

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA PARA EL SANEAMIENTO DE LAS VARIEDADES DE VID INFECTADAS CON GLRAV-3 Y GFkV

T. San Pedro¹, R. Peiró¹, A. Medina¹, A. Yuste², A. Olmos³, C. Gisbert¹

¹ Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana-UPV.

² Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo-UPV.

³ Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

Palabras claves: *Vitis vinifera* L., cultivar “Valencí Blanc”, cultivar “Botó de Gall”, 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4D), multiplex RT-PCR.

Resumen

La embriogénesis somática es una técnica de cultivo *in vitro* que permite el saneamiento de cultivares de vid (*Vitis vinifera* L.). Se ha analizado la presencia de los virus ArMV, GFLV, GFkV, GLRaV-1 y GLRaV-3 mediante real-time multiplex RT-PCR en hojas de plantas adultas de los cultivares “Valencí Blanc” y “Botó de Gall”. Además, se ha establecido un protocolo de embriogénesis somática para ambas variedades. La adición de 2 mgL⁻¹ de 2,4D en el medio de cultivo incrementa el porcentaje de embriones cultivados así como el número de embriones por callos.

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es una técnica de cultivo *in vitro* que se utiliza principalmente para la micropropagación de plantas y también tiene interés para el rescate de mutantes somáticos o la eliminación de virus. Martinelli y Gribaudo (2001) desarrollaron el primer protocolo en vid (*Vitis vinifera* L.) y en los últimos años se han descrito diferentes protocolos para el saneamiento de cultivares (Gambino et al., 2010; Prada et al., 2010).

El objetivo del presente trabajo es establecer un protocolo de embriogénesis para el saneamiento del cultivar “Valencí Blanc”, también llamado “Grumet Blanc” y del cultivar “Botó de Gall”, variedades minoritarias en la Comunidad Valenciana.

MATERIAL Y METODOS

A partir de hojas de una planta de “Valencí Blanc” y de una de “Botó de Gall” cultivadas en la provincia de Alicante (Penàguila) se realizó la extracción de RNA utilizando el kit de extracción de Mo-Bio, y se analizó la presencia de los virus ArMV, GFLV, GFkV, GLRaV-1 y GLRaV-3 siguiendo el protocolo multiplex RT-PCR descrito por López-Fabuel et al. (2013).

Se sumergieron semillas de “Valencí Blanc” en una solución 0,4% de hipoclorito sódico durante 10 minutos, y se realizaron tres lavados. Las semillas se cortaron longitudinal (L) o transversalmente (T) previamente al cultivo en el medio de inducción, que contenía sales y vitaminas Nitsch y Nitsch, sacarosa, PVP, agar vegetal y 6-BA en la misma concentración pero que variaba en la concentración de 2,4-D (0, 1, 2 y 4 mgL⁻¹). El mismo protocolo se utilizó para las semillas de “Botó de Gall”. El porcentaje de embriones y el número de embriones por callo obtenidos se analizó mediante un análisis GLM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hojas analizadas de la planta adulta de “Valencí Blanc” mediante multiplex RT-PCR estaba libre de GFLV, ArMV y GLRaV-1, sin embargo presentaban el GLRaV-3 y GFkV. Las hojas analizadas de la planta adulta de “Botó de Gall” estaban libres de todos los virus a excepción

del GFkV. La infección de los cultivares para alguno de los virus era esperable debido a la alta incidencia encontrada en diversos cultivares de la provincia de Alicante en todos los virus a excepción del ArMV (Bertolini et al., 2010).

El porcentaje de callos obtenidos para el cultivar “Valenci Blanc” fue elevado, 99,3%. El porcentaje de embriones obtenidos al adicionar 0 o 1 mgL⁻¹ de 2,4-D en el medio de embriogénesis es menor al porcentaje obtenido al adicionar 2 y 4 mgL⁻¹ de 2,4-D, no obteniéndose diferencias en estas dos concentraciones. Análogamente, un menor número de embriones por callo se ha obtenido en los medios de cultivo con un menor porcentaje de embriones (0 y 1 mgL⁻¹ de 2,4-D). Sin embargo, el medio al que se le ha adicionado 2 mgL⁻¹ de 2,4-D presenta el mayor número de embriones por callo (5,64 embriones/callos), obteniéndose un valor intermedio al adicionar 4 mgL⁻¹ de 2,4-D (1,78 embriones/callos). Resultados similares han sido obtenidos al analizar el cultivar “Botó de Gall”. Se realizará el análisis de los virus de las plántulas obtenidas a partir de este protocolo de embriogénesis para conocer si se ha realizado el saneamiento de dichos cultivares.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2011-00067 (C04-01 y C04-04) del INIA cofinanciado con fondos FEDER.

REFERENCIAS

- Bertolini E, García J, Yuste A, Olmos A. 2010. High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 128:283-287.
- Gambino, G., Vallania, R. y Gribaudo, I. 2010. *In situ* localization of Grapevine fanleaf virus and phloem-restricted viruses in embryogenic callus of *Vitis vinifera*. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:557-570.
- López-Fabuel, I., Wetzel, T., Bertolini, E., Bassler, A., Vidal, E., Torres, L.B., Yuste, A. y Olmos A. 2013. Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. *J. Virol. Methods* 188:21-24.
- Martinelli, L. y Gribaudo, I. 2001. Somatic embryogenesis in grapevine. p. 327-351. En: K.A. Roubelakis-Angelakis (Ed.), *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Prada, M.J., Rodríguez, E., Rey, L., González, M.V., Santos, C. y Rey, M. 2010. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plant of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell Organ Cult.* 103:49-59.

Tabla 1. Media mínimo cuadrática y error standard del porcentaje de embriones y el número de embriones por callos en diferentes concentraciones de 2,4-D en “Valenci Blanc”.

| | 0 mgL ⁻¹ | 1 mgL ⁻¹ | 2 mgL ⁻¹ | 4 mgL ⁻¹ |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| % embriones | 5,0 ± 2,3 ^a | 12,5 ± 8.4 ^a | 48,3 ± 7.3 ^b | 57,5 ± 12,6 ^b |
| Embriones/callos | 0,43 ± 0,30 ^a | 0,87 ± 0.42 ^a | 5,64 ± 0.72 ^c | 1,78 ± 0,34 ^b |