



Universitat
de les Illes Balears



Títol del projecte: Obtenció de material de vinya lliure de virus .

Investigador principal: Dra. Josefina Bota DNI: 43086965F

Tema del projecte d'investigació: Obtenció de material de vinya lliure de virus.

Entitat sol·licitant: Universitat de les Illes Balears (UIB)

Agraïments

Aquest projecte s'ha dut a terme amb el finançament de la Conselleria d'agricultura, pesca i alimentació i el FOGAIBA (Govern de les Illes Balears) a través de la convocatòria d'ajudes per a la investigació aplicada en matèria d'agricultura, ramaderia i pesca en l'àmbit de les Illes Balears 2020 (2ª convocatòria). Agrair també a l'IRFAP la seva total col·laboració en el desenvolupament d'aquest projecte i la cessió de material vegetal per poder dur a terme la multiplicació i cultiu in vitro. Agrair també a tant al departament de Biologia de la UIB i en especial a l'àrea de Fisiologia Vegetal i al NIAGEA per cedir les seves instal·lacions per dur a terme el projecte. També al personal d'administració de l'INAGEA per els tràmits administratius i al personal de la OSR tant de la unitat tècnica com de l'econòmica per seva ajuda.

Resultats obtinguts d'acord amb les actuacions realitzades

1.Comprovació de l'estat sanitari de les varietats minoritàries candidates a sol·licitar la seva autorització, com per exemple Vinater Blanc.

Amb l'objectiu de detectar plantes lliures de virus i proposar-les per a la seva reproducció vegetativa, i la seva posterior autorització, es va recollir material vegetal de les varietats: Vinater Blanc, Valent Blanc i Pollença. Per conèixer l'estat sanitari de les plantes es va realitzar el test ELISA (acrònim de l'anglès Enzyne-Linked Immuno Sorbent Assay). El material utilitzat provenia de plantes obtingudes en projectes anteriors (AIA03/15, BIA 05/17 i BIA 09/18). Durant el projecte anterior ja es va intentar el sanejament de manera que patirem de plantes amb únicament dues virosis: GLRaV (Grapevine Leaf Roll associated Virus3), GFLV (Grapevine Fan Leaf Virus). Per tant els virus analitzats foren aquests dos. A més, al gener de 2021, es va recollir també material procedent directament de camp. Es van recollir del Banc de Germoplasma de Palma de Mallorca (BGPM) de l'Institut de Recerca i Formació en Agricultura i Pesca (IRFAP), varetes de Vinater Blanc (Fila 3 plantes 31, 32 i 33), de Valent Blanc (Fila 3 plantes 42,45 i 46, Fila 50) i de Pollença (Fila 3 Planta 48). Aquest material es va arrelar amb l'objectiu de tenir plantes per multiplicar. Al cap de 3-4 mesos es van trasplantar a terra les plantes que havien arrelat i es van fer nous test ELISA de totes les plantes per comprovar el seu estat sanitari. A la taula 1 es mostren els resultats de l'estat inicial de tot el material vegetal.

Taula 1. Resultats del test ELISA per les virosis de GFLV i GLRaV3. Octubre 2021

Cultivar	No plantes	Projector/Any	Virus	
			GFLV	GLRaV3
Vinater Blanc	6	AIA 03-15	0	6
Valent Blanc	1	AIA 03-15	1	1
Vinater Blanc	5	2020	0	5
Valent Blanc	1	2020	1	1
Vinater Blanc	4	2021	0	4
Valent Blanc	2	2021	1	2
Pollença	9	2021	9	5

Els resultats de les proves ELISA realitzades a les plantes, mostraren que de la varietat Vinater Blanc (15), totes mostraven encara infecció al virus GLRaV-3. El cultivar Valent blanc (4 plantes), donava positiu en totes les plantes al virus GLRaV-3, i 3 plantes al virus GFLV abans del cultiu *in vitro*. Les plantes de la varietat Pollença, totes mostraven infecció al virus GFLV i 3 plantes donaren positiu al virus GLRaV3.

2. Sanejament mitjançant la tècnica de cultivo *in vitro* d'àpex en combinació o no de termoteràpia.

La tècnica de termoteràpia utilitzada, va consistir a tractar amb aire calent a material vegetal arrelat al febrer de 2021 en creixement actiu (4 plantes de Vinater Blanc, 2 de Valent Blanc i 9 de Pollença). Previ al tractament es va efectuar l'aclimatació de les plantes, durant 41 dies, dins de la cambra de cultiu a temperatures menys elevades: 29,5 °C i 16 hores llum. Després de l'aclimatació, les plantes es van sotmetre durant 67 dies a una temperatura de 35,5 °C i 16 hores llum. Una planta de Vinater Blanc i 3 plantes de Pollença, van morir al final de la termoteràpia. El material resultant es va testar mitjançant el test ELISA, els resultats es presenten en la taula 2. Per confirmar els resultats, es van realitzar proves RT-PCR.

Taula 2. Resultats Test ELISA post tractament de Termoteràpia (març 2022)

Varietat	GFLV	GLRaV3	Total plantes	Sense Virus
Vinater Blanc	0	2	3	1
Valent Blanc	1	2	2	0
Pollença	6	2	8	2

Els resultats de les proves PCR van confirmar que de les 3 plantes de Vinater Blanc, tractades mitjançant termoteràpia, només una va resultar negativa per als virus de GFLV i GLRaV3. Així com també es va confirmar que de les 8 plantes de Pollença, 2 donaren negatiu per GLRV3 i GFLV. A l'abril de 2022 aquestes plantes van ser portades al IRFAP, on al cap d'un temps es va realitzar de nou una PCR que indicà la presència de virus a les 3 plantes. És probable que la quantitat de virus a la primera analítica fou tan baixa que no fos detectable. A la resta de plantes procedents de termoteràpia passaren al següent pas de sanejament per cultiu *in vitro*.

L'altra tècnica utilitzada en tot el material vegetal fou el cultiu *in vitro* d'àpexs caulinars i també gemes axil·lars. La taula 3 mostra les plantes de les 3 varietats que van ser utilitzades per al cultiu *in vitro*.

Varietat	Plantes
Vinater Blanc	23
Valent Blanc	12
Pollença	15

Taula 3. Plantes utilitzades per al cultiu *in vitro*

En tots els casos la supervivència de les plantes va ser molt baixa. De més de 600 explants que es cultivaren *in vitro*, només 21 d'ells sobrevisqueren el procés complet donat lloc a una planta completa. Tots ells foren de la varietat Vinater blanc i Pollença. Per tant finalment tinguérem 18 plantes de Vinater Blanc i 2 plantes de Pollença procedents del cultiu *in vitro*. Una cop que les plantes van créixer i es van aclimatar, es va realitzar novament un test ELISA per comprovar l'estat sanitari de les plantes obtingudes mitjançant cultiu *in vitro* (Taula 4). De les 20 plantes obtingudes només es va realitzar l'ELISA a 17 plantes de Vinater Blanc, ja que les plantes restants encara estaven en la cambra de cultiu (2 de Pollença i 1 de Vinater Blanc). Segons els resultats cap de les plantes de Vinater Blanc van mostrar infecció a GFLV i 12 van ser positives per al virus GLRaV3.

Taula 4. Resultats de el test ELISA per a les plantes obtingudes mitjançant cultiu *in vitro*

Cultivar	GFLV	GLRaV3
Vinater Blanc 1 al 17	Negatiu	
Vinater Blanc 1 al 12		Positiu
Vinater Blanc 13 al 17		Negatiu

Per confirmar els resultats, es van realitzar proves PCR (Taula 5).

Taula 5. Resultats PCR per els plantes de Vinater Blanc *ex vitro* 2022

Cultivar	data	Virus	Resultat
----------	------	-------	----------

Vinater Blanc	07.11.22	GLRV3	Positiu
Vinater Blanc	07.11.22	GLRV3	Positiu
Vinater Blanc	07.11.22	GLRV3	Positiu
Vinater Blanc	07.11.22	GLRV3	Positiu
Vinater Blanc	07.11.22	GLRV3	Positiu

La taula mostra els resultats de les plantes que foren sotmeses a PCR, totes les plantes obtingudes mitjançant el cultiu *in vitro* d'apexs caulinars de Vinater Blanc son positives per el virus GLRaV3.

3. Estat sanitari final i resum actual del material disponible

Els resultats de les proves PCR (Taules 5) així como els resultats del test ELISA (Taula 4) van confirmar que de les 17 plantes de Vinater Blanc, obtingudes mitjançant el cultiu *in vitro* d'apexs caulinars, totes son positives per GLRaV3.

Totes les plantes de Valent Blanc (11) obtingudes de les estaquetes arrelades, tant de l'any 2020 com 2021 i 2022 estan infectades pels virus GFLV i/o GLRaV3. I de les 16 plantes de Vinater obtingudes de estaquetes arrelades els mateixos anys, totes van ser negatives per al GFLV, 20 van ser positives per GLRaV3 i una negativa per GLRaV3 confirmada per PCR en març 2022 va resultar positiva confirmada per PCR en IRFAP en juny 2022.

La taula 6 recull l'inventari del material disponible actualment que inclou les plantes ex vitro de Valent Blanc i Pollença pendants de comprovar l'estat sanitari un cop tenguin material lignificat.

Taula 6. Inventari de plantes de Vinater Blanc, Valent Blanc i Pollença

Varietat	Plantas Ex Vitro a gener 2023	Estaquetes 2020	Estaquetes 2021	Estaquetes 2022
Vinater Blanc	24	6	2	8
Valent Blanc	1	1	2	8
Pollença	2		3	6

4. Conclusions

Els resultats han posat de manifest dues qüestions principals. S'ha confirmat l'alt grau de infecció que trobem a les varietats locals analitzades, resultat esperable donat a la major part del material analitzat a les illes presenta alts graus de infecció (El Aou-ouad et al., 2022). Per altra banda s'ha constata que algunes varietats són altament recalcitrants a l'eliminació de virosis, ja que els mètodes clàssics que han funcionat en altres varietats presenten una efectivitat molt baixa a les varietats objecte d'aquest projecte. Aquesta dificultat va unida a la dificultat per



Universitat
de les Illes Balears



*Instituto de Investigaciones Agroambientales
y de Economía del Agua*

propagar-se in vitro de les varietats estudiades i ja s'havia descrit prèviament a les varietats Prensall blanc i Valent blanc (Jiménez, 2018). Tot i així, el fet de tenir supervivents i amb graus de infecció inferiors als inicials és un bon resultat ja que aquest material servirà com a material de partida per continuar amb els programes de sanejament.