el número de plantas que se puede obtener en un tiempo dado es casi ilimitado (Barlass y Skenne, 1978). Si nos referimos al material vitivinícola, hemos de señalar que se obtiene una óptima respuesta en términos de calidad y cantidad (Silvestroni, 1981), siendo económicamente rentable cuando la demanda para especies, o cultivares es lo suficientemente grande como para justificar el costo de la producción (Gray y Fisher, 1985).

La elección de las especies para micropropagar viene condicionada por diversos factores, tales como: la dificultad para la propagación tradicional, la atención de una elevada demanda de nuevos cultivares, la economía del sistema, etc. (Damiano et al 1991). Aunque debemos tener en cuenta que el genotipo es uno de los factores más importantes en la respuesta y en la proliferación «in vitro», lo cual ha sido distintamente mostrado en algunas especies de *Vitis* (Rajasekaran y Mullins, 1981; Chée y Pool, 1983).

El objetivo de la micropropagación no es sólo el de una multiplicación masiva, sino también multiplicar cultivares libres de virus y nuevos clones, así como portainjertos tales como *Vitis berlandieri*, poco utilizado por su pobre capacidad de enraizamiento, con las técnicas tradicionales (Pastena, 1972, citado por Morini et al, 1985). Como ya comentábamos anteriormente, el logro de buenos resultados depende de la tasa de multiplicación de los brotes subcultivados, así como del porcentaje de enraizamiento.

Las características esenciales del método son (Marín, 1993):

- 1) Es una propagación **vegetativa**, es decir, sin participación de los órganos reproductores de la planta. Se lleva a cabo por medio de la estimulación de las yemas axilares preexistentes que darán lugar a nuevos brotes que, una vez enraizados, formarán nuevas plantas.
- 2) Es una propagación **masiva**, ya que la formación de nuevas yemas puede ser estimulada en gran número y en corto espacio de tiempo.
- 3) Es una propagación **clonal**, ya que la utilización de yemas axilares preformadas asegura la producción de plantas conformes genéticamente al tipo original.
- 4) Es una propagación «**in vitro**», porque tiene lugar en frascos de cultivo (originalmente de vidrio, aunque actualmente también se emplea el plástico) y con **medios de cultivo definidos**, en los que se controla la com-

posición y la concentración de sus componentes. Tiene lugar fuera del ambiente natural en cámaras de cultivo, donde se **controlan las condiciones ambientales** (luz, temperatura y humedad relativa), manteniéndolas a unos niveles óptimos para el crecimiento.

En vid, se han realizado diferentes experiencias (Ciccotti, 1982; Harris y Stevenson, 1982; Chée et al, 1984; Heloir et al, 1997) con la intención de desarrollar un protocolo para una rápida propagación de clones seleccionados. Aproximadamente se han propagado “in vitro” unos 60 cultivares de *Vitis* (Jona y Webb, 1978; Goussard, 1981;Ciccotti, 1982; Chée y Pool, 1982,83, Chée et al, 1984; Harris y Stevenson, 1982; Barlass y Skenne, 1983; Rosu, 1983; Fanizza et al, 1984; Li y Eaton 1984). Aunque la gran mayoría han sido cultivares derivados de *V. vinifera*, otros cultivares que se han ensayado para la propagación «in vitro» incluyen: *V. argentifolia*, *V. cinerea*, *V. labrusca* y *V. riparia*.

Sin embargo, todavía hay varias especies de vid, principalmente del género *Muscadinia* (Gray y Benton, 1991), con las que no siempre se ha obtenido éxito a causa de la dificultad existente en diversas fases de la obtención de la planta, bien sea durante la proliferación de los explantos (Galzy, 1971, 72,77; Bini, 1979), o porque no se dispone de un medio de cultivo apropiado (Chée y Pool, 1982).

En definitiva, es fácilmente intuible que la técnica de la micropropagación puede resultar interesante para la vid, sobre todo cuando se exige disponer rápidamente de material de multiplicación y, especialmente, cuando se trata de material seleccionado y saneado. Ahora bien, para la realización práctica de este objetivo se impone una experimentación, ya que el mayor impedimento puede ser la formación de plantas con modificaciones genéticas y/o somáticas. En este último caso, las divergencias morfológicas pueden ser en algunos casos de corta duración, desapareciendo después de transferir las plantas al invernadero (Mullins et al 1979; Barlass y Skenne, 1980); en otros casos, las modificaciones son más estables permaneciendo durante una o más estaciones (Morini et al, 1985).

2.1. Etapas del proceso

2.1.1. Selección y preparación de la planta madre (Fase-0)

Dos son las principales razones que justifican la existencia de esta etapa o fase: fisiológicas y patológicas (Negueroles, 1978). El estado fisiológico de la planta madre, y por tanto del explanto, dependerá del nivel nutricional, intensidad lumínica, grado de desarrollo, tratamientos con fitoreguladores

de crecimiento y otros productos químicos, fotoperíodo, poda, riego, época del año, etc. Es evidente, que estos condicionantes pueden ser optimizados en relación con el objetivo primordial: asegurar la viabilidad y el desarrollo del explanto «in vitro». Por otro lado, el estado sanitario de la planta madre será el factor básico en la obtención de un cultivo aséptico.

Debergh y Maenne (1981-1985) postularon que las plantas madres, antes de ser utilizadas como fuente de explantos, han de mantenerse durante un período más o menos largo de tiempo (de semanas a meses) en un invernadero de preparación. En este invernadero será necesario establecer adecuadas condiciones higiénicas, de nutrición, irradiación y fotoperíodo controlado; en los casos en que sea necesario se realizarán podas y tratamientos con fitoreguladores o productos químicos que mejorarán el posterior comportamiento «in vitro». Todos estos tratamientos posibilitarán obtener explantos con mejor y más homogénea respuesta en el establecimiento del cultivo. Este es el motivo de que muchos investigadores (Debergh et al, 1986; Damiano, 1991) incluyan una etapa 0 de preparación de la planta madre, en las etapas o fases fundamentales de la micropropagación.

2.1.2. Establecimiento de cultivos iniciales en condiciones asépticas (Fase-I)

Desinfección superficial del material vegetal

La obtención de un número considerable de explantos no contaminados es indispensable para el establecimiento normal de cultivos «in vitro» de una especie determinada (Surga, 1992). En principio existen 4 fuentes de infección: la planta madre (tanto en la superficie exterior como en su interior), el medio nutritivo (insuficientemente esterilizado), el aire y el operador (trabajo poco preciso). De ellas la más importante es sin duda la planta misma, de forma que el material vegetal deberá ser bien desinfectando antes de su aislamiento y puesta «in vitro» (Pierik, 1990). La desinfección deberá ser suave pero efectiva, ya que una desinfección drástica puede favorecer tanto la aparición de vitrificación como la oxidación (Thomas y Ravindra, 1997), causando la muerte del explanto y provocando el pardeamiento del medio de cultivo (Damiano et al., 1991).

Otro factor a tener en cuenta es la elección del agente desinfectante, su concentración y el tiempo de desinfección, de acuerdo con las circunstancias particulares de cada caso. En algunas semillas pueden ser necesarios hasta 30 minutos de permanencia en hipoclorito sódico (NaClO) al 2%, para conseguir una buena desinfección superficial de las mismas (Pierik, 1990). A veces, la

superficie de las heridas producidas al trocear la planta puede ser cubiertas con parafina para impedir la penetración del líquido desinfectante en el tallo y/o el «sangrado» de este, como ocurre por ejemplo en Euforbiáceas.

En el caso de que existan infecciones internas (hongos o bacterias presentes en vasos conductores o espacios intercelulares), estas constituyen un problema importante, ya que no pueden ser eliminadas por desinfección externa (Samson, 1996). Hemos de tener en cuenta, que las necesidades nutritivas de los microorganismos son similares a las de las células de los tejidos vegetales cultivados «in vitro», lo cual crea una fuerte competencia, siendo las células de los tejidos vegetales normalmente menos eficientes en el aprovechamiento de los nutrientes (Murashige, 1974). Es posible que microorganismos no patógenos “in vivo” produzcan enfermedades “in vitro” o que patógenos “in vivo”, permanezcan latentes “in vitro”; las especies saprófitas pueden ver favorecido su desarrollo por la alta concentración de nutrientes y azúcares que se utilizan en los medios de cultivo, así como también por la elevada humedad en la que estos se desarrollan (Chueca et al, 1997). Tanto las especies patógenas como las saprófitas pueden afectar de forma más o menos importante a los cultivos, reduciendo su capacidad de crecimiento y de morfogénesis, así como el enraizamiento y vigor de las plantas. Esta presencia de microorganismos es una de las causas más importantes de pérdidas en los cultivos “in vitro” de plantas, siendo una gran carga para las casas comerciales dedicadas a la propagación de material vegetal (Chueca et al, 1997).

En principio, la forma de combatir este problema de contaminación sería adicionando fungicidas y/o antibióticos (según la naturaleza de la infección) al medio de cultivo; aunque no siempre se resuelve ya que su adición generalmente conduce a fenómenos fitotóxicos. Además como se necesitan unas concentraciones muy altas, éstas inhiben también el crecimiento y desarrollo de la planta, en la mayoría de los casos. La utilización de antibióticos puede también conducir a la selección de microorganismos resistentes. Por todo ello y siempre que sea posible se deben utilizar plantas que no presenten problemas de infección (Pierik, 1990). Algunas plantas, parecen estar más predispuestas que otras a albergar bacterias latentes en el interior de los tejidos, por ejemplo los ápices caulinares de hortensia.

El tamaño del explanto está muy relacionado con el porcentaje de éxito obtenido en la desinfección; pues se observa que a medida que disminuye el tamaño del explanto existe una menor tasa de contaminación, sobre todo de tipo endógeno (Surga y Guevara, 1992).

Establecimiento de cultivos iniciales en condiciones asépticas

El inicio del cultivo es una fase muy delicada, ya que la porción de tejido vegetal que sirve de inóculo (explanto) debe sobrevivir al aislamiento del resto de la planta original, al proceso de desinfección y, tras su inoculación en medios de cultivo apropiados, comenzar el crecimiento «in vitro». La capacidad de regeneración viene determinada por la biología del cultivar (Pérez 1990), las condiciones de incubación, el suministro de nutrientes y reguladores; así como del estado de desarrollo y la fase vegetativa de la planta (Botti et al, 1993), la cual a su vez está relacionada con la época del año (Pandeliev, 1990).

El medio de cultivo debe proporcionar al explanto todo lo que este necesita para sobrevivir y desarrollarse (agua, sales minerales y compuestos orgánicos, como azúcares y vitaminas), así como reguladores de crecimiento que estimulen su desarrollo (Marín, 1993). De aquí la importancia en el estudio y la selección de un medio de cultivo adecuado. De hecho Barlass y Skenne (1980) demostraron que la proliferación de cultivos de vid era dependiente de la nutrición, resultando el medio de cultivo MS, mejor que cuando se utilizaba el mismo medio con las macrosales diluidas a la mitad (MS/2).

Otro factor a tener en cuenta en esta fase de establecimiento, es la influencia de la época del año sobre la respuesta de los explantos (Yu y Meredith, 1986). El ambiente de la planta madre, así como la época del año en la cual se extrae el explanto, el régimen de luz bajo el que crece y el «status» de agua y nutrientes son muy importantes (Thomas y Ravindra, 1997). Wei (1992) destacó que los factores estacionales afectan mucho a la división celular «in vitro» y a la regeneración.

Krul y Mowbray (1984) señaló que algunos cultivares de vid son sensibles al fotoperíodo, y muestran una reducción en su tasa de crecimiento como respuesta a la disminución de la longitud del día; destacando también la influencia de la temperatura sobre el crecimiento y desarrollo de las células. Dicho autor sugiere que el género *Vitis* contiene genes sensibles a la temperatura, que regulan el crecimiento y desarrollo.

La condición fisiológica de la planta madre tiene una marcada influencia sobre la respuesta obtenida «in vitro», probablemente como resultado de su interacción con los nutrientes disponibles y niveles endógenos de reguladores de crecimiento (Vasil y Vasil, 1986). De ahí que los resultados sean muy variables, cuando se comparan explantos cultivados en distintas estaciones del año (Vasil y Vasil, 1986).

El material vegetal es otro factor muy importante a tener en cuenta; así cada especie, variedad o clon, se comporta de manera diferente (Botti et al, 1993). Otro factor a considerar es el efecto de la posición del explanto en la planta (topofisis), teniendo una muy importante influencia sobre su posterior crecimiento y desarrollo «in vitro» (Pierik, 1990). En general, la producción de brotes se incrementa con la distancia al ápice (Novak y Juvova, 1980; Yu y Meredith, 1986; Norton 1986), probablemente debido a la relación con el alto contenido de fenoles existentes en las yemas terminales (Fanizza et al, 1984). El mayor grado de proliferación de los explantos basales podría atribuirse también a la eliminación física de la dominancia apical y al mayor número de yemas preformadas (Sudarsono y Goldy, 1991). Díaz-Sala (1989) sugiere que el factor determinante de la respuesta proporcional a la longitud del tallo son las citoquininas; sin embargo, para otros investigadores se podría explicar por un acúmulo basipétalo de auxinas en el tallo.

Botti et al (1993), trabajando con vid, observó que el potencial morfo genético de la región axilar variaba de un explanto a otro, dentro de un mismo cultivar. Algunos explantos tenían un destacable potencial morfo genético, siendo capaces de desarrollar más de 20 brotes y grupos compactos de yemas, en un intervalo de 3 meses. Igualmente son de destacar los resultados obtenidos por Nicolau (1991), quien encontró que las yemas derivadas de la posición media o basal de los brotes crecieron mejor «in vitro», que las obtenidas de la posición apical. También Pandeliev et al (1990) observó el mayor poder de regeneración en los sectores 5° a 8° yema, seguidos de la 8° a 10° posición. Del mismo modo, Sudarsono y Goldy (1991) observaron que las yemas basales mostraban mejor proliferación que los explantos originados de las yemas más distales. Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos por Cholvadova (1989), quien obtuvo los peores resultados con las yemas de 5° a 6° orden, ya que formaron más masa de callo y mostraron menor capacidad para formar brotes que las yemas de 2° a 4° orden.

En otras especies se ha visto que las tasas de multiplicación son dependientes del tamaño inicial del explanto (Murashige, 1977; Thomas y Ravindra, 1997), esto puede reflejar un incremento en el número de sitios activos para la iniciación de los brotes. Para Pierik (1990), el volumen del explanto puede tener importantes consecuencias, como por ejemplo una mayor cantidad de reservas nutritivas y reguladores endógenos, un porcentaje inferior de superficie cortada productora de etileno, etc.; todas ellas posiblemente condicionantes de la respuesta en cultivo «in vitro». Al mismo tiempo las heridas o lesiones, pueden romper barreras de tipo anatómico en los explantos (por ejemplo una capa de fibras de esclerénquima), facilitando la formación de raíces adventicias (Pierik, 1990).

La edad fisiológica del explanto tiene influencia en la dirección y extensión de la organogénesis, ya que frecuentemente se observa una disminución en el transporte de auxina en tejidos viejos. En árboles y arbustos son también comunes los efectos perifísicos (la misma edad y posición, pero diferente exposición, por ejemplo, al sol o a la sombra) y los efectos ciclofísicos (la misma edad pero diferente posición. Welander (1988) destacó un mayor crecimiento «in vitro» de yemas en reposo y de las más cercanas a la base de plantas en crecimiento activo, lo cual podría ser atribuido a la acumulación de almidón y carbohidratos solubles en estas yemas.

2.1.3. Mantenimiento y multiplicación de los cultivos (Fase-II)

Esta fase es de gran importancia, pues supone el mayor potencial para la propagación clonal a gran escala de *Vitis*; sin embargo la producción de rutina de un gran número de cultivares no ha sido todavía descrita (Lewandowsky, 1991).

Las técnicas utilizadas «in vitro» para la propagación de varias especies y cultivares de *Vitis*, se pueden clasificar en tres grandes grupos:

- 1) Cultivo de segmentos nodales.
- 2) Cultivo de masas proliferantes de brotes miniaturizados.
- 3) Embriogénesis somática

Cultivo de segmentos nodales

Fue Galzy (1961) quién por vez primera logró poner a punto esta técnica, con el fin de estudiar la diferencia en el desarrollo y organogénesis entre vid sana e infectada por el virus del **Entrenudo Corto Infeccioso**; así como para profundizar en los requerimientos nutricionales de la vid. Consiste en sembrar fragmentos de tallo, que portan yemas funcionales sobre un medio de cultivo estéril que contiene sacarosa, macroelementos, oligoelementos, vitaminas y agar -para solidificar el substrato-, pero sin reguladores del crecimiento. Se trata de un microestaquillado de segmentos uninodales en condiciones asépticas. Si las condiciones de cultivo (temperatura, iluminación y humedad) son óptimas, la yema dará lugar en dos meses a un tallo, del cual podrán obtenerse de 6 a 10 explantos útiles para realizar un nuevo ciclo de multiplicación, pudiendo llegar a una producción teórica anual de 10^4 a 10^5 plantas, según las variedades utilizadas. Este método presenta una alta estabilidad genética, sin embargo, no va destinado a estimular la múltiple formación de brotes (Barlass y Skenne, 1980) a partir de las yemas axilares pre-existentes.

Cultivo de masas proliferantes de brotes miniaturizados

Es posible aumentar este rendimiento, adicionando reguladores de crecimiento al medio de cultivo que estimulan la proliferación de brotes laterales a partir de las yemas preexistentes en la axila de la hoja (Silvestroni, 1981; Goussard, 1981; Harris y Stevenson, 1982; Novak y Juvova, 1982/83; Rosu et al, 1983; Chée y Pool, 1985; Heloir et al, 1997). Este método, aplicado a la vid más recientemente, utiliza la aptitud que tienen las citoquininas para inhibir la dominancia apical y estimular el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares (Dunstan y Thorpe, 1986).

En algunas especies arbóreas se han obtenido tasas de multiplicación (número de propágulos producidos a partir de un sólo explanto en cada subcultivo) de 8 a 10, lo que permite obtener millones de plantas anualmente (Boxus, 1974; Murashige, 1974). El ritmo de proliferación de los brotes depende fundamentalmente de la especie estudiada, concentración de citoquinina y tiempo de permanencia en el cultivo. También se han dedicado muchos esfuerzos e investigaciones para conocer el nivel óptimo de sales minerales inorgánicas, vitaminas, reguladores de crecimiento y otros requerimientos, para obtener la máxima proliferación de brotes (Monette, 1983). Asimismo se ha demostrado que la concentración de agar en el medio de cultivo influye en la tasa de proliferación «in vitro» de *Malus* spp. Otros investigadores como Gribaudo et al, (1995), también han estudiado la influencia de la concentración de sacarosa en la proliferación de yemas axilares. En trabajos con diferentes cultivares de *V. vinifera*, Harris y Stevenson (1982) comprobaron que la utilización de medio de cultivo líquido resulta en un incremento del crecimiento y proliferación, al comparar con el medio solidificado que limita la disponibilidad de citoquininas (Debergh et al, 1986). La utilización de medio de cultivo líquido tiene, sin embargo, el inconveniente de presentar un mayor porcentaje de vitrificación.

La producción teórica puede sobrepasar las 10^6 plantas al año. En realidad el rendimiento es sensiblemente menor por diversas razones, a saber: vitrificación de plantas; nutrición mineral o hídrica defectuosa; acumulación de polifenoles en el medio (Torregrosa y Bouquet, 1993); así como el continuo subcultivo de explantos de vid, que conlleva el envejecimiento de los cultivos (Koruza y Jelaska, 1993) y la obtención de brotes de longitud reducida, lo que ocasiona gran dificultad para la fragmentación (Silvestroni, 1981). Krul y Mowbray (1984) destacan que el prolongado cultivo «in vitro» puede originar un cambio fenotípico en las vides regeneradas; las citoquininas pueden acelerar la formación de yemas juveniles debido al aumento en la producción de brotes adventicios (Mullins et al, 1979). El estado juvenil puede ser inducido por repetidos subcultivos de brotes (Mur, 1979).

Con dosis relativamente altas de citoquininas y subcultivos intensivos y sucesivos se dan las mayores probabilidades de variaciones y mutaciones, por ello hay que manejar con cuidado el número total de individuos. En estas condiciones es frecuente la obtención de plantas que no muestran conformidad morfológica y/o fisiológica con la planta madre, retornando en ocasiones a caracteres juveniles. Para algunos autores, si bien las citoquininas permiten el desarrollo de las yemas axilares, al mismo tiempo frenan el crecimiento de los brotes y, sobre todo, inhiben la formación de raíces, lo que obliga a realizar posteriormente una etapa suplementaria de enraizamiento o rizogénesis.

Embriogénesis somática

Puede definirse como una embriogénesis asexual en la que células diploides somáticas dan lugar a la formación de estructuras bipolares, con presencia de un polo caulinar y otro radicular, comparables a los embriones cigóticos salidos de la fusión de gametos haploides. Estos embriones somáticos son llamados embrioides, para distinguirlos de los verdaderos embriones sexuales. En este caso, la totipotencialidad de la célula vegetal se expresa totalmente: una célula integrada en un tejido diferenciado debe ser capaz, después de la desdiferenciación celular, de seguir un programa de desarrollo comparable al seguido por el cigoto y dar lugar a una planta entera. En la naturaleza, este proceso ocurre en algunas familias, especialmente en las Rutáceas y en muchas especies de *Citrus* (Sefc et al, 1997).

En la vid, la embriogénesis somática puede obtenerse a partir de explantos de naturaleza y de origen diverso, por ejemplo: limbos foliares (Hirabayashi, 1985; Stamp y Meredith, 1988; Torregrosa y Bouquet, 1995), fragmentos de inflorescencias (Krul y Worley, 1977), óvulos (Mullins y Srinivasan, 1976), anteras (Rajasekaran y Mullins, 1979; Bouquet et al, 1982; Faure et al, 1996; Popescu, 1996; Torregrosa al, 1998) y embriones cigóticos (Stamp y Meredith, 1988). Los tejidos florales o los reproductores (óvulos, anteras) son los más favorables para la inducción de una embriogénesis somática.

La embriogénesis somática puede suponer un importante rendimiento potencial, pero en la actualidad sólo puede ser utilizada para unas pocas especies o variedades (Mozsar y Súle, 1994), siendo muy importante el efecto del genotipo (Mozsár y Viczian, 1996). En la mayoría de los casos la frecuencia de regeneración de plantas a partir de los embriones es generalmente baja (Mozsár y Viczián, 1996), pero puede ser mejorada, optimizando las técnicas de cultivo. De hecho se han desarrollado varios protocolos para incrementar la tasa de regeneración, tales como: enfriamiento de los embri-

nes a 4 °C (Rajasekaran y Mullins, 1979; Martinelli et al, 1993), subcultivo de los embriones en medio fresco (Coutos-Thevenot et al, 1992), eliminación de los cotiledones de los embriones (Mauro et al, 1986), aplicación de reguladores de crecimiento (Gray y Klein, 1989) y germinación en medio líquido (Mozsár y Süle, 1994).

Los embrioides se obtienen normalmente en suspensiones celulares o bien a partir de cultivos de callos (Quesada et al, 1997). En cualquier caso, el proceso embriogénico implica una etapa más o menos larga, en el curso de la cual las células indiferenciadas y en proliferación activa ven modificadas sus interacciones, experimentando una reorientación de su programa celular. Los medios de inducción a menudo llevan altas dosis de auxinas exógenas, generalmente 2,4-D (ácido 2,4-dichlorofenoxiacético). Una vez inducido el embriode será necesario transferirlo a un medio de maduración exento de auxina (Sala et al, 1997). Los embrioides, de hecho, son como semillas artificiales y cada una de ellas puede originar una planta entera (Martínez y Cañameras, 1989; Micheli et al, 1998). En estas condiciones, parece ser, que pueden producirse y expresarse modificaciones genéticas y/o epigenéticas, de modo que existe el riesgo de que algunas de las plantas obtenidas no sean conformes al tipo de partida. Pero no por ello deja de ser una herramienta importante en la micropropagación.

En vid cabe destacar los trabajos de Harst (1995), quien indujo la formación de embriones en el 80% de los cultivos originados a partir de discos de hojas, con una capacidad de regeneración permanente durante al menos 2 años. Publicaciones recientes han demostrado la posibilidad de que ciertos cultivares de vid (*Vitis* spp), manifiesten aptitud para la regeneración de plantas por organogénesis (Stamp et al 1990) o embriogénesis somática (Martinelli, 1993; Robacker, 1993), a partir de diferentes tipos de tejidos (tallos, peciolos, zarcillos, inflorescencias y bayas). Otros autores que también han utilizado la embriogénesis somática en vid han sido: Hawker et al, 1973; Krul y Worley, 1977; Torregrosa y Bouquet, 1995; Yahyaovi et al., 1998; Passos et al., 1999.

También son de destacar los trabajos de Goussard et al (1991), quién eliminó el virus del **Enrollado** mediante la embriogénesis somática, realizada a partir de tejido de ovario y antera; para poder eliminar el virus del **Entrenudo Corto Infeccioso** necesitó someter el cultivo a termoterapia. Martinelli y Mandolino (1995) y Scorza et al (1995) cultivaron embriones somáticos con *Agrobacterium* como vector de transferencia de genes, logrando de este modo plantas transgénicas vía embriogénesis.

2.1.4. Enraizamiento y elongación de los brotes (Fase III)

La fase de enraizamiento «in vitro», parece limitante para la micropropagación de algunas especies leñosas. En la mayoría de los casos se desconoce todavía la causa de los bajos porcentajes de enraizamiento. El complejo metabolismo de la auxina, la existencia de una fase sensitiva y otra inhibidora y la interacción con el estado fisiológico del explanto pueden tener un papel importante (Marín, 1993).

A pesar de esta dificultad, son cada vez más numerosas las especies leñosas en las que se logran importantes niveles de respuesta en esta etapa imprescindible para completar el proceso de propagación «in vitro». En coníferas, son más de 20 especies en las que se ha logrado aumentar el porcentaje de enraizamiento (Ferro, 1989). En vid, la rizogénesis es relativamente fácil de inducir en cultivos de tejidos “in vitro” (Gribaudo 1985; Ferro, 1989). De hecho ya en el primer cultivo de fragmentos de brotes jóvenes de vid, efectuado por Morel (1944, 1948), se diferenciaron raíces. En algunos cultivares, no obstante, el enraizamiento puede ser un problema; así Gifford y Hewitt (1961) enraizaron sólo el 2% de los brotes, y Galzy (1972) enraizó el 40% de los brotes, pero sólo tuvo éxito en producir plantas normales en el 21% de los casos. La formación de raíces en vid, parece estar muy ligada al genotipo, tal como indicaron (Jona y Webb, 1978; Chée y Pool, 1983; Martínez y Tizio, 1990; Damiano, 1991; Roubelakis, 1991). Dichos investigadores señalaron que la producción de raíces, calidad y vigor del brote están generalmente relacionados con el genotipo.

A veces, existe gran discrepancia entre los porcentajes de enraizamiento obtenidos por los distintos investigadores, lo que puede ser debido además de a la diversidad genética, a que la dosis óptima del regulador utilizado parece depender de la fase de crecimiento, pero seguramente también de otros factores desconocidos relacionados con el estado fisiológico (Puente y Marín, 1994).

A continuación citaremos algunos factores con influencia sobre el enraizamiento. Puente y Marín (1994) clasifican los factores que influyen en el enraizamiento “in vitro” en:

- 1) Factores genéticos; normalmente las especies que enraízan más fácilmente en campo, también lo hacen “in vitro”.
- 2) Factores fisiológicos, como pueden ser: el estado fisiológico del brote, la procedencia de las plantas jóvenes o adultas, el número de subcultivos, etiolación, vitrificación, época del año, longitud del brote, número de hojas, etc.

- 3) Factores del medio de cultivo: concentración de sales minerales, fuente de carbono, suplementos orgánicos, poliaminas, floroglucinol, coumarín, vitaminas, agente solidificante, pH, reguladores de crecimiento, temperatura de incubación de los cultivos, iluminación, humedad, etc.

Seguidamente, comentaremos con más detalle algunos de dichos factores, dedicando especial atención a la influencia de los reguladores de crecimiento.

Composición y estado físico del medio de cultivo

a) Reguladores de crecimiento

La supresión de las citoquininas produce un bloqueo en la fase de proliferación (Silvestroni, 1981) e induce la formación de raíces en la base del explanto (Jona y Webb, 1978), que junto con la inclusión de auxinas (sólo si es necesario), constituyen la operación fundamental de esta etapa (Negueiros, 1978). Aunque se considera que las citoquininas inhiben el enraizamiento, dichos efectos inhibidores desaparecen y el desarrollo de los primordios radicales parece depender de ellas [Eriksen (1974); citado por Németh (1986)]. En la bibliografía se describen interferencias del regulador de crecimiento y dosis utilizada en la fase de multiplicación, sobre la posterior fase de enraizamiento; en ocasiones la citoquinina residual es suficiente para suprimir la formación de raíces (Díaz Sala, 1989; Royo et al, 1991; Blazina y Koruza, 1991; Kanakis y Demetriou, 1993; Encina, 1993). De hecho Harris y Stevenson (1979) encontraron que dosis de citoquininas mayores de 20mM provocaban una reducción de la longitud de los brotes de vid y subsiguiente dificultad en el enraizamiento de los mismos. Sin embargo, Neves, (1995) estudió los efectos de niveles de reguladores de crecimiento diferentes en el medio de multiplicación sobre el enraizamiento «in vitro» e “in vivo” de brotes de vid y observó que no existían diferencias significativas entre ellos.

En algunos casos, la rizogénesis es inducida añadiendo una o más auxinas al medio de cultivo. El tipo de auxina utilizable para conseguir un óptimo enraizamiento depende del genotipo; así por ejemplo, los porcentajes de enraizamiento de algunos cultivares de *V. vinifera* (Grenan, 1979) fueron aceptables con 0,1mM de AIA o AIB (ácido indolbutírico) y menos aceptables con ANA (ácido naftalenacético). En contraste, explantos de *V. rupestris* mostraron mayor porcentaje de enraizamiento con ANA a 0,1mM (Galzy, 1972; Grenan, 1979; Chée y Pool, 1983, 1987); concentraciones de auxina mayores de 0,1mM causaron formación de callo basal y reducido crecimiento del brote (Galzy, 1972). Según Barlass y Skene, (1980), sólo los

cultivares **Cabernet sauvignon** y **Cabernet franc** enraizaron en ausencia de auxina, mientras que otros cultivares como, **Sultana**, **Muscat** y **Doradillo** requieren la presencia de auxinas para desarrollar raíces.

Grenan (1979) ensayó el efecto de diversas auxinas, concluyendo que la más idónea, por rapidez y eficacia, es el AIA a la dosis de 10mM. El AIA, es también utilizada por otros investigadores (Jako y Nitsch, 1980; Cong-Linh, 1987; Blazina y Koruza, 1991; Thies et al, 1992; Koruza y Jelaska, 1993).

Otros autores prefieren el empleo de AIB (Novak y Juvova, 1982/83; Li y Eaton, 1984; Morini et al, 1985; Lee et al, 1989). Casal (1990) obtuvo una elevada respuesta de enraizamiento mediante pretratamiento por inmersión, de brotes apicales de los cultivares **Marecharal**, **Foch** y **Cascade**, en una solución con alta concentración de AIB; sin embargo, cuando los brotes fueron cultivados sin pretratamiento alguno, el desarrollo de las raíces fue insatisfactorio y la mayoría de los brotes presentó una sola raíz.

También el ANA ha sido utilizado para inducir rizogénesis (Bini, 1979; Cossio, 1981; Chée y Pool, 1982; Ferro, 1989; Martínez y Cañameras, 1989; Gray y Benton, 1991). Algunos autores han obtenido peores resultados frente a las otras auxinas, frecuentemente por la aparición de abundante callo (Martínez-Pullido, 1990; Puente y Marín, 1994), mientras que otros lo han encontrado favorable (Ferro, 1989).

El 2,4-D prácticamente no se utiliza para conseguir el enraizamiento. Novak y Juvova (1982/83) mencionaron que la adición de 2,4-D no resultó útil para la inducción de rizogénesis, pero Rajasekaran y Mullins (1981) lo utilizaron para enraizar segmentos nodales de vid.

Algunos autores combinan 2 auxinas para tener así un efecto aditivo, así por ejemplo, Novak y Juvova (1982/83) y Lewandowski (1991) realizaron combinaciones de ANA + AIB.

Es conocido que las auxinas inducen la formación de raíces, pero también inhiben su posterior crecimiento (Maene y Debergh, 1983; Gribaudo et al 1985) y pueden provocar la formación de callo. La elongación de las raíces ocurre más rápidamente en un medio libre de auxinas (Galzy, 1972; Grenan, 1979); por ello, algunos autores inducen la rizogénesis en un medio de cultivo adicionado con auxina para, posteriormente, transferir los brotes a un medio sin regulador y permitir así un crecimiento radicular más completo (Jona y Valania, 1980; Jona et al, 1984; Ferro, 1989). Galzy (1972) señaló que la velocidad de crecimiento del tallo, disminuye regularmente cuando se prolonga el cultivo en presencia de ANA, por lo que aconseja que una vez inducido el enraizamiento se transfiera a un medio de cultivo sin ANA, durante 20 días.

b) Sales minerales

La reducción de la concentración de sales minerales utilizadas en el medio de cultivo es un factor favorable para facilitar el enraizamiento “in vitro” (Chée y Pool, 1988). La necesidad de macro y microelementos, depende en gran medida de la cantidad de “reservas alimenticias” disponibles en el explanto. Las plantas leñosas y especialmente las gimnospermas prefieren una concentración salina baja para la formación de raíces adventicias. Por este motivo, la mayoría de los investigadores que trabajan con vid, disminuyen la concentración de sales (normalmente sólo las macrosales), empleadas en la fase de proliferación al 25% o 50% (Goussard, 1981; Skene y Barlass, 1981; Harris y Stevenson, 1982; Novak y Juvova, 1982/83; Li y Eaton, 1984; Yamakawa et al, 1986). Para algunos autores los cambios en la concentración de sales, no tuvieron efecto sobre el porcentaje de enraizamiento, pero sí sobre el número de raíces que fue mayor cuando las sales se redujeron al 50% (Harris y Stevenson, 1979; Skene y Barlass, 1981; Li y Eaton, 1984). Una dilución demasiado drástica de las sales, puede dar lugar a un temprano desarrollo de síntomas cloróticos, con áreas amarillas en las hojas y brotes de color pálido y sin vigor (Roubelakis y Zivanovitch, 1991) que muestran una reducida capacidad de enraizamiento (Puente y Marín, 1994).

Para otros investigadores, el efecto favorable de la dilución de sales radica no en la iniciación de raíces, sino en su posterior crecimiento (Skene y Barlass, 1981; Novak y Juvova, 1982/83; Goussard, 1991). Sin embargo, el genotipo del cultivar también parece jugar un papel importante; de hecho, Choi (1992), trabajando con el cultivar **S9110**, no encontró ningún efecto positivo en el enraizamiento al diluir 1/10 las sales del medio de cultivo, mientras que en iguales condiciones la inducción de raíces fue excelente con el cultivar **Kyoho**. Martínez (1990) ensayó distintos medios para inducir el enraizamiento, resultando ser el medio MS/2 el mejor adaptado a todos los genotipos ensayados, en lo concerniente al porcentaje de plantas obtenidas. Especial mención merece los trabajos llevados a cabo por Galzy (1969a,b), quién profundizó su investigación sobre los factores físicos (temperatura) y químicos (potasio e ión amonio) que favorecen la rizogénesis referida al porcentaje de enraizamiento, velocidad de crecimiento del brote y velocidad de emisión de las raíces.

c) Compuestos orgánicos

Corte (1980) mencionó que la rizogénesis es favorecida por la presencia de vitamina D; sin embargo, Novak y Juvova (1982/83) no encontraron influencia favorable de dicha vitamina en el enraizamiento de distintos cultivares de vid.

La utilización de ácido cítrico en el medio de cultivo no favoreció el enraizamiento, al contrario resultó ser perjudicial (Roubelakis y Zivanovitch, 1991).

Novak y Juvova (1982/83) probaron el efecto del ácido ferúlico sobre el enraizamiento de brotes de vid, concluyendo que tenía un efecto inhibitorio en la formación de raíces.

Para Ferro (1989) la sacarosa favorece la rizogénesis. La sacarosa y la luz son factores muy importantes por su influencia en los niveles endógenos de hidratos de carbono, los cuales tienen una intervención directa en la iniciación del proceso de enraizamiento «in vitro». Chée y Pool (1983) redujeron la concentración de sacarosa en el medio de cultivo del 3 al 1% para lograr el enraizamiento de brotes de vid; dicha reducción redundó en un incremento del porcentaje de enraizamiento, así como del vigor y calidad de los brotes. Sin embargo, para Choi et al (1992) un suplemento de sacarosa resultó en un incremento del número de raíces principales. Harris y Stevenson (1979) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa, sobre la rizogénesis de *V. vinifera* y encontraron que 20 g/L resultó ser la mejor entre las dosis por ellos ensayadas. Para Puente y Marín (1994) el efecto beneficioso de la disminución de la concentración de sacarosa del medio quizá sea debido a la disminución de la presión osmótica del medio.

La utilización en el enraizamiento de cofactores, como el floroglucinol, ha dado buenos resultados en algunas especies (Damiano et al, 1991). En ciertos casos la presencia de floroglucinol reduce el tiempo de iniciación de las raíces, mientras que en algunos frutales aumenta el porcentaje de enraizamiento (Wang, 1991). El floroglucinol muestra, no obstante, un comportamiento variable, lo cual puede ser debido a la interacción con el estado fisiológico de los explantos (Zimmerman, 1983).

Los fenoles muestran un efecto sinérgico con las auxinas que podría ser debido a la inhibición de la enzima AIA-oxidasa y al incremento consecuente del nivel endógeno de AIA (Damiano et al, 1991). La presencia de coumarín (monofenol) también parece aumentar el porcentaje de enraizamiento en cultivares de manzano (Karhu, 1993).

También la utilización de otros suplementos orgánicos, como poliaminas, resulta especialmente beneficiosa en el enraizamiento del olivo (Rugini et al, 1988).

d) Estado físico del medio de cultivo

En experiencias con medios de cultivo líquidos, utilizando la técnica de puentes de papel de filtro, Harris y Stevenson (1979) consiguieron un au-

mento del porcentaje de enraizamiento del híbrido **Baco**. Posteriormente dicha metodología la aplicaron a veintidós genotipos, entre variedades de *V. vinifera* L. e híbridos. El enraizamiento sobre medio líquido supone un mejor suministro de oxígeno (Pierik, 1990). Puente y Marín (1994), al contrario que Harris y Stevenson (1979), afirmaron que el uso de medio líquido, no parece afectar consistentemente al porcentaje de enraizamiento. Además se ha encontrado que disminuye la absorción de auxinas y las plantas resultantes son más difíciles de aclimatar.

Para Conner y Thomas (1981) el enraizamiento disminuye al incrementar la concentración de agar; en su caso la dosis óptima fue de 6 g/L, mayores concentraciones reducían la humedad relativa y la mayoría de las raíces fue dañada en el trasplante. Algunos investigadores para lograr el enraizamiento utilizan el sistema de cultivo en doble fase (Debergh et al, 1986), a pesar de que incrementa el porcentaje de vitrificación. El cambio o transferencia del cultivo a un medio nutritivo nuevo permite un mejor enraizamiento de los brotes, ya que de esta manera se eliminan las posibles sustancias inhibitoras emitidas al medio (Favre, 1973).

Condiciones de incubación

a) Temperatura

Alleweldt (1962) constató que la rizogénesis tiene un óptimo de temperatura en torno a 25 °C, a diferencia de la callogénesis que se ve favorecida por una temperatura más alta. La temperatura influye sobre el porcentaje de enraizamiento y número de raíces emitidas por brote. Harris y Stevenson (1982) encontraron que con una temperatura de 30 °C, 5 de cada 6 brotes presentaban raíces a los 7 días de cultivo, siendo estas visibles a partir de los 5 días; a 40 °C no se produjo enraizamiento, mientras que a 20 °C sólo enraizaron 4 de cada 6 brotes.

Favre (1979) realizó un amplio estudio sobre la influencia de la temperatura en la rizogénesis. Para ello ensayó el efecto de 3 temperaturas diferentes (22, 32, y 39 °C) observando los siguientes resultados: a 32 °C, los brotes enraizaron muy rápidamente, de modo que más del 95% habían enraizado ya a los 13 días; a 22 °C, el enraizamiento fue más lento y una eficacia del 90%; por último, a 39 °C, el enraizamiento además de lento fue infructuoso ya que sólo enraizó 1/4 de los brotes, la base de muchos de ellos comenzó a dilatarse, debido a un funcionamiento periclinal anormal que ocasionó abundante tejido secundario.

Galzy (1969a) realizó un estudio de temperaturas, entre 8 y 39 °C, con *Vitis rupestris*, resultando que las temperaturas extremas de 39 °C, provoca-

ban una disminución de la rizogénesis. La emisión de nuevas raíces tenía lugar a velocidad máxima cuando la temperatura era de 33 °C; en contraste, para el crecimiento del tallo y las raíces la temperatura óptima parece ser un poco más baja, 30 °C. Sin embargo, algunas plantas leñosas precisan frío para la formación de raíces (Pierik, 1990).

b) Iluminación

En la fase de enraizamiento, se han obtenido mejores resultados con luminosidad baja y con luz de color rojo (Negueroles, 1978). La acción fotomorfogénica de la luz (Cabaleiro y Economon, 1991) estaría relacionada con la actividad peroxidasa, el nivel endógeno de auxina y el contenido fenólico (Nemeth, 1986).

Las especies leñosas, parecen tener diferentes requerimientos de luz que las especies herbáceas; bajas intensidades de luz, fueron favorables para el enraizamiento de varias especies leñosas (Cabaleiro, 1991). En algunos casos es beneficioso un período de oscuridad. Jona y Barboglio (1981) reportaron una discreta rizogénesis en cultivos de vid, mantenidos en oscuridad, durante 3 semanas. Sin embargo, Chée (1982), al mantener los brotes en oscuridad, observaron que permanecían verdes hasta los 15 días, transcurrido este tiempo no crecieron ni desarrollaron raíces y después se tornaron marrones. Posteriormente, Chée y Pool (1986), al estudiar la influencia de la calidad de la luz, encontraron que, a altas concentraciones de SO_4Mn , no existían diferencias en el número de raíces por brote entre la luz roja y la azul; por el contrario, a bajas concentraciones de SO_4Mn , con luz azul se produjeron más raíces. Chée y Pool (1989) obtuvieron un mayor porcentaje de brotes enraizados en días largos y con luz roja, que con luz blanca ó azul. El número de raíces producidas por brote y la longitud total, fueron también mayor con luz roja.

Material vegetal

Se han descrito importantes diferencias en la aptitud frente al enraizamiento (Vieitez et al, 1983) entre material vegetal juvenil y adulto, mostrándose más apto el juvenil. Douglas (1984), trabajando con brotes de *Rhododendron*, encontró que la facilidad para el enraizamiento de estos brotes podría estar relacionada con su fisiología juvenil y su capacidad para absorber nutrientes y auxina, durante el pretratamiento. A veces las diferencias en la capacidad regenerativa se pueden explicar por la presencia de alguna barrera de tipo anatómico; en estos casos las lesiones o heridas pueden jugar

un papel importante en el enraizamiento, como ocurre en algunos patrones de manzano.

También se pueden establecer diferencias entre especies vegetales y cultivares. Más aún, se ha demostrado que en algunas especies vegetales, por ejemplo *Actinidia chinensis*, las plantas femeninas tienen una mayor capacidad regenerativa, que las plantas masculinas.

Otro factor a tener en cuenta es la condición de brote producido «in vitro». Debergh (1988) destacó que el uso de la citoquinina BA, durante la etapa de multiplicación, produce dificultades en la inducción de raíces, pero probablemente esta disminución del porcentaje de enraizamiento no sólo es debida a la dosis de fitoregulador presente en el medio de cultivo, sino también al número de subcultivos realizados. Es conocido que este número interfiere en el nivel de fitoreguladores endógenos de las plantas, interfiriendo la fisiología de las mismas. De hecho la formación de raíces adventicias disminuyó en las especies de la familia Rosáceas, al realizar subcultivos sucesivos. En contraste, en cultivos de manzano cv. **Jonathan** se ha demostrado que, con un número creciente de repicados, el porcentaje de enraizamiento aumenta. Esto puede ser explicado quizá por el proceso de rejuvenecimiento que tiene lugar, principalmente en plantas leñosas, al realizar repicados sucesivos.

La longitud del brote puede tener influencia sobre su capacidad rizogénica. Novak y Juvova (1982/83) enunciaron que brotes de vid con longitud comprendida entre 2 y 2,5 cm y 3 a 5 hojas, fueron los más aptos para el enraizamiento; la eliminación de las hojas tuvo un efecto negativo en el enraizamiento de los brotes. Lee y Wetzstein(1990), por el contrario, no encontró influencia de la longitud del brote en el enraizamiento en vid. Németh (1986), enraizando brotes de manzano, observó que el tamaño de los brotes y el número de hojas, no tuvieron influencia sobre el enraizamiento. Morini et al (1985), trabajando en vid, señalaron que cuando los brotes presentaban vitrificación, los porcentajes de enraizamiento disminuyeron. Marín (1993) y Puente y Marín (1994) afirmaron que el estado fisiológico del brote es muy importante en la respuesta al enraizamiento.

Destacar la contribución que para algunos investigadores tiene la lámina de la hoja a la hora de realizar el enraizamiento. Thomas (1998) describió los efectos significativos de la presencia de la lámina de la hoja a la hora de lograr un temprano y mayor porcentaje de enraizamiento, número de raíces y vigor de estas. Estos factores nos permitirían explicar las fluctuaciones que existen en los porcentajes de enraizamiento y que no constituyen diferencias significativas.

El hecho de que la vid no continúe proliferando brotes en medio de enraizamiento, es importante y positivo para algunos cultivares de *Vitis*, que se utilizan como portainjertos (Conner y Thomas, 1981).

2.1.5. Aclimatación en condiciones “extra vitrum” (Fase IV)

Hemos visto que las vides pueden ser propagadas «in vitro» a partir de ápices y yemas axilares. Las plantas micropropagadas son susceptibles de sufrir una rápida desecación después de su transferencia a suelo, por lo que requieren una fase ó etapa de aclimatación «extra vitrum» (Harris y Stevenson, 1982). La transpiración después del trasplante es frecuentemente excesiva, lo cual da lugar a severos déficits de agua en la planta que son una de las principales causas de mortalidad. Como resultado de la aclimatación tiene lugar una reducción en la conductancia estomatal de la hoja que, junto con otros factores condiciona el grado de apertura estomatal, contribuyendo a reducir la transpiración. El objetivo principal de la aclimatación es conseguir una elevada supervivencia al trasplante, la adquisición de resistencia a las condiciones ambientales naturales y la recuperación de todas las actividades fisiológicas (During y Stoll, 1996).

La aclimatación supone transferir las plantas enraizadas “in vitro” desde un ambiente aséptico a maceta o suelo para su adaptación a las condiciones ambientales «in vivo». Las plantas han de superar con éxito dicha fase, asegurando así su supervivencia y posterior crecimiento y, consecuentemente, la viabilidad económica del cultivo (Gribaudo y Fronda, 1993). Sin embargo, constituye una de las etapas menos estudiadas de las técnicas de micropropagación, ya que algunos investigadores no la consideran al desarrollarse «fuera» del laboratorio. La mayor limitación para la aplicación comercial del cultivo de tejidos en la producción de plantas frutales son los cuidados que deben hacerse en las plantas micropropagadas al trasplantarlas a condiciones ambientales naturales (Villegas, 1990). De hecho esta fase, es todavía un paso problemático en la micropropagación a gran escala de algunos cultivos (Gribaudo et al, 1995; Kitto, 1997). También otros investigadores (De Fossard, 1976; Murashige, 1977; Anderson, 1980) afirman que esta fase todavía presenta problemas, que pueden implicar grandes pérdidas (marchitamiento, desecación, podredumbre de raíces) y en definitiva una disminución de la supervivencia. Como consecuencia de esta baja supervivencia se origina pérdidas económicas elevadas y el consiguiente encarecimiento del material aclimatado (Martínez y Cañameras, 1989). El éxito del cultivo de tejidos vegetales, como un mecanismo comercial de propagación de plantas, depende de la capacidad de transferir plantas «extra vitrum» a gran escala, bajo coste

y con una alta tasa de supervivencia (Conner y Thomas, 1981).

Las condiciones particulares en las que se desarrollan las plantas, durante el período de cultivo sobre medios artificiales «in vitro», a saber: en asepsia, con una humedad relativa del 90-100%, iluminación poco intensa, intercambio gaseoso limitado, temperatura y fotoperíodo estrictamente controlado, etc., inducen importantes alteraciones morfológicas y fisiológicas (De Fossard, 1976; Conner y Thomas 1981; Aguirreola, 1995; Debergh, 1995), responsables de su baja supervivencia al ser transferidas al ambiente natural. Así,

- 1) La elevada humedad relativa de cultivo provoca un desarrollo cuticular ausente o incompleto en la superficie de las hojas (Iacono y Martinelli, 1998) y una lenta respuesta estomatal (Lewandowski, 1991), lo que origina un escaso control del intercambio hídrico. Las plantas propagadas «in vitro» pueden presentar una anatomía de las hojas muy modificada, así como también mostrar alteraciones estructurales en la raíz, una pobre conexión vascular entre brotes y raíces o un funcionamiento inadecuado «in vivo» de estas últimas (no tienen o tienen pocos pelos radicales), lo que reduciría la capacidad de la planta para tomar agua. Estas modificaciones de las hojas y raíces sugieren que durante el período de aclimatación tendrán que ocurrir una serie de cambios que permitan el equilibrio entre el crecimiento del tallo y de la raíz.
- 2) Las condiciones de iluminación y nutricionales, con un medio de cultivo provisto de todos los elementos necesarios para el desarrollo de las plantas, propician un escaso desarrollo del sistema fotosintético (Gribaudo, 1993) y una nutrición fundamentalmente heterótrofa. Las hojas de una planta producida «in vitro» son frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas, ya que tienen las células empalizadas más pequeñas y en menor cantidad.
- 3) El ambiente aséptico elimina, por otra parte, la natural competencia-lucha con otros agentes biológicos, fitopatógenos o no, y con ello las posibles respuestas adaptativas.

La transferencia de las plantas a condiciones naturales supone, por tanto, su ubicación en un lugar menos favorable (Zuccherelli, 1979; Zinnerman, 1988) y el paso de una nutrición heterótrofa a otra autótrofa.

Para Cazet et al (1993) y Bourrain y Ctifl (1995) los principales factores que inciden en el éxito de la aclimatación son:

1. El ambiente ó clima del invernadero (temperatura, H.R., iluminación, aireación, etc.). Durante las primeras 72 horas de aclimatación se debe controlar estrictamente la humedad ambiental y la temperatura.

2. El tipo de contenedor y sustrato más adecuado, el grado de humedad de este, su pH, nivel de fertilización, porosidad, textura y grado de desinfección.
3. La calidad del material vegetal producido «in vitro» que está estrechamente relacionada con el protocolo de manipulación y medios de cultivo utilizados durante la micropropagación. Las plantas obtenidas deben estar bien desarrolladas y tener un buen sistema radicular.

2.1.5.1. Acondicionamiento previo

Consiste en llevar a cabo diferentes técnicas para reducir el estrés de la planta durante el trasplante a condiciones «extra vitrum». Normalmente se interviene durante la fase de enraizamiento, con la finalidad de habituar a la planta a diversas condiciones ambientales más parecidas a las naturales.

Entre los diferentes procedimientos, que pueden ser útiles y favorables para la subsiguiente aclimatación, cabe destacar: disminuir la H.R., aumentar la intensidad luminosa, favorecer el intercambio gaseoso con el exterior, aumentar la presión osmótica del medio de cultivo, disminuir la concentración de azúcar en el medio de cultivo, aumentar la concentración de CO₂, etc. (During y Harst, 1996; Silva, 1996; Thomas, 1999). De esta manera las plantas quedan «endurecidas» para afrontar el nuevo ambiente, incrementando así la tasa de supervivencia.

El colocar los recipientes de cultivo en un invernadero, durante unos 10 días antes del trasplante, es una práctica recomendable para la adaptación a los regímenes de luz y temperatura del invernadero (Morini et al, 1985). Un problema potencial de tal procedimiento es la acumulación de calor dentro de los tubos cerrados, debido a un doble efecto invernadero; esto se puede paliar quitando los tapones y aportando la humedad suficiente para prevenir el marchitamiento, siendo la contaminación poco importante (Conner y Thomas, 1981). Otro modo de realizar dicho pretratamiento consiste en dejar el tubo o matraz abierto en un ambiente estéril durante algunos días, con el fin de ajustarse a las condiciones “in vivo”.

Pruebas realizadas en el Centro de mejora genética de la vid, en Torino, han demostrado que la vid puede crecer “in vitro” en ausencia de sacarosa y que es capaz de fotosintetizar “in vitro” (Gribaudo y Fronda, 1993). Frente a esta opción existe la posibilidad de cultivar los brotes con una fuente de carbohidratos; en este caso se produce un incremento de las reservas de los cloroplastos al aumentar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Las reservas de almidón actuarían como el endospermo de una semilla, ayu-

dando a sobrellevar el período de transición durante el cual la planta no es realmente fotoautotrófica. También hemos de tener en cuenta que la adición de sacarosa al medio de cultivo modifica su potencial osmótico y capacidad de retención de agua, interfiriendo sobre el desarrollo de las plantas y su preparación para la aclimatación (Debergh y Maene, 1981). Un valor suficientemente elevado de esta fuerza favorece la respuesta posterior de las plantas en invernadero. Un aumento de la concentración de agar del medio de cultivo resulta igualmente adecuado para conseguir dicho objetivo (Coudret, 1992).

Otro tipo de pretratamiento, que se puede realizar en la fase de enraizamiento y que mejora la adaptación a las condiciones “in vivo”, consiste en un incremento de la intensidad luminosa (de 35 a 100 $\text{mEm}^{-2}\text{s}^{-1}$) acompañado normalmente de un enfriamiento de la base de los recipientes de cultivo. Bajo estas condiciones disminuye la H.R. en el interior del recipiente, por condensación sobre el medio frío. Todo ello activa el movimiento estomático, estimula la formación de ceras epidérmicas y tiene un efecto positivo sobre la actividad fotosintética (Martínez y Cañameras, 1989; Doring y Harst, 1996).

También se consigue un endurecimiento de las plantas en la fase de enraizamiento reduciendo el nivel de nutrientes en el medio de cultivo (Ziv, 1986).

Con la finalidad de proporcionar, durante el cultivo “in vitro”, unas condiciones ambientales más parecidas a las naturales y facilitar por tanto un balance hídrico óptimo para el desarrollo de las plantas, se han diseñado nuevos recipientes de cultivo que permiten modificar su atmósfera interna, jugando con diferentes tasas de ventilación. Dichos recipientes utilizan tapaderas que poseen una pequeña membrana que permite el intercambio gaseoso con una atmósfera de menor humedad relativa, que la que existe en el interior del recipiente. Los resultados obtenidos por Fal et al (1995), trabajando con plantas de clavel, ponen de manifiesto que el control del ambiente “in vitro” incide en las características anatómicas y en la calidad de las plantas producidas. El cultivo de plantas en recipientes con elevada tasa de ventilación favorece la aparición de fenotipos intermedios entre las plantas aclimatadas y las plantas obtenidas en recipientes no ventilados. El efecto de la ventilación se refleja en un mayor desarrollo de los tejidos analizados de la cutícula, del sistema plastidial, así como una menor frecuencia estomática. También Kozai et al (1995) destaca la importancia del control del ambiente “in vitro” para mejorar el crecimiento, desarrollo y morfología de la planta producida, o lo que es lo mismo, su calidad.

Recientes investigaciones han revelado que las plantas “in vitro” tienen una capacidad fotosintética importante y en ambientes controlados para la fotosíntesis algunas veces crecen mejor bajo condiciones fotoautotróficas que

heterotróficas o mixotróficas (Serret et al, 1997). Los brotes “in vitro” no pueden fotosintetizar debido principalmente a la baja concentración de CO₂ en el vaso de cultivo y a una insuficiente intensidad luminosa (Gribaudo y Fronda, 1993); no debido a una reducida capacidad fotosintética. La tasa neta fotosintética disminuye con la presencia de azúcar en el medio de cultivo.

Los trabajos “in vitro” realizados por Fournioux (1993) y Lackyo et al (1996) manifiestan que el crecimiento de los brotes de vid fue mayor en atmósferas enriquecidas con CO₂; las plantas fueron más homogéneas, el tamaño de la hoja incrementó y se promovió la formación de zarcillos y raíces, teniendo como principal efecto la expresión de la morfología adulta. También Faulky y Mudse (1988) realizaron pretratamientos con CO₂ en cámaras de ambiente controlado para aumentar el crecimiento y enraizamiento del brote de vid, a la hora de realizar la aclimatación. Sin embargo, para Lewandowsky (1991) el enriquecimiento con CO₂ en la aclimatación de vid no es necesario para mejorar el crecimiento de la planta.

Inclusión de retardantes del crecimiento en el medio de cultivo reduce el desarrollo del brote y de las hojas y pueden minimizar problemas de hiperhidricidad (Debergh et al, 1991). Smith et al (1992) obtuvo los mejores resultados en la aclimatación de plantas de *V. vinifera* L. cv. **Moscato Bianco**, combinando la inclusión de un triazol (paclobutrazol 1 mg/L) en el medio de enraizamiento y el cultivo en vasos que reducían la H.R. del 100% al 94%. Las plantas presentaban una mayor resistencia al marchitamiento después del trasplante, pequeña apertura estomatal, reducida área foliar y raíces más gruesas. Asimismo, Dami y Hughes (1997) incluyeron polietilenglicol en el medio de cultivo para enraizamiento, mejorando de este modo la supervivencia obtenida al aclimatar las plantas en invernadero. También Murali y Duncan (1995) obtuvieron buenos resultados en la aclimatación de banana, incluyendo otro triazol (tridimefon 2 mg/L) en el medio de cultivo, como agente condicionante.

Otro modo de facilitar la posterior aclimatación consiste en transferir las plantas, durante un corto período de tiempo, a recipientes conteniendo una mezcla de substrato saturada con las sales inorgánicas del medio de cultivo, realizando todo ello bajo condiciones asépticas. También se pueden transferir directamente brotes o plántulas para que enraícen en dichos recipientes. Goussard y Wiid (1989) transfirieron vides producidas “in vitro” a otros tubos de menor longitud, de manera que el sistema radicular quedara inmerso en una solución estándar de nutrientes inorgánicos. Tuvo lugar un rápido crecimiento bajo condiciones controladas y después de que emergieran sobre los tubos las primeras hojas bien desarrolladas, las vides fueron trasplantadas definitivamente a suelo; la supervivencia osciló entre el 95-100%.

2.1.5.2. *Aclimatación*

Consiste básicamente en mantener una H.R. alta, durante los primeros días tras el trasplante, y paulatinamente ir disminuyéndola, manteniendo una temperatura moderada entre 22-25 °C y una iluminación de 55mEm²s⁻¹ aproximadamente. Para ello se utilizan cubiertas individuales de plástico sobre las plantas, mantos de entretela humedecida, túneles de plástico ó sistemas de nebulización («mist», «fog system», etc.). La disminución gradual de la H.R. permite la recuperación de las plantas, estimulando las adaptaciones fisiológicas y anatómicas necesarias para controlar la pérdida de agua e incrementar la tasa fotosintética. A las 2-3 semanas las plantas alcanzan su actividad fotosintética normal y ya pueden crecer sin protección en el invernadero.

La elección del método vendrá dada por consideraciones económicas, tipo de especie, cultivar, etc. También es importante tener en cuenta las condiciones de las que procede la planta trasplantada. Hoy en día comienza a ser frecuente, para los productores que poseen instalaciones adecuadas, la compra a los laboratorios de planta sin aclimatar, realizando esta operación en la misma explotación. Esta vía disminuye el coste del material vegetal, aunque no siempre es rentable (Martínez y Cañameras, 1989).

El procedimiento de aclimatación se puede complementar con diferentes tratamientos. Así:

- 1) Se han realizado tratamientos pulverizando las plantas con un antitranspirante. Su aplicación suele tener un efecto contradictorio o incluso negativo (Pierik, 1990), ya que las sustancias utilizadas son fitotóxicas a las dosis recomendadas y escasamente eficaces a dosis más bajas. Morini et al (1985) señala que los antitranspirantes pueden ocasionar clorosis foliar, quizá debido al escaso depósito de ceras epicuticulares; asimismo indica que pueden obstaculizar la actividad fotosintética, que todavía no está completamente restablecida. Sin embargo, en algunas especies si pueden tener resultados interesantes, por ejemplo: la aplicación de folicote sobre plantas de manzano producidas «in vitro» mejoró los resultados obtenidos con el uso exclusivo de «mist» (Gribaudo y Fronda, 1993). Conner y Thomas (1981) citan que el uso de antitranspirantes disminuye el marchitamiento y aumenta la supervivencia.
- 2) En ocasiones se aplican reguladores de crecimiento. En nogal, por ejemplo, se han realizado tratamientos con Promalin (19 g/L BA más 19 g/L de giberelina) y Dormex (520 g/L de cianamida de hidrógeno), logrando una buena respuesta de las plantas bloqueadas en estado leñoso. Dormex puede ocasionar fitotoxicidad en el momento de su aplicación (Bourrain

y Ctifl, 1995), especialmente si la planta está escasamente lignificada. Pulverizando con 200 mg/L de GA₃ se mejora la elongación de las plantas y se elimina el estado de roseta en ciruela (Németh, 1986).

- 3) A veces es necesario un tratamiento de frío (4-8 semanas a 5 °C), bien sea todavía como planta «in vitro» o inmediatamente después de su trasplante «extra vitrum» para romper la dormición. La ruptura del estado de reposo es generalmente necesaria en microbulbos formados «in vitro» y a veces en arboles y arbustos. En remolacha, Casas (1987) realizó el tratamiento de frío durante la aclimatación (10°/4 °C, día/noche) con el fin de disminuir indirectamente la pérdida de agua producida por la transpiración, obteniendo una supervivencia mayor que cuando se realizaba dicha aclimatación en un invernadero con calefacción.

2.1.6. Endurecimiento y trasplante definitivo a campo (Fase-V)

Una vez finalizada la aclimatación -normalmente llevada a cabo en cámara climática o bien bajo condiciones controladas- se procede al endurecimiento de la planta en umbráculo, con la finalidad de que esta adquiera resistencia a las condiciones ambientales naturales y recupere todas las actividades fisiológicas. Posteriormente será necesario realizar el trasplante a una maceta de mayor tamaño, en este momento es necesario observar:

- a) Si existe un razonable equilibrio entre raíces y brotes, de modo que cada uno sea capaz de sostener al otro, pues una situación desequilibrada del sistema brote-raíz puede conducir a formas de crecimiento anómalas (Sommer y Caldas, 1981).
- b) Los recipientes en los que las plantas enraizan y crecen deben seleccionarse cuidadosamente ya que algunas macetas no permiten el crecimiento de las raíces y dan lugar a malformaciones (Thorpe, 1984).
- c) Puede ser conveniente cortar el extremo radical, para que tenga lugar el crecimiento de las raíces laterales, dando lugar a una planta con mayor área de superficie radicular (Aitken-Christie y Thorpe, 1984).

Sin embargo, la etapa de endurecimiento y comportamiento de las plantas al aire libre es a menudo obviado en las descripciones de las metodologías del cultivo “in vitro”. Pero como es lógico suponer resulta esencial para cualquier sistema práctico de cultivo “in vitro” no sólo lograr elevadas tasas de multiplicación de plantas sino también obtener elevadas tasas de supervivencia durante el período de aclimatación y posterior traslado al campo.

De aquí la importancia de realizar un seguimiento durante un período de al menos 1-2 años de estas plantas, bien sea en invernadero, umbráculo y

posteriormente en condiciones de campo para observar detalladamente su comportamiento y tipología comparativa, pues como citábamos en capítulos anteriores, en vid se han descrito fenómenos de regresión al estado juvenil, y como es sabido, cualquier sistema de propagación es útil si las plantas regeneradas son copias fieles del clon parental. La estabilidad fenotípica es esencial y la forma en que ésta puede medirse es a través de una evaluación del comportamiento en el campo de las plantas regeneradas (Martínez Pulido, 1990).

LÁMINA 7.
DISTINTOS ESTADIOS DE LA ACLIMATACIÓN



Distintos estadios de la aclimatación:

A) Fin de la etapa de enraizamiento. Plantas dispuestas para ser transferidas a macetas.

3) Plantas jóvenes (de 3 a 5 días) transferidas a un sustrato estéril. Las plantas se cubren durante cierto tiempo para dificultar la transpiración.



C) Distintos estadios de crecimiento a intervalos semanales.



D) Crecimiento y endurecimiento en umbráculo

BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRREOLA, J. 1995. Relaciones hídricas y aclimatación de plantas cultivadas “in vitro”. XI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Estoril, 3-6 octubre 1995: 39.
- AITKEN-CHRISTIE, J. 1994. Large scale production in plant tissue culture an over view. VIII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Firenze, 12-17 June, 1994: 263.
- ALBOUY, J. 1998. Suspicion de virose, comment réagir? PHM. Revue Horticole. Juillet-Août 1998, 394: 46-49.
- ALDWINCKLE, H.S.; BUTURAC, I. 1980. Culture of grape cultivars from apical meristems. Proc. 7th. Meeting Int. Council Study of Virus like Diseases of the Grape-Vine. Niagara Falls, Canada: 339-341.
- ALFARO, A. 1971. Presencia en España del “fanleaf” de la vid. Anales I.N.I.A. Serie Protección Vegetal, 1: 71-81.
- ALFONSO, J.; COLL, Y.; PUJOL, M.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. 1997. Optimización de las condiciones de microbombardeo y regeneración “In vitro” de *Oryza sativa* cv. Perla. II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales, 1997: 8.
- ALLEWELDT, G.; RADLER, F. 1962. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plant tissue cultures. Plant Physiol, 37: 376-379.
- ALTMAYER, B. 1989. Elimination of different nepoviruses and grapevine leafroll by “in vitro” apical culture of grapevine. Proceeding 9th Meeting ICVG, Kiryat-Anavim, 1987: 155-158.
- ALTMAYER, B. 1990. The use of “in vitro” apical culture of grapevines to eliminate pathogens different viruses, *Agrobacterium tumefaciens*. Vitis special issue. Proceedings of the 5th international Symposium on Grape Breeding, 463.

- ANDERSON, W.C. 1980. Mass propagation by tissue culture: principals and practice. In Proceedings of the Conference on Nursery Production of Fruit Plants Through Tissue Culture Applications and Feasibility, Maryland: 1-10.
- APPIANO, A.; PENNAZIO, S. 1972. Electron microscopy of potato meristem tips infected with potato virus X. J. Gen. Virol. 14: 273-276.
- ARANCIBIA, R.A. 1988. Identificación de los virus asociados al enrollamiento de la hoja de la vid (*Vitis vinifera* L.) presentes en el cv. Black seedless y obtención de plantas limpias mediante termoterapia y cultivo de meristemos. Tesis doctoral, 100pp. Santiago-Chile.1988.
- ASKANI, A.; BEIDERBECK R. 1991. *In vitro* propagation of *Dactylospheara vitifolii* on shoot and root cultures of a *Vitis* hybrid. Vitis, 30: 223-232.
- AYUSO, P.; PEÑA-IGLESIAS, S. 1978. Microinjerto de meristemos: una nueva y prometedor técnica para regenerar vides enfermas por virus. VI Conferencia Internacional sobre Virus y Virosis de la vid. ICVG VIth Meeting 1976. Cordoba. Monografias INIA, 1978, 18: 319-324.
- BARBA, M.; MARTINO, L.; CUPIDI, A. 1992. Il risanamento della vite: tre technique a confronto. Vignevini, n° 3: 33-36.
- BARBIER, P.; DEMANGEAT, G.; PERRIN, M.; COBANOV, P.; JACQUET, C.; WALTER, B. 1997. Grapevine genetically transformed with the coat protein gene of grapevine fanleaf virus: an analysis of transformants. In Sequeira O.A.; Sequeira, J.C.; Santos, M.T. (Eds.). Extend Abstracts 12th Meeting ICVG Lisbon. Portugal.: 131.
- BARLASS, M. 1987. Elimination of stem pitting and corky bark diseases from grapevines by fragmented shoot apex culture. Ann. Appl. Biol. 110: 653-656.
- BARLASS, M.; MILLER, R.M.; ANTCLIFF, A.J. 1986. Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by Downy mildew. I. Dual culture "in vitro". Am. J. Enol. Vitic. 37, 1: 61-66.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. 1978. "In vitro" propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. Vitis, 17: 335-340.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. 1980. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II Factors affecting growth and differentiation "in vitro". J. Exp. Bot. 31 (121): 489-495.

- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. 1983. "In vitro" adventitious bud formation from grapevine shoot apex. Proc. 8 th. Aust. Plant. Breed. Conf. Adelaide. February, 1983: 310-312.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M.; CLINGELEFFER, P.R. 1981. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. III A scanning electron microscope study of adventitious bud formation "in vitro". J. Exp. Bot. 32 (130): 1079-1083.
- 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.
- BARNHILL JONES, J.; SLUIS, C.T. 1991. Marketing of micropropagated. In: Micropropagation, Technology and Application. (Debergh P.C. y Zimmerman, R.H. eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 141-154.
- BASLER, P.; BRUGGER, J.J. 1981. Résultats préliminaires d'une comparaison entre des clones de Pinot noir obtenus par sélection visuelle et les mêmes clones après thermothérapie. Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. Vol. 13 (6): 337-339.
- BASS, P.; LEGIN, R. 1981 Thermothérapie et multiplication "in vitro" d'apex de vigne. Application à la séparation on à l'elimination de diverses maladies de type viral et à l'évaluation des dégâts. C.R.. Acad. Agric. 67 (11): 922-933.
- BASS, P.; VUITTENEZ, A. 1976. Amélioration de la thermothérapie des vignes virosées au moyen de la culture d'apex sur milieux nutritifs ou par greffage sur des vignes de semis obtenues aseptiquement "in vitro". Ann. Phytopathol, 9: 539-540.
- BASS, P.; VUITTENEZ, A.; LEGIN, R. 1978. Amelioration de la thermothérapie de la vigne par culture d'extrémités de pousses sur milieux nutritifs ou par greffage d'apex sur plantules de semis cultivées aseptiquement "in vitro". VI Conf. ICVG, 1976. Cordoba. Monografias INIA, 1976, 18: 325-332.
- BELLI, G. 1996. Accartocciamento fogliare della Vite. Virus floematici e malattie della vite, di Martelli, G.; Savino, V.; Digiario, M. 1996: 27-40.
- BENIN, M. 1989. Recherches sur l'évaluation de la variabilité ampélogométrique et enzymatique inter et intravariétale chez la vigne. Tesis Universidad de Burdeos, 220p.

- BENIN, M.; GREANAN, S. 1984. Le microgreffage: nouvelle technique d'élimination des virus de la vigne. *Progr. Agric. Vitic.* 101: 33-36.
- BERRES, R. 1990. Influence of virus and virus-like diseases on the vitality and the mineral content of grapevine rootstocks. *Proceeding 10th meeting ICVG, Volos 1990*: 374-385.
- BINI, G. 1976. Prove di colture "in vitro" di meristemis apicali di *Vitis vinifera* L. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.*, 60: 289-296.
- BINI, G. 1979. Prove di moltiplicazione "in vitro" della Vite (*Vitis vinifera*, L). Atti dell'incontro sulle Technique di colture "in vitro" per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticole. Pistoia, ottobre, 1979: 203-210.
- BLAICH, R. 1985. Recherches sur les cultures de méristèmes et d'organes de vigne "in vitro" en vue de la sélection et de la conservation de génotypes. *Bull. O.I.V.*, 650-651: 391-395.
- BLAZINA, I.; KOROSK-KORUZA, Z. 1991. Regeneration and micropropagation of the grapevine (*Vitis vinifera* L. "Zelen") from shoot tip meristems. *Acta Horticulturae* 300: 123-126.
- BORGIO, M.; CALÓ, A.; BOUOTTO, A. 1992. Study on the relation ship between virus diseases and productive features: preliminary result concerning the elimination of leafroll and fleck. *Rivista di Viticoltura e Enologia, Cornegliano*, 45 (1): 3-10.
- BORGIO, M.; CALÓ, A.; COSTACURTA, A.; GARDIMAN, M.; MALACCHINI, G. 1998. La propagación rápida de la vigne par microgreffage "ISV Cornegliano". *Riv. Vitic. Enol.* n.3, 1998:3-14.
- BORGIO, M. 1991. Influenza della virosi dell'accartocciamento fogliare della vite su alcuni parametri della produzione. *Riv. Vitic. Enol.* n° 2: 21-30.
- BOSCIA, D.; GREIF, C.; GUGERLI, P.; MARTELLI, G.P.; WALTER, B.; GONSALVES, D. 1995. Nomenclature of grapevine leafroll associated putative closteroviruses. *Vitis*, 34: 171-175.
- BOTTA, R.; VALANIA, R.; MIAJA, M.L.; VERGANO, G.; ME, G. 1990. Isozyme pattern comparison between tissue cultured grape-vines and mother plants. *Proceedings of the 5th international Symposium on Grape Breeding*, 88-92.
- BOTTI, C.GARAY, L.; REGINATO, G. 1993 The influence of culture dates, genotype and size and type of shoot apices on "in vitro" shoot prolifera-

- tion of *Vitis vinifera* cvs Thompson seedless, Ribier, and Black seedless. *Vitis*, 32: 125-126.
- BOUBALS, D.; PISTRE, R. 1966. La maladie à virus de l'enroulement des feuilles de Vigne dans le sud de la France. *Le Prog. Agric. Et Vitic.* 83 (5): 113-120, (6): 140-144.
- BOUQUET, A. 1982. Interêt des techniques de culture "in vitro" pour la multiplication et l'amélioration génétique et sanitaire des variétés de vignes. II Colloque international sur la multiplication de la vigne. Bordeaux, septembre 1982: 38-43.
- BOUQUET, A. 1989a. Culture "in vitro" de la Vigne. Attention aux mauvaises surprises. *Prog. Agric. Vitic.* 106, n° 13-14: 303-305.
- BOUQUET, A.; BRANCHARD, M. 1988. *In vitro* culture of the vine. *Bio-futur*, 72: 20-22.
- BOUQUET, A.; CHABBERT, M.; DAUGLOT, Y. 1990. "In vitro" selection for tolerance to magnesium deficiency in grapevine rootstocks. *Vitis special issue. Proceedings of the 5 th international Symposium on Grape Breeding*, 445.
- BOUQUET, A.; DAVIS, H.P. 1989b. Culture "in vitro" d'ovules et d'embryons de Vigne (*Vitis vinifera*, L.) appliquée à la sélection de variétés de raisins de table sans pépins. *Agronomie*, 9: 565-574.
- BOURRAIN, L.; CTIFL, J.C.N. 1995. Acclimatation en serre et élevage du plant en pépinière. *Infos-Ctifl*, n° 112: 28-33.
- BOURSIQUOT, J.M. 1998. La conservation des ressources génétiques vigne en France. *Bulletin de l'OIV*, 811-812: 729-737.
- BOVEY, R. 1958. Etat actuel des connaissances sur les maladies à virus de la Vigne. *Vitis*, 1,: 237-256.
- BOVEY, R. 1970. Importance économique des viroses de la vigne. *Bull. O.I.V.*, 43: 124-138.
- BOVEY, R.; CARTEL, W.; HEWITT, W.B.; MARTELLI, G.P.; VUITTE-NEZ, A. 1980. Virus and virus-like disease of grapevine. Ed. Payot, Lausanne, 180 pp.
- BOVEY, R.; ROCHAIX, M.; SIMON, J.L. 1973. La sélection phytosanitaire de la vigne. Méthodes résultats et perspectives d'avenir. *Bull. OIV.* 46 (514): 1077-1093.

- BOXUS, PH. 1974. The production of strawberry plants by "in vitro" micro-propagation. *Journal of Horticultural Science*, 49: 209-210.
- BRANAS J. 1948. Recherches sur la dégénérescence infectieuse de la Vigne. *Bull. O.I.V.* 205: 7-12.
- BUENO, M.A.; GÓMEZ, A.; BOSCAIN, M.; MANZANERA, J.A.; VICENTE, O. 1997. Embriogénesis y obtención de haploides a partir de cultivos de anteras en alcornoque, II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 50-51.
- BURGER, P.; GOUSSARD, P.G. 1996. "In vitro" culture of ovules and embryos from seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *South Africa Journal for Enology and Viticulture*, Stellenbosch, 17 (2): 31-37.
- BURR, T.J.; REID, C.L.; SPLITTGTOESSER, D.F.; YOSHIMURA, M. 1996. Effect of heat treatment on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis* "in vitro" and in dormant grape cuttings. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47 (2): 119-123.
- CABALEIRO, C.; ECONOMOU, A.S: 1991. Effect of light on rooting "in vitro" of *Petunia* microshoots. In *Acta Horticulturae* 300: "In vitro" Culture: 189-196.
- CABALEIRO, C.; SEGURA, A. 1996. Efecto del Enrollado de la vid (GL-RaV, 3), en un viñedo en plena producción del cv. "Albariño". *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* Vol 11 (3): 451-463.
- CABALEIRO, C.; SEGURA, A. 1997. Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (4): 373-378.
- CABALEIRO, C.; SEGURA, A.; GARCÍA-BERRIOS, J.J. 1999. Effects of grapevine leafroll-associated virus 3 on the physiology and must of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño following contamination in the field. *Am. J. Enol. Vitic.* vol. 50, n° 1: 40-44
- CAIN, D.W; EMERSHAD, R.L.; TARAIO, R.E. 1983. In ovulo embryo culture and seedlin development of seedless grapes. *Vitis*, 22: 9-14.
- CALÓ, A. 1988. Reaction physiologique de la vigne en presence de virus. *Riv. Vitic. Enol*, Conegliano: 41, 317-323.
- CÂMARA MACHADO, A.; SOELLES, R.; MOYER, R.; KATINGER, H.; LAIMER DA CÂMARA MACHADO, M. 1997. Biotechnological appro-

- aches to grapevine virus resistance breeding. In Sequeira O.A.; Sequeira, J.C.; Santos, M.T. (ed). Extend Abstracts 12th Meeting ICVG Lisbon. Portugal.: 132.
- CAMPBELL, A.I. 1970. Factors affecting growth during heat treatment. Table Ronde: "La thermothérapie des espèces ligneuses". Station des cultures fruitières et maraîchères à Grand-Manil. Gembloux: 40- 45.
- CANCELLIER, S.; COSSIO, F. 1988. Risultati di osservazioni su un clone di "Corvina veronese" (*Vitis vinifera* L.). Moltiplicato attraverso la coltura "in vitro". Riv. Vitic. Enol. Conegliano, n° 3, 1988: 110-117.
- CANTOS, M.; LIÑAN, J.; PEREZ-CAMACHO, F.; TRONCOSO, A. 1993. Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de la virosis de Entrenudo Corto Infeccioso. Actas II Congreso Ibérico. S.E.C.H. 1993: 705-711.
- CAPELLADES QUERALT, M.; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGHE, A.; DEBERGH, P.C. 1991. Ornamentals. In: Micropropagation, Technology and Application. (Debergh P.C. y Zimmerman, R.H. eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 215-229.
- CASAL, M. 1990. Micropropagation of *Vitis vinifera* from "Vihno verde" region of Portugal: a method for grapevine leafroll virus elimination. Nato Asi Series: Series A, Life Sciences. 186: 327-334.
- CASANOVA, E.; MOYSSET, M.L.; TRILLAS, M.I. 1997. Efecto de las sustancias reguladoras del crecimiento en la morfogénesis de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) "in vitro" a partir de pétalos. II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 5.
- CASAS, A.M. 1987. Cultivo "in vitro" en remolacha azucarera (*Beta vulgaris*, L.). Tesis Doctoral, Universidad de Navarra, 215 pp.
- CASTELLANO, M.A.; MARTELLI, G.P.; SAVINO, V. 1983. Virus like particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll affected grapevines. *Vitis*, 22: 23-29.
- CAUDWELL, A.; LARRNE, J.; BOUDON-PANDIEU, E.; MC LEAN, G.D. 1997. Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. *Austral J. Grape and Wine Res.* 3: 21-25.
- CAUDWELL, A.; LARRNE, J.; VALAT, C.; GREANAN, S. 1990. Les traitements a l'eau chaude des bois de vigne atteints de la flavescence dorée. *Progrès Agricole et Viticole*, 107, n° 12: 281-286.

- CAZET, M.; DUFOUR, J.; VERGUER, M. 1993. Multiplication du merisier par bouturage herbacé (1ère partie). PHM Revue Horticole, mai n° 338: 27-29.
- ÇELIK, H.; BATUR, M. 1990. Meristem culture for clonal micropropagation of grapevines. *Vitis* special issue. Proceedings of the 5 th. International Symposium on Grape Breeding: 455-462.
- CHAPMAN, H.D. 1966. Diagnostic criteria for plants and soils. Univ. Calif. Div. Agr. Riverside (Published at Berkeley), 793 pp.
- CHAUVET, M.; REYNIER, A. 1984. Manual de viticultura. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, 279p.
- CHÉE, R. 1986. "In vitro" culture of *Vitis*: the effects of light spectrum, manganese sulfate, and potassium iodide on morphogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Cult*, 7: 121-134.
- CHÉE, R.; POOL, R. 1985. *In vitro* propagation of *Vitis*: the effects of organic substances on shoot multiplication. *Vitis*, 24: 106-118.
- CHÉE, R.; POOL, R.; BUCHER, D. 1984. A method for large scale "in vitro" propagation of *Vitis*. *New York's Food and Life Sciences Bulletin*, 109: 1-9.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultures "in vitro". *Sci. Hortic.* 16: 17-27.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. 1983. "In vitro" vegetative propagation of *Vitis*. Application of previously defined culture conditions to a selection genotypes. *Vitis*, 22: 363-374.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. 1988. Sucrose and NAA influence growth of subcultured shoots and "in vitro" production of roots in *Vitis*. *Hortscience*, 23 (4): 776.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. 1989. Morphogenic responses to propagule trimming spectral irradiance and photoperiod of grapevine shoots recultured "in vitro". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114 (2): 350-354.
- CHÉE, R.; POOL, R.M. 1987. Improved inorganic media constituents for "in vitro" shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae*, 32: 85-95.
- CHENG, Z.M.; REISCH, B.I. 1989. Shoot regeneration from petioles and leaves of *Vitis x Labruscana* "Catawba". *Plant Cell. Reports*, 8: 403-406.

- CHOI, S.Y.; OH, J.Y.; KIM, J.S.; PAK, D.M.; LEE, S.B.; CHOI, D.U. 1992. Studies on the grape meristem culture "in vitro" 1. Factors affecting culture establishment and shoot proliferation of Kyoho and S 9110 grape varieties by meristem culture "in vitro". Research Reports of the Rural Development Administration Horticulturae, 34 (2): 1-9.
- CHUECA, M.C.; ESCORIAL, M.C.; SIXTO, H. 1997. Cultivos "in vitro" ¿libres de contaminación? Phytoma España, nº 85. Enero, 1997: 26-29.
- CICCOTTI, A.M. 1982. Micropropagazione di *Vitis vinifera* L. cvs. Moscato d'Amburgo e Pinot bianco. Esperienze e Ricerche, Staz. Sperim. Forestale di S. Michele all'Adige, 11: 73-81.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. J. Gen. Virol. 34, 475-483.
- COBIANCHI, D.; LIUERANI, A.; FAEDI, W.; SALVADOR, R.; INSERO, O.; PENNONE, F.; RIVALTA, L.; MALTONI, M.L. 1992. Valutazione agronomica di materiale vivaistico micropropagato. L'Informatore Agrario, 24: 43-47.
- COMPTON, M.E.; GRAY, D.J. 1996. Effects of sucrose and methylglyoxal bis guanylhydrazone on controlling grape somatic embryogenesis. Vitis, 35 (1): 1-6.
- CÔNG LINH LÈ 1987. Multiplication végétative "in vitro" de la vigne (*Vitis vinifera* L.). Recherche agronomie en Suisse 26 (4): 507-517.
- CONNER, A.J.; THOMAS, M.B. 1981. Reestablishing plantlets from tissue culture: a review. Intern. Pl. Prop. Soc. 31: 342-357.
- CONRADIE, F.J.; KRIEL, G.J.; SPREETH, N.A.; VISSER, D.J. 1989. The influence of heat treatment on clonal material. Proceeding 9th Meeting ICVG, Kiryat-Anavim, 1987:34.
- CORTE, G.; MENDONÇA, A. 1985. Importance de la culture de meristemes pour la multiplication accelere de clones de vigne exemptes de virus. Bull. OIV (650-651): 396-402.
- COSSIO, F. 1981. Risultati preliminari sulla micropropagazione di "Corvina veronese" (*Vitis vinifera* L.). Atti 3° Simp. Internaz. Selez. Clonale della Vite, 8-12/6/81: 51-55.
- COUDRET, A. 1992. Amélioration de la micropropagation d'espèces ligneuses commerciales. PHM Revue Horticole, nº 325: 24-28.

- COUTOS-THEVENOT, P.; GOEBEL-TOURAND, I.; MAURO, M.C.; JOUANNEAU, J.P.; BOYLAY, M.; DELOIRE, A.; GUERN, J. 1992. Somatic embryogenesis from grapevine cells. Improvement of development by changes in culture conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 29: 125-133.
- CREDI, R.; BABINI, A.R. 1984. Afezioni virali e virus simili della vite. *Informatore Fitopatologico*, 5: 47-51.
- CREDI, R.; BABINI, A.R. 1997. Heat-therapy of virus-infected *Vitis vinifera* cultivars in Emilia Romagna (northern Italy) In Sequeira O.A.; Sequeira, J.C.; Santos, M.T. (ed). *Extend Abstracts 12 th Meeting ICVG Lisbon. Portugal.*: 167.
- CROWLEY, N.C.; HANSON, J. 1960. The infection of apical meristems of tomato roots with tobacco mosaic virus after treatment with ethylene diamine-tetraacetic acid. *Virology*, 12: 603-606.
- D'KHILI, B.; GREANAN, S. 1995. Diagnostic rapide de la nécrose des nervures par la technique de microgreffage de tiges "in vitro" (Rapid diagnosis of vein necrosis using "in vitro" shoots). *J. Int. Sci. Vigne et Vin* 29: 11-15.
- DAGNIN, F.; LETOUZÉ, R. 1997. Nouvelles orientations en culture "in vitro". *PHM Revue Horticole*, 380: 52-56.
- DAI, G.H.; ANDARY, C.; MONDOLOT-COSSON, L.; BOUBALS, D. 1995. Histochemical responses of leaves of "in vitro" plantlets of *Vitis ssp* to infection with *Plasmopora viticola*. *Phytopathology*, 85 (2): 149-154.
- DAMI, I.; HUGHES, H.G. 1997. Effects of PEG-induced water stress on "in vitro" hardening of valiant grape *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47 (2): 97-101.
- DAMIANO, C.; CHIARIOTTI, A.; ANTONELLI, M. 1991. Cultivo "in vitro" y micropropagation en fruticultura. *Hortofruticultura*, 10, 1991: 24-30.
- DE FOSSARD, 1976. *Tissue culture for plant propagators*. Univ. New England printery, Armidale. 409 p.
- DEBERGH, P. 1988. Improving mass propagation of "in vitro" plantlets. In: *The organizing committee Intl. Symp. High. Technology in protected cultivation* (Ed). *Horticulture in high technology Era*, Tokyo: 45-57.
- DEBERGH, P.; MAENE, L. 1985. Some aspects of stock-plant preparation for tissue culture propagation. *Acta Hortic.*, 166: 21-24.

- DEBERGH, P.; MAENE, L.; CAPELLADES, M. 1986. Problemas actuales que influyen en la producción de plantas "in vitro". ITEA, 1986, n° 65: 3-6.
- DEBERGH, P.C. 1995. Evolution and automation in micropropagation and artificial seed production. Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology by M. Terzy et al (eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands: 95-104.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Hort., 14: 335-345.
- DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. 1991. Micropropagation technology and application. In Micropropagation by Debergh, P.C. and Read, P.E. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 484 pp: 1-15.
- DIAZ-SALA, C.; CUOZZO, L.; ANCORA, G.; RODRIGUEZ, R. 1989. Posible efecto inhibidor de medios de proliferación sobre el posterior enraizamiento "in vitro" de peral (cv. Guyot). FYTON 50 (1/2): 73-80.
- DIAZ-YUBERO F.; ESTEBAN, P. 1973. Identificación visual de síntomas de virosis en viñedos de Rioja. IV Jornadas de estudio A.I.D.A. y observación de síntomas de virosis en viñedos de Rioja. Agricultura, 500: 773-779.
- DIMITRIJEVIC, B. 1970. The occurrence of leafroll of grapevines in Yugoslavia. Zast. Bilja, 21: 373-378.
- DOAZAN, J.P.; HÉVIN, M.; OTTENWAELTER, M.M. 1979. Remarques sur la thermothérapie de plants de Vigne cultivés en pots. Le Progrès Agricole et Viticole, 96. Annèe, n° 7: 146-147.
- DOLCET-SANJUAN, R.; CLAVERIA, E.; RODRIGUEZ, A.J.; LLAURADÓ, M. 1997. Producción de dihaploides en clavel (*Dianthus caryophyllus*, L.). II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 39.
- DORÉ, C. 1987. Applications of tissue culture to vegetable crop improvement. In: tissue and cell culture (Green, C.E.; Sommers, D.A.; Hackett, W.P. and Biesboer, D.D. Eds). Alan R. Liss, New York: 419-432.
- DOUGLAS, G.C. 1984. Propagation of eight cultivars of *Rhododendron* "in vitro" using agar solidified and liquid media and direct rooting of shoot "in vivo". Scientia Horticulturae, 24: 337-347
- DUNSTAN, D.I.; THORPE, T.A. 1986. Regeneration in forest trees. In Vasil, I.K. (ed). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando, Academic Press V, 3; 657 pp: 223-241.

- 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.
- DÜRING, H.; HARST, M. 1996. Stomatal behaviour, photosynthesis and photorespiration of "in vitro" grown grapevines: Effects of light and CO₂. *Vitis*, 35 (4): 163-167.
- DÜRING, H.; STOLL, M. 1996. Stomatal patchiness of grapevines leaves I. Estimation of non uniform stomatal apertures by a new infiltration technique. *Vitis*, 35 (2): 65-68.
- ENCINA, C.L.; PADILLA, I.G.; CARO, E. 1993. Enraizamiento "in vitro" de microestaquillas de chirimoyo. II Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas, Pamplona, 1993: 978-983.
- ENGELBRECHT, D.J.; SCHWERDERGER, U. 1979. "In vitro" grafting of grape vine shoots apices an aid to the recovery of virus-free clones. *Phytophylactica*, 11: 183-185.
- ERNY, C.; BELIN, C.; ESMENJAUD, D.; DEMANGEAT, G.; PINCK, L.; WALTER, B. 1997. Molecular variability of grapevine fanleaf virus coat protein. In Sequeira O.A.; Sequeira, J.C.; Santos, M.T. (ed). *Extend Abstracts 12th Meeting ICVG Lisbon. Portugal*: 29-30.
- ESTADÍSTICA AGRARIA DE LA REGIÓN DE MURCIA. 1996-97. Consejería de Medio Ambiente Agricultura y Agua. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.
- ESTOPÀ, M.; MARFÀ, V.; MELÈ, E.; MESSEGUER, J. 1997. Eficiencia de la regeneración y transformación genética en clavel en relación al estadio de desarrollo foliar de los explantos. II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 48.
- FAL, M.A.; MAJADA, J.P.; SANCHEZ-TAMÉS, R. 1995. El ambiente "in vitro" como condicionante del rendimiento de la micropropagación de clavel. XI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Estoril, 3-6 octubre 1995: 158.
- FALLOT, J.; TEY-RULH, P.; CONTOULY, P.; PETITPREZ, M.; ROUSTAN, J.R.; PHILIPPE, I.; TABACCHI, R. 1990. Culture "in vitro": étude de l'Eutypiose et stratégie de création de somaclones de Vigne tolérants. In "Cinquantenaire de la culture "in vitro". Les Colloques de l'INRA, 51: 151-156.

- FANIZZA, G.; TANZARELLA, O.; CASTELLANO, M.; SAVINO, V. 1983. Coltura "in vitro" di apici vegetativi per lóttimento di piante essenti da virus. *Vitis*. Atti XXVII Conv. Soc. Ital. Genetica Agr. Perugia, 1983: 44-45.
- FANIZZA, G.; TAUZARELLA, O.A.; CARRO, G. 1984. Influence of *Vitis* source on "in vitro" shoot apex culture. *Ann. Appl. Biol.*, 104: 577-578.
- FAULKY, L.; MUDGE, K.W. 1988. Optimization of environmental conditions of stage IV micropropagated grapes. *Hortscience*, 23: 101 (Abstr.)
- FAURE, O.; ARROUF, J.; NOUGARÈDE, A. 1996. Ontogenesis differentiation and precocious germination in anther derived somatic embryos of grapevine, *Vitis vinifera*, L.: embryonic organogenesis. *Annals of Botany*, 78 (1): 29-37.
- FAVRE, J.M. 1973. Effects corrélatifs facteurs internes et extremes sur la rhizogenése de la Vigne (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) cultivée "in vitro". *Rev. Gén. Bot.* 80: 279-361.
- FERNÁNDEZ DE BOBADILLA, G. 1948. Dégénérescence infectieuse de la vigne. *Siembra*, 4.
- 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, 194 pp.
- FEUCHT, W.; TREUTTER, D.; CHRIST, E. 1996. Flavanols in grapevine: "in vitro" accumulation and defence reactions in shoot. *Vitis*, 35 (3): 113-118.
- FORNECK, A.; WALKER, M.A.; MERKT, N. 1996. Aseptic dual culture of grape (*Vitis spp*) and grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch). *Vitis*, 35 (2): 95-97.
- FORTUSINI, A.; GARAU, R.; MINAFRA, A. 1996. Epidemiologia dei virus floematici associati al complesso dell'accartocciamento fogliare e del legno riccio della vite. In: *Virus floematici e malattie della vite* di Martelli, G.P.; Savino, V.; Digiario, M. (Eds.):103-116.
- FOURNIOUX, J.C.; BESSIS, R. 1993. Use of carbon dioxide enrichment to obtain adult morphology of grapevine "in vitro". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 51-57.
- GALZY, R. 1961. Confirmation de la nature virale du court-noué de la vigne par des essais de thérmothérapie sur des cultures "in vitro". *C.R. Acad. Seances. Soc. Biol. Paris*, 253: 706-708.

- GALZY, R. 1962. Essais de thermothérapie du court-noué de la vigne sur des cultures "in vitro". III Conf. Int. Étude des maladies à virus de la vigne. Lisbonne. Bull. O.I.V. XXXVI, 383: 41-44.
- GALZY, R. 1964. Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. Ann. Epiphyties, 15: 145-256.
- GALZY, R. 1966. Action de la température 35°C sur *Vitis rupestris* atteint de court-noué. Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg. 12: 392-399.
- GALZY, R. 1969a. Recherches sur la croissance de *Vitis rupestris* schéele sain et court noué cultivé "in vitro" a différentes températures. Ann. Phytopathol. 1 (2), 149-166.
- GALZY, R. 1969b. Remarques sur la croissance de *Vitis rupestris* cultivée "in vitro" sur différents milieux nutritifs. Vitis, 8: 191-205.
- GALZY, R. 1971. Recherces sur la croissance de la Vigne saine et court-noue cultivée "in vitro". Ed by Taris, G. Bordeaux, France.
- GALZY, R. 1972. La culture "in vitro" des apex de *Vitis rupestris*. C.R. Acad. Sci. 274: 210-213.
- GALZY, R. 1977. Recherche d'un milieu minéral permettant la culture "in vitro" des apex de *Vitis rupestris* comportant trois ábauches foliaires. Extrait de La culture des tissus et des cellules des vegetaux" par Gautheret. Travaux Morel Masson, Paris: 134-146.
- GALZY, R. 1985. Les possibilités de conservation "in vitro" d'une collection de clones de Vignes. Bull. OIV. 58: 377-390.
- GALZY, R.; COMPAN, H. 1968. Thermothérapie de quelques variétés de vigne présentant des symptômes de virose. Vignes et Vins, 166: 1-8.
- GALZY, R.; HAFFNER, V.; COMPAN, D. 1990. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcutings. Journal of Experimental Botany, vol, 41, n° 224: 295-301.
- GALZY, R. 1965. Observations sur les variations de l'état sanitaire à l'intérieur d'un clone de *Vitis rupestris* court-noué. Ann. Epiphyties 18: 97-108.
- GARCÍA DE LUJÁN, A. 1996. El material vegetal y su mejora sanitaria: portainjertos y viníferas. Phytoma. España, n° 83: 18-22.
- GARCÍA DE LUJAN, A.; GIL DE BERNABÉ 1976. La degeneración infecciosa y las enfermedades de virus de la viña en la zona de Jerez. Comunicaciones I.N.I.A.. Serie Producción Vegetal, n° 6, 1976.

- GAUTHERET, J.R. 1939. Sur les possibilité de realiser la culture indefinie des tissus de tubercules de carotte. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 208: 118.
- GAUTHERET, R.J. 1983. Plant tissue culture: a history. Bot. Mag. Tokyo, 96: 393-410.
- GELLA, R. 1990. La obtención de material de partida. Métodos de saneamiento. I seminario sobre producción, certificación y utilización de plantas de vivero de frutales, 15 p.
- 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.; LUHN, C.F. 1973. Heat inactivation of viruses in grapevines. V Convegno Internazionale sui Virus e le virosi della Vite (ICVG), Salice Terme, 1973: 287-289.
- GOHEEN, A.C. 1989. Virus diseases and grapevine selection. Am. J. Enol. Vitic. vol.40, n° 1: 67-72.
- 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.
- GOHEEN, A.C.; HARMON, F.N.; WEINBERGER, J.H. 1958. Leafroll (White Emperor Disease) of grapes in California. Phytopathol. 48: 51-54.
- GOHEEN, A.C.; HEWITT, W.B.1964. Diagnosis of leafroll of grapevines. Riv. Patol. Veg. 4: 427-442.
- GOHEEN, A.C.; LUHN, C.F.; HEWITT, W. 1965. Inactivation of grapevine viruses in vid. Procedings of the International Conference on Virus and vector on perennial host with special reference to *Vitis*. Davis. University of California, 1966: 255-256.
- GOHEEN, A.C.1970. Grape leafroll virus disease of small fruits and grapevines. Univ. Calif. Div. Of Agric. Sciences, Berkeley, California: 209-212.
- GONZALEZ, E.; MOSQUERA, M.V.; SAN JOSÉ, M.C.; DIAZ, T. 1997. Influence of virus on the chlorophyll, carotenoid and polyamine contents in grapevine microcuttings. J. Phytopathol. 145: 185-187.
- GONZÁLEZ-NEBAUER, S.; ARRILLAGA, I.; CASTILLO AGUDO, L.; SEGURA, J. 1997. Transformación genética de *Lavandula latifolia* mediante *Agrobacterium tumefaciens*. II Reunión de la SECIVTV (Sociedad

- dad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales). Barcelona, 1997: 12.
- GOUSSARD, P.G. 1981. Effects of cytokinins on elongation proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured "in vitro". *Vitis*, vol.20: 228-234.
- GOUSSARD, P.G.; WIID, J. 1989. A revised approach to the acclimatation of grapevine plantlets cultured "in vitro". *Dec. Fruit. Grow.* 39: 29-31.
- GOUSSARD, P.G.; WIID, J.; KASDORF, G.F. 1991. The effectiveness of "in vitro" somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus, and leafroll associated viruses from grapevines. *South. Afr. J. Enol. Vitic.* Vol 12: 77-81.
- GRAY, D.J.; BENTON, C.M. 1991. "In vitro" micropropagation and plant establishment of Muscadine grape cultivars, *Vitis rotundifolia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 7-14.
- GRAY, D.J.; FISHER, L.C. 1985. "In vitro" shoot propagation of grape species hybrids and cultivars. *Proc. State. Hort. Soc.* 98: 172-174.
- GRAY, D.J.; KLEIN, C.M. 1987. "In vitro" shoot micropropagation and plant establishment of Orlando seedless grape and Tampa rootstock. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 100: 308-309.
- GRAY, D.J.; KLEIN, C.M. 1989. "In vitro" micropropagation and plant establishment of "Blanc du Bois" grape. *Proc. Fla. State. Hort. Soc.* 102: 221-223.
- GRENAN, S. 1979. Possibilités d'élimination des modifications foliaires apparues sur la variété Grenache N. après un passage prolongé en culture "in vitro". *Le Progrès Agricole et Viticole*, 96. Année, 7: 152-157.
- GRENAN, S. 1982. Quelques réflexions à propos de modifications morphogénétique consécutives à la culture "in vitro" chez la vigne (*Vitis vinifera*, L.). *Ann. Sci. Nat.* 4 (3): 135-146.
- GRENAN, S. 1984. Polymorphisme foliaire consécutif à la culture "in vitro" de *Vitis vinifera* L. *Vitis*, 23: 159-174.
- GRESSHOF, P.M.; DOY, C.H. 1974. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. *Z. Pflanzenphysiol.* 73: 132-141.

- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. 1993. L'ambientamento piante frutticole micropropagate. *Rivista di Frutticoltura*, n° 1, 1993: 75-80.
- GRIBAUDO, I.; JONA, R.; VIGLIOCCO. 1985. La vite nella coltura di tessuti. IV Simposio Internazionale di genetica della vite. Italia, 1985: 8-21.
- GRIBAUDO, I.; MORTE, M.A.; SCHUBERT, A. 1995. Use of gentian violet to differentiate "in vitro" and "ex vitro" formed roots during acclimatization of grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 41: 187-188.
- GRIBAUDO, I.; RESTAGNO, M. 1995. Influence of sucrose concentration on axillary bud proliferation in micropropagated grapevine. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux*, 30 (1-2): 55-57.
- GRIBAUDO, I.; SCHUBERT, A.; CAMINO, C. 1995. Establishment of grapevine axenic root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Adv. Hort. Sci.* 9: 87-91.
- GUGERLI, P.; BRUGGER, J.J.; RAMEL, M.E. 1997. Identification immuno-chimique du 6^e virus associé à la maladie de l'enroulement de la vigne et amélioration des techniques de diagnostic pour la sélection sanitaire en viticulture. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* vol 29 (3): 137-141.
- GUHA, S.; MARESHWARI, S.C. 1964. "In vitro" production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204, 497.
- GUIDONI, S.; MANNINI, F.; FERRANDINO, A.; ARGAMANTE, N.; STEFANO, R.D. 1997. The effect of grapevine leafroll and rugose wood sanitation on agronomic performance and berry and leaf phenolic content of a Nebbiolo clone (*Vitis vinifera*, L.) *Am. J. Enol. Vitic.* vol. 48, n° 4: 438-442.
- HABERLANDT, G. 1902. Citado por Kitto, 1997.
- HABERLANDT, G. 1902. Citado por Margara, 1988.
- HABILI, N.; EWART, A.J.; FAZELI, C.F.; SCOTT, N.S.; KRAKE, L.R.; REZAIAN, M.A. 1996. Virus types associated with grapevine leafroll disease in Australia. *Australian Grapegrower & Winemaker Adelaide* (390^a): 25-28.
- HALE, C.R.; WOODHAM, R.C. 1979. Effect of grapevine leafroll disease on the acid and potassium composition of Sultana grapes. *Am.J. Enol. and Vitic.* 30 (2): 91-92.
- HARRIS, A.E.; STEVENSON, J. 1982. "In vitro" propagation of *Vitis*. *Vitis*, 21 (1): 22-32.

- HARRIS, R.E.; STEVENSON, J. H. 1979. Virus elimination and rapid propagation of grapes "in vitro". Proc. Int. Plant. Prop. Soc. 29: 95-108.
- HARST, M. 1995. Development of a regeneration protocol for high frequency somatic embryogenesis from explants of grapevines (*Vitis spp.*). Vitis, 34 (1): 27-29.
- HARST-LAGENBUCHER, M.; ALLEWELDT G. 1990. Conservation of the genetic resources of *Vitis*. Proceedings of the 5th international Symposium on Grape Breeding, 446-454.
- HARTL, D.; MALES, P.; JELASKA, S. 1990. Vegetative multiplication of five Dalmatian autochthonous grape cultivars "in vitro". Vitis special issue. Proceedings of the 5th international Symposium on Grape Breeding, 464.
- HASSANI, Z.; BOUBALS, D. 1991. Le microgreffage "in vitro". Progr. Agric. Vitic. 108: 443-445.
- HATZINIKOLAKIS, H.K.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. 1993. A modified method for "in vitro" thermotherapy and meristem culture for production of virus-free grapevine plant material. In Extend Abstrats 11th Meeting ICVG. Montreux, 1993: 172.
- HAWKER, J.S.; DOWTON, W.J.S.; WISKICH, D.; MULLINS, M.G. 1973. Callus and cell culture from grape berries. HortScience, 8 (5): 389-399.
- HAZEL, Y.; MYERS, S.C. 1994. Vegetative and yield component characteristics of micropropagated *Muscadine* grape. Journal of Horticultural Science, 69 (4): 747-753.
- HELOIR, M.C.; FOURNIOUX, J.C.; BARBIER, M.; JEANDET, P.; BESSIS, R. 1998. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and micropropagated grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir). Vitis 37 (1): 61-62.
- HELOIR, M.C.; FOURNIOUX, J.C.; OZIOL, L.; BESSIS, R. 1997. An improved procedure for the propagation "in vitro" of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary-bud microcuttings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49 (3): 223-225.
- HEWITT, W.B. 1968. Viruses and virus diseases of the grapevine. Rev. Appl. Mycol. 47 (9): 433-455.
- HEWITT, W.B. 1978. On the origen and distribution of *Vitis* and the virus diseases of the grapevine. VI Conferencia Internacional sobre virus y

- virosis de la vid. ICVG VI meeting. VI Conf. ICVG, 1976. Cordoba. Monografias INIA, 1978, 18: 3-6.
- HIDALGO, L. 1973. Etat actuel des travaux sur la sélection clonale génétique et sanitaire. Methodes et resultats. Diffusion du matériel sélectionné. 53. Assamb. Generale de l'O.I.V.. Madrid, 1973.
- HIDALGO, L. 1981. Patrones y variedades. I Jornadas sobre la uva de mesa. Novelda, abril, 1981.
- HIRABAYASHI, I.; KOZAKI, I.; AKIHAMA, T. 1976. *In vitro* differentiation of shoots from anther callus in *Vitis*. HortScience, 11 (5): 511-512.
- HIRABAYASHI, T. 1985. Somatic embryogenesis from leaf tissue of grape. In " Amélioration de la Vigne et culture "in vitro". Ed. Moët: 75-82.
- HOEFERT, L.L. 1965. Anatomical effects of the leafroll virus in *Vitis vinifera* L. Ph. D.Diss. Univ. Davis. California.
- HOEFFER, L.L.; GIFFORD, E.J. 1964. Growth "in vitro" of excised stem-tips of *Vitis vinifera*. Am. J. Bot. 51: 677.
- HOEFFERT, L.L.; GIFFORD, E.M. JR. 1967. Trabeculae in the grapevine infected with leafroll virus. Amer. J. Bot. 54: 257-261.
- HOLLINGS, M.; STONE, O.M. 1964. Investigation of carnation viruses. I. Carnation mottle. Ann. Appl. Biol. 53: 103-118.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. 1983. Meristem shoot tip, and bud culture. In " Handbook of plant cell culture" (Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Amirato, P.V.; Yamada, Y., eds), vol. 1, chapter, 5. Macmillan, New York: 177-227.
- HUSS, B.; RIDE, M.; PAULUS, F.; TINLAND, B.; CANADAY, J.; HERMAN, A.; KARES, C.; OTTEN, L. 1988. Introduction de gènes résistance au crown-gall dans la plante. L'approche antiooncogène. Colloque Moët-Hennessy "Les stratégies de sélection face aux technologies modernes". Versailles. (Summary).
- IACONO, F.; MARTINELLI, L. 1998. CO₂ assimilation and transpiration balance in species of genus *Vitis* cultivated "in vivo" and "in vitro". Estimation of stomatal and cuticular transpiration "in vitro". J. Int. Sci. Vigne Vin. 1998, n° 2: 91-97.
- JAKÓ, N. 1986. Elimination de l'enroulement chez le Pinot noir et le Merlot au moyen des cultures d'apex. Connaissance de la Vigne et du Vin, 20: 77-86.

- JONA, R.; WEBB, J.K. 1978. Callus and axillary-bud culture of *Vitis vinifera* "Sylvaner riesling". *Sci. Hortic.* 9: 55-60.
- JONA, R.; BARBOGLIO, A. 1981. Fattori stimolanti l'allungamento en la radicazione di germogli ottenuti "in vitro". *Atti 3° Simp. Intern. Selez. Clonale Vite*, 1981: 61-64.
- JONA, R.; GRIBAUDO, I.; VIGLIOCCO, R. 1984. Special feature of grapevine bud proliferation. *Intern. Symp. "Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement" Olomovc (Cs)*, 1984: 78.
- JONA, R.; VALLANIA, R. 1980. Stem elongation and root initiation in proliferating shoots of *Vitis vinifera*. In: *Plant Cell Cultures: results and perspectives*. Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R.; Ciferri, O. Eds. Elsevier Publ. Amsterdam: 313-315.
- KANAKIS, A.G.; DEMETRIOU, K. 1993. "In vitro" shoot regeneration of globe artichoke from shoot apices treated with thidiazuron and from mature zygotic embryos treated with cytokinins. *Journal of Horticultural Science* 68 (3): 439-445.
- KARHU, S.T.; ZIMMERMAN, R.H. 1993. Effect of light and coumarin during root initiation on rooting apple cultivars "in vitro". *Adv. Hort. Sci.* 7: 33-36.
- KASSANIS, B.; POSNETTE, A.F. 1961. Thermotherapy of virus infected plants. In *Progress in the control of virus diseases*. Reprinted from *Recent Advances in Botany*. Publ. By University of Toronto Press: 557-563.
- KIKKERT, J.R.; HÉBERT-SOULÉ, D.; WALACE, P.G.; STRIEM, M.J.; REISCH, B.I. 1996. Transgenic plantlets of chancellor grapevine. *Vitis sp.*, from biolistic transformation of embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports*, 15 (5): 311-316.
- KIM, S.K.; REISCH, B.I.; ALDWINCKLE, H.F. 1986. *In vitro* grape shoot tip mutagenesis. *Proceed. 4 th. Intern. Symp. Breeding (Verona)*. *Vigne-Vini*, 12: 26-27.
- KITTO, S.L. 1997. Commercial Micropropagation. *Hortscience*, vol. 32 (6): 1012-1013.
- KLEMPKA, K.C.; MEREDITH, C.P.; SALL, M.A. 1984. Dual culture of grape powdery mildew (*Uncinula necator* Burr) on its host (*Vitis vinifera* L.). *Am. J. Enol. Vitc.* 35: 170-174.

- KORUZA, B.; JELASKA, S. 1993. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Refosk). *Vitis*, 32: 59-60.
- KOZAI, T.; KITAYA, Y.; FUJIWARA, K.; ADELBERG, J. 1995. Environmental control for large scale production of "in vitro" plantlets. In: Terzi, M. et al (eds). *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer academic publishers. Netherlands: 659-667.
- KRASTANOVA, S.; PERRIN, M.; BARBIER, P.; DEMANGEAT, G.; CORNUET, P.; BARDONNET, N.; OTTEN, L.; PINCK, L.; WALTER, B. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports*, 14: 550-554.
- KRUL, W.R.; MOWBRAY, G.H. 1984. *Grapes. Handbook of plant cell culture*. Ed. By Sharp W.R.; Evans, D.A.; Ammirto, P.V.; Yamada, Y.; Millan, P.; Company, P. 2: 396-434.
- KRUL, W.R.; WORLEY, J. 1977. Formation of adventitious embryos in callus culture of Seyval a French hybrid grape. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 102: 360-363.
- KUKSOVA, V.B.; PIVEN, N.M.; GLEBA, Y.YU. 1997. Somaclonal variation and "in vitro" induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. vol. 49, n°1: 17-27.
- LAFON, J.; COULLAUD, P.; HUDE, R. 1955. *Maladies et parasites de la vigne*. J.B. Baillièrre et Fils. Paris, 364 pp.
- LAKSO, A.N.; REISCH, B.I.; MORTENSEN, J.; ROBERTS, M.H. 1996. Carbon enrichment for stimulation of growth of "in vitro" propagated grapevines after transfer from culture. *J.Amer.Soc. Hort. Sci.* 111: 634-638.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- LE GALL, O.; TORREGROSA, L.; DANGLLOT, Y.; CANDRESSET, T.; BOUQUET, A. 1994. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). *Plant Sci.*, 102: 161-170.
- LÊ, C.L.; PELET, F.; PERKO, J. 1991. Assainissement de l'échalote. II. Thermothérapie et culture de méristèmes. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 23 (5): 329-332.

- LEBRUN, L.; RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. 1985. Selection "in vitro" for NaCl tolerance in *Vitis rupestris* scheele. *Annals of Botany*, 56: 733-739.
- LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y. 1990. "In vitro" propagation of *Muscadine* grape by axillary shoot proliferation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115 (2): 324-329.
- LEWANDOWSKI, V.T. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* "Delaware". *Hortscience* 26 (5): 586-589.
- LI, J.R.; EATON, G.W. 1984. Growth and rooting of grape shoot apices "in vitro". *Hort. Science*, 19 (1): 64-66.
- LIMASSET, P.; CORNUET, P. 1949. Recherche du virus de la mosaïque du tabac dans le méristèmes des plantes infectées. *C.R. Ac. Sc.* 228: 1971-1972.
- LING, K.S.; ZHU, H.Y.; DRONG, R.F.; SLIGHTOM, J.L.; GONSALVES, D. 1997. Nucleotide sequencing and genome organization of grapevine leafroll associated closterovirus 3 and development of transgenic plants expressing its coat protein and other genes. In Sequeira O.A.; Sequeira, J.C.; Santos, M.T. (ed). *Extend Abstracts 12th Meeting ICVG Lisbon*. Portugal: 18.
- LIUNI, C.S.; AUTONACCI, D.; CAPUTO, A.; TARRICONE, L.; OCCHIOGROSSO, G.; PERES, L.; NAVACCHI, O. 1998. Viticoltura da tavola: utilizzo della tecnica "in vitro" nel miglioramento genetico e nella pratica agronomica. *Rivista di frutticoltura*, n° 2: 63-71.
- LLACER, G. 1974. Métodos curativos de lucha contra las virosis de los árboles frutales. La termoterapia. *Comunicaciones INIA. Serie, Protección Vegetal*, n° 2.
- LÓPEZ-ARANDA, J.M.; PLIEGO-ALFARO, F.; LÓPEZ-NAVIDAD, I.; BARCELÓ-MUÑOZ, M. 1994. Micropropagation of strawberry (*Fragaria* x *Ananassa* Duch.) Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the "in vitro" and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *Journal Horticultural Science*. 69, 3: 29-35.
- LORRAIN, R. 1997. Nematode vectors of grapevine fanleaf disease; use of nematological analysis. *Progrès Agricole et Viticole*, 114 (15-16): 338-342.

- MAENE, L.; DEBERGH, P. 1983. Rooting of tissue cultured plants under "in vitro" conditions. *Acta Horticulturae*, 131: 201-208.
- MAGALHAES, N.; OLIVEIRA, A.; CARVALHO, J.B.; TOSCANO, E.; CORREIRA, M.J.; PEREIRA, A.M.; CARNEIRO, L.C.; MARTINS, A. 1997. Evolution of leafroll (GLRaV, 3) effect on grapevine yields and potential ethanol. In Sequeira O.A.; Sequeira, J.C.; Santos, M.T. (Eds.). *Extend Abstracts 12th Meeting ICVG Lisbon, Portugal.*: 175-176.
- MANNINI, F.; CREDI, R.; ARGAMANTE, N. 1993. Effect of heat therapy on agronomical and enological aptitudes of grapevine clones. In: *Extend Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux, 1993*: 32.
- MANNINI, F.; GRIBAUDO, I. 1999. Risanamento da virus per migliorare il materiale di moltiplicazione viticolo. *L'Informatore Agrario*, 131, 99: 69-72.
- MARCILLA, J. 1942. *Tratado práctico de Viticultura y Enología españolas, tomo I, Viticultura*. Editorial Saeta, 375 pp.
- MARENAUD, C. 1970. Multiplication du matériel après le traitement. Discussion. Table Ronde: «La thermothérapie des espèces ligneuses». Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil. Gembloux: 89-93.
- MARÍN, J.A. 1993. Micropropagación de especies frutales. *Hortofruticultura*, 1, 1993: 56-62.
- MAROQUIN, C. 1970. Facteurs influençant la croissance des plants en cours de traitement. Table Ronde: "La thermothérapie des espèces ligneuses". Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil. Gembloux: 45-56.
- MARTELLI, G.P. 1993. Fleck. In G.P. Martelli (ed.). *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. FAO Rome, 263 pp: 63-65.
- MARTELLI, G.P. 1993. Grapevine degeneration fanleaf. In G.P. Martelli (ed.). *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. FAO Rome: 263pp: 9-18.
- MARTIN, C.; VERNON, R.; CARRE, M.; VESELLE, G.; COLLAS, A.; BOUGEREY, C. 1987. Vignes et techniques de culture "in vitro" quelques résultats d'une collaboration entre recherche publique et entreprise privée. *Bull. O.I.V.*, 675-676: 447-458.

- MARTINELLI, L.; BRAGAGNA, P.; POLETTI, V.; SCIENZA, A. 1993. Somatic embryogenesis from leaf and petiole derived callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Rep*, 12: 207-210.
- MARTINELLI, L.; MANDOLINO, G. 1994. Plant regeneration from transgenic *Vitis rupestris* somatic embryos. VIII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Firenze, 12-17 June, 1994: 140.
- MARTINELLI, L.; POLETTI, V.; BRAGAGNA, P.; POZNANSKI, E.A. 1996. Study on organogenic potential in the *Vitis* genus. *Vitis*, 35 (4): 159-161.
- MARTÍNEZ PULIDO, C. 1990. Cultivo de tejidos vegetales multiplicación vegetativa "in vitro" del pino canario. Universidad de La Laguna, 122 pp.
- MARTÍNEZ ZARATE, A. 1979. Selección clonal y saniteria de la uva de mesa Napoleón. Trabajo fin de carrera. Escuela Politécnica de Orihuela, 123 p.
- MARTÍNEZ, A.; PADILLA, V. 1981. Selección clonal y sanitaria de la uva de mesa. I Jornada de la uva de mesa, Novelda, abril 1981: 4-20.
- MARTINEZ, E.A.; TIZIO, R. 1990. Effect of three mineral on media on the kind of growth and of the micropropagation ability of some *Vitis*. *Comptes Rendus des Sceances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*, vol. 184, 5-6: 318-324.
- MARTÍNEZ, M.C. 1996. Comportement du cultivar Albariño (*Vitis vinifera*, L.) provenant de culture "in vitro" soumis à diverses situations dans la serre et au champ. *Riv. Vitic. Enol.* N° 1: 75-76.
- MARTÍNEZ, X.; CAÑAMERAS, N. 1989. El cultivo "in vitro" y la agricultura. *Horticultura*, 52: 92-102.
- MAURO, M.C.; NEF, C.; FALLOTH, J. 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet sauvignon. *Plant Cell Rep.* 5: 372-380.
- MC. CARTHY, M.G.; CIRAMI, R.M.; VAN VELSEN, R.J. 1989. Virus thermotherapy effects on the performance of a Muscadelle selection. *Vitis*, 28: 13-19.
- MESHIT, OKADA, Y. 1986. Systemic movement of viruses. *Plant Microbe Interact*: 4, 295-304.
- MICHELI, M.; MENCUCINI, M.; STANDARDI, A. 1998. Encapsulation of "in vitro" proliferated buds of olive. *Adv. Hort. Sci.* 1998, 12: 163-168.

- MILLIKAN, D.F.; KOIRTYOHANN, S.R.; UPCHURCH, W.J. 1965. Effect of varying levels of potassium on the leafroll virus upon mineral content of grape leaf tissue. *Plant. Dis. Repr.* 49: 36-38.
- MILLIKAN, D.F.; PICKETT, E.E.; HEMPHILL, D.D. 1963. Some preliminary observations on the potassium, magnesium and protein content of grape leaf tissue associated with the leafroll. *Pl. Dis. Repr.* 47: 213-215.
- MONETTE, P.L. 1983. Virus eradications through "in vitro" techniques. *Intern. Plant. Propagators. Soc.*, 33: 90-100.
- MONETTE, P.L. 1986. Elimination "in vitro" of two grapevine nepoviruses by an alternating temperature regime. *Journal Phytopathology*, 116: 88-91.
- MONIN, A. 1970. Multiplication du matériel après le traitement. Table Ronde: "La thérapie des espèces ligneuses". Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil. Gembloux: 70-76.
- MORALES, A. 1972. El altiplano de Jumilla-Yecla. Tesis Doctoral. Dpto. Geografía. Facultad Filosofía y Letras. Universidad de Murcia.
- MOREL, G. 1944. Sur le développement de tissus de Vignes cultivés "in vitro". *C.R. Acad. Seances Biol (Paris)*, 138: 62
- MOREL, G. 1960. Producing virus free *Cymdidium*. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 29: 495-497.
- MOREL, G. 1965. La culture "in vitro" du méristème apical de certaines orchidées. *C.R. Ac. Sc.* 256: 4955-4957.
- MOREL, G.; MARTIN, C. 1952. Guérison de daphlias atteints d'une maladie a virus. *C.R. Acad. Sci.*, 235: 1324-1325.
- MORINI, S.; MARZIALETTI, P.; BARBIERI, C. 1985. *In vitro* propagation of grapevine. *Riv. Ortoflorofrutt. Ital.* 69: 385-396.
- MOUKADIRI, O.; CONNOR, J.E.; CORNEJO, M.J. 1997. Análisis estructural y funcional de células criopreservadas: efecto de la presión de selección. II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 35.
- MOZSÁR, J.; SÜLE, S. 1994. A rapid method for somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured anthers of *Vitis riparia*. *Vitis*, 33: 245-246.
- MOZSÁR, J.; VICZIÁN, O. 1996. Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis spp.* *Vitis*, 35 (4): 155-157.

- MOZSÁR, J.; VICZIAN, O.; SÜLE, S. 1998. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of an interspecific grapevine. *Vitis*, 37 (3): 127-130.
- MULLINS, M.G. 1985. Amplification of clonal variability in the grapevine: progress and prospects. In: "Amelioration de la vigne et culture "in vitro". Ed. Moet: 63-71.
- MULLINS, M.G.; NAIR, Y.; SAMPET, P. 1979. Rejuvenation "in vitro" induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L. *Ann. Bot.* 44: 623-627.
- MULLINS, M.G.; SRINIVASAN, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet sauvignon) by apomixis "in vitro". *J. Exp. Bot.*, 37: 1022-1030.
- MULLINS, M.G.; TANG, F.C.A.; FACCIOTTI, D. 1990. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of grapevines: transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. *Biotechnology*, 8: 1041-1045.
- MUNIZ, J.E.; WAMPLE, R.L.; LOESCHER, W.H. 1991. Cultivar differences in response to low temperatures in *Vitis vinifera* callus "in vitro". *Am. J. Enol. Vitic.*, 42: 341-346.
- MUR, G. 1979. Thermothérapie de variétés de *Vitis vinifera* L. Par la méthode de culture "in vitro". Quelques observations. Quelques remarques. *Le Progrès Agricole et Viticole*, 96. Année, n° 7, 15 mars: 148-151.
- MUR, G.; MARKOVITCH, R. 1978. Influence of "in vitro" thermotherapy treatments on the rooting rootstocks (shoots and roots development). VI Conf. ICVG, 1976. Cordoba. Monografias INIA, 1978, 18: 349-350.
- MURAI, E.; BORGO, M.; VIBIO, M.; SARTOI, E.; BERTACCINI, A. 1997. Thermotherapy trials to eliminate phytoplasmas from prosecco Chardonnay and Incrocio Manzoni 6.0.13. grapevine cultivars premiers resultats In Sequeira O.A.; Sequeira, J.C.; Santos, M.T. (ed). *Extend Abstracts 12 th Meeting ICVG Lisbon. Portugal.*: 85-86.
- MURALI, T.P.; DUNCAN, E.J. 1995. The effects of "in vitro" hardening using triazoles on growth and acclimatization of banana. *Scientia Horticulturae*, 64: 243-251.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.

- MURASHIGE, T. 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Hort.* 78: 17-30.
- MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P.; NAWER, E.M.; ROISTACHER, C.N.; HOLLIDAY, D. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilisation towards recovering virus citrus clones. *Hortic. Sci.* 7: 116-119.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- NAUMMANN, G. 1970. The grafting of apple plants after treatment. *Table Ronde: "La thérapie des espèces ligneuses"*. Station des cultures fruitières et maraichères à Grand-Manil. Gembloux: 82-84.
- NAVARRO, L. 1983. Microinjerto de ápices caulinares "in vitro" y sus aplicaciones. *Levante Agrícola*, nº 245: 19-25.
- NEGUEROLES, J. 1978. Micropropagación de especies frutales. *ITEA*, 1978, nº 33: 58-64.
- NÉMETH, G. 1986. Induction of rooting. In Bajaj YPS (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 1. Trees. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 49-64.
- NETZER, M.H.; GUELLEC, V.; BRANCHARD, M. 1991. Etude du comportement au cours de l'embryogenèse somatique de divers porte-greffes de vigne cultivés en conditions chlorosantes. *Agronomie*, 11: 125-131.
- NEVES, C.C.; AMÂNCIO, S. 1995. Multiplicação "in vitro" de videira e controlo da vitrificação e do enraizamento. XI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Estoril, 3-6 octubre 1995: 235.
- NICOLAU, N.A. 1991. Le choix des explants et l'accélération de la croissance des tiges de Vigne en culture "in vitro". *Progr. Agric. Vitic.* 108, nº 10: 235-238.
- NOBERCOURT, P. 1939. Sur la perennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C.R. Soc. Biol.* 130: 1270-1271.
- NOVAK, F.J.; JUVOVA, Z. 1980. Hormonal regulation of the development of isolated grapevine shoot tips (*Vitis sp.*) under "in vitro" conditions. *Sbor. UTLZ-Ochr. Rostl*, 16 (4): 241-252.
- NOVAK, F.J.; JUVOVÁ, Z. 1982/83. Clonal propagation of grapevine through "in vitro" axillary bud culture. *Scientia Horticulturae*, 18: 231-240.

- NYLAND, G. 1962. Thermoherapy of virus infected fruit trees. Proc. Vth Eur. Symp. Fruit Tree Virus Dis. Bologna: 156-160.
- OLIVARES, O.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. 1997. Hibridación somática de cítricos por fusión de protoplastos. II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 21.
- OTTENWAEALTER, M.M.; HEVIN, M.; LECLAIR, P.; DOAZAN J.P.; RIVES, M. 1973. Heat therapy eliminates the ability to transmit the causal agent of "Marbrure" in several *V. vinifera* clones and in *V. rupestris* de lot (St. George). V Conference ICVG. Salice Terme: 281-285.
- OVER DE LINDEN, A.J.; CHAMBERLAIN, E.E. 1970. Effect of grapevine leafroll virus on vine growth and fruit yield and quality. N.Z. Jl. Agric. Res. 13: 689-698.
- PADILLA 1990. El síndrome de la madera rizada de la vid en el cv. D. Mariano (Napoleón negra), en la Región de Murcia. Madrid. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- PADILLA, V. 1986. Virósisis de la vid, 1^{er} Curso de Viticultura, Enología y Cata de Vinos (E.U.I.T.A.). Albacete.
- PADILLA, V. 1996. La calidad del material vegetal vitícola. Phytoma-España, n° 83: 14-17.
- PADILLA, V. 1997. Factores a considerar en la plantación de una viña. Agrícola Vergel. Febrero 1997: 60-62.
- PADILLA, V.; MARTÍNEZ, A. 1979. Virosis de la vid. Monografía de la Caja de Ahorros de Alicante y Murcia, 19 pp.
- PADILLA, V. 1988. Los parásitos de la vid. Estrategia de lucha. Ed. MundiPrensa, Madrid, 276 p.
- PALLARES, T. 1987. Diferencias anatómicas entre vides sanas y viróticas. Proyecto fin de carrera, Orihuela, 1987, 73 pp.
- PALYS, J.M.; MEREDITH, C.P. 1984. Dual cultures of grape (*Vitis sp.*) and the lesion nematode (*Pratylenchus vulnus*) for studies of nematode tolerance. Plant Disease, 68: 1058-1059.
- PANDELIEV, S.; RUSEVA, R.M.; GEORGIEVA, P. 1990. Degree of development of vine plants under "in vitro" conditions depending on the biology of the initial explant Rastenievudni Nauki, Sofia (Summary) vol 27, 7: 79-83.

- PEÑA-IGLESIAS, A.; AYUSO P. 1980. Shoot apex (meristem) micrografting and indexing of infected grapevine varieties at the same time. Proc. of 7th Meeting of the International Council for the Study of viruses and virus-like diseases of the grapevine. Niagara Canada, 1980, 333-338.
- PEÑA-IGLESIAS, A.; AYUSO, P. 1973. A new and accurate way of heat therapy of plants grown "in vitro" applied to the sanitary selection of spanish grapevine varieties. Riv. Patol. Veg. Ser. IV, 9 (suppl): 172-174.
- PÉREZ-RUIZ, C. 1990. Técnicas de cultivo "in vitro", multiplicación, saneamiento y mejora genética de la vid. Vitivinicultura, 1990, 1: 56-60.
- PIERIK, R.L.M 1990. Cultivo "in vitro" de las plantas superiores. Ed. Mundi Prensa, Madrid, 326 pp.
- PLESSIS, P.; LEDDET, C.; DERENDRE, J. 1991. Résistance à la déshydratation et à la congélation dans l'azote liquide d'apex enrobés de Vigne (*Vitis vinifera*, L. cv. Chardonnay). C.R. Acad. Sci. 313: 373-380.
- PLIEGO, F.; BARCELÓ, A. 1995. Micropropagación de plantas: estado actual y perspectivas futuras. XI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Estoril, 3-6 octubre 1995:73-82.
- POPESCU, C.F. 1996. Somatic embryogenesis and plant development from anther culture of *Vitis vinifera* L. plant growth regulation, 20, (1): 75-78.
- PROTA, U. 1996. Il legno riccio della vite. In Virus floematici e malattie della vite di Martelli, G.P.; Savino, V.; Digiaro, M. (Eds.): 41-62.
- PROVEDO J.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.L. 1973. Planteamiento del problema de las virosis de la vid a nivel regional. IV Jornadas de estudio A.I.D.A.
- PUENTE, J.; MARIN, J.A. 1994. Enraizamiento "in vitro" de chirimoyo. II Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas. Abril, 1993. Zaragoza: 917-922.
- PULGAR, J. 1994. La vid. Agricultura, nº 78. Noviembre 1994; 967-969.
- QUAK, F. 1961. Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus free plants. Adv. Hort. Sci. Appl. 1: 144-148.
- QUAK, F. 1965. Infection of tobacco-callus tissue with tobacco mosaic virus and multiplication of virus in such tissue. In Proc. Intern. Conf. Plant Tissue Culture Penn State Univ. 1963. Ed. White, P.R.; Grove, A.R.: 513-519.

- RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. 1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J. Exp. Bot.* 30 (116): 399-407.
- RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. 1981. Organogenesis on internode explants of grapevines. *Vitis*, 20: 218-227.
- RAVAZ, L.; DUPONT, E.; CALLANDEUX, R. 1933. Recherches sur le rougeau de la vigne. *Annl. Agron.* 3: 225-231.
- RECHINGER, 1893. Citado por Gautheret, 1983.
- REFATTI, E.; CARRARO, L.; OSLER, R. 1999. Alcuni dati sul risanamento mediante calore di materiale di moltiplicazione per pomacee affetto da agenti virali. *Frutticoltura*, 1999, n° 4: 91-95.
- REUSTLE, G.; NATTER, I. 1994. Effect of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal on formation of microcallus from grapevine protoplasts (*Vitis sp.*). *Vitis*, 33: 117-121.
- REZAIAN, M.A.; HABIL, N.; KRAKE, L.R.; STEELE SCOTT, N. 1992. Viruses, viroids and grapevines. *Annual Technical Issue*: 37-41.
- ROBACKER, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from muscadine grape leaf explants. *Hortscience*, 28: 53-55.
- RODRIGUEZ, N.; TORRES, M.; PÉREZ, C. 1997. Micropropagación del clon "Lobel" del olmo resistente a grafiosis. II Reunión de la SECIVTV (Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales). Barcelona, noviembre, 1997: 37.
- ROIG, C.; CUSIDÓ, R.M.; PALAZÓN, J.; BONFILL, M.; NAVIA-OSORIO, A.; PIÑOL, M.T. 1997. Producción de escopolamina mediante el cultivo en biorreactor de raíces transformadas de *Datura metel*. II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 41.
- ROSATI, P.; DE PAOLI, G. 1992. Micropropagation industrielle des arbres fruitiers et plants auto-enraices en Italie. *Le fruit belge*, 60: 318-328.
- ROSATI, P.; GAGGIOLI, D. 1989. Orchard response of micropropagated sour cherry and apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 39: 201-209.
- ROSU, A.; BREZEANU, A.; JORDAN, M. 1983. Micropropagation in *Vitis vinifera* L. III Studies regarding "in vitro" stimulation of multiple axillary shoot development in some grapevine cultivars for clonal multiplication. *Rev. Roum. Biol.* 28: 115-122.

- ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOVITC, S.B. 1991. A new culture medium for "in vitro" rhizogenesis of grapevine (*Vitis spp*) genotypes. Hortscience, 26, (12): 1551-1553.
- ROYO, B.; GONZÁLEZ, J.; LAQUIDAIN, M.J.; ALEGRÍA, M. 1991. Utilización de las técnicas de cultivo "in vitro" en especies ornamentales. Hortofruticultura, 10, 1991: 31-38.
- RUGINI, E.; BAZZOFFIA, A.; JACOBINI, A. 1988. A simple "in vitro" method to avoid the initial dark period and to increase rooting in fruit trees. Acta Hort. 227: 438-440.
- RUIZ CASTRO, A. 1966. Plagas y enfermedades de la vid. Monografías I.N.I.A. Madrid.
- SACHS, J. 1880/82. Citado por Gautheret, 1983.
- SALA CAMARENA, E.; GARCÍA-SOGO, B.; GARCÍA-PITARCH, A.; MORENO, V. 1977. Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de explantos de *Ficus lyrata*. ". II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 27.
- SALES, E.; ARRILLAGA, I.; CASTILLO, L.; SEGURA, J. 1997. Optimización de las condiciones para la transformación genética de *Digitalis dubia* con *Agrobacterium tumefaciens*. II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 13.
- SAMSON, R. 1996. Épidemiologie des bactérioses des plantes cultivées. PHM. Revue Horticole, decembre 1995/ Janvier 1996.
- SAVINO, V. 1996. Lotta contro le virosi della vite Convegno di virus floematici e malattie della vite. Locorotondo, 1996, 243 pp: 229-243.
- SAVINO, V.; BOSCIA, D.; D'ONGHIA, A.M.; MARTELLI, G.P. 1990. Effect of heat therapy and meristem tip culture on the elimination of grapevine leafroll-associated closterovirus type III. Proceedings 10 th. Meeting ICVG, Volos. Grecia: 62-66.
- SCHNEIDER, S.; REUSTLE, G.; ZYPRIAN, E. 1996 Detection of somaclonal variation of grapevine regenerants from protoplast by RAPD-PCR. Vitis, 35 (2): 99-100.
- SCHOFFLING, H. 1981. Premiers résultats d'un essai de clones de Riesling traités par la chaleur. Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. Vol 13 (6): 331-336.

- SCORDO, E. 1998. Micropropagare con un bioreattore. *Culture protette*, n° 6. 1998: 57-59.
- SCORZA, R.; CORDTS, J.M.; RAMMING, D.W.; EMERSHAD, R.L. 1995. Transformation of grape *Vitis vinifera* L. zygotic derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 14 (9): 589-592.
- SECKINGER, G.R. 1991. Micropropagation of vegetable crop species. In: *Micropropagation, Technology and Application*. (Debergh P.C. y Zimmerman, R.H. eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 265-284.
- SEFC, K.M.; RUCKENBAVER, P.; REGNER, F. 1997. Embryogenesis in microspore culture of *Vitis* subspecies. *Vitis*, 36 (1): 15-20.
- SERGHINI, M.A.; FUCHS, M.; PINCK, M.; REINBOLT, J.; WALTER, B.; PINCK, L. 1990. RNA 2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *J.Gen. Virol.* 71: 1433-1441.
- SERRET, M.D.; ARAUS, J.L.; TRILLAS, M.I. 1997. Efecto de la luz, CO₂ y concentración de sacarosa en el desarrollo de fotoautofia durante la micropropagación de *Gardenia jasminoides*. II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 55.
- SILVESTRONI, O. 1981. Prime esperienze sulla micropropagazione della vite europea. *Vigne Vini*, 10: 31-37.
- SIMON, S. 1908. Citado por Margara, 1988.
- SKENE, K.G.M. 1974. Culture of protoplasts from grapevine pericarp callus. *Austr. J. Plant. Physiol.* 1: 371-376.
- SKENE, K.G.M.; BARLASS, M. 1980. Micropropagation of grapevine. *International Plant Propagators Society Combined*. V. 30: 564-570.
- SKENE, K.G.M.; GOODWINS, D.R.; BARLASS, M. 1988. Ploidy stability in grapevines following long term storage "in vitro". *Vitis*, 27: 41-46.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated "in vitro". In: *Biological action of growth substances*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131.
- SMITH, E.F.; GRIBAUDO, I.; ROBERTS, A.V.; MOTTLEY, J. 1992. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. *Hortscience*, 27: 111-113.
- SOTÉS, V. 1996. Aspectos generales de la viticultura española. *Phytoma España*, 83: 5-9.

- SOULLE, O.; ROUSTAN, J.P.; FALLOT, J. 1993. Early "in vitro" selection of entypiner tolerant plantlets. Application to screening of *Vitis vinifera* cv. Ugni blanc somaclones. *Vitis, somaclones Vitis*, 32: 243-244.
- SPIEGEL-ROY, P.; SAHAR, N.; BARON, J.; LAVI, V. 1985. *In vitro* culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 109-112.
- STACE-SMITH, R.; MELLOR, F.C. 1968. Erradication of potato viruses X and S by thermotherapy and axillary bud culture. *Phytopathology*, 58: 199-203.
- STAMP, J.A.; COLGY, S.M.; MEREDITH, C.P. 1990. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis sp.*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 22: 127-133.
- STAMP, J.A.; MEREDITH, C.P. 1988. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine. *Scientia Horticulturae*, 35: 1-16.
- STAUDT, G.; KASSEMAYER, H.H. 1994. Elimination of grapevine leafroll associated virus type I in *Vitis vinifera* cv. Lemberger. *Vitis*, 33: 179-180.
- STELLMACH, G. 1993. Lush growth combined with continued green cutting propagation on effective means of eliminating viruses from grapevine shoot tips. In *Extend Abstrats 11th Meeting ICVG. Montreux, 1993*: 176-177.
- STEWARD, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. 1958. Growth and organization in cultures grown from freely suspended cell. *Am. J. Bot.* 45: 705-708.
- STIMART, D.P. 1986. Commercial micropropagation of florist flower crops. In: *tissue culture as a plant production system for horticultural crops* (Zimmerman, R.H.; Griesbasch, R.J.; Hammerschlag, F.A. and Lawson, R.H., eds). *Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht*: 301-315.
- SUDARSONO,; GOLDY, R. 1991. Growth regulator and axillary bud position effects on "in vitro" establishment of *Vitis rotundifolia*. *Hortscience*, 26 (3): 304-307.
- SURGA, J.G.; GUEVARA, Y. 1992. Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo "in vitro" de ápices caulinares de banana (*Musa AAA*). *Fitopatol. Venez.* Vol 7, nº 1: 14-17.
- SWARD, R.J.; HALLAM, N.D. 1976. Changes in fine structure of the potato meristem following heat treatment for virus eradication. *Aust. J. Bot.*, 24: 597-605.

- SZENDREY, G.; DULINAFKA, G.; SZEGEDI, E 1995. Elimination of mites from the buds of dormant grapevine cuttings by hot water treatment. *Vitis* 34 (1): 65-66.
- TAKEBE, I.; LABIB, G.; MELCHERS, G. 1971. Reneration of whole plants from isolated mesophyl protoplasts of tobacco. *Naturwissen*, 58: 318-320.
- TANNE, E.; ORENSTEIN, S. 1997. Molecular detection of phytoplasmas associated vith grapevine yellow disease in Israel. In: Sequeira O.A.; Sequeira, J.C.; Santos, M.T. (ed). *Extend Abstracts 12 th Meeting ICVG Lisbon. Portugal.*: 79-80.
- TANNE, E.; SPIEGEL-ROY; P; SCHLOMOVITZ, N. 1993. Rapid diagnosis of corky-bark and leafroll diseases by “in vitro” micrografting. *Extend Abstrats 11. Meeting ICVG. Montreux*: 144-145.
- TEPFER, M.; ROBAGLIA, C.; CASSE-DELBART, F. 1988. Ilustration de l'intérêt des méthodes de transfert de génes: l'étude des interactions plantes-virus. *Le sélectionneur français*, 40: 67-75.
- THIES, K.L.; CLINTON, H.; GRAVES, JR. 1992. Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia*, Michx. *Hortscience*, 27 (5): 447-449.
- THOMAS, P. 1998. Contribution of leaf lamina of grape nodal microcuttings to rooting, root vigour and plantlet growth “in vitro”. *J. Plant. Physiol.*, vol.153: 727-732.
- THOMAS, P. 1999. Relationship between tissue growth, CO2 level and tendril formation during “in vitro” culture of grape (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 38 (1): 25-29.
- THOMAS, P.; RAVINDRA, M.B. 1997. Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *Journal of Horticultural Science*, 72 (5): 713-722.
- THOMAS, W. 1983. The impact of virus diseases on quality and yield in the vineyard. Reprinted of the wine industry journal “wine review”: 54-62.
- TORREGROSA, L. 1998. A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis* 37 (2): 91-92.
- 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.

- TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. 1995. *In vitro* propagation of *Vitis x Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. *Vitis*, 34 (4): 237-238.
- TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. 1996. Adventitious bud formation and shoot development from "in vitro" leaves of *Vitis x Muscadinia* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45 (3): 245-252.
- TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. 1997. *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens* co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol.49, n°1: 53-62.
- TRÉCUL, A. 1853. Accroissement des végétaux dicotylédones ligneux (reproduction du bois et de l'écorce par le bois décortiqué). *Ann. Sc. Nat.* 19: 157-192.
- TRILLAS, M.I.; COTXARRERA, L.; CASANOVA, E. 1997. Estudio de la interacción de callos de clavel cv. "Pallas" y *F. oxysporum* f. Sp. *Dianthi* raza 8 (compatible) raza 1 (incompatible) ". II Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales. Barcelona, 1997: 54.
- VALAT, C. 1986. La vigne et les techniques de culture "in vitro". *Progrès Agricole et Viticole*, 103, n° 11: 286-287.
- VALAT, C.; GREANAN, S.; AURAN, G. 1981. Thermo-thérapie "in vitro". Premières observations sur les aptitudes de quelques variétés de porte-greffes et de *Vitis vinifera* traitées. *Vignes et Vins*, 298: 17-23.
- VALAT, C.; GREANAN, S.; BONNET, A. 1981 La maladie du bois strié de la vigne. *Le Prog. Agr. Et Vitic.* 98: 151-156.
- VALAT, C.; MUR, G. 1976. Thermo-thérapie du Cardinal rouge. *Progr. Agric. Vitic.* 6: 200-202.
- VALAT, C.; RIVES, M. 1973. Informations and comments on variation induced by thermotherapy. *Riv. Pathol. Veg.* 4 (9), 291-293.
- VANNEL, D.; BARBIER, M.; BESSIS, R. 1991. Etude de la toxicité du filtrat de culture de *Botrytis cinerea* sur des vitroplants de vigne. *Vitis*, 30: 167-175.
- VASIL, I.K.; VASIL, V. 1986. Regeneration in cereal and other grass species. In Vasil, I.K. (ed.) *Cell Culture and somatic cell genetics of plants*. Orlando, Academic Press, 657 pp: 121-150.

- VASIL, V.; HILDEBRANDT, A.C. 1965. Differentiation of tobacco plants from single isolated in microcultures. *Science*, 150: 889-892.
- VERDISSON, S.; BAILLIEUL, F.; AUDRAU, J.C. 1999. Néof ormation "in vitro" de vignes chimériques (*Vitis vinifera* L.). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 1999, vol. 33, n° 1: 1-7.
- VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, M.L.; VIEITEZ, E. 1983. "In vitro" plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hortic. Sci.* 58: 457-463.
- VILLEGAS, A.1990. Efecto de la fuente y concentración de nitrógeno en el desarrollo "in vitro" de explantos de portainjertos de vid. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, 168 pp.
- VÖCHTING, H. 1878. Citado por Murashige, 1990.
- VUITTENEZ, A.; PAQUIER, A; KUSZALA, J. 1962. Essais de guérison de vignes de dégénérescence infectieuse par thérapie. *Virologie appliquée*, INRA, 3: 23-26.
- WALKER, M.A.; MEREDITH, C.P. 1990. The genetics of resistance to grapevine fanleaf virus in *Vitis vinifera*. *Proceed. 5 th. Intern. Symp. Grape Breeding. Vitis special issue*: 228-238.
- WALKEY, D.G.A.; WEBB, M.J.W. 1968. Viruses in plant apical meristems. *J. Gen. Virol.* 3: 311-313.
- WALTER, B. 1988. Quelques exemples de la réaction physiologique de la vigne en présence de virus. *Bull. O.I.V.*, 687-688: 383-390.
- WALTER, B. 1991. Génie génétique appliqué à la Vigne. *Bull. OIV*, 721-722: 213-218.
- WALTER, B.; MARTELLI, G.P. 1996. Sélection clonale de la vigne: sélection sanitaire et sélection pomologique. Influence des viroses et qualité. 1^{ère} partie: Effets des viroses sur la culture de la vigne et ses produits. *Bull. OIV*, 69: 945-971.
- WALTER, B.; MARTELLI, G.P. 1997. Consideration on grapevine selection and certification. In Sequeira O.A.; Sequeira, J.C.; Santos, M.T. (ed). *Extend Abstracts 12th Meeting ICVG Lisbon. Portugal.*: 161-162.
- WALTER, B.; MARTELLI, G.P. 1997. Sélection clonale de la vigne: Sélection sanitaire et sélection pomologique. Influence des viroses et qualité 2^o partie: sélection sanitaire, sélection pomologique. *Bull OIV* (791-792): 5-23.

- WALTER, B.; MARTELLI, G.P. 1998. Considerations on grapevine selection and certification. *Vitis*, 37, (2): 87-90.
- WANG, Q. 1991. Factors affecting rooting of microcuttings of the pear rootstock BP 10030. *Scientia Horticulturae*, 45: 209-213.
- WEBSTER, C.A.; JONES, O.P. 1989. Micropropagation of the apple rootstock M-9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation "in vitro". *Journal of Horticultural Science*, 64 (4): 421-428.
- WEI, J.; YING, G.; SHEN-ZHI, Z. 1992. "In vitro" propagation of *Rubus* species. *Scientia Horticulturae*, 49: 335-340.
- WELANDER, M. 1988. Biochemical and anatomical studies of Birch (*Betula pendula* Roth) buds exposed to different climatic conditions in relation to growth "in vitro". In: genetic manipulation of woody plants (Hanover, J.W. and Keathley, D.E. Eds). Plenum Publishing Corporation, 79-99.
- WHITE, P.R. 1934. Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaic in growing excised tomato roots. *Phytopathology*, 24: 1003-1011.
- WOODHAM, R.C.; EMMETT, R.W.; FLETCHER, G.C. 1984. Effects of thermotherapy and virus status on yield, annual growth and grape composition of Sultana. *Vitis*, 23: 268-273.
- WOODHAM, R.C.; KRAKE, L.R.; CELLIER, K.M. 1983. The effect of grapevine leafroll plus yellow speckle disease on annual growth, yield and quality of grapes from Cabernet franc under two pruning systems. *Vitis*, 22: 324-330.
- WU, J.H.; HILDEBRANDT, A.C.; RIKER, A.J. 1960. Virus-host relationship in plant tissue culture. *Phytopathology*, 50: 587-594.
- YAMASHITA, H.; SHIGEHARA, I.; HARNIUDA, T. 1998. Production of triploid grapes by in ovulo embryo culture. *Vitis*, 37 (3): 113-117.
- YU, D.H.; MEREDITH, C.P. 1986. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 111 (6): 972-975.
- ZIMMERMAN, R.H. 1983. Factors affecting "in vitro" propagation of apple cultivars. In: 21st International Horticultural Congress. Hamburg Germany September 1982. *Acta Horticulturae* 131: "In vitro" culture: 171-178.
- ZIMMERMANN, D.; WALTER, B.; LE GALL, O. 1988. Purification de particules virales associées à l'enroulement de la vigne et mise au point d'un protocole ELISA permettant leur détection. *Agronomie*, 8 (8): 731-741.

- ZIV, M. 1986. "In vitro" hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: Plant tissue culture and its agricultural applications by Whithers, L.A.; Alderson, P.G. (ed.) Butterworths, London: 187-196.
- ZOU, C.J.; LI, P.F. 1981. Induction of pollen plants of grape (*Vitis vinifera* L.). *Acta botanica sinica*, 23: 79-81.
- ZUCCHERELLI, G. 1979. Metodologia nella moltiplicazione industriale "in vitro" dei portinnesti clonali di pesco *Pesco x mandorlo* GF 677, Susino GF 43. Damasco 189.S Giuliano 655/2. Atti dell'incontro sulle Technique di colture "in vitro" per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticole. Pistoia, ottobre, 1979: 147-154.